



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL  
CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS



**FISIOLOGÍA DIGESTIVA DURANTE EL  
DESARROLLO LARVAL DEL PARGO  
LUNAREJO *Lutjanus guttatus***

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTORADO EN CIENCIAS MARINAS

PRESENTA

IVETTE MOGUEL HERNÁNDEZ

LA PAZ, B.C.S., JUNIO DE 2015



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**SECRETARIA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**  
*ACTA DE REVISIÓN DE TESIS*

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., siendo las 12:00 horas del día 28 del mes de Mayo del 2015 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CICIMAR para examinar la tesis titulada:

“FISIOLOGÍA DIGESTIVA DURANTE EL DESARROLLO LARVAL  
DEL PARGO LUNAREJO *Lutjanus guttatus*”

Presentada por el alumno:

MOGUEL

HERNÁNDEZ

IVETTE

Apellido paterno

materno

nombre(s)

Con registro: 

B	1	1	0	4	2	1
---	---	---	---	---	---	---

Aspirante de:

DOCTORADO EN CIENCIAS MARINAS

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA DEFENSA DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

**LA COMISION REVISORA**

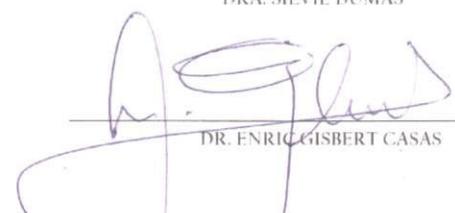
Directores de Tesis

  
\_\_\_\_\_  
DR. RENATO PEÑA MARTINEZ  
Director de Tesis

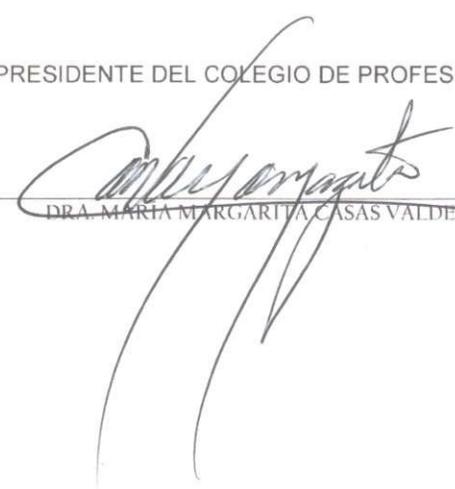
  
\_\_\_\_\_  
DR. HECTOR GERARDO NOLASCO SORTA  
2º Director de Tesis

  
\_\_\_\_\_  
DRA. SILVIE DUMAS

  
\_\_\_\_\_  
DR. SERGIO FRANCISCO MARTINEZ DIAZ

  
\_\_\_\_\_  
DR. ENRIC GISBERT CASAS

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

  
\_\_\_\_\_  
DRA. MARIA MARGARITA CASAS VALDEZ



**IPN**  
**CICIMAR**  
**DIRECCION**



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL  
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

**CARTA CESIÓN DE DERECHOS**

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., el día 11 del mes Junio del año 2015  
el (la) que suscribe MC. IVETTE MOGUEL HERNÁNDEZ alumno(a) del  
Programa de DOCTORADO EN CIENCIAS MARINAS  
con número de registro B110421 adscrito al CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS  
manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de tesis, bajo la dirección de:  
DR. RENATO PEÑA MARTÍNEZ Y DR. HÉCTOR GERARDO NOLASCO SORIA  
y cede los derechos del trabajo titulado:

"FISIOLOGÍA DIGESTIVA DURANTE EL DESARROLLO LARVAL  
DEL PARGO LUNAREJO *Lutjanus guttatus*"

al Instituto Politécnico Nacional, para su difusión con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Éste, puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección: relir12@gmail.com - rpenam@ipn.mx - hnolasco04@cibnor.mx

Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

MC. IVETTE MOGUEL HERNÁNDEZ

*nombre y firma*

## RECONOCIMIENTO

El presente trabajo de investigación se desarrollo con financiamiento de los Proyectos de Investigación Financiados por el IPN a través de la Secretaría de Investigación y Posgrado:

Desarrollo de la capacidad digestiva durante el desarrollo larval del pargo lunarejo *Lutjanus guttatus* en condiciones de cultivo intensivo I. Actividad enzimática digestiva. Clave: 20121585

Fisiología digestiva durante el desarrollo larval del pargo lunarejo *Lutjanus guttatus*: caracterización de la actividad enzimática digestiva. Clave: 20131190

Ontogenia molecular de la capacidad digestiva de larvas de pargo lunarejo *Lutjanus guttatus*. Clave: 20141459

## DEDICATORIA

A mis papás Lourdes y Miguel, que con su ejemplo, confianza y amor han apoyado cada una de mis decisiones y sueños. Gracias por hacer de mí la mujer que soy.

A mi hermano Alejandro, que con su ejemplo me ha enseñado que todas las metas se pueden alcanzar. Eres mi orgullo.

A mis abuelos Berna, Vale, Amparito y Miguel que a pesar de la distancia o la ausencia han estado presentes de alguna manera en mi vida, alentándome a seguir adelante.

A Karla María, Alejandra, Roy y Meche, que me han apoyado y han estado para mí en cada momento.

Los amo.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Instituto Politécnico Nacional y al Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas por la oportunidad de superación profesional y el invaluable conocimiento adquirido.

A las becas CONACYT y PIFI que apoyaron mis estudios de posgrado.

Al Dr. Renato Peña Martínez, director de esta tesis, por su paciencia, apoyo, entrega y confianza.

Al Dr. Héctor Nolasco Soria, codirector de tesis, por su guía en la realización de éste trabajo.

Al comité revisor: Dr. Enric Gisbert Casas, Dra. Silvie Dumas, Dr. Sergio Martínez Díaz y Dr. Jesús Iván Murillo Álvarez por sus atinados comentarios, los cuales enriquecieron este trabajo.

Al Dr. Enric Gisbert Casas y al Dr. Karl Andree, que me abrieron las puertas de su laboratorio y me permitieron tener una de las experiencias más enriquecedoras en mi vida académica. Al IRTA (Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentaries, San Carlos de la Rápita, España) por permitirme realizar una estancia de investigación en sus instalaciones.

Al Dr. Dariel Tovar por su invaluable ayuda en la extracción de ARN y el traslado de muestras.

A Patricia Hinojosa Baltazar, encargada del laboratorio de Fisiología Comparada del CIBNOR, por su apoyo durante el trabajo de laboratorio.

A la Dr. Ma. del Carmen Rodríguez Jaramillo y la Sra. Ma. Eulalia Meza Chávez, por su apoyo durante el trabajo en el laboratorio de Histología e Histoquímica del CIBNOR.

A mis compañeros y amigos de la UPIMA: Dr. Oscar Iram Zavala Leal, Biól. Laura Flores Montijo, M. en C. Mauricio Contreras Olgún, M. en C. Margarita Rangel y Saúl Iván León Valencia por su valiosa ayuda en el cultivo larvario, pero sobre todo por su amistad durante todo este viaje.

A mi familia, que con su confianza y apoyo me han ayudado a cumplir cada una de las metas que me he trazado.

A mis hermanas Lulú y Yuyus; a mi cuñado Ale; a mis amigos Walther, Salwa, Nuria Salas, Juan Pablo (ñoño), Mario (abuelo), Joss, Ana, Elín, Nalle, Isa, Elvira, Almudena, Kruno, Carles, María, Miguel (hermanito), Chucho y Bruce por compartir conmigo este sueño y por estar en los buenos y malos momentos.

A la Sra. Ma. de Lourdes Jáuregui y Juan Bautista Fierro por abrirme las puertas de su casa y hacerme sentir parte de su familia.

A Ricardo Fierro Jáuregui por enseñarme a comerme al mundo sin cubiertos y verlo con flores amarillas.

A todas esas personas que directa o indirectamente me ayudaron a realizar este sueño.

**Gracias!!!**

## CONTENIDO

RESUMEN	6
ABSTRACT	7
LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE TABLAS	11
ABREVIATURAS	12
GLOSARIO	13
I. INTRODUCCIÓN	15
II. ANTECEDENTES	17
II.1. Desarrollo morfológico	17
II.2. Ontogenia enzimática	20
II.2.1. Proteasas	22
II.2.2. Carbohidrasas	25
II.2.3. Lipasas	26
II.2.4. Fosfatasas ácida y alcalina	26
II.3. Control hormonal	27
II.4. <i>Lutjanus guttatus</i>	29
III. JUSTIFICACIÓN	30
IV. OBJETIVO GENERAL	31
V. OBJETIVOS PARTICULARES	31
VI. HIPÓTESIS	32
VII. METODOLOGÍA	33
VII.1. Obtención y mantenimiento de las larvas	33
VII.2. Histología e histoquímica del tracto digestivo	35
VII.3. Actividad enzimática digestiva	36
VII.4. Caracterización enzimática digestiva por medio de electroforesis	38
VII.5. Ontogenia molecular de las enzimas digestivas y factores reguladores de la digestión	41
VII.6. Efecto del destete en la expresión genética de las enzimas	44

digestivas y factores reguladores de la digestión	
VII.7. Análisis de datos	44
VIII. RESULTADOS	45
VIII.1. Desarrollo del tubo digestivo	45
VIII.2. Actividad enzimática digestiva	53
VIII.3. Caracterización de la actividad enzimática digestiva	59
VIII.4. Expresión genética de enzimas digestivas y factores reguladores de la digestión	62
VIII.5. Efecto del destete en la expresión de enzimas digestivas y factores reguladores de la digestión	66
IX. DISCUSIÓN	70
IX.1. Desarrollo del tubo digestivo	71
IX.2. Actividad, caracterización y expresión de enzimas digestivas, y factores reguladores de la alimentación	76
IX.3. Efecto del destete en la expresión de las enzimas digestivas y de los factores reguladores de la digestión	85
IX.4. Esquema general de la función digestiva de las larvas de pargo lunarejo	87
X. CONCLUSIONES	90
XI. RECOMENDACIONES	91
XII. REFERENCIAS	92
XIII. ANEXOS	106

## RESUMEN

El estudio de la fisiología digestiva es un tema importante en especies que han sido introducidas en la acuicultura, debido a que la supervivencia de las larvas es un aspecto esencial que está directamente relacionado con la satisfacción de sus requerimientos nutricionales. El objetivo del presente estudio fue describir e integrar aspectos morfológicos y fisiológicos de la capacidad digestiva durante el desarrollo larval de *Lutjanus guttatus*. Estos aspectos incluyen: el desarrollo del tubo digestivo y órganos accesorios; la producción de la hormona gastrointestinal colecistoquinina y el neuropéptido Y; así como la expresión, actividad y caracterización de la actividad enzimática digestiva durante el desarrollo larval de *L. guttatus*. También evidenciar el efecto del destete en la expresión de los parámetros antes mencionados. Los resultados muestran que al momento de la eclosión las larvas presentan un tracto digestivo indiferenciado con la boca y ano cerrados. Al inicio de la primera alimentación, a una temperatura de 26°C, se observa una regionalización del tracto digestivo en la cavidad bucofaríngea, esófago, estómago en formación, intestino anterior, posterior y recto. A ésta edad, se detectó la expresión y actividad de proteasas alcalinas, carbohidrasas y lipasas, las cuales presentaron fluctuaciones con una tendencia a incrementar a lo largo del desarrollo de las larvas. A los 20 DDE (520 GD) se detectó un estómago funcional con la presencia de glándulas gástricas y el intestino mayormente desarrollado con pliegues y enterocitos con numerosas microvellocidades. La mayoría de las actividades y expresiones enzimáticas analizadas, así como la detección de la expresión pepsina, mostraron un incremento significativo alrededor de 20 DDE (520 GD). La actividad pepsina se registró 25 DDE (650 GD). Estos resultados sugieren que la maduración de las funciones digestivas (pepsina,  $\alpha$ -amilasa, tripsina y quimotripsina) y de absorción (fosfatasa ácida y alcalina, leucina aminopeptidasa) inicia alrededor de 20 a 25 DDE (520 a 650 GD) en el pargo lunarejo. Por otra parte, se evidenció un efecto del destete sobre la expresión de las enzimas digestivas, destacando que las larvas de pargo lunarejo tienen la capacidad de llevar a cabo el destete alrededor de 25 DDE (650 GD) con una coalimentación de 5 días.

Palabras clave: *Fisiología digestiva, Lutjanus guttatus, enzimas digestivas, morfología digestiva, destete.*

## ABSTRACT

The study of digestive physiology is an important issue in species that have been introduced in aquaculture, because the survival of the larvae is an essential aspect that is directly related to satisfying their nutritional requirements. The aim of this study was to describe and integrate morphological and physiological aspects of the digestive capacity during larval development of *Lutjanus guttatus*. These aspects include the development of the digestive tract and accessory organs; the production of gastrointestinal hormone cholecystinin and neuropeptide Y; and the expression, activity and characterization of digestive enzyme activity during larval development of *L. guttatus*. And evaluate the effect of weaning in the expression of the parameters mentioned above. The results show that at the time of hatching the larvae present an undifferentiated digestive tract with closed mouth and anus. On first feeding, at a temperature of 26 °C, a regionalization of the digestive tract in oropharyngeal cavity, esophagus, stomach training, foregut, hindgut and rectum was observed. At this age, the expression and activity of alkaline proteases, carbohydrases and lipases were detected, which showed fluctuations with a tendency to increase during the larval development. At 20 DAH (520 GD) a functional stomach with the presence of gastric glands and intestine mostly developed with folds and enterocytes with numerous microvilli was detected. Most expression and enzymatic activities analyzed and pepsin expression showed a significant increase about 20 DAH (520 GD). Pepsin activity was recorded 25 DHA (650 GD). These results suggest that the maturation of the digestive (pepsin, amylase, trypsin and chymotrypsin) and absorptive (acid and alkaline phosphatase, leucine aminopeptidase) functions start around 20-25 DAH (520-650 GD) in the spotted rose snapper. Moreover, weaning effect on the expression of digestive enzymes is evident, noting that weaning of spotted rose snapper larvae at about 25 DHA (650 GD) with a cofeeding period of 5 days is possible.

Keywords: *Digestive physiology, Lutjanus guttatus, digestive enzymes, digestive morphology, weaning.*

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Imágen del pargo lunarejo *L. guttatus*.....29
- Figura 2.** Longitud estándar (mm) de las larvas de pargo lunarejo *L. guttatus* de 0 a 35 días después de la eclosión. Cada punto representa la media ( $n = 15$ ), las barras verticales = desv. est. Las barras horizontales representan fases larvarias: a) larva con saco vitelino; b) pre-flexión; c) flexión; d) post-flexión.....46
- Figura 3.** Desarrollo del sistema digestivo en larvas de pargo lunarejo *L. guttatus*. a) 1 día después de la eclosión (DDE), hematoxilina-eosina (H-E), 20x. b) 2 DDE, azul alciano-Schiff, 40x. c) 3 DDE, H-E, 20x.....48
- Figura 4.** Desarrollo del sistema digestivo en larvas de pargo lunarejo *L. guttatus*. a) 8 DDE, hematoxilina-eosina (H-E), 20x. b) 8 DDE, H-E, 60x. c) 9 DDE, H-E, 60x.....49
- Figura 5.** Desarrollo del sistema digestivo en larvas de pargo lunarejo *L. guttatus*. a) 10 DDE, azul alciano-Schiff, 40x. b) 10 DDE, Sudán, 100x.....50
- Figura 6.** Corte transversal de una larva de pargo lunarejo *L. guttatus* de 20 DDE. Técnica: Sudán. Aumento: 20x.....52
- Figura 7.** Desarrollo del sistema digestivo en larvas de pargo lunarejo *L. guttatus*. a) Corte longitudinal del esófago 25 DDE, azul alciano-Schiff, 20x. b) Corte longitudinal del estómago e intestino anterior 25 DDE, H-E, 10x. c) Corte longitudinal del estómago e intestino anterior 30 DDE, Sudán, 4x. d) Glándulas gástricas, H-E, 60x.....53
- Figura 8.** Actividad enzimática específica (Unidades  $\text{mg proteína}^{-1}$ ) (●) e individual (Unidades  $\text{larva}^{-1}$ ) (○) durante el desarrollo larval del pargo lunarejo *L. guttatus*. (a)

fosfatasa ácida, (b) fosfatasa alcalina, (c)  $\alpha$ -amilasa, (d) lipasa. Línea vertical punteada indica el momento de la alimentación exógena. Cada punto representa la media ( $n = 3$  extracto), las barras verticales = desv. est. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los días de desarrollo, para cada tipo de actividad.....56

**Figura 9.** Actividad enzimática específica (Unidades  $\text{mg proteína}^{-1}$ ) (●) e individual (Unidades  $\text{larva}^{-1}$ ) (○) durante el desarrollo larval del pargo lunarejo *L. guttatus*. (a) tripsina, (b) quimotripsina, (c) leucina aminopeptidasa, (d) pepsina. Línea vertical punteada indica el momento de la alimentación exógena. Cada punto representa la media ( $n = 3$  extracto), las barras verticales = desv. est. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los días de desarrollo, para cada tipo de actividad.....58

**Figura 10.** Zimogramas de la ontogenia de la actividad  $\alpha$ -amilasa (a) y lipasa (b) en geles de poliacrilamida en gradiente (4 - 20%) en condiciones nativas durante el desarrollo larval del pargo lunarejo *L. guttatus*. M: marcador de peso molecular en kDa. Los números superiores indican los días después de la eclosión. Las líneas horizontales destacan el lugar de acción de la enzima.....60

**Figura 11.** Zimogramas de la ontogenia de la actividad proteasa alcalina (a) y proteasa ácida (b) en geles de poliacrilamida en gradiente (4 - 20%) en condiciones nativas durante el desarrollo larval del pargo lunarejo *L. guttatus*. M: marcador de peso molecular en kDa. Los números superiores indican los días después de la eclosión. Las líneas horizontales destacan el lugar de acción de la enzima.....61

**Figura 12.** Longitud estándar (mm) de las larvas de pargo lunarejo *L. guttatus* de 0 a 35 días después de la eclosión (DDE). Cada punto representa la media ( $n = 15$ ), las barras verticales = desv. est.....62

**Figura 13.** Expresión genética relativa de las enzimas digestivas  $\alpha$ -amilasa (a), lipasa (b) y fosfolipasa A (c) durante el desarrollo larval del pargo lunarejo *L. guttatus* (media  $\pm$  error estándar,  $n = 3$  pool larvario). Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).....63

**Figura 14.** Expresión genética relativa de las enzimas digestivas tripsina (a), quimotripsina 1 (b), quimotripsina 2 (c) y pepsina (d) durante el desarrollo larval del pargo lunarejo *L. guttatus* (media  $\pm$  error estándar,  $n = 3$  pool larvario). Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).....65

**Figura 15.** Expresión genética relativa de la hormona colecistoquinina (a) y del neuropéptido Y (b) durante el desarrollo larval del pargo lunarejo *L. guttatus* (media  $\pm$  error estándar,  $n = 3$  pool larvario). Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).....66

**Figura 16.** Longitud estándar (a) y peso (b) de las larvas de pargo lunarejo *L. guttatus* durante el destete. Las barras negras representan las larvas alimentadas con dieta microparticulada y las barras grises a las alimentadas con *Artemia* ( $n = 20$ , promedio  $\pm$  error est.).....67

**Figura 17.** Esquema general de la función digestiva de las larvas de pargo lunarejo *L. guttatus* a una temperatura de cultivo de 26 °C.....89

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla I.</b> Composición proximal de las dietas usadas en el destete de larvas de pargo lunarejo <i>L. guttatus</i> (Obtenido de Nguyen <i>et al.</i> , 2011).....	35
<b>Tabla II.</b> Calendario para el destete de larvas de pargo lunarejo <i>L. guttatus</i> .....	35
<b>Tabla III.</b> Protocolo de preparación de geles de poliacrilamida en gradiente del 4 al 20% para electroforesis nativa.....	39
<b>Tabla IV.</b> Composición del marcador de peso molecular SERVA Native Marker Liquid Mix.....	40
<b>Tabla V.</b> Secuencias de primers para PCR de pargo lunarejo <i>L. guttatus</i> .....	42
<b>Tabla VI.</b> Secuencias de primers para qPCR de pargo lunarejo <i>L. guttatus</i> .....	43
<b>Tabla VII.</b> Actividad enzimática específica (Unidades mg proteína <sup>-1</sup> ) (media ± desv. est.; <i>n</i> = 3 extractos) de larvas en inanición del pargo lunarejo <i>L. guttatus</i> .....	54
<b>Tabla VIII.</b> Expresión genética relativa de las enzimas digestivas de larvas de pargo lunarejo <i>L. guttatus</i> comparando larvas alimentadas con <i>Artemia</i> (AV) y dieta inerte (D) (media ± error estándar, <i>n</i> = 2 pool larvario).....	69
<b>Tabla IX.</b> Expresión genética relativa de la hormona colecistoquinina (CCK) y del neuropéptido Y (NPY) de larvas de pargo lunarejo <i>L. guttatus</i> comparando larvas alimentadas con <i>Artemia</i> (AV) y dieta inerte (D) (media ± error estándar, <i>n</i> = 2 pool larvario).....	70

## ABREVIATURAS

DDE	Días después de la eclosión	µm	Micrometros
DE	Después de la eclosión	g	Gramos
GD	Grados-día	PM	Peso molecular
mm	Milímetros	G	Fuerza de centrifugación
desv. est.	Desviación estándar	min.	Minutos
H-E	Hematoxilina-Eosina	µL	Microlitros
kDa	Kilodaltons	µg	Microgramos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa	mL	Mililitros
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa	mM	Milimoles
NPY	Neuropéptido Y	M	Moles
CCK	Hormona gastrointestinal colecistoquinina	nm	Nanómetros
SNC	Sistema nervioso central	ADN	Ácido desoxirribonucleico
m	Metros	ARN	Ácido ribonucleico
L	Litros	s	Segundos
UER	Unidades de expresión relativa	LE	Longitud estándar
ups	Unidades prácticas de salinidad		

## GLOSARIO

**$\alpha$ -amilasa:** Enzima digestiva ( $\alpha$ -1,4 glucano-4-glucanohidrolasa) que cataliza la hidrólisis de enlaces  $\alpha$ -1,4 internos en polisacáridos que contengan 3 o más unidades de glucosa unidas por enlace  $\alpha$ -1,4 (Lehninger, 1995).

**Absorción:** Transporte de los productos de la digestión desde el tracto digestivo hasta la sangre por difusión facilitada, difusión simple, pinocitosis o transporte activo (Álvarez-González, 2003).

**Borde de cepillo:** Proyección de la superficie apical de los enterocitos que consiste en numerosas microvellosidades, cada una está cubierta por una extensión de la membrana plasmática (Randall *et al.*, 1998).

**Células caliciformes:** Consideradas glándulas unicelulares, son células secretoras de mucosubstancias. Se presentan a lo largo del tubo digestivo, excepto en el estómago, intercaladas entre las células epiteliales de la mucosa (Randall *et al.*, 1998).

**Destete:** Término adoptado del inglés “weaning”. Se refiere al cambio de alimento vivo, por un alimento artificial (Peña *et al.*, 2005).

**Eclosión:** Proceso en el cual se rompe el corion o envoltura del huevo y emerge la larva vitelina (Balon, 1984).

**Electroforesis:** Técnica para separar moléculas en una matriz (agarosa o poliacrilamida) de acuerdo a su carga eléctrica y tamaño (Álvarez-González, 2003).

**Enlace peptídico:** Enlace que une a los aminoácidos para formar proteínas, se origina por la condensación del grupo  $\alpha$ -amino de un aminoácido con el grupo  $\alpha$ -carboxílico de otro aminoácido con pérdida de agua (Lehninger, 1995).

**Enterocitos:** Término que reciben las células epiteliales de la mucosa que reviste a intestino del tubo digestivo debido a su función de absorción de nutrientes (Randall *et al.*, 1998).

**Enzima:** Proteína que cataliza una reacción química específica (Alberts *et al.*, 1996).

**Grados-día:** Tiempo de desarrollo de un organismo basado en la temperatura de cultivo y la edad. ( $GD = Temperatura\ de\ cultivo\ (^{\circ}C) \times edad(DDE)$ ) (Ribeiro *et al.*, 2002).

**Quilomicrones:** Lipoproteínas sintetizadas en el epitelio del intestino caracterizadas por poseer baja densidad y gran diámetro (75-1.200 nm). Son grandes partículas esféricas que recogen desde el intestino delgado los triacilglicéridos, los fosfolípidos y el colesterol ingeridos en la dieta llevándolos hacia los tejidos a través del sistema linfático (Randall *et al.*, 1998).

**Vacuola:** Cavidad limitada por una membrana en el citoplasma de una célula (Randall *et al.*, 1998).

**Zimógeno:** Precursor inactivo de enzimas digestivas que se forma y acumula en los acinos pancreáticos en forma de gránulos y que posteriormente son secretados y transportados hacia los intestinos (Randall *et al.*, 1998).

## I. INTRODUCCIÓN

Los peces, al igual que otros organismos, requieren una fuente de energía para llevar a cabo procesos como el crecimiento, el metabolismo y la reproducción (Lazo *et al.*, 2011). La digestión es el proceso por medio del cual el organismo obtiene los nutrientes necesarios para todas las funciones biológicas, e incluye una serie de pasos regulados hormonalmente. El proceso digestivo comienza con eventos pre-digestivos, como la búsqueda e ingesta del alimento; suele incluir una digestión ácida dentro del estómago, en el caso de los peces gástricos; seguida de una digestión intestinal, donde intervienen sales biliares, secreciones pancreáticas y enzimas del borde de cepillo; y finalmente la absorción de nutrientes (Peña, 2005; Lazo *et al.*, 2011).

La capacidad digestiva de un organismo se incrementa y optimiza durante el desarrollo. En el caso de los peces marinos con ontogenia indirecta, durante el periodo embrionario ocurre un desarrollo progresivo, tanto morfológico como fisiológico de la función digestiva, permitiendo que la alimentación exógena inicie durante el período larval, cuando el sistema digestivo se encuentra aún en desarrollo y con menor capacidad digestiva que en juveniles y adultos (Ronnestad, 2002; García-Ortega, 2009; Gisbert *et al.*, 2009; Naz y Türkmen, 2009). En este contexto, la eficiencia en la utilización de los alimentos depende de las capacidades fisiológicas en los peces durante cada etapa de desarrollo para digerir y transformar los nutrientes ingeridos (Ronnestad *et al.*, 2013).

La comprensión de las funciones y limitaciones en el sistema digestivo durante las primeras etapas de desarrollo sigue siendo un área clave en la investigación aplicada al cultivo de larvas de peces marinos, ya que el análisis de la actividad y la expresión de las enzimas digestivas permite conocer la fisiología digestiva de las larvas (Ronnestad *et al.*, 2013), así como su estado nutricional y brinda información importante para ayudar en la definición de sus requerimientos nutricionales (Bolasina *et al.*, 2006). Además, un análisis exhaustivo de los cambios ontogénicos durante las etapas tempranas de la vida de los peces es esencial para el correcto diseño de

estrategias de alimentación y formulación de dietas compuestas (Cahu y Zambonino-Infante, 2001).

En este sentido, numerosos estudios han identificado dos etapas críticas durante el cultivo larval de peces marinos, en las cuales se registran las mayores tasas de mortalidad y ambas están relacionadas con el proceso alimenticio (García-Gasca *et al.*, 2006; García-Ortega, 2009; Qu *et al.*, 2012). La primera de ellas, durante el inicio de la alimentación exógena, cuando las larvas deben iniciar exitosamente la búsqueda y captura del alimento una vez que se han agotado sus reservas alimenticias (i.e. saco de vitelo y glóbulo de aceite) (Pérez-Casanova *et al.*, 2006; Ronnestad *et al.*, 2013); y la otra durante el destete o adecuación alimentaria, que es la transición de un alimento vivo a una dieta compuesta (Pérez-Casanova *et al.*, 2006; Muguet *et al.*, 2010). Se ha sugerido que éstas etapas críticas están asociadas a una baja capacidad digestiva durante el periodo larval en comparación con otras etapas posteriores del desarrollo (Tovar-Ramírez, 2002).

Aunque los mecanismos básicos de diferenciación de órganos y producción de enzimas son similares en los teleósteos, existen diferencias en su tiempo de aparición, ya que el desarrollo de órganos y sus funciones fisiológicas asociadas se ven afectados por la ontogenia de cada especie, así como por factores bióticos y abióticos tales como la temperatura, la calidad del agua, la disponibilidad y la composición del alimento durante las primeras etapas de la vida, etc. (Zambonino-Infante y Cahu, 2001; Álvarez-González *et al.*, 2006; García-Gasca *et al.*, 2006; Pérez-Casanova *et al.*, 2006; Lazo *et al.*, 2011).

Por lo cual, el estudio de la fisiología digestiva es un tema de suma importancia en las especies marinas que están siendo introducidas en la acuicultura, y de las cuales, las técnicas y esquemas de alimentación se encuentran aún en desarrollo. El conocer la fisiología digestiva de dichas especies aportará elementos básicos que permitirán modificar el esquema de alimentación de larvas en condiciones de cultivo intensivo y sincronizar el estado de desarrollo de la larva con el proceso de cultivo. Así como también sentará las bases para establecer los requerimientos nutricionales y para la formulación de dietas inertes acordes a la fisiología digestiva.

## II. ANTECEDENTES

Con la finalidad de mejorar los protocolos de crianza larvaria y alimentación, muchos estudios han descrito el desarrollo del tracto digestivo, así como la actividad y expresión enzimática digestiva en diferentes especies de peces (Lemieux *et al.*, 2003; Gisbert *et al.*, 2004; García-Gasca *et al.*, 2006; Pérez-Casanova *et al.*, 2006; Sveinsdóttir *et al.*, 2006; Gisbert *et al.*, 2009; Kortner *et al.*, 2011a; Galaviz *et al.*, 2012, entre otros); con lo cual ha sido posible plantear esquemas generales de desarrollo y funcionalidad de la capacidad digestiva durante el desarrollo inicial de los peces.

### II.1. Desarrollo Morfológico

En especies con ontogenia indirecta, tal es el caso de la mayoría de los teleósteos que presentan un periodo larvario, se observa una gran variación en la diferenciación del tubo digestivo. Se ha observado que al momento de la eclosión, el tracto digestivo de las larvas se presenta como un tubo recto e indiferenciado, situado en la parte dorsal del saco de vitelo. La boca y ano permanecen cerrados y el epitelio digestivo no está diferenciado y consta de una sola capa de células, con núcleos basales y en algunos casos con microvellosidades en la región apical (Hachero-Cruzado *et al.*, 2009).

El tiempo de la apertura de la boca y ano varía según la especie y la temperatura; por ejemplo en *Scophthalmus rhombus* (Hachero-Cruzado *et al.*, 2009) se da a 16 grados-día (GD); en *Paralabrax maculatofasciatus* a 50 GD (Peña *et al.*, 2003); en *Paralichthys californicus* a 54 GD (Gisbert *et al.*, 2004) y en *Lutjanus peru* a 75 GD (Zavala, 2007).

Al inicio de la primera alimentación, además de la apertura de la boca y el ano, el tubo digestivo presenta una diferenciación comenzando con la cavidad bucofaríngea constituida por epitelio escamoso simple que se encuentra rodeado por tejido conectivo y una capa de músculo circular (Peña *et al.*, 2003; Gisbert *et al.*, 2004); seguida del esófago, el cual se forma entre los 32 y 36 GD en *P. californicus* (Gisbert *et al.*, 2004) y *S. rhombus* (Hachero-Cruzado *et al.*, 2009), mientras que en

*Dentex dentex* a los 54 GD (Santamaría *et al.*, 2004) y en *P. maculatofasciatus* a los 75 GD (Peña *et al.*, 2003). Es posible distinguir un estómago primordial recubierto por un epitelio cúbico simple (Peña *et al.*, 2003; Hachero-Cruzado *et al.*, 2009). El intestino está cubierto por una capa simple de enterocitos con un núcleo basal (Morrison, 1993; Gisbert *et al.*, 2004). En los primeros días de desarrollo, se observa en la parte posterior del intestino un giro de 90° hacia la región ventral apareciendo una válvula intestinal dividiendo al intestino en dos regiones, prealvular (intestino anterior) y postalvular (intestino posterior). Resalta la presencia de vacuolas en los enterocitos del intestino anterior y posterior, formadas por la absorción de lípidos y proteínas, respectivamente (García-Gasca *et al.*, 2006; Pérez-Casanova *et al.*, 2006; Zavala-Leal, 2011). La aparición de las primeras células caliciformes intestinales, responsables de secretar mucina para mantener húmedo el epitelio, son a los 125 GD en *P. maculatofasciatus* (Peña *et al.*, 2003) y a los 198 GD en *P. californicus* (Gisbert *et al.*, 2004) y se observan en mayor cantidad en el intestino anterior.

Por otra parte, en la eclosión, el hígado y el páncreas no son evidentes (Santamaría *et al.*, 2004; Gisbert *et al.*, 2004) o bien se observan como pequeños grupos de células indiferenciadas (Morrison, 1993; Hamlin *et al.*, 2000; Peña *et al.*, 2003). El tejido pancreático se origina de la pared del tubo digestivo medio en las larvas recién eclosionadas, mientras que el hígado comienza a desarrollarse pocas horas después de la eclosión a partir de la proliferación de hepatocitos en el grupo de células que se encuentran en la posición antero-ventral de la cavidad abdominal (Calzada, 1996). El hígado está en posición ventral al tubo digestivo en desarrollo y puede ser identificado como una masa de tejido blanquecina no lobulada. En especies como *Sparus aurata* (Calzada, 1996) y *D. dentex* (Santamaría *et al.*, 2004), entre los 18 y 32 GD, el hígado y páncreas exocrino son detectados como células redondeadas basofílicas e indiferenciadas; horas después ambos empiezan la diferenciación y tanto los hepatocitos como las células pancreáticas son claramente distinguibles. A pesar de que éstos órganos accesorios se encuentran poco diferenciados y aún en desarrollo, ya son funcionales (García-Gasca *et al.*, 2006; Pérez-Casanova *et al.*, 2006; Zavala-Leal, 2011).

Conforme avanza el desarrollo larvario, se observa una transformación de la cavidad bucofaríngea, la cual incrementa en tamaño y cantidad de estructuras especializadas (ej. papilas gustativas, células caliciformes y dientes) (Gisbert *et al.*, 2004; Hachero-Cruzado *et al.*, 2009). Por su parte, el esófago se diferencia en dos regiones, ambas cubiertas por un epitelio cúbico o columnar, según la especie. La región anterior se distingue por presentar células caliciformes, mientras que en la unión de la región posterior y el estómago se caracteriza por presentar varios pliegues longitudinales (Peña *et al.*, 2003).

En el estómago, de *P. maculatofasciatus* (Peña *et al.*, 2003) y *D. dentex* (Santamaría *et al.*, 2004), alrededor de los 163 y 117 GD, respectivamente, el tejido conectivo rodea el epitelio cúbico, mientras que una capa circular de músculo estriado rodea la mucosa de éste órgano. Posteriormente, el estómago sufre cambios representados por pliegues en la mucosa y glándulas gástricas, las cuales aparecen alrededor de 384 GD en *S. rhombus* (Hachero-Cruzado *et al.*, 2009) y 414 GD en *P. californicus* (Gisbert *et al.*, 2004), iniciando la funcionalidad gástrica (Peña *et al.*, 2003; Zavala-Leal *et al.*, 2011). Estas glándulas están revestidas por un epitelio cuboidal simple y se localizan en la región anterior e intermedia del estómago. Posterior a la aparición de las glándulas se puede dividir histológicamente al estómago en tres regiones: cardiaca, gástrica y pilórica (Gisbert *et al.*, 2004; Zavala-Leal *et al.*, 2011). Finalmente, se observa un esfínter pilórico que separa al estómago de la parte anterior del intestino, el cual incrementa en tamaño y cantidad de pliegues intestinales (Zavala-Leal *et al.*, 2011).

Por su parte, el hígado incrementa en talla y aumenta también la formación de vacuolas dentro de los hepatocitos y sinusoides hepáticos. Las células del páncreas exocrino (células piramidales) forman acinos y muestran un citoplasma con gránulos de zimógeno fuertemente acidofílicos (Calzada, 1996; Hachero-Cruzado *et al.*, 2009). Posteriormente, el páncreas exocrino incrementa en talla y se rodea de diferentes estructuras en la cavidad visceral (Hachero-Cruzado *et al.*, 2009).

## II.2. Ontogenia Enzimática Digestiva

Las enzimas digestivas son catalizadores biológicos que hidrolizan los nutrientes para que puedan ser asimilados por el organismo. Dependiendo del sustrato sobre el que actúan se dividen en proteasas, lipasas y carbohidrasas (Randall *et al.*, 1998). Dentro de este tipo de enzimas también se han nombrado a las fosfatasas ácida y alcalina por participar en los procesos de absorción.

Con el fin de tener un mayor entendimiento de la fisiología digestiva de las larvas, se ha mostrado un gran interés en la evaluación de la actividad de enzimas digestivas pancreáticas, gástricas e intestinales, a través de su cuantificación bioquímica (Cuvier-Péres y Kestemont, 2002; Bolasina *et al.*, 2006; Álvarez-González *et al.*, 2008; Shan *et al.*, 2009; Kamaci *et al.*, 2010a; entre otros). Recientemente, estos trabajos se han complementado con técnicas de biología molecular que proporcionan conocimiento sobre la expresión temporal de genes implicados en la síntesis de esas enzimas digestivas (Péres *et al.*, 1998; García-Gasca *et al.*, 2006; Galaviz *et al.*, 2012). Se ha reportado que el tiempo de aparición de las diferentes enzimas digestivas es especie-específico y que la actividad presenta fluctuaciones que pueden estar influenciadas por la edad de los organismos, el tipo de alimento, la cantidad y la calidad de la dieta (Zambonino-Infante y Cahu, 2001; Álvarez-González *et al.*, 2006; García-Gasca *et al.*, 2006; Pérez-Casanova *et al.*, 2006; Lazo *et al.*, 2011).

En algunas especies como *Perca fluviatilis* (Cuvier-Péres y Kestemont, 2002), *P. californicus* (Álvarez-González *et al.*, 2006), *Anarhichas minor* (Savoie *et al.*, 2008), *D. dentex* (Gisbert *et al.*, 2009), *S. aurata* (Naz, 2009), *L. peru* (Moguel-Hernández *et al.*, 2013), se ha observado que pocas horas después de la eclosión se presenta la actividad de proteasas, carbohidrasas y lipasas. La presencia de estas enzimas antes de que comience la alimentación exógena apoya la hipótesis de una expresión enzimática digestiva genéticamente programada durante los primeros días de desarrollo. Así, las larvas son capaces de sintetizar enzimas para digerir y absorber nutrientes sin la estimulación del alimento (Carnevali *et al.*, 2001; Cuvier-Péres y Kestemont, 2002).

Durante los primeros días de desarrollo, la mayoría de las larvas de peces marinos no poseen un estómago funcional y por lo tanto no hay secreción de pepsina ni de ácido clorhídrico. Así que comienzan con una digestión intestinal alcalina, la cual se lleva a cabo tanto intracelular como extracelularmente (Lazo, 2000). Esta digestión está dada por enzimas que son secretadas por el páncreas al lumen intestinal ( $\alpha$ -amilasa, lipasa, tripsina, quimotripsina, elastasa, carboxipeptidasa, entre otras); también por enzimas que se localizan en la membrana del epitelio intestinal y son nombradas enzimas de borde de cepillo (fosfatasa alcalina, aminopeptidasa); y por enzimas que se encuentran en el interior de los enterocitos, llamadas enzimas citosólicas (leucina-alanina peptidasa, catepsina, tri y di peptidasa) (Kolkovski, 2001; Bolasina *et al.*, 2006; Lazo *et al.*, 2011; Galaviz *at al.*, 2012).

De manera general, al comienzo de la alimentación exógena se registra una baja actividad de las enzimas pancreáticas, la cual se incrementa con la edad de los organismos (alrededor de las tres primeras semanas en organismos de hábitats templados) (Martínez *et al.*, 1999; Zambonino-Infante y Cahu, 2001; Cuvier-Péres y Kestemont, 2002; Pérez-Casanova *et al.*, 2006; Zambonino-Infante y Cahu, 2007). Eventualmente se observa un cambio en la capacidad digestiva y de absorción, ya que después de altos niveles de actividad de las enzimas citosólicas en los enterocitos, éstas disminuyen progresivamente para dar paso a un aumento en la actividad de las enzimas del borde de cepillo. En larvas de *Pseudosciaena crocea* las enzimas del borde de cepillo fosfatasa alcalina y aminopeptidasa mostraron un incremento exponencial a los 480 GD. La relación de estas dos enzimas con la enzima leucina-alanina peptidasa mostró un aumento de la digestión en el nivel de las membranas, cuando la digestión citosólica disminuyó entre 552 y 600 GD (Ma *et al.*, 2005). Este proceso ha sido descrito en varias especies de peces, y ocurre en diferentes momentos: alrededor de 500 GD en *Solea senegalensis* (Ribeiro *et al.*, 1999), hasta 600 GD en *Gadus morhua* e *Hippoglossus hippoglossus* (Kvåle *et al.*, 2007).

Este cambio en la actividad enzimática ha sido reportado como un indicador de la maduración de la función digestiva de los enterocitos, lo cual refleja que se ha alcanzado el mismo nivel de funcionalidad que en juveniles y adultos (Cahu y

Zambonino-Infante, 1995). Aunado a esto, la aparición de glándulas gástricas y la secreción de pepsina (estómago funcional) señalan el final del período larval y el inicio del período juvenil en términos de la función digestiva (Álvarez-González, 2003; Peña *et al.*, 2003; Zambonino-Infante y Cahu, 2010; Lazo *et al.*, 2011). Este patrón de actividad se ha observado en organismos como *P. californicus* (Álvarez-González *et al.*, 2006), *G. morhua* e *H. hippoglossus* (Kvåle *et al.*, 2007) y *P. maculatofasciatus* (Álvarez-González *et al.*, 2008).

### **II.2.1 Proteasas**

Antes del desarrollo de un estómago funcional, el proceso digestivo en las larvas de peces comienza en un ambiente alcalino, con la contribución de enzimas como la tripsina (E.C. 3.4.21.4), quimotripsina (E.C. 3.4.21.1), carboxipeptidasa A y B (E.C. 3.4.17.1 y E.C. 3.4.17.2, respectivamente), entre otras (Cuvier-Péres y Kestemont, 2002; Álvarez-González *et al.*, 2008; Shan *et al.*, 2009).

La tripsina es una endoproteasa secretada por el páncreas hacia el intestino en su forma precursora, el tripsinógeno. Cataliza la hidrólisis de aquellos enlaces peptídicos en que la función carbonilo es aportada por el resto de lisina o de arginina, con independencia de la longitud o la secuencia de aminoácidos en la cadena (Muhlia-Almazán *et al.*, 2008; Lazo *et al.*, 2011). Esta enzima ha sido señalada como un indicador de la capacidad digestiva, debido a que se encuentra directamente relacionada con el metabolismo de las proteínas y tiene la capacidad de activar otras proteasas como la quimotripsina y la catepsina (Bolasina *et al.*, 2006; Carnevali *et al.*, 2001; Sveinsdóttir *et al.*, 2006). La actividad enzimática de tripsina se ha registrado desde la eclosión en *P. californicus* (Álvarez-González *et al.*, 2006), *P. maculatofasciatus* (Álvarez-González *et al.*, 2008), *Pagellus bogaraveo* (Ribeiro *et al.*, 2008), *D. dentex* (Gisbert *et al.*, 2009), *Diplodus puntazzo* (Kamaci *et al.*, 2010b) con una tendencia a incrementar o mantenerse constante a lo largo del desarrollo larval. Sin embargo, en otros organismos como *Melanogrammus aeglefinus* y *G. morhua* (Pérez-Casanova *et al.*, 2006) se observa un decremento en la actividad de esta enzima con la edad. No obstante, en ambos casos se presentan diversas fluctuaciones durante la ontogenia inicial de los organismos.

Estudios moleculares han identificado en larvas de *Pleuronectes americanus* tres genes que codifican para tripsinógenos (precursores de la tripsina) diferentes, los cuales presentan variaciones en su secuencia, lo que sugiere que pueden tener diferencias funcionales y pueden ser expresados en diferentes puntos del desarrollo de las larvas (Murray *et al.*, 2004). Se observó por medio de hibridación *in situ* que la expresión del tripsinógeno 2 se produjo a partir del momento de la apertura de la boca y se localizó en el páncreas exocrino. Fue el gen que más se expresó, en comparación con los tripsinógenos 1 y 3, lo que sugiere que es el más importante durante el inicio del desarrollo larvario de *P. americanus*. Por otra parte, la expresión de tripsinógeno 1 se observó en edades más avanzadas, sugiriendo su función en juveniles y adultos. Para el caso del tripsinógeno 3, su propósito aún no se ha dilucidado, ya que se detectó a los 200 GD y su distribución se encontró limitada al recto (Murray *et al.*, 2004).

La quimotripsina (E.C. 3.4.21.1) también es una endoproteasa pancreática que hidroliza los enlaces peptídicos que contienen grupos carboxilo de los aminoácidos aromáticos fenilalanina, triptófano y tirosina (Muhlía-Almazán *et al.*, 2008). En especies como *Sciaenops ocellatus* (Applebaum *et al.*, 2001), *P. californicus* (Álvarez-González *et al.*, 2006), *G. morhua* (Sveinsdóttir *et al.*, 2006), *P. maculatofasciatus* (Álvarez-González *et al.*, 2008) y *D. dentex* (Gisbert *et al.*, 2009) se reporta que la actividad de esta enzima es baja en los primeros días de desarrollo y continúa decreciendo para después incrementar su actividad, la cual presenta un patrón similar a la actividad tripsina a lo largo del desarrollo. La presencia de esta proteasa en edades tempranas del desarrollo y el aumento observado de la actividad durante el período larval sugiere que la quimotripsina contribuye a la digestión de proteínas en las larvas compensando la ausencia de proteasas ácidas previas al desarrollo de un estómago funcional (Applebaum *et al.*, 2001). Applebaum y Holt (2003) proponen que ésta enzima puede ser utilizada como un indicador del estado nutricional de los organismos en las primeras etapas de vida, ya que observaron en *S. ocellatus* una reducción del 84% en la actividad quimotripsina y 18% en el peso en larvas mal alimentadas, comparándolas con larvas alimentadas con rotíferos

enriquecidos con un suplemento comercial (Algamac 2000) y la microalga *Isochrysis galbana*.

Además de la acción de las enzimas pancreáticas, durante los primeros días de desarrollo se observa una alta actividad de las enzimas citosólicas (catepsinas, leucina-alanina peptidasa, dipeptidasas y tripeptidasas) las cuales degradan proteínas y oligopéptidos que han sido absorbidos por los enterocitos mediante pinocitosis (Zambonino Infante y Cahu, 2001; Kvåle *et al.*, 2007). Algunos autores consideran esta absorción, y posterior digestión intracelular, como un mecanismo para compensar la incompleta digestión proteica extracelular, debida a la ausencia de un estómago funcional (Ribeiro *et al.*, 1999; Kolkovski, 2001; Peña, 2005).

Al final del período larval, la pinocitosis disminuye, junto con la actividad de las enzimas citosólicas. Los niveles de actividad de las enzimas del borde de cepillo, como fosfatasa alcalina y exopeptidasas aumentan bruscamente (Ribeiro *et al.*, 1999; Kolkovski, 2001; Zambonino-Infante y Cahu, 2001). Dentro de las exoproteasas más estudiadas en las larvas de peces figuran la leucina-aminopeptidasa, carboxilpeptidasa, aminopeptidasa, entre otras (Zambonino-Infante y Cahu, 1994; Ma *et al.*, 2005; Kvåle *et al.*, 2007). Las aminopeptidasas hidrolizan el enlace peptídico liberando el aminoácido en posición terminal; por otro lado las carboxipeptidasas hidrolizan el enlace peptídico que libera el aminoácido en posición carboxilo terminal de los oligopéptidos que han sido generados por las endopeptidasas (tripsina y quimotripsina) en el lumen intestinal. Como resultado de la acción de estas exoproteasas se producen péptidos más pequeños y aminoácidos libres que posteriormente son absorbidos a través del borde de cepillo de los enterocitos (Kvåle *et al.*, 2007)

Aunado a esto, se ha observado la aparición de glándulas gástricas que producen pepsinógeno y HCl. La pepsina (E.C. 3.4.23.1) es la principal enzima proteolítica e hidroliza los enlaces peptídicos que contienen grupos carboxilo de los aminoácidos aromáticos, fenilalanina, triptófano, tirosina y otros (Lazo *et al.*, 2011). La actividad pepsina se ha registrado 324 GD en *P. californicus* (Álvarez-González *et al.*, 2006); 551 GD en *P. fluviatilis* (Cuvier-Péres y Kestemont, 2002); 1044 GD (504

GD después del inicio de la alimentación exógena) en *H. hippoglossus* (Murray *et al.*, 2006).

## II.2.2 Carbohidrasas

Las carbohidrasas tienen una acción hidrolítica sobre los polisacáridos, transformándolos en cadenas de oligosacáridos y monosacáridos (Lehninger, 1995). Dentro de las carbohidrasas, la  $\alpha$ -amilasa (E.C. 3.2.1.1) es la más reportada en larvas de peces. Es una enzima pancreática que cataliza la hidrólisis del enlace  $\alpha$ 1-4 del almidón y glucógeno dando como resultado oligosacáridos ( $\alpha$ -amilasa) y maltosa ( $\beta$ -amilasa) (Álvarez-González, 2003; Lazo *et al.*, 2011). La actividad  $\alpha$ -amilasa se ha registrado desde la eclosión en larvas de *S. senegalensis* (Martínez *et al.*, 1999), *P. fluviatilis* (Cuvier-Péres y Kestemont, 2002); *Pagrus pagrus* (Darias *et al.*, 2006), *M. aeglefinus* y *G. morhua* (Pérez-Casanova *et al.*, 2006) y *P. maculatofasciatus* (Álvarez-González *et al.*, 2008), mostrando altos niveles en los primeros días, lo cual indica una predisposición natural de las larvas a utilizar carbohidratos durante esta etapa de vida. Sin embargo, se ha observado una disminución notable durante el resto del desarrollo de las larvas. Sugiriendo que este patrón en la actividad  $\alpha$ -amilasa está programado genéticamente y puede reflejar las diferentes necesidades de nutrientes en distintas etapas de la ontogenia larvaria (Zambonino-Infante y Cahu, 2001). Lo anterior fue confirmado por Péres *et al.* (1998) en larvas de *Dicentrarchus labrax* alimentadas con dos dietas con diferente contenido de almidón (24.5% y 4.5%), en las cuales se presentó éste patrón, independientemente del contenido de almidón en las dietas.

No obstante, Lazo *et al.* (2000) sugieren que ésta disminución es menos pronunciada en peces omnívoros tales como *Chelon labrosus*, e incluso se puede evitar en peces carnívoros alimentados con dietas ricas en glúcidos. Lo anterior fue confirmado por Ma *et al.* (2005), quienes observaron un incremento en la actividad  $\alpha$ -amilasa a partir de los 690 GD en larvas de *P. crocea* lo cual fue atribuido al alto nivel de glucógenos en los copépodos congelados suministrados en su alimentación a esa edad.

### **II.2.3 Lipasas**

Las lipasas son enzimas específicas que poseen la función de hidrolizar los enlaces ester en lípidos complejos liberando diglicéridos, monoglicéridos, glicerol y ácidos grasos asimilables por el organismo (Lehninger, 1995; Álvarez-González, 2003). Los lípidos son emulsificados por las sales biliares producidas en el hígado, para facilitar su digestión. Los ácidos grasos son absorbidos por las células de la pared del intestino anterior y resintetizados en triacilglicéridos intracelularmente antes de ser transportados al hígado (Izquierdo *et al.*, 2000; Lazo *et al.*, 2000). La respuesta de la actividad lipasa (E.C. 3.1.1.3) a la cantidad de triacilglicéridos en la dieta no es lineal, sino más bien se encuentra regulada por la longitud y el grado de saturación de la cadena (Zambonino-Infante y Cahu 2010).

Se ha observado actividad lipasa antes de que la alimentación exógena comience en *Diplodus sargus* (Cara *et al.*, 2003), *Paralichthys olivaceus* (Bolasina *et al.*, 2006), *P. maculatofasciatus* (Álvarez-González *et al.*, 2008), *D. dentex* (Gisbert *et al.*, 2009) la cual tiende a incrementarse con la edad de los organismos o permanecer relativamente constante. Sin embargo, se debe tener en consideración que no toda la actividad lipasa registrada pertenece al tracto digestivo. Se ha documentado que existen dos tipos de lipasas durante el desarrollo larval, la primera relacionada con la hidrólisis de triacilglicéridos presentes en el glóbulo de aceite y la segunda utilizada en la digestión de los alimentos (Díaz *et al.*, 2002; Álvarez-González *et al.*, 2008). También es importante considerar que una parte de la actividad lipasa viene del tejido larvario y otra parte del tracto digestivo (Martínez *et al.*, 1999), en particular cuando se utiliza todo el organismo para la obtención del extracto, como se reportó en *P. californicus* (Álvarez-González *et al.*, 2006) y *P. maculatofasciatus* (Álvarez-González *et al.*, 2008). Lo anterior con la finalidad de no sobreestimar la actividad enzimática lipasa durante el desarrollo larvario.

### **II.2.4 Fosfatasas ácida y alcalina**

Las enzimas fosfatasa ácida (E.C. 3.1.3.2) y alcalina (E.C. 3.1.3.1) están relacionadas con la absorción y el transporte de nutrientes como glucosa, proteínas, lípidos a través de la membrana celular en los enterocitos y en la hidrólisis del fósforo

inorgánico que se utilizará para la producción de energía (Tengjaroenkul *et al.*, 2002) y su presencia se ha observado en las larvas de especies como *M. aeglefinus* y *G. morhua* (Pérez-Casanova *et al.*, 2006), *P. maculatofasciatus* (Álvarez-González *et al.*, 2008)

La tendencia al incremento en la actividad de estas dos enzimas está relacionada con un aumento en la capacidad de absorción de nutrientes en el intestino de las larvas de teleósteos (Segner *et al.*, 1989) y puede reflejar el desarrollo del borde en cepillo de los enterocitos (Martínez *et al.*, 1999; Ribeiro *et al.*, 1999; Ribeiro *et al.*, 2002; Zambonino Infante y Cahu 2007; Shan *et al.*, 2009).

### **II.3. Control Hormonal**

En los vertebrados, el consumo de alimento es controlado por los niveles de nutrientes en la sangre combinado por un grupo de factores de señalización que estimulan (orexigénicos) o inhiben (anorexigénicos) el apetito. Estos factores de señalización incluyen hormonas y neuropéptidos producidos y liberados en el sistema nervioso central (SNC), particularmente en el hipotálamo y en órganos periféricos (tracto gastrointestinal, tejido adiposo, hígado, páncreas). Los mecanismos fisiológicos que controlan el apetito aparentemente están bien conservados entre los vertebrados, y muchos de los neuropéptidos y hormonas involucrados en la regulación del apetito en mamíferos también han sido encontrados en peces (Volkoff *et al.*, 2009; Gomes *et al.*, en revisión).

En años recientes, ha habido un gran interés en el estudio del mecanismo hormonal y su influencia en el control de la expresión y secreción de las enzimas digestivas. Uno de los principales reguladores hormonales de la digestión es la hormona colecistoquinina (CCK), la cual se ha detectado desde el momento de la eclosión (Kortner *et al.*, 2011a; Webb *et al.*, 2010); esta hormona influye en la liberación de sales biliares y de enzimas pancreáticas, en la regulación de la saciedad, sobre los movimientos peristálticos y estimula el movimiento de la vesícula biliar, así como la secreción de tripsina en el intestino (Ronnestad, 2002; Ronnestad *et al.*, 2007; Webb *et al.*, 2010; Tillner *et al.*, 2013).

Tras la presencia de nutrientes en el intestino, CCK se libera de las células endócrinas del epitelio intestinal en los fluidos del cuerpo y actúa sobre las células diana en el páncreas para liberar las secreciones pancreáticas en el lumen intestinal. La estimulación en el intestino podría ser de naturaleza mecánica y/o bioquímica, ya que una alta actividad de la enzima tripsina en el intestino actúa como un control de retroalimentación negativa para la liberación de CCK en los seres humanos (Liddle, 2006). El mismo mecanismo se ha descrito en peces adultos (Zambonino-Infante y Cahu, 2007; Murashita *et al.*, 2008; Tillner *et al.*, 2013), lo que sugiere un bucle regulatorio entre estos dos factores.

Se ha observado en *P. olivaceus* (Kurokawa *et al.*, 2000), *Thunnus thynnus* (Kamisaka *et al.*, 2002) y *D. labrax* (Cahu *et al.*, 2004) que en la primera alimentación la producción de CCK se encuentra programada genéticamente, sin embargo en larvas de mayor edad también puede ser regulada por la longitud de las cadenas peptídicas, la presencia de aminoácidos libres y ácidos grasos en el alimento (Cahu *et al.*, 2004; Zambonino-Infante y Cahu, 2007; Naz y Türkmen, 2009).

Por su parte, el neuropéptido Y (NPY) tiene un papel antagónico al de CCK en el control de la secreción pancreática (Murashita *et al.*, 2008). Es un neurotransmisor de 36 aminoácidos perteneciente a la familia de polipéptidos pancreáticos, y es uno de los neurotransmisores más abundantes en el cerebro; sin embargo, también se produce en los enterocitos y se ha detectado en el hígado, bazo, músculo y tejido adiposo de los peces (Murashita *et al.*, 2008; Campos *et al.*, 2010). La composición nutricional puede influir en la expresión de NPY (Kortner *et al.*, 2011b).

En peces, además de ser un potente agente orexigénico, el cual regula la alimentación, también está involucrado en la estimulación de la secreción de hormonas de la pituitaria, la regulación del crecimiento, secreción de gonadotropinas y funciones cardiovasculares (Silverstein y Pilisetskaya, 2000; De Pedro *et al.*, 2001; Hernández y Solomon, 2006; Kortner *et al.*, 2011b).

En diversos estudios se ha demostrado que el NPY está implicado en la regulación de la ingesta de alimentos en teleósteos. Por ejemplo, al suministrar éste neuropéptido se ha presentado un aumento en la ingesta del alimento dependiente

de la dosis. Lo anterior se ha observado en *Ictalurus punctatus* (Silverstein y Plisetskaya, 2000).

#### **II.4. *Lutjanus guttatus***

El pargo lunarejo *L. guttatus* (Steindachner, 1869) es una especie demersal, que habita en arrecifes costeros, hasta unos 30 m de profundidad, generalmente solitario o en pequeños grupos, pero ocasionalmente forma grandes cardúmenes; los juveniles viven en estuarios y bocas de río. Esta especie se distribuye desde el Golfo de California, México hasta Perú (Arellano-Martínez *et al.*, 2001; Herrera-Ulloa *et al.*, 2011).



**Figura 1.** Imagen del pargo lunarejo *Lutjanus guttatus*.

Es considerada una especie de importancia comercial en el Pacífico mexicano, por lo que el interés en su cultivo se ha incrementado. Recientemente se han reportado algunos aspectos sobre su cultivo, incluyendo inducción a la reproducción, cultivo larvario, nutrición de juveniles y engorda (Boza-Abarca *et al.*, 2008; García-Ortega, 2009; Abdo-de la Parra *et al.*, 2010a; Abdo de la Parra *et al.*, 2011; Álvarez-Lajonchère *et al.*, 2012). En la Unidad Piloto de Maricultivos del

CICIMAR-IPN se ha logrado la maduración en cautiverio y la obtención de desoves espontáneos, lo cual ha permitido desarrollar el cultivo larval de esta especie hasta lograr la obtención de juveniles (resultados no publicados, proyecto Fundación PRODUCE).

En cuanto a los protocolos de crianza, se ha propuesto un esquema general de alimentación con microalga (*Nannochloropsis oculata*), rotíferos (*Brachionus rotundiformis*), nauplios y metanauplios de *Artemia* durante los primeros 29 días después de la eclosión (García-Ortega, 2009). Por su parte, Abdo-de la Parra *et al.* (2010b) sugieren que los juveniles de pargo lunarejo requieren por lo menos 45% de proteína y 9% de lípidos totales en la dieta para un mayor crecimiento y supervivencia.

Por otra parte, la fisiología digestiva de ésta especie está poco estudiada. Existe un reporte de Galaviz *et al.* (2012), quienes realizaron la descripción histológica del tubo digestivo y determinaron la actividad y expresión de las enzimas digestivas tripsina y pepsina durante el desarrollo larvario del pargo lunarejo.

### III. JUSTIFICACIÓN

El éxito comercial del cultivo de peces marinos, como lo es el pargo lunarejo, depende en gran medida de la producción controlada de un número suficiente de juveniles. Así, la supervivencia de las larvas es un aspecto esencial que está directamente relacionado con la satisfacción de sus requerimientos nutricionales. A pesar de que existen protocolos de crianza larvaria y alimentación para el pargo lunarejo (Boza-Abarca *et al.*, 2008; García-Ortega, 2009; Abdo-de la Parra *et al.*, 2010b; Álvarez-Lajonchère *et al.*, 2012), se deben generar nuevos esquemas alimenticios que permitan incrementar la supervivencia, los cuales deben basarse en argumentos biológicos y fisiológicos para aprovechar al máximo la capacidad digestiva de las larvas en las diferentes etapas de desarrollo.

Muchos estudios han descrito el desarrollo del tracto digestivo y la actividad enzimática digestiva en especies de peces marinos con la finalidad de mejorar los

protocolos de crianza larvaria y alimentación (Lemieux *et al.*, 2003; Gisbert *et al.*, 2004; García-Gasca *et al.*, 2006; Pérez-Casanova *et al.*, 2006; Sveinsdóttir *et al.*, 2006; Gisbert *et al.*, 2009; Kortner *et al.*, 2011a). En el caso del pargo lunarejo *L. guttatus*, se ha reportado un estudio que provee información sobre la expresión y actividad de las enzimas tripsina y pepsina (Galaviz *et al.*, 2012). Bajo este marco, resalta la necesidad de obtener un mayor entendimiento de la fisiología nutricional de larvas del pargo lunarejo antes de sugerir modificaciones en los protocolos alimenticios de las mismas.

La presente propuesta pretende describir e integrar aspectos morfológicos y fisiológicos relacionados con la capacidad digestiva de larvas de una especie de importancia comercial, como lo es el pargo lunarejo. Estos aspectos incluyen: el desarrollo del tubo digestivo y órganos accesorios, lo cual permite establecer las bases estructurales de la capacidad digestiva; la producción de la hormona gastrointestinal colecistoquinina y el neuropéptido Y; así como la expresión, actividad y caracterización de la actividad enzimática digestiva durante el desarrollo larval de *L. guttatus*. También evidenciar el efecto del destete en la expresión de los parámetros antes mencionados.

#### **IV. OBJETIVO GENERAL**

El objetivo general fue describir las características morfológicas y fisiológicas de la capacidad digestiva durante el periodo larval del pargo lunarejo *L. guttatus*.

#### **V. OBJETIVOS PARTICULARES**

Describir el desarrollo ontogénico del tubo digestivo y órganos asociados durante el periodo larval del pargo lunarejo *L. guttatus*.

Determinar los niveles de actividad de las enzimas digestivas:  $\alpha$ -amilasa, lipasa, tripsina, quimotripsina, leucina aminopeptidasa, pepsina, fosfatasa ácida y fosfatasa alcalina.

Realizar la caracterización enzimática de las proteasas ácidas y alcalinas, lipasas y  $\alpha$ -amilasas.

Registrar la expresión genética de las enzimas digestivas tripsina, quimotripsina 1, quimotripsina 2, pepsina,  $\alpha$ -amilasa, lipasa y fosfolipasa.

Registrar la expresión genética de la hormona gastrointestinal colecistoquinina y del neuropéptido Y.

Determinar el efecto del destete en la expresión génica de las enzimas digestivas tripsina, quimotripsina 1, quimotripsina 2, pepsina,  $\alpha$ -amilasa, lipasa y fosfolipasa; así como de la hormona gastrointestinal colecistoquinina y del neuropéptido Y.

## **VI. HIPÓTESIS**

Considerando el marco teórico anterior y el patrón de desarrollo general de la función digestiva de larvas de peces marinos, con la presente propuesta se pretende demostrar que la capacidad digestiva de las larvas de *L. guttatus* se incrementa durante el período larval, a través de la diferenciación morfológica del tracto digestivo, y alcanzará su completa funcionalidad alrededor de la tercer semana de desarrollo con la aparición de las glándulas gástricas y la aparición de una digestión ácida en el estómago; así como el incremento de la digestión alcalina intestinal.

Por otra parte, la incorporación de una dieta artificial generará fluctuaciones en los niveles de expresión génica de las enzimas digestivas, así como de la hormona colecistoquinina y del neuropéptido Y, las cuales se espera que sean mayores en comparación a las observadas con el alimento vivo.

## VII. METODOLOGÍA

En el presente trabajo se realizaron análisis histológicos e histoquímicos para describir el desarrollo del tubo digestivo y órganos accesorios en las larvas de pargo lunarejo. También se hicieron determinaciones bioquímicas y moleculares para describir los patrones de actividad y expresión enzimática digestiva y de factores reguladores de la digestión. Finalmente se hicieron análisis moleculares para determinar el efecto del destete en las expresiones enzimáticas, CCK y NPY en larvas de *L. guttatus*.

### VII.1. Obtención y mantenimiento de las larvas

Las larvas se obtuvieron mediante desoves espontáneos de reproductores de pargo lunarejo *L. guttatus* (20 machos y 10 hembras de 1.5 - 3 kg) mantenidos en la Unidad Piloto de Maricultivos (UPIMA) del CICIMAR-IPN y en el CIAD de Mazatlán. Se obtuvieron dos desoves, uno el 24/07/11 que corresponde a las muestras utilizadas para la descripción histológica e histoquímica del tracto digestivo, así como para la determinación de la actividad y caracterización de las enzimas digestivas; y otro el 23/08/13 para las muestras utilizadas para registrar la expresión enzimática digestiva y de la hormona CCK y el neuropéptido Y, así como para determinar el efecto del destete en las expresiones de los factores antes mencionados. Los desoves fueron recolectados en las mañanas mediante un sistema colector. Se realizó una evaluación volumétrica de los desove, y se separaron los huevos viables de los no viables mediante el método de flotabilidad. Los huevos viables se colocaron en tolvas de incubación cilíndricas de 120 L con agua de mar filtrada e irradiada con luz UV, a una temperatura de 26 °C y salinidad de 35 ups, con flujo continuo de agua y aireación moderada hasta el momento de la eclosión.

Después de la eclosión, las larvas del primer desove se sembraron en un sistema de cultivo de circulación cerrada, en 10 tanques de 120 L, con una densidad de siembra de 150 larvas L<sup>-1</sup> y un fotoperiodo de 13h:11h (luz:oscuridad). Se monitorearon diariamente las condiciones de temperatura, salinidad, oxígeno disuelto, así como la concentración de amonio. El cultivo se llevó a cabo con una

temperatura de  $26.7 \pm 0.21$  °C y una salinidad de  $36.01 \pm 0.66$  ups. Se formaron dos grupos, el primer grupo (Grupo A, seis tanques) se cultivó un total de 35 días después de la eclosión (DDE) y se alimentó con: nauplios de copépodo *Pseudodiaptomus euryhalinus* (2 nauplios mL<sup>-1</sup>) de 2 a 18 DDE, rotíferos *B. rotundiformis* enriquecidos con microalga *N. oculata* (3 rotíferos mL<sup>-1</sup>) de 2 a 7 DDE, rotíferos *B. rotundiformis* enriquecidos con SELCO™ (3 rotíferos mL<sup>-1</sup>) de 8 a 18 DDE, nauplios de *Artemia* enriquecidos con SELCO™ (0.5 nauplios mL<sup>-1</sup>) de 14 a 24 DDE, juveniles y adultos de *Artemia* (3 presas mL<sup>-1</sup>) de 22 DDE en adelante. Además se adicionó a los tanques microalga *N. oculata* (300,000 células mL<sup>-1</sup>) como agua verde de 2 a 18 DDE. El segundo grupo (Grupo B, cuatro tanques), se mantuvo bajo las mismas condiciones de cultivo del Grupo A, pero no se le ofreció alimento.

En el segundo desove, las larvas se mantuvieron bajo las mismas condiciones que en el primer desove. El día 23 después de la eclosión con la finalidad de homogeneizar tamaños y número de larvas para comenzar el experimento, se formaron 4 tanques con 127 lavas por tanque (1.06 larvas L<sup>-1</sup>). Los tanques se dividieron en dos grupos, el primero (Grupo AV) se continuó alimentando con adultos de *Artemia* (3 presas mL<sup>-1</sup>) hasta el día 35 después de la eclosión. En el segundo grupo (Grupo D) se llevó a cabo el destete con la dieta Otohime B2 (360-650 µm) (Tabla I), desde 25 DDE hasta 30 DDE disminuyendo la proporción de alimento vivo y aumentando la cantidad de dieta a lo largo de los 5 días (Tabla II). Después del día 30 sólo se ofreció dieta hasta el día 35 después de la eclosión. La cantidad de dieta suministrada correspondió al 8% de la biomasa de los organismos. En ambos grupos el alimento se dividió en cuatro raciones, las cuales se suministraron a lo largo del día a las 8, 11, 14 y 17 horas.

**Tabla I.** Composición proximal de las dietas usadas en el destete de larvas de pargo lunarejo *L. guttatus* (Obtenido de Nguyen *et al.*, 2011).

	Artemia	Otohime B2 (360-650 $\mu$ m)
Peso seco (%)	11.83	94.8
Proteína cruda (%)	56.3 $\pm$ 0.67	52.0 $\pm$ 0.51
Lípidos crudos (%)	26.0 $\pm$ 0.71	21.9 $\pm$ 0.97
Ácidos grasos		
n-3 HUFA (% dw) <sup>1</sup>	2.5 $\pm$ 0.06	2.7 $\pm$ 0.09
DHA/EPA <sup>2</sup>	1.4 $\pm$ 0.01	0.7 $\pm$ 0.01
EPA/ARA <sup>3</sup>	5.0 $\pm$ 0.01	26.0 $\pm$ 0.26

1) n-3 ácidos grasos altamente insaturados (ac. grasos  $\geq$  20:3)

2) DHA, 22:6n-3/EPA, 20:5n-3

3) ARA, 20:4n-6

**Tabla II.** Calendario para el destete de larvas de pargo lunarejo *L. guttatus*.

Edad (DDE)	Proporción (%) dieta/ <i>Artemia</i>
25	15/85
26	30/70
27	45/55
28	60/40
29	80/20
30	100/0

## VII.2. Histología e histoquímica del tracto digestivo

Se tomó diariamente una muestra de 30 organismos del Grupo A desde el día 0 (momento de la eclosión) hasta el día 10 y posteriormente cada cinco días hasta el día 35 DE. Se midió la longitud estándar de las larvas con ayuda de un analizador de imágenes Image Pro Plus v4.5 (Media Cybernetics, MD, USA). Las larvas para el análisis histológico se preservaron en formol al 4%, se deshidrataron en un procesador de tejidos y se incluyeron en parafina (Anexo 1), posteriormente, se

hicieron cortes a 4  $\mu\text{m}$ . La mitad de los cortes se tiñó con la técnica de hematoxilina-eosina (Anexo 2) (Everson, 1980); la otra mitad se dividió en dos para ser teñidas con la técnica de azul alciano-Schiff para observar mucopolisacáridos neutros y ácidos (Anexo 3) (Everson, 1980), y negro de SUDAN para determinar la localización de lípidos (Anexo 4) (Everson, 1980). Finalmente las muestras fueron analizadas en el microscopio óptico.

### **VII.3. Actividad enzimática digestiva**

Para determinar los niveles de actividad enzimática digestiva, se tomaron muestras de larvas del Grupo A, antes de ser alimentadas, a los 0, 1, 2, 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30 y 35 DDE. Así mismo, se tomaron muestras de larvas del Grupo B diariamente desde el día 0 hasta la muerte por inanición de los organismos. Todas las muestras se pesaron (1 g como mínimo) y se almacenaron en un ultracongelador a  $-80^{\circ}\text{C}$ , hasta el momento de su análisis.

Se preparó el extracto enzimático colocando un volumen de agua destilada conocido (4 veces el peso de la muestra en mL). Posteriormente, se maceró la muestra, en baño de hielo, con un homogeneizador de tejidos (Pro200) por un lapso de 60 segundos. Los tubos se centrifugaron (Microcentrífuga refrigerada Eppendorff 5804R) a 17949.49 G a  $5^{\circ}\text{C}$  durante 10 min. El sobrenadante se almacenó a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

La concentración de proteínas se determinó con base en la técnica de análisis de Bradford (1976). Se colocaron 792  $\mu\text{L}$  de agua destilada, 200  $\mu\text{L}$  de la solución de Bradford y 8  $\mu\text{L}$  del extracto problema y se agitó en un vortex. Posteriormente se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 595 nm en un espectrofotómetro UV/visible (Jenway 6505). La curva de calibración se llevó a cabo a partir de una solución estándar de albúmina bovina (0-50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

La actividad enzimática digestiva se expresó en términos de la actividad específica (unidades  $\text{mg proteína}^{-1}$ ) y actividad individual (unidades  $\text{larva}^{-1}$ ), donde una unidad es la cantidad de enzima requerida para incrementar 0.01 unidades de absorbancia a determinada longitud de onda por minuto. Se determinó la actividad de las enzimas fosfatasa ácida (E.C. 3.1.3.2), fosfatasa alcalina (E.C. 3.1.3.1),  $\alpha$ -amilasa

(E.C. 3.2.1.1), lipasa (E.C. 3.1.1.3), tripsina (E.C. 3.4.21.4), quimotripsina (E.C. 3.4.21.1), leucina aminopeptidasa (E.C. 3.4.11.1) y pepsina (E.C. 3.4.23.1).

Para la determinación de la fosfatasa ácida y alcalina se colocaron 500  $\mu$ L de buffer, en el caso de la fosfatasa ácida se utilizó citrato-HCl 90 mM a un pH 4.8 y para la fosfatasa alcalina glicina 100 mM con pH 10. Posteriormente se agregaron 500  $\mu$ L de una solución de p-nitrofenil fosfato como sustrato, se mezcló por inversión y se equilibró a una temperatura de 37° C. Se agregaron 20  $\mu$ L del extracto y se dejó incubar a la misma temperatura por 20 min. Se colocaron 4000  $\mu$ L de solución de hidróxido de sodio 0.1 M para detener la reacción y se mezcló por inversión. La absorbancia de la mezcla de reacción se leyó a una longitud de onda de 410 nm (Bergmeyer *et al.*, 1974).

La actividad  $\alpha$ -amilasa se determinó en un tubo de ensaye con tapa de rosca colocando 500  $\mu$ L de buffer Tris-HCl 50 mM a un pH 7.5 y 20  $\mu$ L de extracto. Se agregaron 500  $\mu$ L de almidón soluble al 1% en tris-HCl a temperatura ambiente, se dejó incubar a 37° C por 60 min. Posteriormente se adicionaron 200  $\mu$ L de carbonato de sodio 2 N y 1.5 mL de reactivo DNS. Se agitaron los tubos y se colocaron en un baño María en ebullición por 15 min. Después se agregaron 7.3 mL de agua destilada. Finalmente se leyó la absorbancia a 550 nm (Vega-Villasante *et al.*, 1993).

Para cuantificar la actividad lipasa se colocaron 100  $\mu$ L de tauracolato de sodio 100 mM en 1900  $\mu$ L de buffer tris-HCl 50 mM a un pH 7.2 y 10  $\mu$ L de extracto, así como 20  $\mu$ L de  $\beta$ -naftil-caprilato 200 mM como sustrato. Posteriormente se dejó incubar por 60 min a temperatura ambiente. Se agregaron 20  $\mu$ L de fast blue BB 100 mM y se volvió a incubar por 5 min. Para detener la reacción se agregaron 200  $\mu$ L de ácido tricloroacético 0.72 N y 2.71 mL de etanol:acetato de etilo para clarificar la reacción. La mezcla de reacción se leyó a una absorbancia de 540 nm en cubetas de vidrio (Versaw *et al.*, 1989).

En el caso de la actividad tripsina, se preparó el sustrato con 100 nM de BAPNA (Na-benzoil-DL-arginina-P-nitroanilida) en 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) y se aforó a 100 mL usando un buffer 50 mM de tris-HCl y 10 mM de CaCl<sub>2</sub> a un pH 8.2. Posteriormente se colocaron 1.25 mL del sustrato a 37° C y 20  $\mu$ L del extracto.

Después de 60 min de incubación se adicionaron 0.25 mL de ácido acético al 30%. La absorbancia se midió a una longitud de onda de 410 nm (Erlanger *et al.*, 1961).

Para analizar la actividad quimotripsina se colocaron 930  $\mu$ L de buffer de 0.1 M Tris-HCl con 0.01 M  $\text{CaCl}_2$  a un pH 7.8. Posteriormente se agregaron 50  $\mu$ L de SAAPNA a una concentración de 0.5 mM y 20  $\mu$ L del extracto. Posteriormente se dejó incubar la reacción por 60 min y se leyó en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 410 nm (Ásgeirsson y Bjarnason, 1991).

La actividad leucina aminopeptidasa se determinó utilizando leucina p-nitroanilida (0.1 mM) como sustrato, el cual se disolvió en 200  $\mu$ l de DMSO y se aforó a 100 ml con buffer de fosfato sódico 50 mM a un pH 7.2. Se colocaron 10  $\mu$ L del extracto y 950  $\mu$ L de sustrato. La reacción se incubó por 60 min a 37° C, posteriormente se agregaron 250  $\mu$ l de ácido acético 30%. Finalmente la absorbancia se midió a una longitud de onda de 410 nm (Álvarez-González, 2003).

La actividad pepsina se evaluó colocando 1 mL de hemoglobina (0.5%) en tampón 0.1 M glicina-HCl a un pH 3. Se añadieron 20  $\mu$ L del extracto y se incubaron por un periodo de 60 min. Después se detuvo la reacción con 0.5 mL de ácido tricloroacético al 20% y se dejó reposar la mezcla de reacción por 20 min a 4° C. Posteriormente se centrifugó a 15294.24 G durante 5 min. El sobrenadante se leyó a una longitud de onda de 280 nm (Anson, 1938).

#### **VII.4. Caracterización enzimática digestiva por medio de electroforesis**

Para la caracterización de las enzimas proteasas ácida y alcalina,  $\alpha$ -amilasas y lipasas se utilizaron los extractos obtenidos para la actividad enzimática digestiva. Las electroforesis se realizaron en cubeta Mini PROTEAN II (Bio Rad) con capacidad para 20 muestras, con geles de poliacrilamida en gradiente del 4 al 20% preparado como se muestra en la tabla III.

**Tabla III.** Protocolo de preparación de geles de poliacrilamida en gradiente del 4 al 20% para electroforesis nativa.

<b>Reactivo</b>	<b>Gel 4%</b>	<b>Gel 20%</b>
Solución madre de poliacrilamida <sup>1</sup>	6.666 mL	33.33 mL
Solución buffer (Tris-HCl 1.5M pH 8.8)	12.5 mL	12.5 mL
Agua destilada	30.684 mL	4.06 mL
	Degasificar con bomba de vacío por 15 min	
Persulfato de amonio (10%)	140 µL	90 µL
TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina)	40 µL	40 µL

<sup>1</sup>Solución de poliacrilamida 30.8% en agua destilada (acrilamida:bis-acrilamida = 30:0.8).

\*Estas cantidades sirven para preparar 8 geles.

Una vez preparados los geles, los extractos se mezclaron con una solución de 0.04% de azul de bromofenol y 20% glicerol procurando que la concentración final de proteína soluble en la muestra fuera de 100 µg. Los geles se montaron en la cubeta y se vertió el tampón de electroforesis (Tris-HCl 25 mM pH 8.8). Se aplicaron las muestras y el marcador de peso molecular SERVA Native Marker Liquid Mix (SERVA Electrophoresis No. 39219, Alemania) (Tabla IV) por medio de una jeringa HAMILTON Microliter®. En todos los geles se desecharon los pocillos de los extremos. Posteriormente, se colocó la cubeta en una cámara a 4° C y se conectó a una fuente de alimentación desarrollándose la electroforesis a un voltaje constante de 80 V por 4 horas.

**Tabla IV.** Composición del marcador de peso molecular SERVA Native Marker Liquid Mix

<b>Proteína</b>	<b>Peso molecular (kDa)</b>
Ferritina	720
Ureasa (hexámero)	545
Ferritina	450
Ureasa (trímero)	272
Lactato deshidrogenasa	146
BSA (albúmina bovina)	67
Ovalbúmina	45
Inhibidor de tripsina	21

Para detectar actividad proteasa alcalina, se sumergieron los geles en una solución de caseína Hamerstein al 1% tamponada en 50mM TRIS-HCl, pH 9 durante 30 minutos a 4° C, posteriormente se incubaron a 37° C por 4 horas. Se lavó con agua destilada y se fijó en una solución de ácido tricloro acético (TCA) al 12%. Para la tinción se usó azul brillante de Coomassie (BBC R-250) 0.1% en metanol, ácido acético y agua (40:10:50) por 2 hrs. Posteriormente se destiñó con una solución de etanol, ácido acético y agua (40:10:50) hasta que la solución dejó de quedar color azul.

En el caso de la detección de actividad proteolítica ácida, los geles se sumergieron en una solución de hemoglobina al 0.25% a 4° C por 30 minutos y se incubaron a 37° C por 3 horas. Se lavaron con agua destilada y se fijaron en TCA 12%. La tinción y el revelado se llevó a cabo de la misma manera que para la detección de la actividad proteasa alcalina.

La actividad lipasa se caracterizó sumergiendo los geles en una solución de  $\beta$ -naftil caprilato (200 mM), tauracolato de sodio (10 mM) y Tris-HCl 1.5 M a pH 8.8 por 25 horas. Para el revelado se agregó una solución de fast blue (100 mM) hasta observar las bandas de actividad lipolítica.

Para revelar la actividad  $\alpha$ -amilasa, a los geles se les incluyó una solución de almidón soluble 0.25%, al terminar la electroforesis, éstos fueron incubados a 37° C

en buffer Tris 25 mM, glicina 192 mM pH 8.3 por 6 horas y fueron revelados con una solución de yoduro de potasio al 25%.

Todos los geles se fotografiaron colocándolos entre dos hojas de acetatos, y fueron digitalizados con la ayuda de un escáner HP Deskjet 2515.

### **VII.5. Ontogenia molecular de las enzimas digestivas y factores reguladores de la digestión**

Para observar la expresión génica de las enzimas digestivas, de la hormona gastrointestinal colecistoquinina y del neuropéptido Y se tomó una muestra de 30 larvas antes de la primera alimentación a los 0, 1, 2, 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30 y 35 DDE. Las muestras se lavaron con agua destilada y se almacenaron en tubos Eppendorf con RNAlater® (Sigma R0901). Se mantuvieron en un ultracongelador a -80° C, hasta el momento de su análisis en el IRTA (Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentaries, San Carlos de la Rápita, España).

Cada muestra fue homogenizada con un procesador de tejidos en TRIzol® Reagent (Invitrogen, USA), después fue sometida a un tratamiento con DNase con el kit RQ1 RNase-Free DNase (Promega, Madison, USA). La calidad y la concentración del ARN se determinó por medio de espectrofotometría (A 260/280) y por electroforesis desnaturalizante en gel de agarosa TAE (Masek *et al.*, 2005).

Por cada muestra, 2 ug de ARN fueron transcritos inversamente a cADN usando el SuperScript™ First-Strand Synthesis System para RT-PCR (Invitrogen™, Life Technologies, Warrington, UK) utilizando como primers o cebadores Oligo(dT)<sub>12-18</sub> y hexámeros al azar.

Para obtener las secuencias específicas de los genes  $\alpha$ -amilasa, lipasa, fosfolipasa A, quimotripsina 1, quimotripsina 2, CCK, NPY y EF1, se hicieron alineaciones de éstos genes con especies homólogas obtenidas del GenBank utilizando el programa BioEdit Sequence Alignment Editor ver 7.0.5.2 (Hall, 1999).

Se diseñaron primers a partir de las regiones conservadas de éstas secuencias homólogas (Tabla V), los cuales se utilizaron para la amplificación de los genes específicos de *L. guttatus*, las cuales se mandaron secuenciar (ANEXO 5).

Dichas secuencias se usaron para diseñar los primers específicos para los ensayos de qPCR de *L. guttatus* (Tabla VI).

**Tabla V.** Secuencias de primers para PCR de pargo lunarejo *L. guttatus*.

<b>Gen</b>	<b>Nombre</b>	<b>Secuencia</b>	<b>Tm°C</b>	<b>Tamaño (pb)</b>
α-amilasa	<b>LGamyF</b>	CAACAACGYTGGGGTCAACATC	66	300 bp
	<b>LGamyR</b>	GTCRATCAGCTTGTTCADGAAG	62	
Lipasa	<b>LGlipF</b>	GTGATACATGGCTGGACGGTAACAG	76	1000 bp
	<b>LGlipR</b>	TCTCCCAGCGCAGCTTCACGATC	74	
CCK	<b>LgCCKF</b>	GTCGTGCTGGCWGTCCTGTGTAC	74	300 bp
	<b>LgCCKR</b>	CCTGTCTGCTATCCGRTGGTTGGC	76	
NPY	<b>LgNPYF</b>	ACTCTGGGGYTCTCTGTGTGGGC	76	230 bp
	<b>LgNPYR</b>	ACCACAATGATGGGTCATATCTTGAC	74	
Quimotripsina 1	<b>LgChym1F</b>	GGGAGAMTGCTGTGTCTGGGTCC	74	700 bp
	<b>LgChym1R</b>	GCAGGTAGGACACACGGGCGTAC	76	
Quimotripsina 2	<b>LgChym2F</b>	GCGGTGCCTCACTCCTGGCCC	74	270 bp
	<b>LgChym2R</b>	AGSRSGATGTCGTTGTTGATGGTG	68	
EF1	<b>LgEF1F</b>	GAACCACMCTGCTGGADGCTC	66	550 bp
	<b>LgEF1R</b>	AGYTGGAGAAGGRCTCCACAAC	66	
Fosfolipasa	<b>LgPhlipF</b>	RRATGATCCTGTGYGTGATGCC	64	230 bp
	<b>LgPhlipR</b>	CTCRCAGATGAACATCTCRCATTC	68	

**Tabla VI.** Secuencias de primers para qPCR de pargo lunarejo *L. guttatus*.

Gen/ NCBI No. acceso	Dirección	Secuencias	Tamaño (pb)	%E	Ref.
$\alpha$ -amilasa KJ908179	F	CACTCTTCATGTGGAAGCTGGTTC	110	94%	(1)
	R	CCATAGTTCTCAATGTTGCCACTGC			
Lipasa KJ908180	F	AAGCTGGTGTCTGCCCTCTACG	190	93%	(1)
	R	AGCCACATGTGCTCCCAGACTG			
Fosfolipasa A2 KJ908181	F	CGACTACGGCTGCTACTGCGG	130	98%	(1)
	R	TCGTCACAGCTGTAGTCGTAGAAC			
Tripsina HM754476	F	ATGAGCTCCACTGCTGACAGAAAC	156	100%	(2)
	R	AGAGTCACCCTGGCAAGAGTCCTT			
Quimotripsinogeno KJ908182	F	CTCACTGCCGCGTGTCTCCAAG	105	89%	(1)
	R	GCCCTGGAAATGGACTTGACCTG			
Quimotripsinogeno KJ908183	F	GGTGTCCCTGCAGGATTACACC	170	89%	(1)
	R	CTTCATGACCTGGATGTCCCTCAGC			
Pepsinogeno HM754478	F	TGTCTTCGACAACATGATCAAGCA	184	90%	(2)
	R	GCTGTCCATCTTGATCTGCCAGTA			
Colecistoquinina KJ908184	F	TCTCCTCGAGGCGGACACCCAC	130	99%	(1)
	R	CTGCGCACAGAACCTTTCTG			
Neuropéptido Y KJ908185	F	GTACTACTCAGCCCTGAGACAC	105	96%	(1)
	R	CCTTCAACAGCAGCTCTGAGAC			
Factor de elongación 1-alpha KJ908186	F	GCATGGTCGTCACCTTCGCTCC	150	94%	(1)
	R	CCACGTATCCACGACGGATTTCC			
18S rADN HM754479	F	CTGAACTGGGGCCATGATTAAGAG	165	98%	(2)
	R	GGTATCTGATCGTCGTCGAACCTC			

Referencias: 1) en el presente estudio, 2) Galaviz *et al.* (2012); Dirección: sentido (F), antisentido (R)

El qPCR tiempo real se realizó utilizando un termociclador ABI PRISM 7300 (Applied Biosystems, Alcobendas, Spain). Los análisis de PCR cuantitativo de cada gen se realizaron por triplicado con un volumen total de 20  $\mu$ L, los cuales contenían 2  $\mu$ L cDNA, 1  $\mu$ L de primers (20  $\mu$ mol L<sup>-1</sup>), 10  $\mu$ L SYBR® Green (Life Technologies, Warrington, UK) y 7  $\mu$ L de agua estéril. Todas las reacciones se llevaron a cabo en placas de 96 pocillos bajo las siguientes condiciones: 1 ciclo a 95° C por 10 min; 40 ciclos a 95° C por 15 s, 62° C por 30 s. Finalmente una curva de disociación completó el programa con 1 ciclo a 95° C por 15 s, 60° C por 1 min, 95° C por 15 s.

Para obtener la curva estándar de cada gen se hicieron ampliaciones por qPCR de una serie de diluciones de cDNA. Estas curvas se utilizaron para calcular la eficiencia de los genes, dada por:  $E = [10^{(-1/m)} - 1] \cdot 100$ , donde  $E$  es la eficiencia del gen, y  $m$  es la pendiente de la regresión lineal de la curva estándar.

#### **VII.6. Efecto del destete en la expresión genética de las enzimas digestivas y de factores reguladores de la digestión**

Se tomó una muestra de 10 larvas de los 4 tanques que conformaron los dos grupos (Grupo AV y Grupo D) antes de la primera alimentación del día. Esto se realizó a los 25, 28, 30 y 35 DDE. Cada larva se pesó en una balanza analítica y se midió con ayuda de un vernier electrónico. Las muestras se almacenaron en RNAlater® y se siguió el mismo procedimiento descrito en el apartado anterior.

#### **VII.7. Análisis de datos**

Para el análisis estadístico de los datos se utilizó el software Statistica versión 8. Se realizaron pruebas de normalidad de Kolmogorov-Smirnov y homocedasticidad de Bartlett y Cochran antes de analizar los datos, cuando éstos cumplían con los supuestos anteriores se decidió utilizar estadística paramétrica, en el caso contrario se usó estadística no paramétrica. En todos los análisis, el nivel de significancia fue de  $p < 0.05$ .

Por medio de análisis de varianza se compararon la longitud de las larvas a lo largo del desarrollo en ambos desoves, también se comparó la longitud y peso de las larvas durante el destete.

La actividad específica y total de las larvas alimentadas, así como las larvas mantenidas en inanición durante los días de muestreo se comparó mediante ANOVA Kruskal-Wallis. Del mismo modo, se comparó la expresión de las enzimas digestivas y de los factores reguladores de la digestión entre los días de muestreo de las larvas alimentadas.

Por medio de un análisis de varianza de dos vías se comparó la expresión de las enzimas digestivas y de los factores reguladores de la digestión, entre las larvas alimentadas con *Artemia* y con la dieta comercial durante el destete, teniendo como

variables los tipos de dieta y el tiempo de muestreo. Así mismo se hicieron pruebas *Post Hoc* de Newman-Keuls para identificar las interacciones entre los tratamientos.

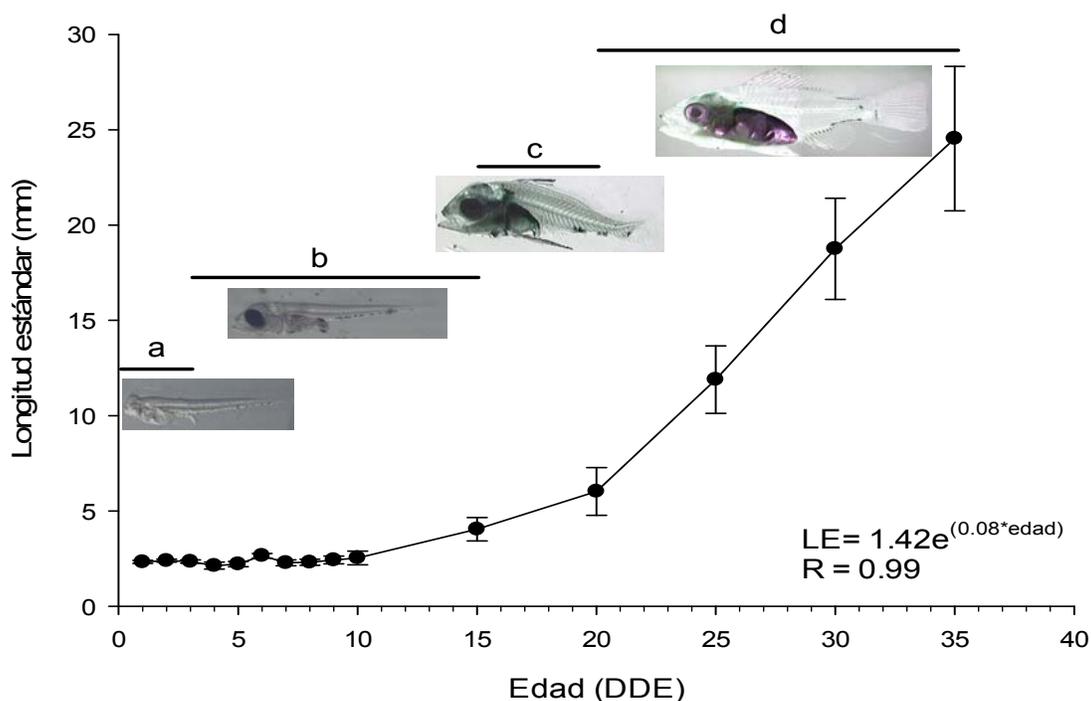
## VIII. RESULTADOS

Se analizaron aspectos estructurales y fisiológicos de la capacidad digestiva durante el desarrollo larvario del pargo lunarejo *L. guttatus*. Primero se describe el desarrollo del tubo digestivo, posteriormente se exponen los resultados del análisis de actividad y caracterización de las enzimas digestivas, y finalmente se presentan los resultados de la expresión genética de enzimas y hormonas digestivas, así como el efecto del destete sobre ellas.

### VIII.1. Desarrollo del tubo digestivo

El crecimiento de las larvas del pargo lunarejo durante los primeros 10 DDE va de  $2.13 \pm 0.17$  mm (media  $\pm$  desv. est.) a  $2.65 \pm 0.12$  mm. Posteriormente, se observa que entre el día 10 al 15 DDE la longitud estándar de las larvas se duplica, para continuar con un crecimiento exponencial ( $LE = 1.42e^{(0.08*edad)}$ ,  $R = 0.99$ ), alcanzando una longitud máxima de  $24.54 \pm 3.78$  mm a los 35 DDE (Figura 2). El cultivo se realizó a una temperatura de  $26.7 \pm 0.21$  °C.

El saco vitelino se absorbió completamente entre los 2 y 3 DDE ( $2.34 \pm 0.08$  mm), para dar paso a la larva en estadio de pre-flexión (desde el momento en que se han agotado las reservas vitelinas y hasta el inicio de la curvatura del extremo posterior de la notocorda) entre 3 y 15 DDE con una longitud estándar de  $2.34 \pm 0.08$  a  $4.04 \pm 0.61$  mm. Entre los 15 y 20 DDE se presentó el estadio de flexión (hasta la formación del complejo caudal). Finalmente, la larva en estadio de post-flexión (completa formación de los elementos de las aletas pares e impares) se observó a partir de 20 DDE y hasta el final del experimento (Figura 2).



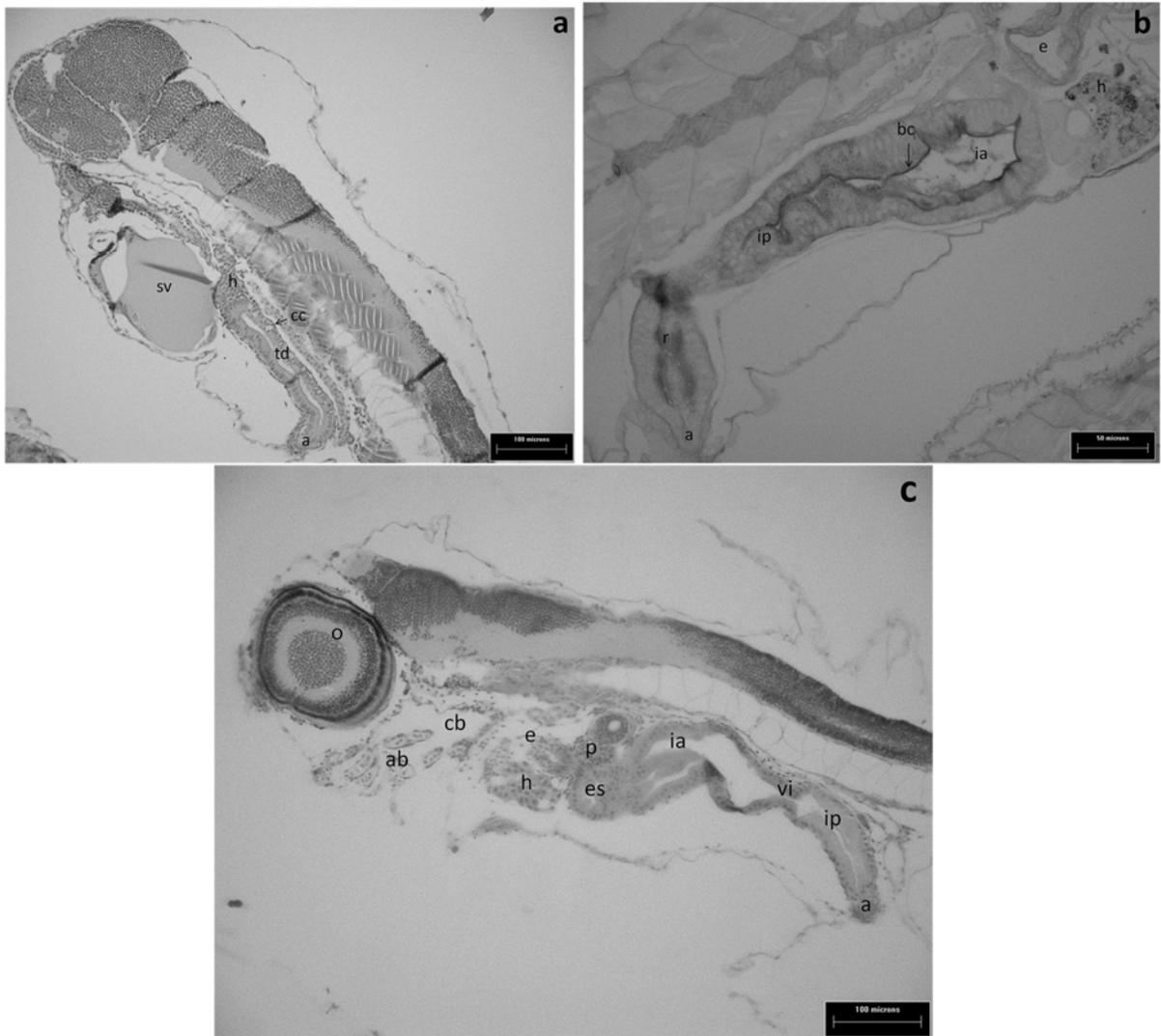
**Figura 2.** Longitud estándar (mm) de las larvas de pargo lunarejo *L. guttatus* de 0 a 35 días después de la eclosión. Cada punto representa la media ( $n = 15$ ), las barras verticales = desv. est. Las barras horizontales representan fases larvarias: a) larva con saco vitelino; b) pre-flexión; c) flexión; d) post-flexión.

Al momento de la eclosión ( $2.21 \pm 0.1$  mm) (media  $\pm$  desv. est.) y hasta 1 DDE ( $2.32 \pm 0.08$  mm), el tracto digestivo de las larvas de pargo lunarejo estaba indiferenciado, en posición dorsal con respecto al saco vitelino; recto en la región anterior y con una inflexión en el extremo posterior hacia la región ventral. Histológicamente, estaba revestido por un epitelio columnar con núcleos basales y con células caliciformes intercaladas en la mucosa, las cuales se presentaron en mayor número en la región anterior. La boca y ano estaban cerrados. El hígado y el páncreas se observaron como un conjunto de células indiferenciadas localizadas en la región anterior (Fig. 3a).

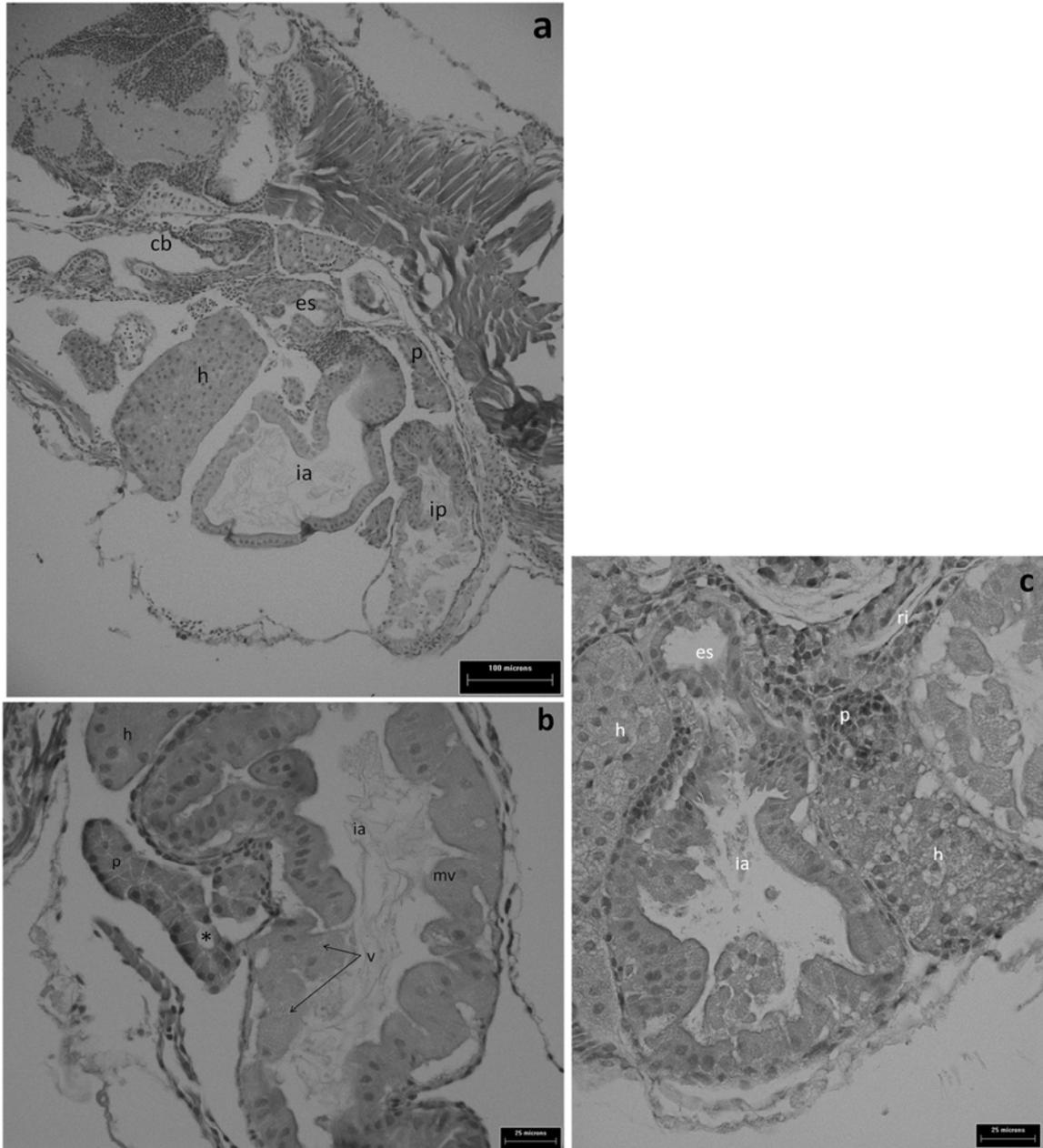
A los 2 ( $2.39 \pm 0.07$  mm) y 3 DDE ( $2.34 \pm 0.08$  mm) se observó la completa absorción del vitelo y de la gota lipídica, así como una regionalización del tracto

digestivo. Las regiones diferenciadas fueron: la cavidad bucofaríngea, el esófago, un estómago incipiente, el intestino anterior, el intestino posterior y el recto (Fig. 3b y 3c). La cavidad bucal estaba delimitada en la región ventral por los arcos branquiales, y conectada al esófago, el cual presentó un epitelio cúbico simple. Se destaca el desarrollo de un estómago primordial como un pequeño saco alargado posterior al esófago y conectado al intestino anterior. El intestino anterior se apreció como un saco alargado más ensanchado en la porción rostral. Esta estructura está conectada mediante la válvula intestinal al intestino posterior, el cual se diferenció en el recto y finalizó con el ano, que a ésta edad se encontraba abierto. Las glándulas digestivas accesorias, páncreas e hígado, estaban mayormente diferenciadas. El páncreas se localizó en posición antero-dorsal del intestino anterior. Mientras que el hígado se localizó en posición ventral al esófago como una estructura de mayor tamaño que el páncreas que ocupó gran parte de la región anterior de la cavidad abdominal (Fig. 3c). Con la técnica de azul alciano-Schiff se observa que desde los 2 DDE el hígado presenta mucopolisacáridos neutros que sugieren la acumulación de glucógeno en éste órgano. También fue evidente una reacción positiva a esta técnica en la región apical de los enterocitos en ambos intestinos (Fig. 3b).

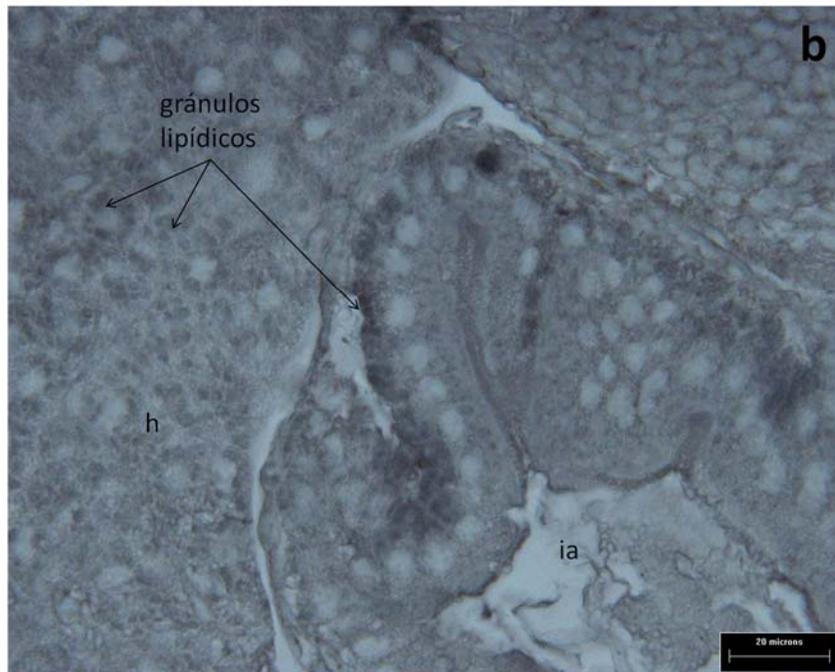
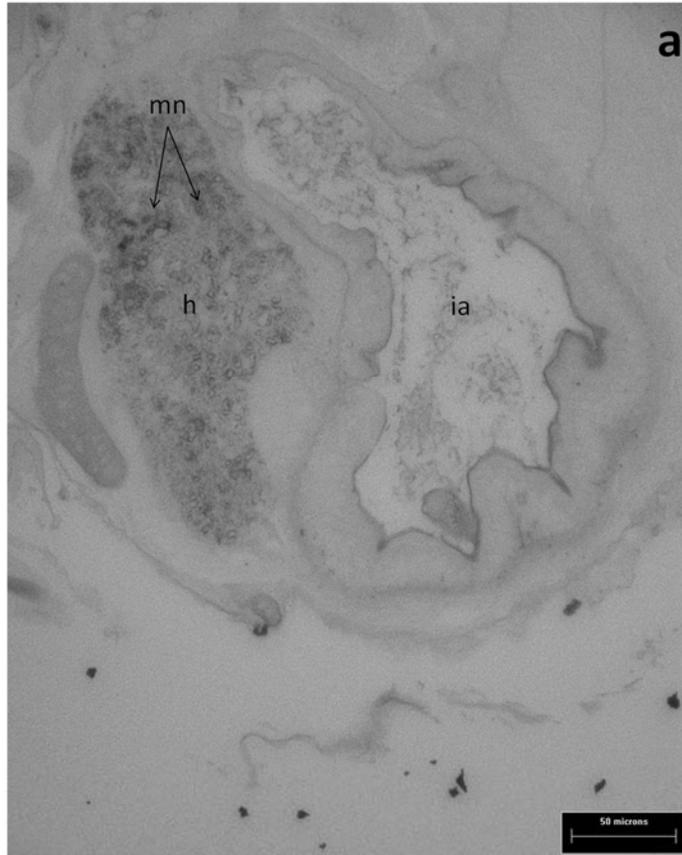
A partir de 5 DDE ( $2.21 \pm 0.13$  mm) y hasta 10 DDE ( $2.53 \pm 0.35$  mm) se observó un incremento en el tamaño y diferenciación de las estructuras involucradas en la digestión y absorción de nutrientes (Fig. 4). En particular, el esófago claramente diferenciado con un epitelio cúbico simple y con muy pocas células caliciformes. En ésta etapa de desarrollo se observa una diferenciación del estómago con epitelio cúbico simple. El intestino anterior está revestido por epitelio cilíndrico con núcleos basales (Fig. 4a y 4c). Los enterocitos presentan numerosas microvellosidades y gran cantidad de vacuolas (Fig. 4b y 4c). La parte apical de los enterocitos tuvo una reacción positiva al reactivo de Schiff (Fig. 5a). Por otra parte, en la región basal de los enterocitos se observaron numerosas vacuolas lipídicas (Fig. 5b). Se observó el páncreas exocrino formado por acinos pancreáticos y la presencia de conductos pancreáticos (Fig. 4b). En el hígado, los hepatocitos se ordenaron en láminas (Fig. 4a y 4c), se observó gran cantidad de gránulos y vacuolas en los hepatocitos que indican la presencia de glucógeno y lípidos, respectivamente (Fig. 5).



**Figura 3.** Desarrollo del sistema digestivo en larvas de pargo lunarejo *L. guttatus*. a) 1 día después de la eclosión (DDE), hematoxilina-eosina (H-E), 20x. b) 2 DDE, azul alciano-Schiff, 40x. c) 3 DDE, H-E, 20x. a: ano; ab: arcos branquiales; bc: borde de cepillo; cb: cavidad bucofaringea; cc: células caliciformes; e: esófago; es: estómago; h: hígado; ia: intestino anterior; ip: intestino posterior; o: ojo; p: páncreas; r: recto; sv: saco vitelino; td: tubo digestivo; vi: válvula intestinal.



**Figura 4.** Desarrollo del sistema digestivo en larvas de pargo lunarejo *L. guttatus*. a) 8 DDE, hematoxilina-eosina (H-E), 20x. b) 8 DDE, H-E, 60x. c) 9 DDE, H-E, 60x. cb: cavidad bucofaríngea; es: estómago; h: hígado; ia: intestino anterior; ip: intestino posterior; mv: microvellosidades; p: páncreas; ri: riñón; v: vacuolas; \*: posible conducto pancreático.



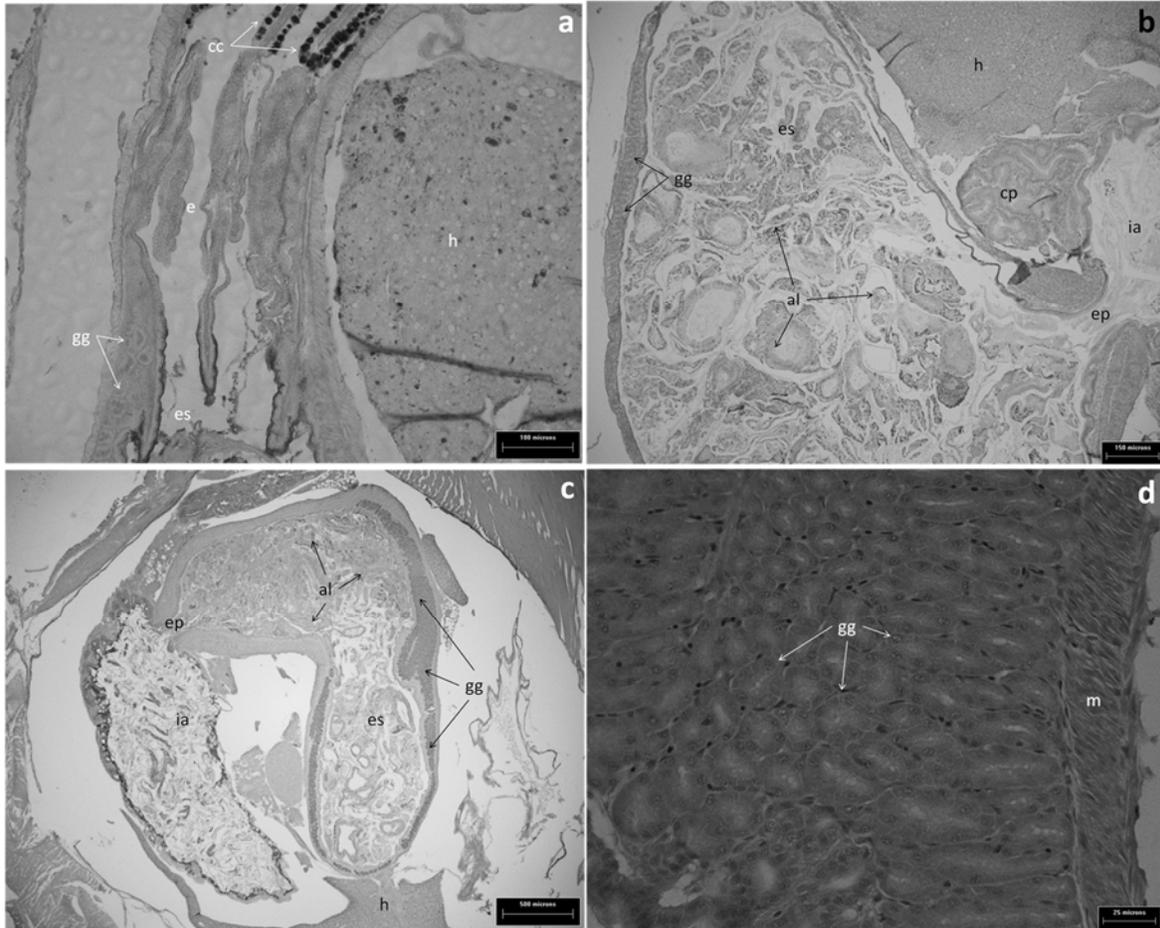
**Figura 5.** Desarrollo del sistema digestivo en larvas de pargo lunarejo *L. guttatus*. a) 10 DDE, azul alciano-Schiff, 40x. b) 10 DDE, Sudán, 100x. h: hígado; ia: intestino anterior; mn: mucopolisacáridos neutros.

Del día 15 al 20 después de la eclosión ( $4.04 \pm 0.61$  mm y  $6.02 \pm 1.25$  mm, respectivamente) el esófago presentó pliegues longitudinales en la región posterior en la unión con el estómago. Se observó un gran aumento en el número de células caliciformes intestinales, así como el aumento en el tamaño y el número de pliegues de la mucosa en el intestino. A 20 DDE se observan por primera vez, las glándulas gástricas revestidas por epitelio cúbico simple. El intestino presentó un mayor número de pliegues con numerosas vellosidades. El hígado y el páncreas se encuentran diferenciados y desarrollados (Fig. 6).

A los 25 DDE ( $11.89 \pm 1.76$  mm) en el esófago se diferenciaron claramente dos regiones, ambas cubiertas por epitelio cúbico. La región anterior se distingue por presentar gran cantidad de células caliciformes con actividad positiva Schiff, denotando la presencia de mucopolisacáridos neutros. Mientras que la unión de la región posterior y el estómago presenta pliegues longitudinales con actividad positiva azul alciano-Schiff, por lo que, aparte de mucopolisacáridos neutros, se observan mucopolisacáridos ácidos (Fig. 7a). El estómago se observó totalmente distendido por la presencia de alimento y unido al intestino anterior por medio del esfínter pilórico, el cual se encontró rodeado de una gruesa capa de músculo liso. Por otra parte, a esta edad, se observó la completa formación de los ciegos pilóricos (Fig. 7b). A los 30 DDE ( $18.75 \pm 2.65$  mm) el tracto digestivo estaba totalmente diferenciado y sólo se observaron cambios en el tamaño de éste y de los órganos accesorios. Sin embargo, a ésta edad se observó claramente que el estómago estaba diferenciado en tres regiones: el cardias, el fundus y el píloro. La región cardiaca mostró una menor cantidad de pliegues de la mucosa y presentó un epitelio cilíndrico ciliado con núcleos basales. La región fúndica se caracterizó por presentar un epitelio cilíndrico ciliado y gran cantidad de glándulas gástricas. Finalmente, la región pilórica desprovista de glándulas gástricas, se encontró junto al esfínter pilórico rodeada de una capa gruesa de músculo (Fig. 7c y 7d).



**Figura 6.** Corte longitudinal de una larva de pargo lunarejo *L. guttatus* de 20 DDE. Técnica: Sudán. Aumento: 20x. e: esófago; es: estómago; gg: glándulas gástricas; h: hígado; ia: intestino anterior; ip: intestino posterior; p: páncreas.



**Figura 7.** Desarrollo del sistema digestivo en larvas de pargo lunarejo *L. guttatus*. a) Corte longitudinal del esófago 25 DDE, azul alciano-Schiff, 20x. b) Corte longitudinal del estómago e intestino anterior 25 DDE, H-E, 10x. c) Corte longitudinal del estómago e intestino anterior 30 DDE, Sudán, 4x. d) Glándulas gástricas, H-E, 60x. al: alimento; cc: células caliciformes; cp: ciego pilórico; e: esófago; ep; esfínter pilórico; es: estómago; gg: glándulas gástricas; h: hígado; ia: intestino anterior; m: músculo.

### VIII.2. Actividad enzimática digestiva

Se registró desde la eclosión la actividad enzimática específica e individual de todas las enzimas, excepto la pepsina. En las larvas mantenidas en inanición se observaron fluctuaciones en las actividades lipasa, tripsina, y leucina aminopeptidasa, mientras que se registró un incremento significativo ( $p < 0.05$ ) en la

actividad fosfatasa alcalina y quimotripsina; y una reducción significativa ( $p < 0.05$ ) en la actividad fosfatasa ácida. La actividad  $\alpha$ -amilasa permaneció relativamente constante durante los tres primeros días después de la eclosión (Tabla VII).

**Tabla VII.** Actividad enzimática específica (Unidades mg proteína<sup>-1</sup>) (media  $\pm$  desv. est.;  $n=3$  extractos) de larvas en inanición del pargo lunarejo *L. guttatus*. Letras diferentes denotan diferencias significativas entre los días después de la eclosión ( $p < 0.05$ ).

Enzima	Días después de la eclosión			
	0	1	2	3
Fosfatasa ácida	$3.63 \times 10^{-2}$ $\pm 7.12 \times 10^{-4}$ a	$2.45 \times 10^{-2}$ $\pm 2.69 \times 10^{-4}$ b	$1.19 \times 10^{-2}$ $\pm 6.20 \times 10^{-4}$ c	$1.77 \times 10^{-2}$ $\pm 3.21 \times 10^{-4}$ c
Fosfatasa alcalina	$5.35 \times 10^{-3}$ $\pm 1.13 \times 10^{-4}$ b	$5.73 \times 10^{-3}$ $\pm 3.69 \times 10^{-4}$ b	$6.58 \times 10^{-3}$ $\pm 3.43 \times 10^{-4}$ b	$10.8 \times 10^{-3}$ $\pm 3.42 \times 10^{-4}$ a
$\alpha$ -amilasa	$24.0 \times 10^{-1}$ $\pm 4.16 \times 10^{-2}$ b	$12.1 \times 10^{-1}$ $\pm 2.10 \times 10^{-2}$ b	11.05 $\pm 2.32 \times 10^{-2}$ a	$7.66 \times 10^{-1}$ $\pm 3.58 \times 10^{-2}$ b
Lipasa	132.91 $\pm 0.99$ b	62.25 $\pm 1.33$ c	317.50 $\pm 6.44$ a	118.42 $\pm 1.40$ b
Tripsina	$0.30 \times 10^{-4}$ $\pm 1.79 \times 10^{-5}$ b	$1.06 \times 10^{-4}$ $\pm 1.11 \times 10^{-5}$ a	$0.31 \times 10^{-4}$ $\pm 0.27 \times 10^{-5}$ b	$0.07 \times 10^{-4}$ $\pm 0.11 \times 10^{-5}$ c
Quimotripsina	$0.21 \times 10^{-6}$ $\pm 3.70 \times 10^{-7}$ b	$0.09 \times 10^{-6}$ $\pm 1.37 \times 10^{-7}$ c	$0.78 \times 10^{-6}$ $\pm 7.05 \times 10^{-7}$ b	$1.49 \times 10^{-6}$ $\pm 5.32 \times 10^{-7}$ a
Leucina aminopeptidasa	1.83 $\pm 0.10$ b	1.29 $\pm 0.02$ c	1.93 $\pm 0.06$ b	2.20 $\pm 0.07$ a

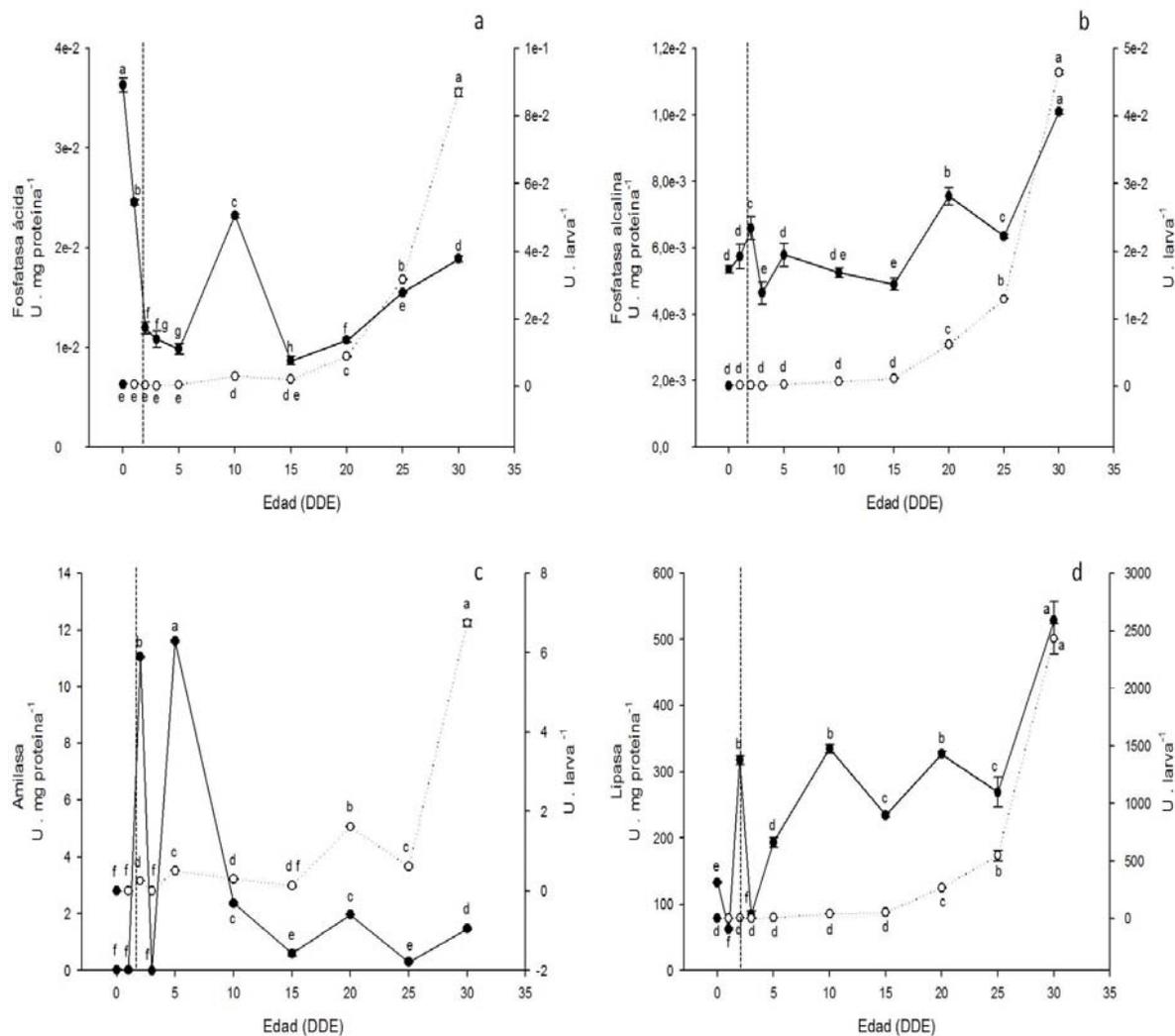
Después de la absorción del saco vitelino al día 2 DDE, la actividad enzimática de las larvas alimentadas mostró una tendencia hacia el incremento con la presencia de fluctuaciones durante el desarrollo larvario (Figs. 8 y 9).

La fosfatasa ácida mostró una disminución en la actividad específica desde la absorción del vitelo hasta el día 5 después de la eclosión. Un pico de actividad se registró a los 10 DDE ( $0.02 \pm 1.94 \times 10^{-4}$  U mg proteína<sup>-1</sup>) seguido por una reducción y un incremento continuo de la actividad hasta el día 30 ( $0.02 \pm 2.82 \times 10^{-4}$  U mg proteína<sup>-1</sup>) (Fig. 8a). La fosfatasa alcalina mostró un nivel relativamente constante de

la actividad específica hasta 15 DDE, luego aumentó durante el desarrollo con un pico máximo al día 30 DE ( $0.01 \pm 5.84 \times 10^{-5}$  U mg proteína<sup>-1</sup>) (Fig. 8b). La actividad individual de ambas enzimas presentó un patrón similar incrementando significativamente ( $p < 0.05$ ) a partir de 20 DDE y llegando a un pico máximo a los 30 DDE ( $0.08 \pm 1.29 \times 10^{-3}$  y  $0.05 \pm 2.69 \times 10^{-4}$  U larva<sup>-1</sup>, respectivamente) (Fig. 8a y 8b).

La actividad específica  $\alpha$ -amilasa presentó dos picos, el primero en el inicio de la alimentación exógena 2 DDE ( $11.05 \pm 2.32 \times 10^{-2}$  U mg proteína<sup>-1</sup>) y el segundo se registró a 5 DDE ( $11.60 \pm 0.04$  U mg proteína<sup>-1</sup>) seguido por una disminución significativa ( $p < 0.05$ ) con fluctuaciones continuas de 10 a 30 DDE ( $2.36 \pm 0.03$  a  $0.30 \pm 0.01$  U mg proteína<sup>-1</sup>, respectivamente). Por su parte, la actividad individual  $\alpha$ -amilasa permaneció constante a lo largo del desarrollo con un incremento significativo de 25 a 30 DDE ( $6.74 \pm 0.08$  U larva<sup>-1</sup>) (Fig. 8c).

La actividad específica lipasa tuvo un decremento significativo ( $p < 0.05$ ) después de la primera alimentación, y a los 5 DDE se incrementó significativamente ( $p < 0.05$ ). Continuó variando durante el desarrollo larvario con una tendencia creciente alcanzando un máximo a los 30 DDE ( $528.99 \pm 28.62$  U mg proteína<sup>-1</sup>). La actividad individual lipasa presentó un incremento exponencial a partir de 15 DDE con un pico máximo a los 30 DDE ( $2433.74 \pm 131.69$  U larva<sup>-1</sup>). Esta enzima mostró los mayores niveles de actividad específica e individual de todas las enzimas analizadas (Fig. 8d).



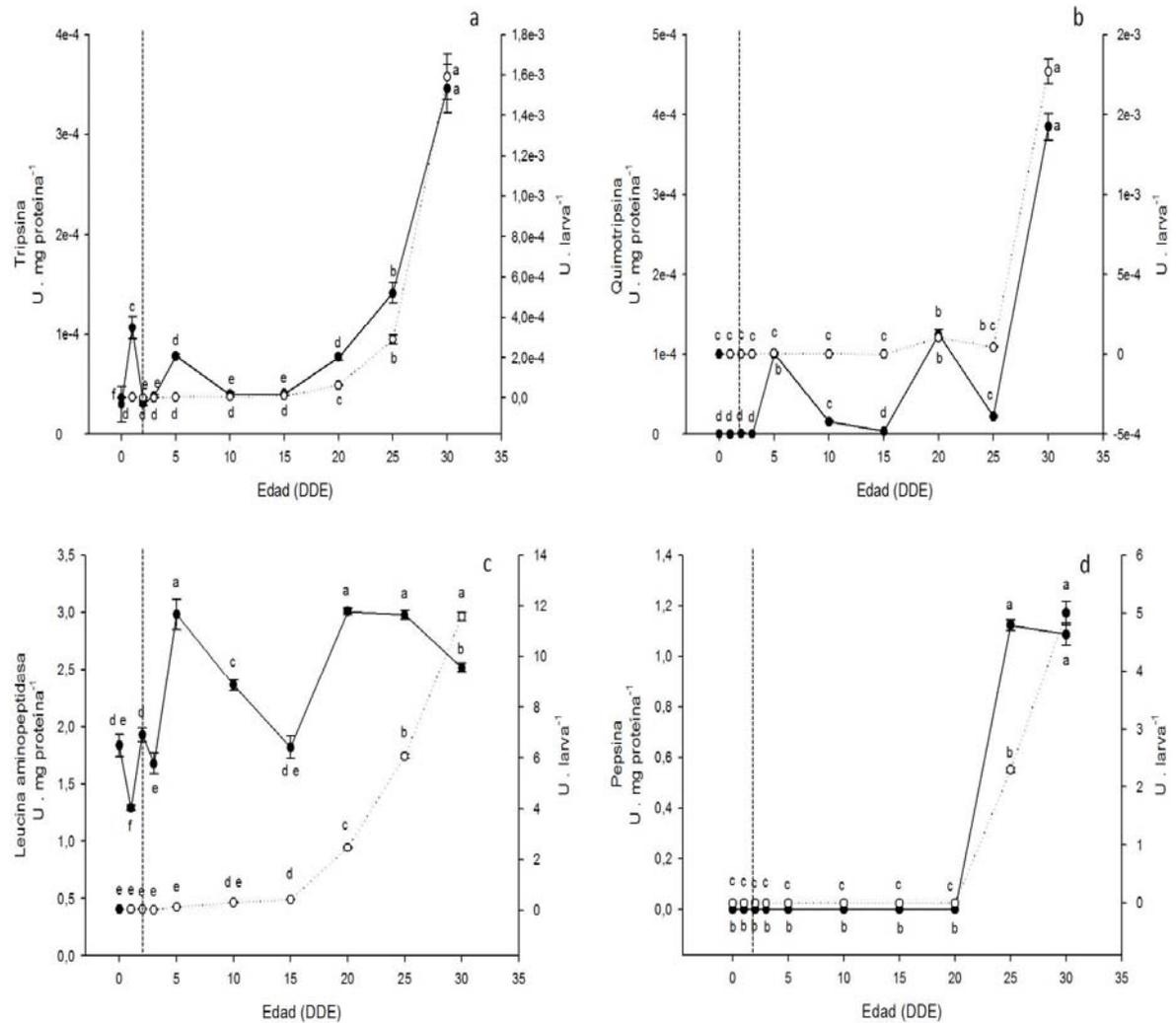
**Figura 8.** Actividad enzimática específica (Unidades mg proteína<sup>-1</sup>) (●) e individual (Unidades larva<sup>-1</sup>) (○) durante el desarrollo larval del pargo lunarejo *L. guttatus*. (a) fosfatasa ácida, (b) fosfatasa alcalina, (c) α-amilasa, (d) lipasa. Línea vertical punteada indica el momento de la alimentación exógena. Cada punto representa la media ( $n = 3$  extracto), las barras verticales = desv. est. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los días de desarrollo, para cada tipo de actividad.

La actividad específica tripsina mostró fluctuaciones desde la eclosión y hasta los 10 DDE, posteriormente se incrementó exponencialmente hasta alcanzar un pico máximo a los 30 DDE ( $3.45 \times 10^{-4} \pm 2.41 \times 10^{-5}$  U mg proteína<sup>-1</sup>). La actividad individual tripsina presentó un patrón similar a su actividad específica, con un máximo a los 30 DDE ( $1.59 \times 10^{-3} \pm 1.11 \times 10^{-4}$  U larva<sup>-1</sup>) (Fig. 9a).

La quimotripsina mostró un bajo nivel de actividad específica en las larvas con saco vitelino y luego aumentó con continuas fluctuaciones entre los 5 y los 25 DDE mostrando su máxima actividad a 30 DDE ( $3.84 \times 10^{-4} \pm 1.68 \times 10^{-5}$  U mg proteína<sup>-1</sup>). La actividad enzimática individual quimotripsina permaneció relativamente baja durante todo el desarrollo larvario con un incremento significativo ( $p < 0.05$ ) entre 25 y 30 DDE ( $1.76 \times 10^{-3} \pm 7.76 \times 10^{-5}$  U larva<sup>-1</sup>) (Fig. 9b).

La actividad específica leucina aminopeptidasa mostró fluctuaciones constantes durante todo el desarrollo larval, registrando la más baja actividad al día 1 después de la eclosión ( $1.291 \pm 0.021$  U mg proteína<sup>-1</sup>). Dos picos de actividad fueron evidentes, a los 5 y 20 DDE ( $2.982 \pm 0.135$  y  $3.006 \pm 0.029$  U mg proteína<sup>-1</sup>, respectivamente); sin embargo, se registró un decremento en la actividad leucina aminopeptidasa a los 30 DDE. La actividad individual permaneció constante hasta 15 DDE e incrementó exponencialmente hasta 30 DDE ( $11.57 \pm 0.17$  U larva<sup>-1</sup>) (Fig. 9c).

La actividad específica pepsina se detectó a partir del día 25 después de la eclosión y se mantuvo relativamente constante en el día 30 ( $1.123 \pm 0.020$  y  $1.086 \pm 0.044$  U mg proteína<sup>-1</sup>, respectivamente). La actividad individual se detectó a los 25 DDE ( $2.28 \pm 0.04$  U larva<sup>-1</sup>) con un pico máximo a los 30 DDE ( $5 \pm 0.2$  U larva<sup>-1</sup>) (Fig. 9d).



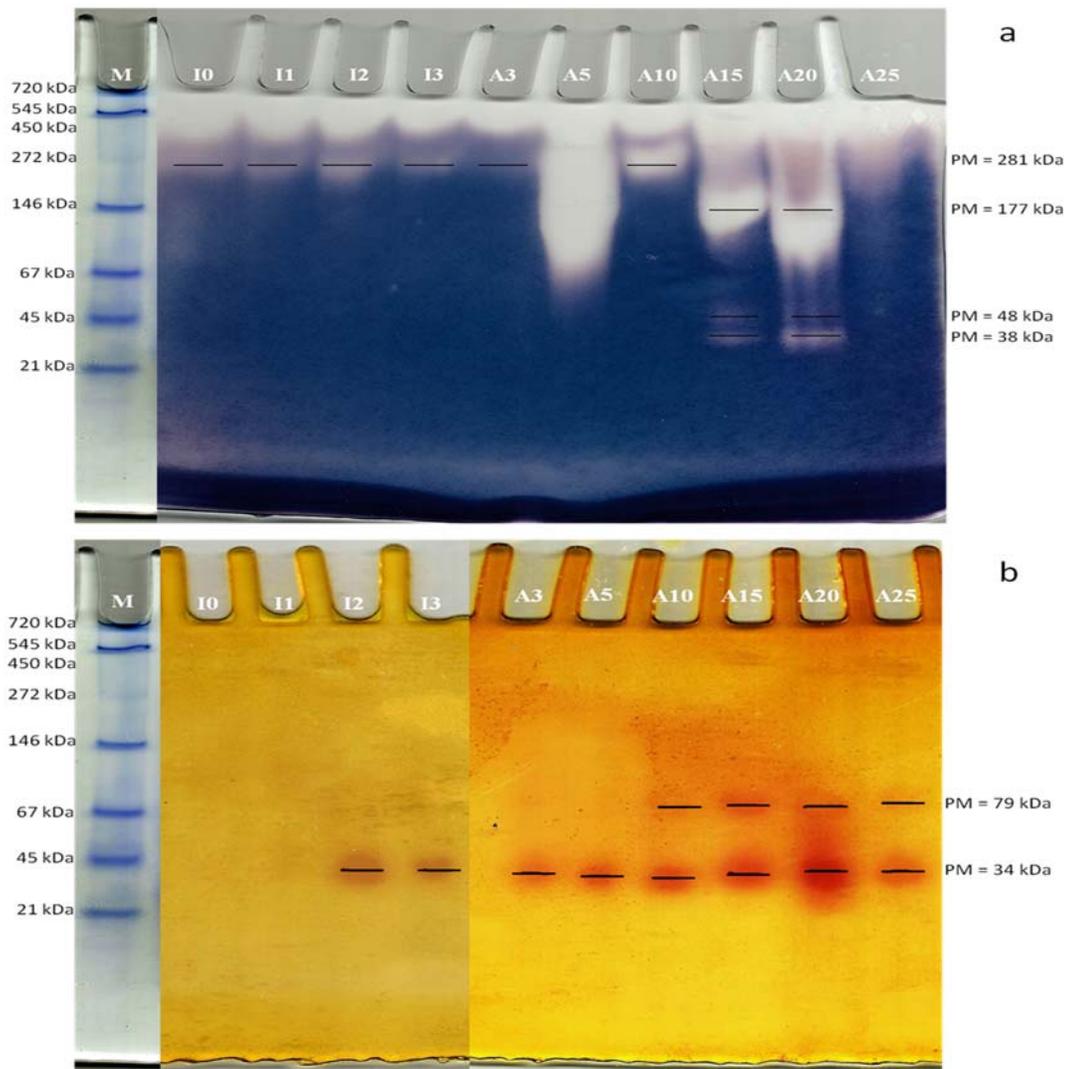
**Figura 9.** Actividad enzimática específica (Unidades mg proteína<sup>-1</sup>) (●) e individual (Unidades larva<sup>-1</sup>) (○) durante el desarrollo larval del pargo lunarejo *L. guttatus*. (a) tripsina, (b) quimotripsina, (c) leucina aminopeptidasa, (d) pepsina. Línea vertical punteada indica el momento de la alimentación exógena. Cada punto representa la media ( $n = 3$  extracto), las barras verticales = desv. est. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los días de desarrollo, para cada tipo de actividad.

### **VIII.3. Caracterización de la actividad enzimática digestiva**

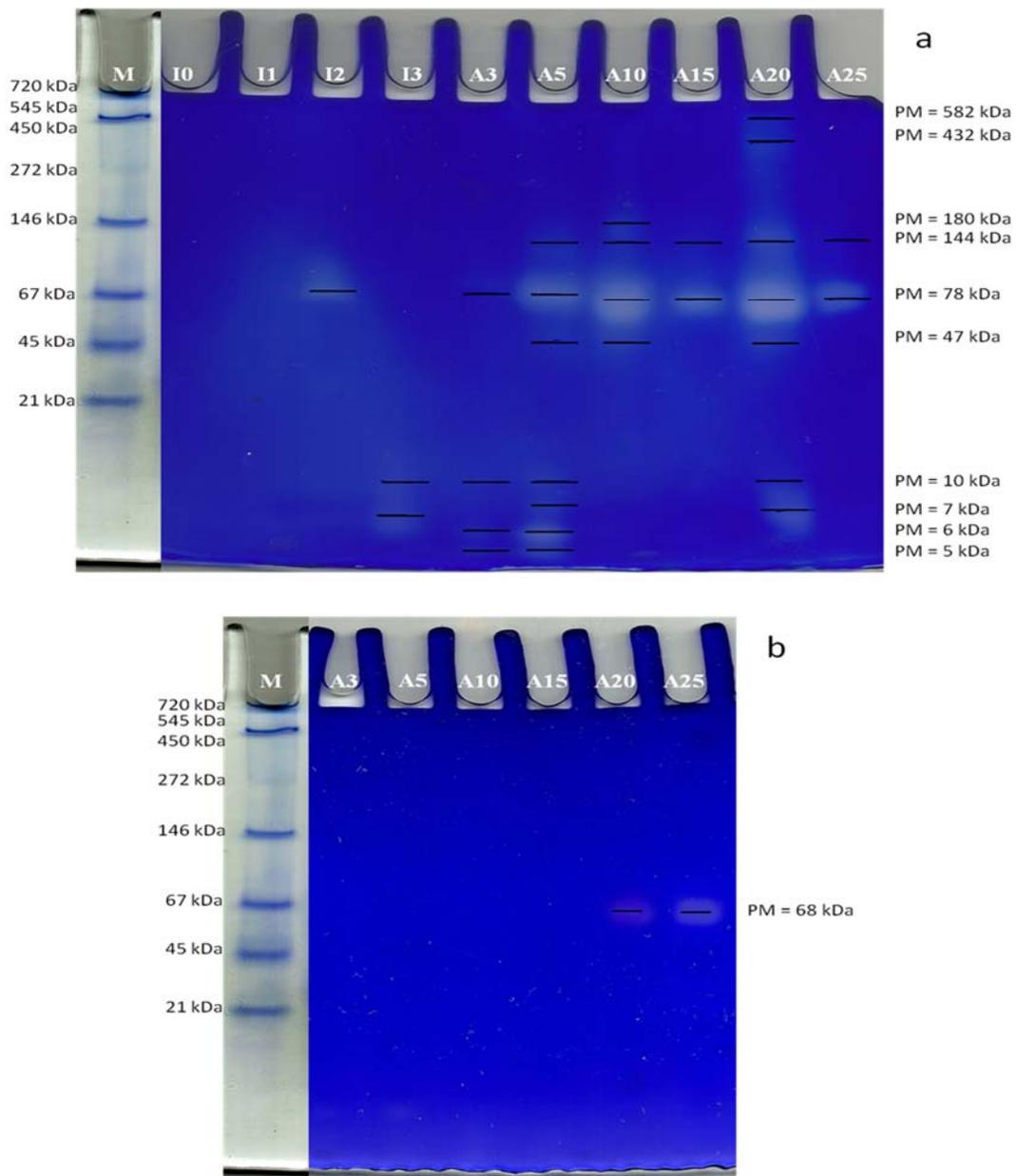
Se obtuvieron zimogramas de la actividad  $\alpha$ -amilasa, lipasa, proteasa alcalina y proteasa ácida. El zimograma de actividad  $\alpha$ -amilasa mostró una banda de elevado peso molecular (281 kDa) desde la eclosión, la cual se mantuvo hasta los 10 DDE. A los 15 y 20 DDE se registraron tres bandas de actividad amilolítica una de 177 kDa y dos de bajo peso molecular (48 y 38 kDa). Sin embargo, a los 25 DDE no se registraron bandas de actividad para ésta enzima (Fig. 10a).

El zimograma de actividad lipasa reveló la presencia de dos bandas de actividad. La primera con un peso molecular de 34 kDa y que incrementó su actividad a lo largo del desarrollo, desde el día 2 hasta el día 25 después de la eclosión. La segunda banda, con un mayor peso molecular (79 kDa), se evidenció desde el día 10 hasta el día 25 después de la eclosión (Fig. 10b).

El zimograma de proteasas alcalinas reveló diversas bandas de actividad a lo largo del desarrollo de las larvas, con pesos moleculares que van desde 5 a 582 kDa (Fig. 11a). Dos bandas permanecieron relativamente constantes, la primera con un peso molecular de 144 kDa que apareció desde los 5 DDE y se siguió observando hasta los 25 DDE; y la segunda, de 78 kDa, que apareció desde el día 2 hasta los 25 DDE. A 20 DDE se presentó el mayor número de bandas. En el caso de la actividad proteasa ácida, se observó una sola banda de 68 kDa a los 20 y 25 DDE, la cual incrementó en intensidad conforme avanzó el desarrollo (Fig. 11b).



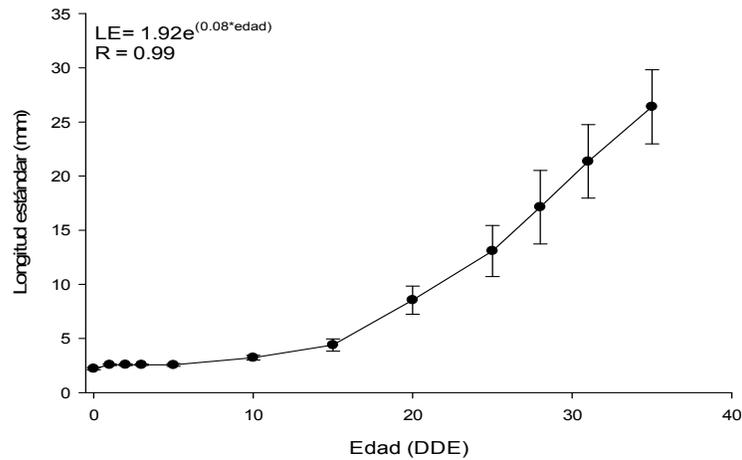
**Figura 10.** Zimogramas de la ontogenia de la actividad  $\alpha$ -amilasa (a) y lipasa (b) en geles de poliacrilamida en gradiente (4 - 20%) en condiciones nativas durante el desarrollo larval del pargo lunarejo *L. guttatus*. M: marcador de peso molecular en kDa. Los números superiores indican los días después de la eclosión. Las líneas horizontales destacan el lugar de acción de la enzima.



**Figura 11.** Zimogramas de la ontogenia de la actividad proteasa alcalina (a) y proteasa ácida (b) en geles de poliacrilamida en gradiente (4 - 20%) en condiciones nativas durante el desarrollo larval del pargo lunarejo *L. guttatus*. M: marcador de peso molecular en kDa. Los números superiores indican los días después de la eclosión. Las líneas horizontales destacan el lugar de acción de la enzima.

#### VIII.4. Expresión genética de enzimas digestivas y factores reguladores de la digestión

Las larvas del segundo desove se muestrearon para evaluar los niveles de expresión genética de enzimas digestivas y de factores reguladores de la digestión; así como para analizar el efecto del destete sobre la expresión genética de las enzimas digestivas, CCK y NPY. En dicho desove se observó un crecimiento de las larvas que se ajustó al modelo exponencial, alcanzando una longitud estándar máxima de  $26.41 \pm 3.42$  mm 35 DDE (Fig. 12). El saco vitelino se absorbió completamente entre los 2 y 3 DDE.



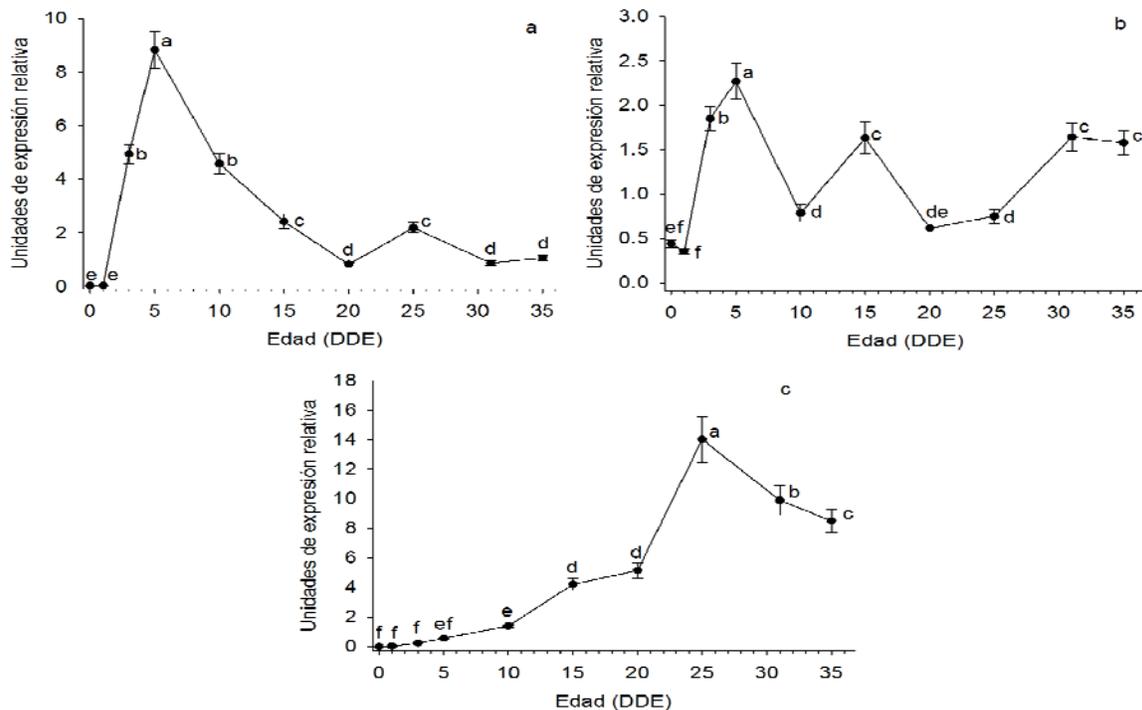
**Figura 12.** Longitud estándar (mm) de las larvas de pargo lunarejo *L. guttatus* de 0 a 35 días después de la eclosión (DDE). Cada punto representa la media ( $n = 15$ ), las barras verticales = desv. est.

Se registraron, desde la eclosión, las transcripciones de todas las enzimas digestivas con excepción de la pepsina y de los factores reguladores de la digestión. La expresión de todas las enzimas digestivas fue baja durante el periodo de alimentación endógena (0 - 2 DDE) mientras que después del día 2 DDE, su expresión aumentó y fluctuó a lo largo del desarrollo larval.

La expresión de  $\alpha$ -amilasa incrementó significativamente ( $p < 0.05$ ) desde la eclosión hasta 5 DDE, donde se alcanzó la máxima expresión relativa de éste gen

( $8.82 \pm 0.69$  UER), seguido de un decremento progresivo hasta el final del periodo larvario (Fig. 13a).

El ARNm de las enzimas lipasa y fosfolipasa A fueron relativamente bajos en las larvas con saco vitelino de 0 a 1 DDE ( $0.35 \pm 0.02$  y  $0.008 \pm 0.001$  UER, respectivamente). Los niveles de expresión lipasa incrementaron al día 5, con un pico de expresión de  $2.26 \pm 0.2$  UER ( $p < 0.05$ ). Otro pico de expresión lipasa se detectó a los 15 DDE ( $1.63 \pm 0.17$  UER). Posteriormente, los valores relativos de expresión de lipasa disminuyeron entre 20 y 25 DDE, y se incrementaron entre los 30 y 35 DDE ( $p < 0.05$ ) (Fig. 13b). Por otra parte, la expresión fosfolipasa A fue baja durante los primeros 10 DDE e incrementó progresivamente hasta un pico máximo 25 DDE ( $14.01 \pm 1.55$  UER), seguido de un decremento en la expresión hasta el final del experimento ( $p < 0.05$ ) (Fig. 13c).



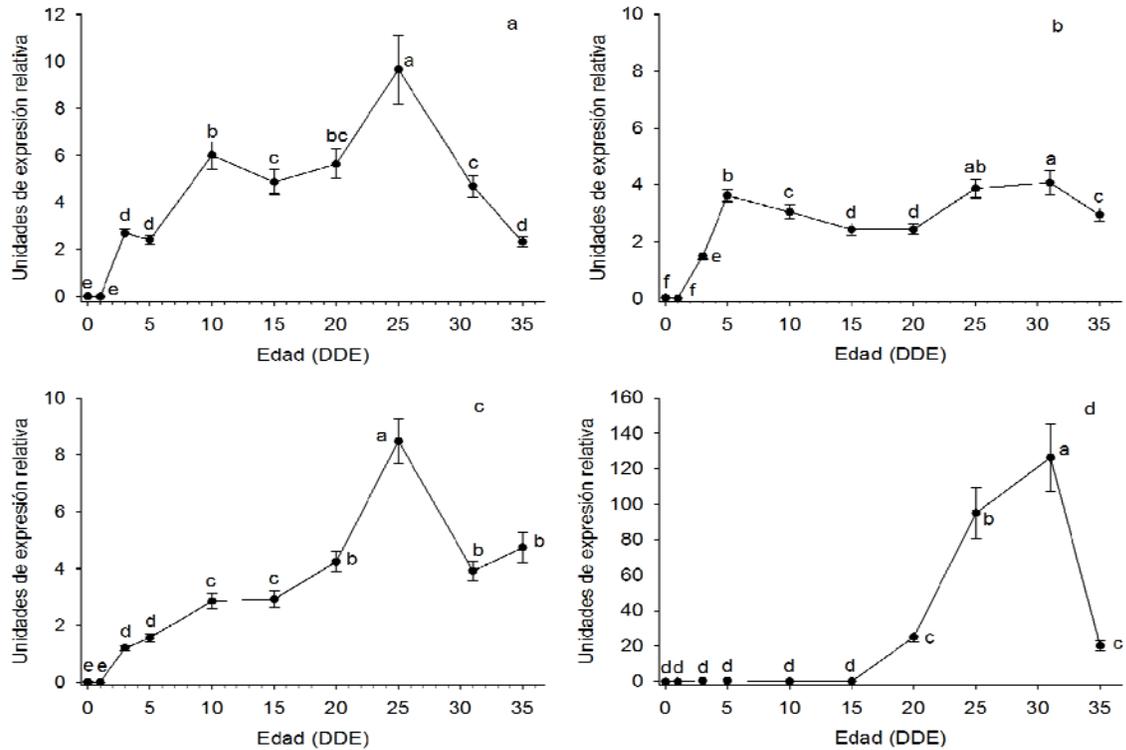
**Figura 13.** Expresión genética relativa de las enzimas digestivas  $\alpha$ -amilasa (a), lipasa (b) y fosfolipasa A (c) durante el desarrollo larval del pargo lunarejo *L. guttatus* (media  $\pm$  error estándar,  $n = 3$  pool larvario). Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

Las proteasas alcalinas tripsina y quimotripsina se detectaron durante todo el desarrollo larval. La expresión relativa de tripsina fue baja durante los primeros 2 DDE, después se incrementó progresivamente hasta los 25 DDE ( $9.65 \pm 1.46$  UER). Después de este pico en la expresión, se registró una disminución significativa ( $p < 0.05$ ) de la misma (alrededor del 80%) a los 35 DDE ( $2.32 \pm 0.21$  UER) (Fig. 14a).

En el caso de la enzima quimotripsina, se encontraron dos isoformas (1 y 2), mostrando diferentes patrones de expresión durante el desarrollo larval. La expresión de quimotripsina 1 fue baja durante los primeros 2 DDE ( $0.02 \pm 0.004$  UER) y aumentó significativamente ( $p < 0.05$ ) hasta el día 5 DDE ( $3.61 \pm 0.21$  UER), posteriormente se redujo ligeramente hasta el día 20 DDE ( $2.43 \pm 0.18$  UER) y volvió a aumentar entre 25 y 30 DDE ( $3.87 \pm 0.33$  y  $4.07 \pm 0.42$  UER, respectivamente). A los 35 DDE, la expresión de la quimotripsina 1 disminuyó 27% con respecto a los valores registrados al día 30 de DDE (Fig. 14b).

La expresión de la quimotripsina 2 aumentó progresivamente desde el día 1 DDE ( $6.34 \times 10^{-3} \pm 5.78 \times 10^{-4}$  UER) hasta alcanzar un pico máximo a los 25 DDE ( $8.49 \pm 0.76$  UER) ( $p < 0.05$ ). Después del día 25, la expresión quimotripsina 2 se redujo y se mantuvo constante hasta el final del estudio a los 35 DDE ( $3.92 \pm 0.34$  UER y  $4.73 \pm 0.53$  UER, respectivamente,  $p > 0.05$ ) (Fig. 14c).

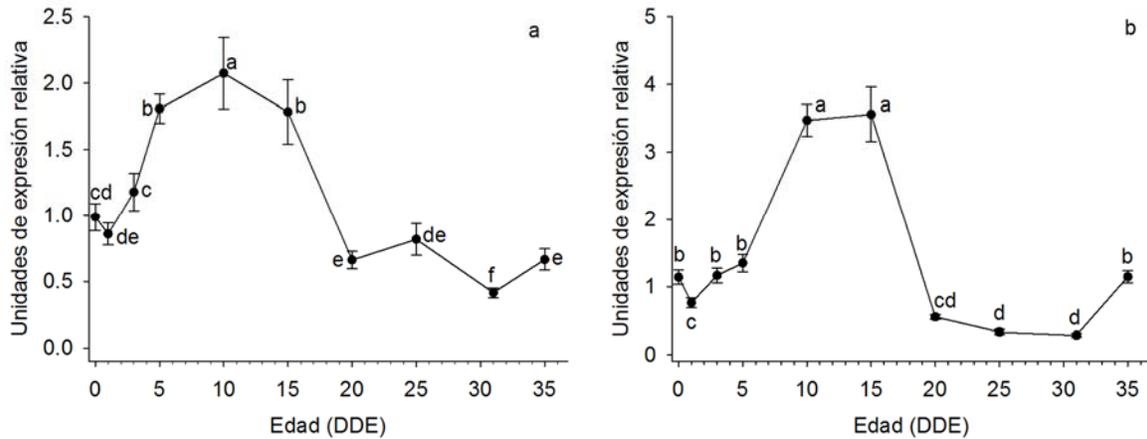
Durante los primeros 15 DDE se registró una baja expresión de pepsina que va de  $7.25 \times 10^{-3} \pm 1.68 \times 10^{-3}$  hasta  $0.52 \pm 0.06$  UER. La expresión de ésta enzima comenzó a incrementar significativamente ( $p < 0.05$ ) a los 20 DDE ( $25.05 \pm 2.61$  UER), alcanzando un máximo a los 30 DDE ( $126.34 \pm 19.29$  UER). Posteriormente, los niveles de expresión disminuyeron considerablemente (85%) a los 35 DDE ( $20.16 \pm 2.58$  UER) (Fig. 14d).



**Figura 14.** Expresión genética relativa de las enzimas digestivas tripsina (a), quimotripsina 1 (b), quimotripsina 2 (c) y pepsina (d) durante el desarrollo larval del pargo lunarejo *L. guttatus* (media  $\pm$  error estándar,  $n = 3$  pool larvario). Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

Los patrones de expresión de los factores reguladores de la digestión, la hormona colecistoquinina (CCK) y del neuropéptido Y (NPY), fueron similares independientemente de sus diferentes funciones. La expresión de la CCK fue de alrededor de  $1.01 \pm 0.11$  UER durante los primeros 3 DDE, y se incrementó progresivamente hasta los 10 DDE, alcanzando un valor máximo en la expresión génica relativa ( $2.07 \pm 0.27$  UER). Posteriormente, la expresión disminuyó hasta los 20 DDE ( $0.66 \pm 0.06$  UER) y se mantuvo constante hasta el final del estudio a los 35 DDE (Fig. 15a). En el caso de NPY, la expresión fue baja al inicio del desarrollo y aumentó significativamente ( $p < 0.05$ ) a los 10 y 15 DDE ( $3.47 \pm 0.23$  y  $3.56 \pm 0.40$

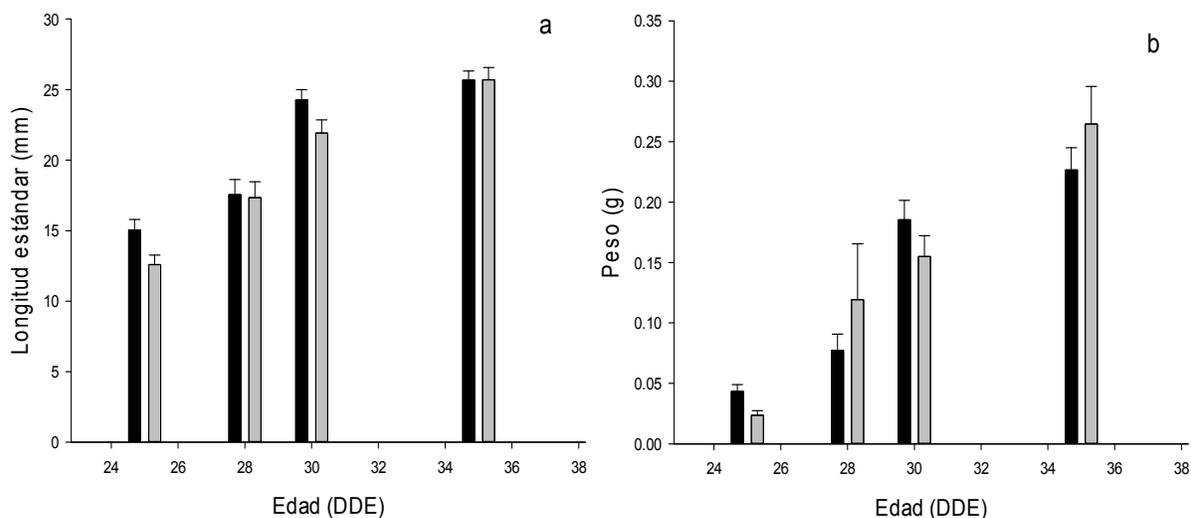
UER, respectivamente), seguido por una disminución significativa ( $p < 0.05$ ) en la expresión desde los 20 a los 35 DDE (Fig. 15b).



**Figura 15.** Expresión genética relativa de la hormona colecistoquinina (a) y del neuropéptido Y (b) durante el desarrollo larval del pargo lunarejo *L. guttatus* (media  $\pm$  error estándar,  $n = 3$  pool larvario). Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

### VIII.5. Efecto del destete en la expresión de enzimas digestivas y factores reguladores de la digestión.

Se compararon los pesos (g) y las longitudes estándar (mm) de las larvas alimentadas con *Artemia* y de las larvas a las que se sometió al destete, no encontrándose diferencias significativas entre ambos tratamientos a lo largo del experimento (Fig. 16). Los porcentajes de supervivencia de los tratamientos fueron de 63% para las larvas alimentadas con *Artemia* y de 54% para las que fueron alimentadas con una dieta artificial.



**Figura 16.** Longitud estándar (a) y peso (b) de las larvas de pargo lunarejo *L. guttatus* durante el destete. Las barras negras representan las larvas alimentadas con dieta microparticulada y las barras grises a las alimentadas con *Artemia* ( $n = 20$ , promedio  $\pm$  error est.).

La expresión relativa de todas las enzimas digestivas analizadas se vio afectada con el cambio de alimento vivo a alimento inerte entre los 25 y 35 DDE ( $p < 0.05$ ) (Tabla VIII), con excepción de la quimotripsina 2, la cual no mostró diferencias significativas en la expresión de genes entre los dos tratamientos. En el primer día del destete (25 DDE), no se observaron diferencias significativas en las expresiones de las enzimas digestivas entre las larvas alimentadas con *Artemia* (AV) y las larvas sometidas al destete (D) ( $p > 0.05$ ). Sin embargo, entre 28 y 30 DDE (3 y 5 días después del comienzo del destete, respectivamente), la expresión relativa de  $\alpha$ -amilasa, fosfolipasa A, tripsina y quimotripsina 1 de los peces del grupo D fue significativamente mayor que la registrada en los del grupo AV ( $p < 0.05$ ). Al final del periodo de destete, la expresión relativa de lipasa en los peces del grupo AV fue mayor que en los animales alimentados con microdieta ( $1.58 \pm 0.09$  vs.  $0.91 \pm 0.21$  UER en 30 DDE y  $1.41 \pm 0.01$  vs.  $0.59 \pm 0.01$  UER a 35 DDE). La expresión relativa enzimática de pepsina varió durante el período de destete, mientras que las UER

fueron mayores en los peces del grupo D en comparación con los del grupo AV a los 28 y 35 DDE ( $p < 0.05$ ); sin embargo, no se registraron diferencias significativas en las UER entre ambos grupos a los 25 y 30 DDE ( $p > 0.05$ ).

En contraste con la expresión de las enzimas digestivas, no se encontraron diferencias significativas en la expresión relativa de CCK y NPY entre los dos grupos experimentales (Tabla IX) durante ningún momento del periodo de destete.

**Tabla VIII.** Expresión génica relativa de las enzimas digestivas de larvas de pargo lunarejo *L. guttatus* comparando larvas alimentadas con *Artemia* (AV) y dieta inerte (D) (media  $\pm$  error estándar,  $n = 2$  pool larvario). Letras diferentes denotan diferencias significativas entre los tipos de alimento de cada expresión enzimática ( $p < 0.05$ ).

Enzima	25 DDE		28 DDE		30 DDE		35 DDE	
	AV	D	AV	D	AV	D	AV	D
<b><math>\alpha</math>-amilasa</b>	1.43 $\pm 0.19$	1.32 $\pm 0.15$	0.83 $\pm 0.03^b$	2.29 $\pm 0.15^a$	0.48 $\pm 0.02^b$	1.11 $\pm 0.01^a$	0.61 $\pm 0.01$	0.85 $\pm 0.01$
<b>Lipasa</b>	0.58 $\pm 0.07$	0.76 $\pm 0.31$	1.28 $\pm 0.16$	1.63 $\pm 0.15$	1.58 $\pm 0.09^a$	0.91 $\pm 0.21^b$	1.41 $\pm 0.01^a$	0.59 $\pm 0.01^b$
<b>Fosfolipasa A</b>	0.68 $\pm 0.17$	1.19 $\pm 0.04$	1.36 $\pm 0.53^b$	2.21 $\pm 0.12^a$	0.95 $\pm 0.28^b$	2.51 $\pm 0.24^a$	0.56 $\pm 0.01$	0.35 $\pm 0.05$
<b>Tripsina</b>	1.03 $\pm 0.28$	2.11 $\pm 0.50$	1.87 $\pm 0.24^b$	3.62 $\pm 0.56^a$	0.69 $\pm 0.06$	1.16 $\pm 0.31$	0.34 $\pm 0.03$	0.27 $\pm 0.00$
<b>Quimotripsina 1</b>	1.01 $\pm 0.13$	1.04 $\pm 0.13$	1.06 $\pm 0.15^b$	1.94 $\pm 0.22^a$	0.82 $\pm 0.11^b$	1.68 $\pm 0.36^a$	0.68 $\pm 0.00$	0.51 $\pm 0.01$
<b>Quimotripsina 2</b>	1.24 $\pm 0.18$	1.61 $\pm 0.34$	1.72 $\pm 0.14$	2.06 $\pm 0.53$	0.76 $\pm 0.11$	1.27 $\pm 0.14$	0.76 $\pm 0.01$	0.21 $\pm 0.00$
<b>Pepsina</b>	0.73 $\pm 0.14$	0.72 $\pm 0.30$	0.81 $\pm 0.14^b$	2.79 $\pm 0.12^a$	1.81 $\pm 0.51$	1.71 $\pm 0.67$	0.21 $\pm 0.01^b$	1.57 $\pm 0.01^a$

**Tabla IX.** Expresión genética relativa de la hormona colecistoquinina (CCK) y del neuropéptido Y (NPY) de larvas de pargo lunarejo *L. guttatus* comparando larvas alimentadas con *Artemia* (AV) y dieta inerte (D) (media  $\pm$  error estándar,  $n = 2$  pool larvario). No se observan diferencias significativas entre los tipos de alimento de cada expresión génica ( $p < 0.05$ ).

Enzima	25 DDE		28 DDE		30 DDE		35 DDE	
	AV	D	AV	D	AV	D	AV	D
<b>CCK</b>	1.51 $\pm 0.37$	1.31 $\pm 0.37$	0.95 $\pm 0.18$	1.36 $\pm 0.32$	0.76 $\pm 0.17$	0.41 $\pm 0.05$	0.93 $\pm 0.01$	1.56 $\pm 0.08$
<b>NPY</b>	0.54 $\pm 0.01$	0.58 $\pm 0.32$	1.54 $\pm 0.78$	1.43 $\pm 0.27$	0.55 $\pm 0.06$	0.93 $\pm 0.02$	1.97 $\pm 0.04$	2.05 $\pm 0.04$

## IX. DISCUSIÓN

El período larval es considerado como uno de los períodos críticos dentro del desarrollo de los peces, representa una etapa de transición en el que ocurren importantes cambios, tanto morfológicos como fisiológicos en todos los órganos y sistemas, encaminados a asegurar su supervivencia. Dentro de ellos, la función digestiva ha tenido mayor atención debido a su impacto directo en la acuicultura.

El desarrollo del presente trabajo ha permitido conocer más a fondo la fisiología digestiva del pargo lunarejo. A continuación se presenta una discusión particular sobre cada uno de los tres aspectos digestivos estudiados en la presente tesis (desarrollo del tubo digestivo; actividad, expresión y caracterización enzimática y factores reguladores de la digestión; y efecto del destete en la expresión de enzimas digestivas, CCK y NPY,) finalmente se presentará un esquema general de la funcionalidad digestiva del pargo lunarejo y las implicaciones de la misma sobre el cultivo de esta especie.

## IX.1. Desarrollo del tubo digestivo

Es evidente que el desarrollo del sistema digestivo presenta diferencias inter-específicas. La organogénesis del tracto digestivo y órganos asociados ha sido descrita en varias especies de peces marinos que viven tanto en aguas frías: *Scophthalmus maximus* (Segner *et al.*, 1994), *G. morhua*, *M. aeglefinus*, *H. hippoglossus* (Falk-Petersen, 2005); como en aguas templadas: *D. labrax* (Kamaci *et al.*, 2010a), *D. dentex* (Santamaría *et al.*, 2004), *P. maculatofasciatus* (Peña *et al.*, 2003), *Plectropomus leopardus* (Qu *et al.*, 2012), *D. puntazzo* (Kamaci *et al.*, 2010b), *Pagrus auriga* (Sánchez-Amaya *et al.*, 2007); entre otras. Estos autores mencionan que el tracto digestivo de los peces marinos comienza como un tubo recto e indiferenciado revestido de un epitelio simple, lo cual fue observado en el pargo lunarejo a los 0 y 1 DDE (alrededor de los 26 GD). Desde la eclosión hasta 2 días después de ésta (52 GD), la nutrición de las larvas de pargo lunarejo dependió exclusivamente de una fuente endógena. Algunos autores informan que la nutrición endógena en larvas de peces se produce por endocitosis del saco vitelino y glóbulo de aceite a través de un sincitio que rodea el saco vitelino (Peña *et al.*, 2003; Kamler, 2008).

Al comienzo de la alimentación exógena, entre 2 y 3 DDE (de 52 a 78 GD), el tracto digestivo se encuentra diferenciado anatómicamente, y se puede observar la cavidad bucofaríngea, el esófago, un estómago incipiente, el intestino anterior y posterior y finalmente el recto. Las glándulas accesorias, páncreas e hígado se observaron como un grupo de células indiferenciadas. Lo anterior ha sido reportado en otras especies como *P. maculatofasciatus* (Peña *et al.*, 2003), *Pagellus erythrinus* (Micale *et al.*, 2006), *Seriola lalandi* (Chen *et al.*, 2006) y *P. pagrus* (Darias *et al.*, 2007).

El esófago tiene un papel en la digestión pregástrica, el cual se caracterizó por presentar dos regiones en las larvas del pargo lunarejo, la primera compuesta por una gran cantidad de células caliciformes y la segunda por pliegues longitudinales los cuales tuvieron una reacción positiva a la técnica azul alciano-Schiff, denotando la presencia de mucopolisacáridos neutros y ácidos. El aumento en la secreción de glicoproteínas de las células caliciformes se ha relacionado con la lubricación y protección de la mucosa del esófago (Sarasquete *et al.*, 1995; Sánchez-Amaya *et al.*,

2007). La reacción positiva Schiff de las células caliciformes y de la mucosa epitelial observada en el pargo lunarejo, también ha sido reportada en otras especies como *S. aurata* (Sarasquete *et al.*, 1995), *P. auriga* (Sánchez-Amaya *et al.*, 2007) y *P. pagrus* (Darias *et al.*, 2007). Por su parte, Darias *et al.* (2007) mencionan que el micro alargamientos del epitelio esofágico funciona como protección contra los impactos mecánicos de los alimentos ingeridos, así como para facilitar el anclaje de la mucosa producida por las células caliciformes.

Las células caliciformes secretan moco para facilitar el paso de alimentos a través del esófago y protegen la mucosa frente a la degradación proteolítica mediante la neutralización de la acidez del estómago (Gisbert *et al.*, 2004; Micale *et al.*, 2006); en el intestino, además de servir de protección, facilitan la absorción de sustancias de fácil digestión (disacáridos y ácidos grasos de cadena corta) (Darias *et al.*, 2007). En el presente estudio, las células caliciformes se observaron por primera vez 1 DDE (26 GD) en el tracto digestivo, con un mayor número en la región anterior. Específicamente en el esófago, éstas células aparecieron alrededor del día 3 después de la eclosión (78 GD), lo que concuerda con el inicio de la alimentación exógena de las larvas de pargo lunarejo, así como en otras especies de peces marinos (Elbal *et al.*, 2004; Flak-Petersen, 2005; Chen *et al.*, 2006; Qu *et al.*, 2012). En el pargo lunarejo, la cantidad de células caliciformes en el esófago, el intestino medio y el intestino posterior aumentó considerablemente alrededor de día 25 después de la eclosión (650 GD), coincidiendo con la aparición de las glándulas gástricas en el estómago. Chen *et al.* (2006) en *S. lalandi*, observaron ésta relación en el incremento de las células caliciformes con la aparición de las glándulas gástricas a los 432 GD. Mencionan que debido a que el esófago se une al estómago, la secreción mucosa de las células caliciformes en el esófago también puede proteger al estómago de la degradación proteolítica.

En el pargo lunarejo, como en otras especies de peces (Elbal *et al.*, 2004; Darias *et al.*, 2007; Kamaci *et al.*, 2010a; Galaviz *et al.*, 2011), la transición del esófago al estómago se evidenció por la desaparición total de las células caliciformes. Un estómago incipiente se pudo observar en las larvas del pargo lunarejo alrededor de los 78 GD, así como en *P. maculatofasciatus* (Peña *et al.*,

2003), mientras que en *P. auriga* se observó a los 60 GD (Sánchez-Amaya *et al.*, 2007); en *S. lalandi* (Chen *et al.*, 2006) y *P. pagrus* (Darias *et al.*, 2007) a los 120 GD.

El momento de desarrollo de las glándulas gástricas varía entre especies. En el presente estudio éstas se observaron por primera vez a los 520 GD, concordando con lo reportado por Galaviz *et al.* (2012) para la misma especie; mientras que en *D. sargus* aparecen a los 260 GD (Ortiz-Delgado *et al.*, 2003); en *P. auriga* a los 320 GD (Sánchez-Amaya *et al.*, 2007); en *S. lalandi* a los 360 GD (Chen *et al.*, 2006); en *P. pagrus* a los 380 GD (Darias *et al.*, 2007); en *P. maculatofasciatus* (Peña *et al.*, 2003) y *D. dentex* a los 400 GD (Santamaría *et al.*, 2004); en *P. californicus* a los 414 GD (Gisbert *et al.*, 2004) y en *S. aurata* a los 1110 GD (Elbal *et al.*, 2004). La aparición de las glándulas gástricas marcó la formación de un estómago funcional, que es también un criterio histológico para diferenciar las larvas de juveniles (Peña *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2006).

Las secreciones de las glándulas gástricas, pepsinógeno y ácido clorhídrico, proporcionan una digestión extracelular preliminar seguida por el transporte a través de la membrana, lo cual sustituye los procesos menos eficientes de pinocitosis y digestión intracelular de las proteínas, ampliando así el espectro alimenticio de los peces (Ortiz-Delgado *et al.*, 2003). Según Segner *et al.* (1994) en *S. maximus* y Chen *et al.* (2006) en *S. lalandi*, el destete se puede lograr con éxito sólo después de que el estómago es funcional.

Existen diferencias inter-específicas en la localización de las glándulas gástricas en el estómago de los peces. En el caso del pargo lunarejo, éstas se encontraron específicamente en la región fúndica del estómago, lo mismo que en *S. maximus* (Segner *et al.*, 1994). Sin embargo, en otras especies de peces se encontraron glándulas gástricas en la región cardiaca del estómago, como en *D. sargus* (Ortiz-Delgado *et al.*, 2003), *S. aurata* (Elbal *et al.*, 2004) y *P. pagrus* (Darias *et al.*, 2007). En *P. auriga* (Sánchez-Amaya *et al.*, 2007) las glándulas gástricas se localizaron en las regiones cardiaca y fúndica del estómago, y en juveniles de *S. senegalensis* se concentraron en las zonas fúndica y pilórica (Arellano-Martínez *et al.*, 2001), mientras que en *P. erythrinus* (Micale *et al.*, 2006) se localizaron en todo el estómago. Tales diferencias inter-específicas en la localización de las glándulas

gástricas en el estómago sugieren diferentes estrategias para la alimentación y podrían deberse al tamaño de las presas (Ortiz-Delgado *et al.*, 2003; Micale *et al.*, 2006).

En las larvas de pargo lunarejo se observó una reacción Schiff positiva (mucopolisacáridos neutros) en la superficie de las células epiteliales gástricas, la cual se asemeja a la observada en los enterocitos intestinales. Ésta reacción fue observada también en larvas de *D. sargus* (Ortiz-Delgado *et al.*, 2003) y *P. pagrus* (Darias *et al.*, 2007). Las mucinas neutras sirven de protección contra los procesos de auto-digestión causados por el ácido clorhídrico y las enzimas secretadas por las glándulas gástricas (Darias *et al.*, 2007).

El intestino de las larvas de pargo lunarejo presentó numerosas microvellocidades que aumenta la superficie de absorción de los nutrientes. Se observó una reacción Schiff positiva en la parte apical de los enterocitos. Este resultado concuerda con los obtenidos en *S. aurata* (Sarasquete *et al.*, 1995), *D. sargus* (Ortiz-Delgado *et al.*, 2003), *P. auriga* (Sánchez-Amaya *et al.*, 2007).

La presencia de vacuolas en el intestino anterior se ha relacionado con el almacenamiento de lípidos. Después de la digestión luminal, los lípidos son absorbidos por los enterocitos como ácidos grasos y monoglicéridos. Dentro de los enterocitos, son resintetizados en triacilglicéridos, almacenados y transportados fuera de la célula como quilomicrones (Sarasquete *et al.*, 1995; Ortiz-Delgado *et al.*, 2003; Peña *et al.*, 2003). En el intestino anterior del pargo lunarejo, se observaron vacuolas negro de SUDAN positivas a lo largo del desarrollo larvario, las cuales se redujeron en número entre los 650 y 780 GD. En especies como *S. aurata* (Sarasquete *et al.*, 1995) y *P. maculatofasciatus* (Peña *et al.*, 2003) ésta reducción en el número y tamaño de las vacuolas se observó alrededor de los 288 y 375 GD, respectivamente. Estos autores mencionan que este evento se asocia con un aumento en el número de pequeñas partículas lipídicas, presumiblemente quilomicrones, en los espacios intercelulares, dando como resultado un aumento en la capacidad de los enterocitos para sintetizar lipoproteína.

Por otra parte, en el intestino posterior del pargo lunarejo aparecieron vacuolas alrededor del día 4 después de la eclosión (104 GD), lo que sugiere la

absorción de proteínas pinocíticas como se ha observado en varias especies de teleósteos, seguida por la digestión intracelular (Peña *et al.*, 2003; Elbal *et al.*, 2004; Falk-Petersen, 2005; Micale *et al.*, 2006; Kamaci *et al.*, 2010a; Kamaci *et al.*, 2010b; Galaviz *et al.*, 2011; Qu *et al.*, 2012). La actividad pinocítica y la digestión intracelular se han propuesto como el principal mecanismo de absorción de las proteínas durante el desarrollo temprano por la falta de un estómago funcional en las larvas (Govoni *et al.*, 1986). La reducción en el tamaño y número de las vacuolas en el intestino posterior con la aparición de las glándulas gástricas se puede considerar como un cambio en los mecanismos de digestión de las proteínas, debido a que se desarrolla una digestión ácida en el estómago, dando como resultado una reducción de la actividad pinocítica y la digestión intracelular por enzimas citosólicas en los enterocitos (Cahu y Zambonino-Infante, 2001; Chen *et al.*, 2006).

La formación de los ciegos pilóricos indican el último cambio importante del sistema digestivo en larvas de peces, los cuales aumentan el área para la digestión y la absorción de nutrientes sin aumentar el tamaño del intestino (Chen *et al.*, 2006). Los ciegos pilóricos y el intestino anterior son estructuralmente similares y tienen la misma función en la digestión. Éste órgano se observó completamente formado a los 25 DDE (650 GD) en el pargo lunarejo, 250 GD antes que lo reportado por Galaviz *et al.* (2012) para la misma especie.

El hígado y el páncreas en el pargo lunarejo se diferenciaron durante los primeros 2 DDE (52 GD). Algunos autores reportan en varias especies de teleósteos, que el páncreas y el hígado se diferencian de manera temprana, y a pesar de que continúan con su desarrollo, ya son funcionales (Sarasquete *et al.*, 1995; Peña *et al.*, 2003; Elbal *et al.*, 2004; Falk-Petersen, 2005; Micale *et al.*, 2006; Kamaci *et al.*, 2010a; Galaviz *et al.*, 2011; Qu *et al.*, 2012). La funcionalidad de estos dos órganos permite a las larvas digerir y asimilar el alimento durante la primera alimentación, cuando las reservas vitelinas y del glóbulo de aceite han sido absorbidas (Sarasquete *et al.*, 1995; Micale *et al.*, 2006). En el hígado de las larvas de pargo lunarejo se mostraron reacciones Schiff y negro de SUDAN positivas a los 10 DDE (260 GD) como un signo de almacenamiento de glucógeno y lípidos, respectivamente. Por su parte, Galaviz *et al.* (2012) encontraron inclusiones lipídicas

en el hígado hasta los 600 GD para esta especie. El almacenamiento de glucógeno y lípidos en el hígado se puede considerar como un signo de la aparición de la funcionalidad de los hepatocitos, que se mantiene a lo largo de las fases larvarias y juveniles (Peña *et al.*, 2003).

## **IX.2. Actividad, caracterización y expresión de enzimas digestivas, y expresión de factores reguladores de la alimentación**

La actividad y expresión enzimática digestiva en el pargo lunarejo está presente durante todo el desarrollo de las larvas. Resultados similares han sido reportados para otras especies (Martínez *et al.*, 1999; Douglas *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2001; García-Gasca *et al.*, 2006; Álvarez-González *et al.*, 2008; Shan *et al.*, 2009; Galaviz *et al.*, 2012). Sin embargo, existen diferencias en términos de intensidad y tiempo de aparición de ciertas enzimas, lo que puede explicarse ya sea como respuesta a cambios en condiciones del cultivo, en la composición y tipo de la dieta, o como consecuencia del crecimiento y desarrollo de nuevos órganos y tejidos, así como afinidad de las especies tropicales o templadas y diferencias interespecíficas (Martínez *et al.*, 1999; Uscanga-Martínez *et al.*, 2011).

Con excepción de la pepsina, las actividades y expresiones enzimáticas analizadas se detectaron desde la eclosión. Lo que significa que durante los primeros días de desarrollo las larvas de pargo lunarejo tienen la capacidad para digerir las proteínas, lípidos y carbohidratos que se encuentran en el saco vitelino y glóbulo de aceite. La presencia de enzimas digestivas en la eclosión y antes de la alimentación exógena se ha reportado en otras especies como *P. fluviatilis* (Cuvier-Péres y Kestemont, 2002), *P. californicus* (Álvarez-González *et al.*, 2006), *A. minor* (Savoie *et al.*, 2008), *D. dentex* (Gisbert *et al.*, 2009) y *S. aurata* (Naz, 2009). Algunos autores mencionan que las enzimas digestivas utilizadas para hidrolizar macronutrientes en el saco vitelino y glóbulo de aceite están genéticamente programadas para activarse antes de la apertura de la boca y el inicio de la alimentación exógena (Carnevali *et al.*, 2001; Cuvier-Péres y Kestemont, 2002; Lazo *et al.*, 2011). No obstante, durante el desarrollo larval la actividad y expresión de algunas enzimas digestivas puede

estar influenciada por la composición y el tipo de dieta, o como consecuencia del crecimiento de las larvas (Lazo *et al.*, 2011).

Las enzimas fosfatasas alcalina y ácida son hidrolasas implicadas en funciones como la hidrólisis del fosfato inorgánico para la producción de energía y en el transporte de nutrientes a través de la membrana celular, y su presencia en el tracto digestivo pueden indicar el desarrollo del borde de cepillo en los enterocitos (Martínez *et al.*, 1999; Ribeiro *et al.*, 1999; Shan *et al.*, 2009). En las larvas de pargo lunarejo, la actividad de ambas fosfatasas se detectó a partir de la eclosión. En *P. maculatofasciatus* (Peña *et al.*, 2003) se detectó la actividad de estas enzimas desde la eclosión en el borde de cepillo de los enterocitos utilizando histoquímica. Un patrón similar de actividad específica al encontrado en *L. guttatus*, ha sido reportado en larvas de especies como *M. aeglefinus* y *G. morhua* (Pérez-Casanova *et al.*, 2006), *P. maculatofasciatus* (Álvarez-González *et al.*, 2008) y *S. senegalensis* (Ribeiro *et al.*, 1999). Un incremento en la actividad de éstas enzimas durante el desarrollo larvario, como el observado en el pargo lunarejo a 20 días después de la eclosión, se ha asociado con un incremento en la capacidad de absorción de nutrientes en el intestino de las larvas de teleósteos (Segner *et al.*, 1989; Álvarez-González *et al.*, 2008; Lazo *et al.*, 2011). Sin embargo, se debe tener mesura en cuanto a la interpretación de la actividad fosfatasa alcalina obtenida para las larvas de pargo lunarejo. Lo anterior debido a que aparte de ser una enzima del borde de cepillo de los enterocitos, es una enzima que se produce en las células del hígado, músculo y otras partes del organismo (Villanueva *et al.*, 1997). Así, al utilizar homogenizados de toda la larva para la cuantificación de la actividad de esta enzima, como se hizo en el presente trabajo, se puede estar sobreestimando dicha actividad. Por lo cual, para utilizar la actividad fosfatasa alcalina como marcador del grado de madurez del sistema digestivo, se recomienda purificar el borde de cepillo de los enterocitos, y así evitar esta sobreestimación.

Las larvas de pargo lunarejo presentaron una actividad  $\alpha$ -amilasa alta durante los primeros 5 DDE (130 GD), mientras que se observó una disminución notable durante el resto del desarrollo. Una elevada actividad  $\alpha$ -amilasa durante el desarrollo temprano se ha observado también en especies como *D. labrax* (Cahu y Zambonino-

Infante, 1994) y *S. aurata* (Moyano *et al.*, 1996), y la fuerte disminución de la actividad de ésta enzima ha sido reportada en larvas de *S. senegalensis* (Martínez *et al.*, 1999) y *P. maculatofasciatus* (Álvarez-González *et al.*, 2008). Por su parte, la expresión  $\alpha$ -amilasa presentó el mismo patrón que la actividad enzimática, concordando con lo reportado en *D. labrax* (Cahu y Zambonino-Infante, 2001), *P. californicus* (Álvarez-González *et al.*, 2006), *Cichlasoma urophthalmus* (López-Ramírez *et al.*, 2011) y *Labrus bergylta* (Hansen *et al.*, 2013). Lo anterior puede ser indicativo de los hábitos carnívoros de la especie y puede reflejar requerimientos nutricionales bajos para los carbohidratos en las etapas posteriores del desarrollo de las larvas (Zambonino-Infante y Cahu 2001).

Este patrón en la expresión y actividad de la  $\alpha$ -amilasa sugiere que durante los primeros días de desarrollo, las larvas tienen la capacidad de utilizar los carbohidratos. Cahu y Zambonino-Infante (2001) mencionan que la  $\alpha$ -amilasa es un ejemplo de la influencia de la edad en la expresión de enzimas pancreáticas, ya que la actividad específica de ésta enzima es muy alta durante los primeros estadios larvarios y disminuye durante el desarrollo. La disminución coordinada entre la actividad específica y los niveles de ARNm de  $\alpha$ -amilasa sugieren una regulación transcripcional de la expresión de  $\alpha$ -amilasa durante el desarrollo larval y por lo tanto esta disminución puede estar programada genéticamente (Péres *et al.*, 1996).

La lipasa y fosfolipasa A2 constituyen las principales enzimas lipolíticas hasta ahora estudiadas en las larvas de peces (Zambonino Infante y Cahu, 2007). La lipasa cataliza una amplia gama de lípidos neutros de la dieta, mientras que las fosfolipasa A2 cataliza la hidrólisis del enlace éster de los ácidos grasos en la posición *sn*-2 de los fosfolípidos (Kortner *et al.*, 2011b).

La presencia de actividad y expresión lipasa antes del inicio de la alimentación exógena ha sido ampliamente reportado en larvas de peces marinos (Martínez *et al.*, 1999; Murray *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2006; Darias *et al.*, 2007; Gisbert *et al.*, 2009; Shan *et al.*, 2009). En el caso del pargo lunarejo, un patrón similar de actividad específica lipasa ha sido reportado en larvas de *S. lalandi* (Chen *et al.*, 2006), *P. californicus* (Álvarez-González *et al.*, 2006), *P. maculatofasciatus* (Álvarez-González *et al.*, 2008) y *Miichthys miui* (Shan *et al.*, 2009) en los que hay mayor actividad al

inicio de la alimentación exógena y un descenso drástico al día siguiente para posteriormente, incrementar su actividad. Por otra parte, el incremento en la actividad lipasa entre los 10 y 30 DDE (260-780 GD) concuerda con la aparición de una nueva banda en el zimograma de actividad lipolítica, con un peso molecular de 79 kDa, la cual continuó durante todo el desarrollo junto con la observada (34 kDa) desde el día 2 después de la eclosión (52 GD). Lo anterior concuerda con lo observado por Álvarez-González *et al.* (2008) en *P. maculatofasciatus*, ya que presentó dos bandas de actividad lipolítica con pesos moleculares ligeramente superiores (93 y 57 kDa) a las reportadas en el presente trabajo.

La expresión de lipasas en las larvas de pargo lunarejo muestra un patrón parecido a la actividad específica. Estas fluctuaciones en la expresión y actividad lipasa han sido reportados en otras especies de teleósteos, argumentando que pueden estar relacionadas con las variaciones en el tipo de alimento y en el crecimiento de las larvas (Zambonino Infante y Cahu 2001; Murray *et al.*, 2003; Saele *et al.*, 2010).

Los elevados niveles de expresión y actividad lipasa durante el período de alimentación endógena de *L. guttatus* pueden ser debido a la acción de esta enzima sobre los triacilglicéridos presentes en el glóbulo de aceite. Algunos autores mencionan que la digestión de los lípidos durante el desarrollo larval depende de la actividad de dos tipos de lipasas dependientes de sales biliares: el primer tipo se activa durante el desarrollo embrionario para digerir los lípidos en el saco vitelino y el aceite de glóbulo; y el segundo es secretado por el páncreas para digerir los lípidos del alimento (Bouchet *et al.*, 2000; Díaz *et al.*, 2002). En el presente estudio, se utilizó un ácido graso de cadena mediana como sustrato para evaluar la actividad lipasa; Álvarez-González *et al.* (2006) utilizaron el mismo sustrato para evaluar la actividad de la lipasa en larvas de *P. maculatofasciatus* y sugieren que una determinación más precisa de la actividad de ésta enzima podría lograrse mediante el uso de sustratos naturales. Además, se ha reportado que una parte significativa de la actividad lipasa proviene de otros tejidos larvales y no sólo del tracto digestivo, principalmente cuando se utiliza la homogenización de todo el cuerpo, como en el presente estudio,

lo cual puede resultar en una sobreestimación de la capacidad digestiva lipasa de las larvas (Oozeki y Bailey, 1995; Martínez *et al.*, 1999; Pérez-Casanova *et al.*, 2006).

Por otro lado, la enzima fosfolipasa A2 incrementa su expresión el día 10 después de la eclosión (260 GD), lo que concuerda con el comienzo del suministro de rotíferos enriquecidos con SELCO como alimento para las larvas; y continúa así hasta el final del desarrollo larvario. Este incremento en la expresión se encuentra relacionado con el cambio de fosfolípidos en la dieta, ya que ésta enzima se encuentra regulada por el tipo de alimento. Lo anterior fue observado por Cahu *et al.* (2003) en *D. labrax* suministrando dietas con diferentes niveles de fosfolípidos.

Al igual que otras larvas de peces marinos durante los primeros días de desarrollo, *L. guttatus* no presenta un estómago funcional y por lo tanto no hay secreción de ácido clorhídrico ni pepsina. Así, la hidrólisis de proteínas se inicia en el intestino en un ambiente alcalino por la actividad de proteasas alcalinas que son secretadas por el páncreas al lumen intestinal (Cuvier-Péres y Kestemont, 2002; García-Gasca *et al.*, 2006; Álvarez-González *et al.*, 2008; Shan *et al.*, 2009; Lazo *et al.*, 2011).

En el caso de *L. guttatus*, las actividades específica e individual de tripsina fueron evidentes desde la eclosión y aumentaron continuamente durante el desarrollo larvario, alcanzando un pico máximo a los 30 DDE (780 GD). Por su parte, la expresión de ésta enzima registró un patrón similar a la actividad con un pico a los 25 DDE (650 GD), 5 días antes que el máximo de actividad. El mismo patrón fue observado por Galaviz *et al.* (2012) en esta especie, aunque los valores reportados fueron ligeramente diferentes, posiblemente debido a diferencias con respecto al horario de alimentación, el tipo de alimento o condiciones de cultivo. Contrariamente a este patrón, varios estudios han reportado niveles fluctuantes de actividad de la tripsina durante el desarrollo con una disminución en la tercera o cuarta semana de desarrollo (Martínez *et al.*, 1999; Cuvier-Péres y Kestemont 2002; Chen *et al.*, 2006; Álvarez-González *et al.*, 2008; Shan *et al.*, 2009). Estas fluctuaciones en el patrón de actividad de la tripsina se han relacionado con una respuesta a los cambios en la cantidad y la composición del alimento vivo y los cambios en el metabolismo de las larvas (Zambonino-Infante y Cahu 2001).

La actividad específica de la quimotripsina fluctuó durante el desarrollo de las larvas de pargo lunarejo. El primer pico en la actividad se registró a los 5 DDE (130 GD). Resultados similares fueron reportados en larvas del tambor rojo *S. ocellatus*, lo que sugiere que está asociada con el comienzo de la alimentación exógena y contribuye con la digestión de proteínas en las larvas, compensando la ausencia de un estómago funcional y actividad pepsina (Applebaum *et al.*, 2001). En cuanto a la expresión, se encontraron dos isoformas. La expresión quimotripsina 1 permaneció relativamente constante durante todo el desarrollo y la quimotripsina 2 presentó el mismo patrón de expresión que la tripsina con un pico a los 25 DDE (650 GD). La presencia de isoformas enzimáticas en larvas de peces ha sido reportada previamente y se ha sugerido que existen diferencias temporales en las expresiones de esas isoformas. Lazo *et al.* (2011) mencionan, por ejemplo, que la enzima tripsina en *P. americanus* muestra tres isoformas. La expresión de la tripsina 2 se detectó desde el día 5 después de la eclosión (50 GD), mientras que los niveles de expresión de la tripsina 1 sólo fueron significativos en estadios larvarios tardíos y durante la metamorfosis y la expresión de la tripsina 3 se observó después de 20 DDE (200 GD) (Murray *et al.*, 2004). Aún no se conoce si estas diferencias ontogénicas en la expresión de las isoformas tienen implicaciones funcionales para la digestión de las proteínas, por lo que se deben realizar más estudios para dilucidar dónde y cuándo aparecen las distintas isoformas (Lazo *et al.*, 2011), como es el caso de las encontradas en el presente estudio.

La actividad específica leucina aminopeptidasa estuvo presente desde la eclosión y aumentó gradualmente hasta 20 DDE (520 GD), momento en el que se observó una disminución hasta el día 30 DDE (780 GD). Este patrón también se observó en larvas de *Petenia splendida* (Uscanga-Martínez *et al.*, 2011) y *P. maculatofasciatus* (Álvarez-González *et al.*, 2008). El aumento en la actividad leucina aminopeptidasa se ha asociado con la presencia de alimento en el tracto digestivo, y este patrón general de actividad con una disminución después de la aparición de la pepsina son indicativos de un mayor eficiencia en el proceso de absorción de los enterocitos (Zambonino-Infante y Cahu, 2001).

La aparición de la enzima digestiva pepsina señala el inicio de la digestión ácida de las proteínas en el estómago después de la formación de las glándulas gástricas, y ha sido considerada como un cambio importante hacia una digestión tipo adulto ya que el tracto digestivo se encuentra plenamente desarrollado (Peña *et al.*, 2003). En el presente estudio, la expresión y actividad pepsina se detectó por primera vez a los 20 DDE (520 GD) y 25 DDE (650 GD), respectivamente, a una temperatura de cultivo de  $26.7 \pm 0.21$  °C. En un estudio previo en larvas de pargo lunarejo, Galaviz *et al.* (2012) registraron la expresión de la pepsina 18 DDE (540 GD) y la actividad 20 DDE (600) a una temperatura entre 29 y 30 °C. Estos eventos concuerdan con la aparición y completa formación de las glándulas gástricas reportadas en el presente trabajo. En cuanto a la ligera diferencia en el momento de la detección de la pepsina entre ambos estudios puede deberse a diferencias en las condiciones de cultivo, horario de alimentación, tipo de presa, cantidad presa, crecimiento de las larvas y el tiempo de muestreo. La presencia de la enzima pepsina en el tracto digestivo varía según la especie, por ejemplo, se ha reportado en *C. urophthalmus* a los 232 GD (López-Ramírez *et al.*, 2011), en *P. maculatofasciatus* a los 276 GD (Álvarez-González *et al.*, 2008), en *D. labrax* a los 456 GD (Zambonino-Infante y Cahu, 1994), en *P. pagrus* a los 560 GD (Suzer *et al.*, 2007) y en *S. ocellatus* a los 572 GD (Lazo *et al.*, 2007). En el zimograma de actividad proteolítica ácida, la aparición y permanencia a lo largo del desarrollo (incrementando su intensidad) de una banda con peso molecular de 68 kDa a los 20 DDE (520 GD), concuerdan con el registro de actividad y expresión antes mencionados. Díaz-López *et al.* (1998) caracterizaron el peso molecular de la pepsina en diferentes organismos y concluyen que para *P. pagrus* es de 67 kDa, lo cual concuerda con el peso molecular de la banda con actividad proteolítica ácida obtenida para el pargo lunarejo, confirmando, junto con su capacidad de hidrolizar proteínas en condiciones ácidas, que es pepsina.

Algunos autores han reportado una disminución de las expresiones tripsina y quimotripsina después de la aparición de la pepsina en el tracto digestivo (Suzer *et al.*, 2006; Galaviz *et al.*, 2011; Lazo *et al.*, 2011). Esto se observó en las larvas de pargo lunarejo con el pico de expresión pepsina a los 30 DDE (780 GD) y una

disminución de la expresión tripsina y quimotripsina; al final del experimento la expresión de ambas enzimas disminuyó. Galaviz *et al.* (2012) sugirió que ambas enzimas se sintetizan en paralelo, y cuando la cantidad de cada enzima es suficiente para llevar a cabo la digestión, la transcripción se reduce e incrementa la actividad, como lo observado en el presente trabajo.

La disminución en la actividad específica de algunas enzimas observadas durante el desarrollo de las larvas se ha relacionado con el aumento en el contenido de proteína de las larvas y no a la disminución de la capacidad digestiva de las mismas (Zambonino-Infante y Cahu, 2001). Por otro lado, la actividad enzimática individual en *L. guttatus* mostró un aumento constante en todas las enzimas analizadas, lo que indica que las larvas aumentan su capacidad digestiva durante el desarrollo.

Es interesante observar que la mayoría de las actividades enzimáticas individuales mostraron un aumento significativo alrededor del día 20 después de la eclosión (520 GD). Se ha reportado que la presencia de pepsina en el tracto digestivo desencadena un mecanismo más eficiente de digestión proteica extracelular en las larvas y se combina con un aumento en la actividad de las enzimas del borde de cepillo (es decir, fosfatasa alcalina y leucina aminopeptidasa) y una disminución de la actividad de las enzimas citosólica (catepsina, leucina-alanina peptidasa, dipeptidasas y tripeptidasas), indicando la maduración de la función digestiva de las larvas de peces (Zambonino-Infante y Cahu, 2001; Lazo *et al.*, 2011).

Este patrón se ha reportado en diversas larvas de peces marinos, aunque el tiempo de maduración varía según la especie. En el caso de las larvas de *L. guttatus*, se demostró que la expresión y actividad de la pepsina comenzaron a los 20 DDE (520 GD) y 25 DDE (650 GD), respectivamente. Teniendo en cuenta los resultados del presente estudio, se sugiere que la maduración de las funciones de digestión (pepsina,  $\alpha$ -amilasa, tripsina, quimotripsina, actividad de la lipasa) y absorción (fosfatasas ácidas y alcalinas, actividades leucina aminopeptidasa) de las larvas del pargo lunarejo inicia alrededor de los 20 y 25 días después de la eclosión.

Por otra parte, el conocimiento del número de moléculas que ayudan a regular una o más características gastrointestinales sigue aumentando, e incluye hormonas y

neurotransmisores (Buddington y Krogdahl, 2004). Una de las principales hormonas reguladoras es la colecistoquinina (CCK), la cual influye en la liberación de las sales biliares y enzimas pancreáticas durante la regulación de la saciedad (factor anorexígeno); los movimientos peristálticos y estimula el movimiento de la vesícula biliar y la secreción de tripsina en el intestino (Ronnestad, 2002;. Ronnestad *et al.*, 2007;. Webb *et al.*, 2010;. Tillner *et al.*, 2013). Se produce en células específicas dispersas en la mucosa del intestino anterior y se secreta en el plasma como respuesta a la presencia de nutrientes en el lumen intestinal (Cahu *et al.*, 2004). Al igual que en *G. morhua* (Kortner *et al.*, 2011a) y *S. ocellatus* (Webb *et al.*, 2010), la expresión de esta hormona se detectó desde la eclosión y hasta el final del estudio en las larvas del pargo lunarejo. Sin embargo, los niveles de ARNm de la CCK mostraron una disminución moderada pero constante posterior a los 15 DDE (390 GD). Resultados similares fueron reportados por Kortner *et al.* (2011a) en *G. morhua*, y mencionan que la CCK se expresa principalmente en el cerebro durante los primeros estadios larvarios. Así que la disminución observada en la expresión de la CCK durante el período experimental podría ser debido a la disminución de la proporción de tejido cerebral con respecto al cuerpo de las larvas. Lo mismo ocurrió con el neuropéptido Y (NPY), que presentó el mismo patrón de expresión que la CCK en *L. guttatus* y se expresa principalmente en el cerebro actuando como un potente factor orexigénico (Volkoff *et al.*, 2005; Kortner *et al.*, 2011b). Un patrón similar de expresión de NPY fue encontrado en *G. morhua*, donde la expresión del gen decrece durante el desarrollo (0 a 600 GD) y es modulada por la dieta (Kortner *et al.*, 2011a; Kortner *et al.*, 2011b).

El mismo patrón en la expresión de estos dos factores sugiere que tanto la CCK como NPY se transcriben de forma paralela para regular la ingesta del alimento y la saciedad. Sin embargo, es necesario hacer estudios de ciclo circadiano para poder observar la relación entre estos factores en el pargo lunarejo, ya que la expresión obtenida de ambos está dada antes de suministrar el alimento.

### **IX.3. Efecto del destete en la expresión de las enzimas digestivas y de los factores reguladores de la digestión**

El destete en el pargo lunarejo se realizó a los 25 DDE (650 GD), cuando se observó la completa formación del tracto digestivo con la presencia de glándulas gástricas denotando un estómago funcional y el incremento en la actividad de las enzimas digestivas y aparición de una digestión ácida en las larvas.

Las larvas de pargo lunarejo alimentadas con *Artemia* (AV) y las sometidas al destete (D) no presentaron diferencias significativas en el peso y la longitud durante el experimento, además se reportaron porcentajes de supervivencia que difieren, solamente, en un 9% entre ambos grupos (63% AV y 54% D). En otras especies de teleósteos también se han reportado resultados parecidos entre los grupos control y en co-alimentación reflejando la capacidad de las larvas para digerir la dieta inerte (Cahu y Zambonino-Infante, 2001; Lazo *et al.*, 2011; Nguyen *et al.*, 2011). Cahu *et al.* (2003) demostraron en *D. labrax* que es posible una sustitución de alimento vivo a una dieta formulada teniendo un crecimiento y supervivencia similar a las larvas alimentadas con presas vivas.

Los resultados obtenidos muestran que la expresión de todas enzimas digestivas, con excepción de la quimotripsina 2 y la lipasa, presentaron diferencias significativas los días 28 y 30 después de la eclosión (a los 728 y 780 GD, respectivamente). Sin embargo, al final del experimento no se observan diferencias significativas entre los tratamientos. Lo anterior podría estar reflejando que las larvas de *L. guttatus* tiene una adaptabilidad a la composición de la dieta y los niveles de expresión de éstas enzimas son parecidos a los necesarios para digerir el alimento vivo. Engrola *et al.* (2007) mencionan que los perfiles de las enzimas digestivas en *S. senegalensis* tiene un período de adaptación a las dietas inertes.

La expresión  $\alpha$ -amilasa se encuentra programada genéticamente (disminución a lo largo del desarrollo, como se mencionó en la discusión del apartado pasado); sin embargo, puede ser modulada por la composición de la dieta como se ha observado en el presente trabajo, donde la expresión de la  $\alpha$ -amilasa fue mayor en las larvas alimentadas con la dieta microparticulada en comparación con las alimentadas con *Artemia*. Probablemente debido a la diferencia en la naturaleza de los carbohidratos,

específicamente a la presencia de almidón en la dieta microparticulada. Un resultado similar se encontró en *D. labrax* donde la disminución de la actividad  $\alpha$ -amilasa fue más lenta en larvas alimentadas con una dieta con 25% de glúcidos que en las alimentadas con una dieta con sólo 5% (Cahu y Zambonino-Infante, 2001). Cahu *et al.* (2004) mencionan que la ontogenia de la enzima  $\alpha$ -amilasa está pre-programada y puede ser sutilmente modificada por la composición de la dieta.

Lazo *et al.* (2011) y Kortner *et al.* (2011a) mencionan que la expresión de las enzimas lipolíticas son sensible a cambios en la composición de la dieta. Esto podría ser confirmada en el pargo lunarejo, donde los niveles de expresión de la enzima lipasa fueron más altos al final del período de destete (30 y 35 DDE, es decir, 780 y 910 GD) en larvas alimentadas con *Artemia* en comparación con las del grupo D. Por el contrario, la expresión fosfolipasa A2 fue mayor en las larvas del grupo D. Al comparar el contenido de lípidos en las dos dietas, se nota que la *Artemia* tiene una proporción de lípidos superior a la microdieta (26% y 22%, respectivamente), esto sugiere que la expresión de la lipasa y fosfolipasa A2 en las larvas de pargo lunarejo pudieran estar reguladas por el tipo y la cantidad de ácidos grasos presentes en la dieta. El tipo y cantidad de lípidos en la dieta se ha demostrado que puede influir tanto en la expresión y actividad lipasa de *Seriola quinqueradiata* (Murashita *et al.*, 2008) y *G. morhua* (Saele *et al.*, 2010), como en la expresión y actividad fosfolipasa en *D. labrax* (Zambonino-Infante y Cahu, 2001).

Por otra parte, Péres *et al.* (1998) proporcionan los primeros datos sobre los mecanismos que controlan la adaptación de la actividad de la tripsina a la cantidad y naturaleza de la proteína, ya que obtuvieron en *D. labrax* dos patrones de ARNm de tripsina en larvas alimentadas con presas vivas y con dietas compuestas. Lo que sugiere que la naturaleza de la proteína modula la transcripción del mRNA de las proteasas. Lo anterior se observó en las larvas del pargo lunarejo, donde la expresión tripsina, quimotripsina 1 y pepsina se vieron afectadas por la co-alimentación a la mitad del experimento, a los 28 DDE (728 GD), presentando una mayor expresión en las larvas alimentadas con dieta inerte. A pesar de que en el análisis proximal realizado por Nguyen *et al.* (2011) a la dieta utilizada en el presente trabajo (Otohime B2), diera como resultado que la cantidad de proteína de ésta es

menor a la que obtuvieron de la *Artemia* ( $52.0 \pm 0.51$  y  $56.3 \pm 0.67$ , respectivamente), la naturaleza protéica de la dieta microparticulada es diferente y nueva para las larvas. Además, por lo general, en las dietas inertes existen proteínas hidrolizadas, las cuales varían según la dieta usada y pueden afectar la actividad y expresión enzimática. El incremento en la actividad de las proteasas durante el destete se ha observado también en especies como *S. senegalensis* (Engrola *et al.*, 2007) y *S. ocellatus* (Kolkovski, 2001), mientras que en *Rachycentron canadum* (Nguyen *et al.*, 2011) no se encontraron diferencias significativas entre las larvas alimentadas con *Artemia* y las alimentadas con dieta. Nguyen *et al.* (2011) mencionan que un aumento de la actividad específica de la tripsina se debe esperar cuando se alimentan con una dieta inerte, debido a que por lo general la cantidad y naturaleza de las proteínas son diferentes al del alimento vivo y por lo tanto deberían inducir mayores niveles de actividad enzimática; estos autores concluyen que él no encontrar diferencias en las larvas de *R. canadum* podría deberse a que éstas no ingerían la microdieta.

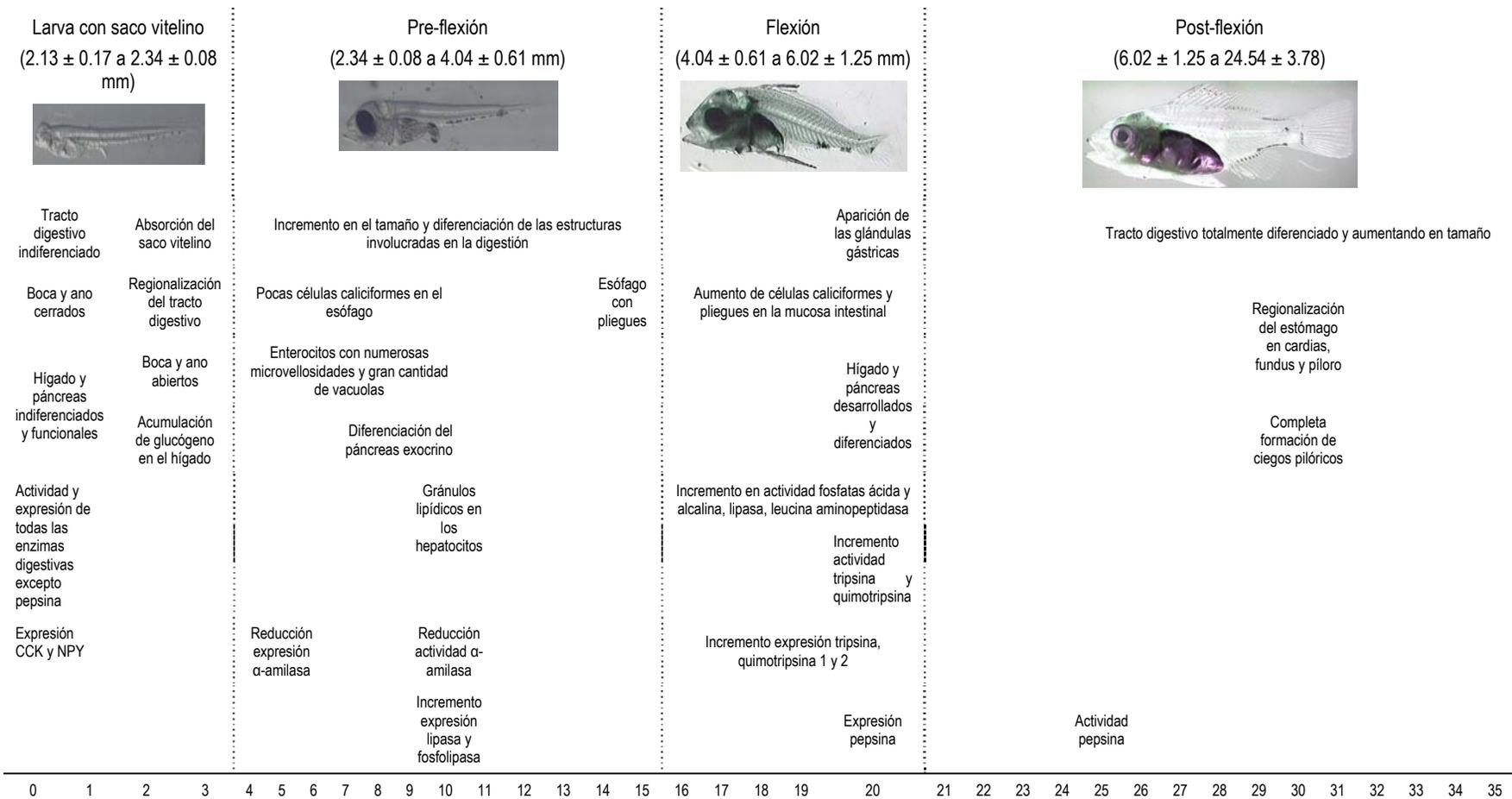
Varios autores mencionan que tanto la expresión de CCK como de NPY pueden estar influenciadas por el tipo de alimento (Volkoff *et al.*, 2005; Webb *et al.*, 2010; Kortner *et al.*, 2011b; Tillner *et al.*, 2013); sin embargo, durante el presente estudio, no se observaron diferencias significativas entre los dos tipos de dieta en ninguno de los factores reguladores de la digestión.

#### **IX.4. Esquema general de la funcionalidad digestiva del pargo lunarejo**

Las larvas de pargo lunarejo sufren una serie de cambios tanto morfológicos como fisiológicos, los cuales se encuentran relacionados en su aparición a lo largo del desarrollo (Fig. 17). Un aumento significativo en la actividad individual y específica de todas las enzimas se produce a los 20 DDE (520 GD), y alrededor del día 25 (650 GD), el tipo de digestión juvenil se observa con la aparición de la actividad pepsina secretada por el estómago gracias a las glándulas gástricas, las cuales se encuentran completamente formadas a ésta edad; a una temperatura de cultivo de  $26.7 \pm 0.21$  °C. Lo anterior sugiere que la maduración de la función digestiva se produce alrededor de los 20 y 25 DDE (de los 520 a los 650 GD), por lo

cual se pudo llevar a cabo un destete exitoso a los 25 DDE (650 GD) con un periodo de coalimentación de 5 días. Sin embargo, los mayores cambios tanto morfológicos como fisiológicos se llevan a cabo el día 20 después de la eclosión (a los 520 GD), lo que hace suponer que un destete precoz pudiera ser posible a partir del día 21 después de la eclosión (546 GD).

Los patrones de actividad y expresión enzimática digestiva reportados en el presente trabajo deben ser considerados durante la formulación de una dieta artificial que se puede utilizar para el destete precoz del pargo lunarejo.



**Figura 17.** Esquema general de la función digestiva de las larvas de pargo lunarejo *L. guttatus* a una temperatura de cultivo de 26 °C.

## X. CONCLUSIONES

- Las larvas de pargo lunarejo muestran un patrón ontogénico del sistema digestivo similar al de otras especies de teleósteos, aunque muestra algunas diferencias en el calendario de desarrollo de los órganos.
- Las larvas de pargo presentan el mismo patrón de actividad y expresión enzimática digestiva que se ha informado anteriormente para otras especies, en las que las actividades enzimáticas pancreáticas (es decir, tripsina, quimotripsina,  $\alpha$ -amilasa y lipasa) e intestinal (es decir, fosfatasas ácidas y alcalinas y leucina aminopeptidasa) están presentes desde la eclosión.
- La actividad y expresión de las enzimas digestivas tienen una tendencia a incrementar con el tiempo, con excepción de la  $\alpha$ -amilasa, la cual presenta una disminución significativa conforme avanza el desarrollo.
- La capacidad digestiva y de absorción del pargo lunarejo aumenta durante el desarrollo larval. Donde los mayores cambios ocurren al día 20 después de la eclosión (520 GD) con la aparición de las glándulas gástricas y el incremento en las enzimas pancreáticas.
- Se evidenció un efecto del destete sobre la expresión de las enzimas digestivas, destacando que las larvas de pargo lunarejo tienen la capacidad de llevar a cabo el destete a partir del día 25 (650 GD), con una coalimentación de 5 días, y tienen la capacidad de adaptar la expresión enzimática a la composición de la dieta.

## XI. RECOMENDACIONES

- Para evitar la sobreestimación de la fosfatasa alcalina al utilizar el extracto del homogenizado del cuerpo de la larva, se recomienda purificar el borde de cepillo de los enterocitos para evidenciar la actividad enzimática relacionada con el proceso digestivo.
- Evaluar la actividad de las enzimas citosólicas (leucina-alanina peptidasa, catepsina, entre otras) y compararla con la actividad de las enzimas de borde de cepillo (fosfatasa ácida, fosfatasa alcalina y leucina aminopeptidasa), obtenidas en el presente trabajo, para evidenciar el cambio en la capacidad digestiva y de absorción de las larvas.
- Realizar un estudio sobre el ciclo circadiano de las larvas de pargo lunarejo evaluando la expresión de los factores reguladores de la digestión (CCK y NPY) y correlacionarla con la expresión de proteasas y lipasas, para aumentar el conocimiento sobre la regulación de la digestión.
- Se recomienda iniciar el destete alrededor del día 25 después de la eclosión, con un periodo de coalimentación de 5 días; y probar si es posible iniciarlo desde 21 DDE.
- Realizar estudios de digestibilidad *in vitro* aplicados a las larvas, a fin de determinar la digestibilidad de ingredientes proteínicos y lipídicos que puedan ser utilizados para la elaboración de dietas microparticuladas específicas para ésta especie.
- El empleo de probióticos como levaduras, para la alimentación y posible maduración del sistema digestivo, analizando específicamente las enzimas citosólicas y del borde de cepillo.

## XII. REFERENCIAS

- Abdo-de la Parra, M. I., L. E. Rodríguez-Ibarra, F. Campillo-Martínez, G. Velasco-Blanco, N. García-Aguilar, L. S. Álvarez-Lajonchère y D. Voltolina. 2010a. Efecto de la densidad de siembra sobre el crecimiento y supervivencia larval del pargo lunarejo *Lutjanus guttatus*. *Rev. Biol. Mar. Oceano*. 45: 141-146.
- Abdo de la Parra, M. I., L. E. Rodríguez-Ibarra, C. Hernández, K. Hernández, B. González-Rodríguez, I. Martínez-Rodríguez y A. García-Ortega. 2010b. Efecto de diferentes niveles de proteína y lípidos totales en la dieta sobre el crecimiento y supervivencia de juveniles de pargo lunarejo *Lutjanus guttatus*. *Rev. Biol. Mar. Oceano*. 45: 433-439.
- Abdo-de la Parra, M. I., L. E. Rodríguez-Ibarra, G. Velasco-Blanco, N. García-Aguilar y B. González-Rodríguez. 2011. Evaluación del efecto de la salinidad sobre la incubación de huevos y eclosión de larvas del pargo flamenco (*Lutjanus guttatus*). *Ciencia Pesquera*. 19: 29-34.
- Alberts, B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts y J. D. Watson. 1996. *Biología molecular de la célula*. Omega. Barcelona, España. 1387 pp.
- Álvarez-González, C. A. 2003. Actividad enzimática digestiva y evaluación de dietas para el destete de larvas de la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* (Percoidei: Serranidae). *Tesis de Doctorado*. CICIMAR-IPN. México. 179 pp.
- Álvarez-González, C. A., M. Cervantes-Trujano, D. Tovar-Ramírez, D. E. Conklin, H. Nolasco, E. Gisbert y R. Piedrahita. 2006. Development of digestive enzymes in California halibut *Paralichthys californicus* larvae. *Fish Physiol. Biochem*. 31: 83-93.
- Álvarez-González, C. A., F. J. Moyano-López, R. Civera-Cerecedo, V. Carrasco-Chávez, J. L. Ortiz-Galindo y S. Dumas. 2008. Development of digestive enzyme activity in larvae of spotted sand bass *Paralabrax maculatofasciatus*. 1. Biochemical analysis. *Fish Physiol. Biochem*. 34: 373-384.
- Álvarez-Lajonchère, L., M. I. Abdo-de la Parra, L. E. Rodríguez-Ibarra, G. Velasco-Blanco, A. C. Puello-Cruz, B. González-Rodríguez, A. Ibarra-Soto y L. Ibarra-

- Castro. 2012. The scale-up of spotted rose snapper, *Lutjanus guttatus*, larval rearing at Mazatlan, Mexico. *J. World Aquaculture Society*. 43: 411-422.
- Anson, M.L. 1938. The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin. *J. Gen. Physiol.* 22: 79-89.
- Applebaum, S. L., R. Perez, J. P. Lazo y G. J. Holt. 2001. Characterization of chemotrypsin activity during early ontogeny of larval red drum (*Sciaenops ocellatus*). *Fish Physiol. Biochem.* 25: 291-300.
- Applebaum, S. L. y G. J. Holt. 2003. The digestive protease, chymotrypsin, as an indicator of nutritional condition in larval red drum (*Sciaenops ocellatus*). *Marine Biology*. 142: 1159-1167.
- Arellano-Martínez, M., A. Rojas-Herrera, F. García-Domínguez, B. P. Ceballos-Vázquez y M. Villalejo-Fuerte . 2001. Ciclo reproductivo del pargo lunarejo *Lutjanus guttatus* (Steindachner, 1869) en las costas de Guerrero, México. *Rev. Biol. Mar. Oceano*. 36: 1-8.
- Ásgeirsson, B. y B. Bjarnason. 1991. Structural and kinetic properties of chymotrypsin from Atlantic cod (*Gadus morhua*). Comparison with bovine chymotrypsin. *Comp. Biochem. Physiol.* 99: 327-335.
- Balon, E. K. 1984. Reflections on some decisive events in the early life of fishes. *Trans. Am. Fish. Soc.* 113:178-185.
- Bergmeyer, H. U., K. Gawehn y M. Grassel. 1974. In *Method of enzymatic analysis*. (Bergmeyer, H. U. ed.). Academic Press, Inc., New York. I, 630 pp.
- Bolasina, S., A. Pérez y Y. Yamashita. 2006. Digestive enzymes activity during ontogenetic development and effect of starvation in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture*. 252 : 503-515.
- Bouchet, V., J. L. Zambonino-Infante y C. L. Cahu. 2000. Effect of the lipid level in a compound diet on the development of red drum (*Sciaenops ocellatus*) larvae. *Aquaculture*. 184: 339-347
- Boza-Abarca, J., E. Calvo-Vargas, N. Solis-Ortiz y J. Komer. 2008. Desove inducido y crecimiento larval del pargo manchado *Lutjanus guttatus*, en la estación de Biología Marina de puntarenas, Costa Rica. *Ciencias Marinas*. 34: 239-252.

- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *An. Biochem.* 72: 248-254.
- Buddington, R. K., y Å. Krogdahl. 2004. Hormonal regulation of the fish gastrointestinal tract. *Comp. Biochem. Physiol., Part A.* 139: 261-271.
- Cahu, C., I. Rønnestad, V. Grangier y J. L. Zambonino-Infante. 2004. Expression and activities of pancreatic enzymes in developing sea bass larvae (*Dicentrarchus labrax*) in relation to intact and hydrolyzed dietary protein; involvement of cholecystokinin. *Aquaculture.* 238: 295-308.
- Cahu, C. L. y J. L. Zambonino-Infante. 1994. Early weaning of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae with a compound diet: effect on digestive enzymes. *Comp. Biochem. Physiol.* 109: 213-222.
- Cahu, C. L. y J. L. Zambonino-Infante. 1995. Effect of the molecular form of dietary nitrogen supply in sea bass larvae: response of pancreatic enzymes and intestinal peptidases. *Fish Comp. Biochem. Physiol.* 14: 209-214.
- Cahu, C. y J. L. Zambonino-Infante. 2001. Substitution of live food by formulated diets in marine fish larvae. *Aquaculture.* 200: 161-180.
- Cahu, C. L., J. L. Zambonino-Infante y V. Barbosa. 2003. Effect of dietary phospholipid level and phospholipid: neutral lipid value on the development of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae fed a compound diet. *British J. Nutr.* 90: 21-28.
- Calzada, B. A. 1996. Desarrollo postembrionario del intestino y órganos asociados de la dorada, *Sparus aurata* L., en cultivo. Estudio histológico y ultraestructural. *Tesis doctoral.* Universidad de Cadiz. 258 p.
- Campos, V. F., T. Collares, J. C. Deschamps, F. K. Seixas, O. A Dellagostin, C. F. C. Lanes y R. B. Robaldo. 2010. Identification, tissue distribution and evaluation of brain neuropeptide Y gene expression in the Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus*. *Journal of biosciences*, 35: 405-413.
- Cara, J. B., F. J. Moyano, S. Cárdenas, C. Fernández-Díaz y M. Yúfera. 2003. Assessment of digestive enzyme activities during larval development of white bream. *J. Fish Biol.* 63: 48-58.

- Carnevali, O., G. Mosconi, M. Cardinali, I. Meiri y A. Polzonetti-Magni. 2001. Molecular components related to egg viability in the Gilthead sea bream, *Sparus aurata*. *Mol. Rep.Dev.* 58: 330-335.
- Chen, B. N., J. G. Qin, M. S. Kumar, W. G. Hutchinson y S. M. Clarke. 2006. Ontogenetic development of digestive enzymes in yellowtail kingfish *Seriola lalandi* larvae. *Aquaculture*. 260: 264-271.
- Cuvier-Péres, A. y P. Kestemont. 2002. Development of some digestive enzymes in Eurasian perch larvae *Perca fluviatilis*. *Fish Physiol.Biochem.* 24: 279-285.
- Darias, M. J., H. M. Murray, J. W. Gallant, A. Astola, S. E. Douglas, M. Yufera y G. Martínez-Rodríguez. 2006. Characterization of a partial  $\alpha$ -amylase clone from red porgy (*Pagrus pagrus*): Expression during larval development. *Comp. Biochem. Physiol. Part B*: 143: 209-218.
- Darias, M. J., J. B. Ortiz-Delgado, C. Sarasquete, G. Martínez-Rodríguez y M. Yúfera 2007. Larval organogenesis of *Pagrus pagrus* L., 1758 with special attention to the digestive system development. *Histol. Histopathol.* 22: 753-768.
- De Pedro, N. y B. T. Björnsson. 2001. Regulation of food intake by neuropeptides and hormones. *Food intake in fish.* 269-296.
- Díaz, J. P., L. Mani-Ponset, C. Blasco y R. Connes. 2002. Cytological detection of the main phases of lipid metabolism during early post-embryonic development in three teleost species *Dicentrarchus labrax*, *Sparus aurata* and *Stizostedion lucioperca*. *Aquat. Living Resour.* 15: 196-178.
- Díaz-López, M., F. J. Moyano-López, F. J. Alarcón-López, F. L. García-Carreño y M. Navarrete del Toro. 1998. Characterization of fish acid proteases by substrate-gel electrophoresis. *Comp. Biochem. Physiol., Part B.* 121: 369-377.
- Douglas, S. E., S. Mandla y J. W. Gallant. 2000. Molecular analysis of the amylase gene and its expression during development in the winter flounder, *Pleuronectes americanus*. *Aquaculture*. 190: 247-260.
- Elbal, M. T., M. P. García-Hernández, M. T. Lozano y B. Agulleiro. 2004. Development of the digestive tract of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). Light and electron microscopic studies. *Aquaculture*. 234: 215-238.

- Engrola, S., L. E. C. Conceição, L. Dias, R. Pereira, L. Ribeiro y M. T. Dinis. 2007. Improving weaning strategies for Senegalese sole: effects of body weight and digestive capacity. *Aquaculture Research*. 38: 696-707.
- Erlanger, B., N. Kokowsky y W. Cohen. 1961. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Arch. Biochem. Biophys.* 95: 271-278.
- Everson, A. G. 1980. *Histochemistry theoretical and applied*. Churchill Livingstone. 4th edition. New York. USA. 439 pp.
- Falk-Petersen, I. B. 2005. Comparative organ differentiation during early life stages of marine fish. *Fish y Shellfish Immuno*. 19: 397-412.
- Galaviz, M. A., A. García-Gasca, M. Drawbridge, C. A. Álvarez-González y L. López. 2011. Ontogeny of the digestive tract and enzymatic activity in White seabass, *Atractoscion nobilis*, larvae. *Aquaculture*. 318: 162-168.
- Galaviz, M. A., A. García-Ortega, E. Gisbert, L. M. López y A. García-Gasca. 2012. Expression and activity of trypsin and pepsin during larval development of the spotted rose snapper *Lutjanus guttatus*. *Comp. Biochem. Physiol., Part B*. 161: 9-16.
- García-Gasca, A., M. A. Galaviz, J. N. Gutiérrez y A. García-Ortega. 2006. Development of the digestive tract, trypsin activity and gene expression in eggs and larvae of the bullseye puffer fish *Sphoeroides annulatus*. *Aquaculture*. 251: 366-376.
- García-Ortega, A. 2009. Nutrition and feeding research in the spotted rose snapper (*Lutjanus guttatus*) and bullseye puffer (*Sphoeroides annulatus*), new species for marine aquaculture. *Fish Physiol. Biochem.* 35: 69-80.
- Gisbert, E., M. C. Sarasquete, P. Willot y F. Castelló-Orvay. 1999. Histochemistry of the development of the digestive system of *Siberian sturgeon* during ontogeny. *J Fish Biol.* 55: 596-616.
- Gisbert, E., R. H. Piedrahita y D. E. Conklin. 2004. Ontogenetic development of the digestive system in California halibut (*Paralichthys californicus*) with notes on feeding practices. *Aquaculture*. 232: 455-470.

- Gisbert, E., G. Giménez, I. Fernández, Y. Kotzamanis y A. Estévez. 2009. Development of digestive enzymes in common dentex *Dentex dentex* during early ontogeny. *Aquaculture*. 287: 381-387.
- Govoni, J., G. W. Boehlert y Y. Watanabe. 1986. The physiology of digestion in fish larvae. *Environmental Biol. Fishes*. 16: 59-77.
- Hachero-Cruzado, I., J. B. Ortiz-Delgado, B. Borrega, M. Herrera, J. I. Navas y C. Sarasquete. 2009. Larval organogenesis of flatfish brill *Scophthalmus rhombus* L: Histological and histochemical aspects. *Aquaculture*. 286: 138-149.
- Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41: 95-98
- Hamlin, H. J., I. Hunt von Herbing y L. J. Kling. 2000. Histological and morphological evaluations of the digestive tract and associated organs of haddock throughout post-hatching ontogeny. *J. Fish Biol.* 57: 716-732.
- Hansen, T. W., A. Folkvord, E. Grøtan y Ø. Sæle. 2013. Genetic ontogeny of pancreatic enzymes in *Labrus bergylta* larvae and the effect of feed type on enzyme activities and gene expression. *Comp. Biochem. Physiol. Part B*. 164: 176-184.
- Herrera-Ulloa, A., J. Chacón-Guzmán, G. Zúñiga-Calero, O. Fajardo y R. Jiménez-Montealegre. 2011. Acuicultura del pargo manchado *Lutjanus guttatus* (Steindachner, 1869) en Costa Rica dentro de un enfoque ecosistémico. *Revista Ciencias Marinas y Costeras*. ISSN:1659-407X.
- Hernández, J. A. M. y A. Solomon. 2006. Participación del sistema nervioso y del tracto gastrointestinal en la homeostasis energética. *Revista de medicina*. 50: 27-37.
- Izquierdo, M. S., J. Socorro, L. Arantzamendi y C. M. Hernández-Cruz. 2000. Recent advances in nutrition in fish larvae. *Fish Physiol. Biochem.* 22: 97-107.
- Kamacı, H. O., D. Çoban, C. Suzer, B. Aksu, Ş. Saka y K. Firat, 2010a. Exocrine pancreas development and trypsin expression in cultured European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Turk. J. Fish. Aquat. Sci.* 10: 123-130
- Kamacı, H. O., C. Suzer, C. Deniz, S. Saka, y K. Firat. 2010b. Organogenesis of exocrine pancreas in sharpsnout sea bream (*Diplodus puntazzo*) larvae:

- characterization of trypsin expression. *Fish Physiol. Biochem.* 36: 993-1000.
- Kamisaka, Y., T. Kaji, S. Masuma, N. Tezuka, T. Kurokawa, T. Suzuki, G. K. Totland, I. Rønnestad, M. Tagawa, y M. Tanaka. 2002. Ontogeny of cholecystokinin-immunoreactive cells in the digestive tract of bluefin tuna, *Thunnus thynnus*, larvae. *Sarsia.* 87: 258-262.
- Kamler, E. 2008. Resource allocation in yolk-feeding fish. *Rev. Fish Biol. Fisheries.* 18: 143-200.
- Kim, B. G., S. Divakaran, C. L. Brown y A. C. Ostrowski. 2001. Comparative digestive enzyme ontogeny in two marine larval fishes: Pacific threadfin (*Polydactylus sexfilis*) and bluefin trevally (*Caranx melampygus*). *Fish Physiol. Biochem.* 24: 225-241.
- Kolkovski, S. 2001. Digestive enzymes in fish larvae and juveniles – implications and applications to formulated diets. *Aquaculture.* 201: 181-201.
- Kortner, T. M., I. Overrein, G. Oie, E. Kjorsvik y A. Arukwe. 2011a. The influence of dietary constituents on the molecular ontogeny of digestive capability and effects on growth and appetite in Atlantic cod larvae (*Gadus morhua*). *Aquaculture.* 315: 114-120.
- Kortner, T. M., I. Overrein, G. Øie, E. Kjørsvik, T. Bardal, P. Wold y A. Arukwe. 2011b. Molecular ontogenesis of digestive capability and associated endocrine control in Atlantic cod (*Gadus morhua*) larvae. *Comp. Biochem. Physiol. Part A.* 160: 190-19.
- Kurokawa, T., T. Suzuki y T. Andoh. 2000. Development of Cholecystokinin and Pancreatic Polypeptide Endocrine Systems during the Larval Stage of Japanese Flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Gen. Comp. Endocrino.* 120: 8-16.
- Kvåle, A., A. Nordgreen, S. K. Tonheim y K. Hamre. 2007. The problem of meeting dietary protein requirements in intensive aquaculture production of marine fish larvae with emphasis on Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Aquaculture Nutrition.* 13: 170-185
- Lazo, J. P., M. J. Darias y E. Gisbert. 2011. Ontogeny of the digestive tract. En Holt, G. J. *Fish larval nutrition.* Chapter 1. Wiley-Blackwell. Oxford, UK. 435 pp.
- Lazo, J. P., M. T. Dinis, G. J. Holt, C. Faulk y C. R. Arnold. 2000. Co-feeding

- microparticulate diets with algae: towards eliminating the need of zooplankton at first feeding in larval red drum (*Sciaenops ocellatus*). *Aquaculture*. 188: 339-351.
- Lazo, J. P., R. Mendoza, G. J. Holt, C. Aguilera y C. R. Arnold. 2007. Characterization of digestive enzymes during larval development of red drum (*Sciaenops ocellatus*). *Aquaculture*. 265: 194-205.
- Lehninger, A. 1995. *Bioquímica*. Ediciones Omega. 2ª Edición. Barcelona. España. 1198 pp.
- Lemieux, H., N. R. Le Francóis y P. U. Blier. 2003. The early ontogeny of digestive and metabolic enzyme activities in two comercial strains of Arctic Charr (*Salvelinus alpinus* L.). *Journal of Experimental Zoology*. 299: 151-160.
- Liddle, R. A., 2006. Regulation of Pancreatic Secretion, Physiology of the Gastrointestinal Tract (Fourth Edition). *Academic Press, Burlington*. 1397-1435.
- López-Ramírez, G., C. A. Cuenca-Soria, C. A. Álvarez-González, D. Tovar-Ramírez, J. L. Ortíz-Galindo, N. Perales-García, G. Márquez-Couturier, L. Arias-Rodríguez, J. R. Indy, W. M. Contreras-Sánchez, E. Gisbert y F. J. Moyano. 2011. Development of digestive enzymes in larvae of Mayan cichlid *Cichlasoma urophthalmus*. *Fish Physiol. Biochem*. 37: 197-208.
- Ma, H., C. Cahu, J. Zambonino, H. Yu, Q. Duan, M. M. Le Gall y K. Mai. 2005. Activities of selected digestive enzymes during larval development of larger yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*). *Aquaculture*. 245: 239-248.
- Martínez, I., F. J. Moyano, C. Fernández-Díaz y M. Yúfera. 1999. Digestive enzyme activity during larval development of the Senegal sole (*Solea senegalensis*). *Fish Physiol. Biochem*. 21: 317-323.
- Masek, T., V. Vopalensky, P. Suchomelova y M. Pospisek. 2005. Denaturing RNA electrophoresis in TAE agarose gels. *Analytic. Biochem*. 336: 46-50.
- Micale, V., M. Garaffo, L. Genovese, M. T. Spedicato y U. Muglia. 2006. The ontogeny of the alimentary tract during larval development in common pandora *Pagellus erythrinus* L. *Aquaculture*. 251: 354-365.
- Moguel-Hernández, I. R. Peña, H. Nolasco-Soria, S. Dumas y I. Zavala-Leal. 2013. Development of digestive enzyme activity in spotted rose snapper, *Lutjanus*

- guttatus* (Steindachner, 1869) larvae. *Fish Physiol. Biochem.* DOI: 10.1007/s10695-013-9890-7.
- Morrison, M. 1993. Histology of the Atlantic cod, *Gadus morhua*: an atlas. Part 4. Eleutheroembryo and larva. *Canadian Special Publication of Fisheries and Aquatic Sciences*. No. 119, 496pp.
- Moyano, F. J., M. Díaz, F. J. Alarcón y M. C. Sarasquete. 1996. Characterization of digestive enzyme activity during larval development of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Fish Physiol. Biochem.* 15: 121-130.
- Muguet, J. B., J. P. Lazo, D. E. Conklin y R. H. Piedrahita. 2010. Evaluation of weaning performance of California halibut (*Paralichthys californicus*) larvae using growth, survival and digestive proteolytic activity. *Aquaculture Nutrition*. doi: 10.1111/j.1365-2095.2010.00786.x
- Muhlía-Almazán, A., A. Sánchez-Paz, y F. L. García-Carreño. 2008. Invertebrate trypsins: a review. *J. Comp. Physiol.* 178: 655-672.
- Murashita, K., H. Fukada, I. Rønnestad, T. Kurokawa y T. Masumoto. 2008. Nutrient control of release of pancreatic enzymes in yellowtail (*Seriola quinqueradiata*): Involvement of CCK and PY in the regulatory loop. *Comp. Biochem. Physiol., Part A.* 150: 438-443.
- Murray, H. M., J. W. Gallant, J. C. Pérez-Casanova, S. C. Johnson y S. E. Douglas. 2003. Ontogeny of lipase expression in winter flounder. *J. Fish Biol.* 62: 816-833.
- Murray, H. M., J. C. Pérez-Casanova, J. W. Gallant, S. C. Johnson y S. E. Douglas. 2004. Trypsinogen expression during the development of the exocrine pancreas in winter flounder (*Pleuronectes americanus*). *Comp. Biochem. Physiol., Part A.* 138: 53- 59.
- Murray, H. M., J. W. Gallant, S. C. Johnson y S. E. Douglas. 2006. Cloning and expression analysis of three digestive enzymes from Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) during early development: Predicting gastrointestinal functionality. *Aquaculture.* 252: 394-408.

- Naz, M. y M. Türkmen. 2009. Changes in the digestive enzymes and hormones of gilthead seabream larvae (*Sparus aurata*, L. 1758) fed on *Artemia nauplii* enriched with lysine. *Aquacult. Int.* 17: 523-535.
- Nguyen, H., H. Reinertsen, P. Wold, T. Tran y E. Kjørsvik. 2011. Effects of early weaning strategies on growth, survival and digestive enzyme activities in cobia (*Rachycentron canadum* L.) larvae. *Aquacult. Int.* 19: 63-78.
- Oozeki, Y. y K. Bailey. 1995. Ontogenetic development of digestive enzyme activities in larval walleye Pollock *Theragra chalcogramma*. *Mar Biol.* 122: 177-186.
- Ortiz-Delgado, J. B., M. J. Darias, J. P. Cañavate, M. Yúfera y C. Sarasquete. 2003. Organogenesis of the digestive tract in the white seabream, *Diplodus sargus*. *Histo. Histochem. Approach.* 18: 1141-1154.
- Peña, R. 2005. Estudio de la función digestiva en larvas de la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus*: aspectos alimenticios y sus aplicaciones prácticas. *Tesis de Doctorado*. CICIMAR.IPN. México. 141 pp.
- Peña, R., S. Dumas, M. Villalejo-Fuerte y J. L. Ortiz-Galindo. 2003. Ontogenic development of the digestive tract in reared spotted sand bass *Paralabrax maculatofasciatus* larvae. *Aquaculture.* 219: 633-644.
- Péres, A., C. L. Cahu, J. L. Zambonino-Infante, M. M. Legall y P. Quazuguel. 1996. Amylase and trypsin response to intake of dietary carbohydrate and protein depend on the developmental stage in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Fish Physiol. Biochem.* 15: 237-242
- Péres, A., J. L. Zambonino-Infante y C. Cahu. 1998. Dietary regulation of activities and mRNA levels of trypsin and amylase in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Fish Physiol. Biochem.* 19: 145-152
- Pérez-Casanova, J. C., H. M. Murray, J. W. Gallant, N. W. Ross, S. E. Douglas y S. C. Johnson. 2006. Development of the digestive capacity in larvae of haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) and Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Aquaculture.* 251: 377-401.
- Qu, M., S. Ding, X. Xu, M. Shen, Y. You y Y. Su. 2012. Ontigenetic development of the digestive system and growth in coral trout (*Plectropomus leopardus*). *Aquaculture.* 334: 132-141.

- Randall, D., W. Burggren y K. French, 1998. *Eckert Fisiología animal: mecanismos y adaptaciones*. McGrawHill-Interamericana. España. 795 pp.
- Ribeiro, L., J. L. Zambonino-Infante, C. Cahu y M. T. Dinis. 1999. Development of digestive enzymes in larvae of *Solea senegalensis*, Kaup 1858. *Aquaculture*. 179: 465-473.
- Ribeiro, L., J. L. Zambonino-Infante, C. Cahu y M. T. Dinis. 2002. Digestive enzymes profile of *Solea senegalensis* post larvae fed *Artemia* and a compound diet. *Fish Physiol. Biochem.* 27: 61-69.
- Ribeiro, L., A. Couto, M. Olmedo, B. Álvarez-Blázquez, F. Linares y L. M. P. Valente. 2008. Digestive enzyme activity at different developmental stages of blackspot seabream, *Pagellus bogaraveo* (Brunnich 1768). *Aquaculture Research*. 39: 339-346.
- Ronnestad, I. 2002. Control and efficiency of digestive function of marine fish larvae. In: Cruz-Suárez, L. E. Ricque-Marie, D. Tapia-Salazar, M. Gaxiola-Cortés, M. G. Simoes (Eds.). *Avances en nutrición acuícola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*. Cancún, México.
- Ronnestad, I., Y. Kamisaka, L. E. C. Conceição, S. Morais y S. K. Tonheim. 2007. Digestive physiology of marine fish larvae: Hormonal control and processing capacity for proteins, peptides and amino acids. *Aquaculture*. 268: 82-97.
- Ronnestad, I., M. Yúfera, B. Ueberschär, L. Ribeiro, Ø. Sæle y C. Boglione. 2013. Feeding behaviour and digestive physiology in larval fish: current knowledge, and gaps and bottlenecks in research. *Rev. Aquaculture*. 5: S59-S98.
- Sæle, Ø., A. Nordgreen, P. A. Olsvik y K. Hamre. 2010. Characterization and expression of digestive neutral lipases during ontogeny of Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Comp. Biochem. Physiol. Part A*. 157: 252-259.
- Sánchez-Amaya, M. I., J. B. Ortiz-Delgado, Á. García-López, S. Cárdenas y C. Sarasquete. 2007. Larval ontogeny of redbanded seabream *Pagrus auriga* Valenciennes, 1843 with special reference to the digestive system. A histological and histochemical approach. *Aquaculture*. 263: 259-279.
- Santamaría, C.A., M. Marín de Mateo, R. Traveset, R. Sala, A. Grau, E. Pastor, C. Sarasquete y S. Crespo. 2004. Larval organogenesis in common dentex

- Dentex dentex* L. (Sparidae): histological and histochemical aspects. *Aquaculture*. 237: 207-228.
- Sarasquete, M. C., A. Polo y M. Yúfera. 1995. Histology and histochemistry of the development of the digestive system of larval gilthead seabream, *Sparus aurata* L. *Aquaculture*. 130: 79-92.
- Savoie, A., N.R. Le Francois, C. Cahu, y P. U. Blier. 2008. Metabolic and digestive enzyme activity profiles of newly hatched spotted wolffish (*Anarhichas minor* Olafsen): effect of temperature . *Aquaculture Research*. 39: 382-389
- Segner, H., R. Rösch, H. Schmidt y K. J. von Poepinghausen. 1989. Digestive enzymes in larval *Coregonus lavaretus*. L. *J. Fish Biol.* 35: 249-263.
- Segner, H., V. Storch, M. Reinecke, W. Kloas y W. Hanke. 1994. The development of functional digestive and metabolic organs in turbot, *Scophthalmus maximus*. *Marine Biology*. 119: 471-486.
- Shan, X. J., W. Huang, L. Cao, Z. Z. Xiao y S. Z. Dou. 2009. Ontogenetic development of digestive enzymes and effect of starvation in miiuy croaker *Miichthys miiuy* larvae. *Fish Physiol. Biochem.* 35: 385-398.
- Silverstein, J. T. y E. M. Plisetskaya. 2000. The Effects of NPY and Insulin on Food Intake Regulation in Fish. *American Zoologist*. 40: 296-308.
- Suzer, C., K. Firat y S. Saka. 2006. Ontogenic development of the digestive enzymes in common pandora, *Pagellus erythrinus*, L. larvae. *Aquacult. Res.* 37: 1565–1571.
- Suzer, C., H. O. Kamaci, D. Coban, S. Saka, K. Firat, B. Özkara y A. Özkara. 2007. Digestive enzyme activity of the red porgy (*Pagrus pagrus*, L.) during larval development under culture conditions. *Aquaculture. Res.* 38: 1778–1785.
- Sveinsdóttir, H., H. Thorarensen y A. Gudmundsdóttir. 2006. Involvement of trypsin and chymotrypsin activities in Atlantic cod (*Gadus morhua*) embryogenesis. *Aquaculture*. 260: 307-314.
- Tengjaroenkul, B., B. J. Smith, S. A. Smith y U. Chatreewongsin. 2002. Ontogenic development of the intestinal enzymes of cultured Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L. *Aquaculture*. 211: 241-251.

- Tillner, R., I. Rønnestad, T. Harboe y B. Ueberschar. 2013. Hormonal control of tryptic enzyme activity in Atlantic cod larvae (*Gadus morhua*): Involvement of cholecystokinin during ontogeny and diurnal rhythm. *Aquaculture*. 402: 133-140.
- Tovar-Ramírez, D. 2002. Potencial probiótico de levaduras productoras de poliaminas en el desarrollo del sistema digestivo de la lubina Europea *Dicentrarchus labrax* y la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus*. *Tesis Doctoral*. CIBNOR. México. 184 pp.
- Uscanga-Martínez, A., N. Perales-García, C. A. Álvarez-González, F. J. Moyano. D. Tovar-Ramírez. G. E. Gisbert, G. Márquez-Couturier, W. M. Contreras-Sánchez. L. Arias-Rodríguez y J. R. Indy. 2011. Changes in digestive enzyme activity during initial ontogeny of bay snook *Petenia splendida*. *Fish Physiol. Biochem.* 37: 667-680.
- Vega-Villasante, F., H. Nolasco y R. Civera. 1993. The digestive enzymes of the Pacific brown shrimp *Penaeus californiensis*. I. Properties of amylase activity in the digestive tract. *Comp. Biochem. Physiol.* 106: 547-550.
- Versaw, W., S. L. Cuppett, D. D. Winters y L. E. Williams. 1989. An improved colorimetric assay for bacterial lipase in nonfat dry milk. *J. Food Sci.* 54: 232-254.
- Villanueva, J., R. Vanacore, O. Goicoechea y R. Amthauer. 1997. Intestinal alkaline phosphatase of the fish *Cyprinus carpio*: regional distribution and membrane association. *J. Exp. Zool.* 279: 347-355.
- Volkoff, H., M. Xu, E. MacDonald y L. Hoskins. 2009. Aspects of the hormonal regulation of appetite in fish with emphasis on goldfish, Atlantic cod and winter flounder: notes on actions and responses to nutritional, environmental and reproductive changes. *Comp. Biochem. Physiol. Part A.* 153: 8-12.
- Volkoff, H., L. F. Canosa, S. Unniappan, J. M. Cerdá-Reverter, N. J. Bernier y R. E. Peter. 2005. Neuropeptides and the control of food intake in fish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 142: 3-19.
- Webb, K. A., I. A. Khan, B. S. Nunez, I. Rønnestad y G. J. Holt. 2010. Cholecystokinin: Molecular cloning and immunohistochemical localization in

- the gastrointestinal tract of larval red drum, *Sciaenops ocellatus* (L.). *Gen. Comp. Endocrino.* 166: 152-159.
- Zambonino-Infante, J. L. y C. L. Cahu. 1994. Development and response to a diet change of some digestive enzymes in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Fish Physiol. Biochem.* 12: 399-408.
- Zambonino-Infante, J. L. y C. L. Cahu. 2001. Ontogeny of the gastrointestinal tract of marine fish larvae. *Comp. Biochem. Physiol., Part C.* 130: 477-487.
- Zambonino-Infante, J. L. y C. L. Cahu. 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. L. y C. L. Cahu. 2010. Effect of nutrition on marine fish development and quality. *In Recent advances in aquaculture research.* 103-124
- Zavala-Leal, I. 2007. Efecto de la temperatura, intensidad de luz, tipo y densidad de presa en la eficiencia alimenticia durante la ontogenia inicial del huachinango del Pacífico (*Lutjanus peru*). *Tesis de maestría.* CICIMAR-IPN. 52p.
- Zavala-Leal, I. 2011. Desarrollo morfológico de las estructuras involucradas en la primera alimentación exógena y evaluación de la eficiencia alimenticia de las larvas del huachinango del Pacífico *Lutjanus peru* (Nichols y Murphy, 1922). *Tesis Doctoral.* CICIMAR-IPN. México. 90 pp.
- Zavala-Leal, I., S. Dumas y R. Peña. 2011. Organogénesis durante el periodo larval en peces. *CICIMAR Océánides.* 26: 19-30.

### **XIII. ANEXOS**

**ANEXO 1.** Técnica de deshidratación e inclusión en parafina del Laboratorio de Histología e Histoquímica del CIBNOR. Responsable: Dra. Carmen Rodríguez Jaramillo.

#### ***Deshidratación***

- Alcohol etílico 50% (30 min.)
- Alcohol etílico 70% (30 min.)
- Alcohol etílico 80% (30 min.)
- Alcohol etílico 96% (30 min.)
- Alcohol etílico 100% I, II y III (30 min. c/u)
- Mezcla de alcohol etílico absoluto-xilol, proporción 1:1 (20 min.)
- Xilol absoluto (10 min.)

#### ***Infiltración en parafina***

- Parafina-xilol, concentración 1:1 (30 min.)
- Parafina paraplast I (30 min.)
- Parafina paraplast II (30 min. larvas de 0 a 20 DDE; 1 hora larvas de 25 a 35 DDE)
- Parafina paraplast III (30 min. larvas de 0 a 20 DDE; 1 hora larvas de 25 a 35 DDE)

**Anexo 2.** Técnica de tinción Hematoxilina-Eosina de Harris del Laboratorio de Histología e Histoquímica del CIBNOR (Everson, 1980). Responsable: Dra. Carmen Rodríguez Jaramillo.

- Xilol I, II y III (10 min. c/u)
- Alcohol 100% - Xilol concentración 1:1 (10 min.)
- Alcohol etílico 96% (5 min.)
- Alcohol etílico 70% I y II (5 min. c/u)
- Agua destilada (5 min.)
- Hematoxilina de Harris (4 min.)
- Agua corriente (5 min.)
- Agua destilada (5 min.)
- Alcohol ácido (10 seg.) (1 L alcohol 96% con 5 gotas de ácido clorhídrico)
- Agua destilada (5 min.)
- Agua amoniacal (10 seg.)
- Agua destilada (5 min.)
- Alcohol etílico al 50% (2 min.)
- Alcohol etílico al 70% (2 min.)
- Eosina-Floxina alcohólica (3 min.)
- Alcohol etílico al 96% I y II (2 min. c/u)
- Alcohol al 100% I y II (1 min. c/u)
- Citrisolv I, II, III (5 min. c/u)

Montar en Entellan.

**Anexo 3.** Técnica de azul alciano-Schiff para mucopolisacáridos neutros y ácidos del Laboratorio de Histología e Histoquímica del CIBNOR (Everson, 1980). Responsable: Dra. Carmen Rodríguez Jaramillo.

- Xilol I, II y III (10 min. c/u)
- Alcohol 100% - Xilol concentración 1:1 (5 min.)
- Alcohol etílico 96% (5 min.)
- Alcohol etílico 70% I y II (5 min. c/u)
- Agua destilada (5 min.)
- Teñir con azul alciano (20 min.)
- Lavar en agua destilada (5 min.)
- Pasar los cortes a ácido peryódico al 0.5% (10 min.)
- Lavar en agua corriente (5 min.) y enjuagar con agua destilada (5 min.)
- Pasar los cortes por el reactivo de Schiff (30 min. en refrigeración)
- Pasar los cortes a la solución sulfurosa haciendo tres cambios (2 min. c/u)
- Lavar en agua corriente (5 min.) y enjuagar con agua destilada (5 min.)
- Deshidratar a partir de alcohol de 96 I y II (1 min. c/u) y alcohol etílico absoluto (1 min.)
- Aclarar en Citrozol I, II y III (5 min.)
- Montar con entellan.

**Resultados:**

Mucopolisacáridos ácidos azul  
Mucopolisacáridos neutros magenta  
Sustancia cartilaginosa mucina epitelial tonalidades de púrpura a azul oscuro.

**Anexo 4.** Técnica negro de SUDAN para lípidos del Laboratorio de Histología e Histoquímica del CIBNOR (Everson, 1980). Responsable: Dra. Carmen Rodríguez Jaramillo.

- Xilol I, II y III (10 min. c/u)
- Alcohol 100% - Xilol concentración 1:1 (5 min.)
- Alcohol etílico 96% (5 min.)
- Alcohol etílico 70% I y II (5 min. c/u)
- Agua destilada (5 min.)
- Colorar los cortes en alcohol etílico al 70% (5 min.)
- Teñir con solución de Sudán negro a saturación en alcohol etílico al 70%, previamente filtrada (30 min.)
- Diferenciar en alcohol al 70% (entrada y salida)
- Repetir el paso anterior con un alcohol al 70% nuevo
- Lavar en agua corriente (5 min.)
- Enjuagar con agua destilada (5 min.)
- Montar en gelatina glicerinada a 60° C

**Resultados:**

Ésteres de colesterol	azul a negro
Triglicéridos	azul a negro
Fosfolípidos	gris
Mielina	bronce

## Anexo 5

**LOCUS** Seq1 263 bp mRNA linear VRT 28-MAY-2014  
**DEFINITION** Lutjanus guttatus, amylase partial CDS.  
**ACCESSION** Seq1  
**VERSION**  
**KEYWORDS** .  
**SOURCE** Lutjanus guttatus (spotted rose snapper)  
**ORGANISM** Lutjanus guttatus  
Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;  
Actinopterygii; Neopterygii; Teleostei; Neoteleostei;  
Acanthomorpha; Percomorpharia; Lutjanidae; Lutjanus.  
**REFERENCE** 1 (bases 1 to 263)  
**AUTHORS** Moguel-Hernandez,I., Andree,K.B., Gisbert,E., Pena,R. and Tovar,D.  
**TITLE** Analysis of ontogeny digestive functions of larvae of Lutjanus  
guttatus  
**JOURNAL** Unpublished  
**REFERENCE** 2 (bases 1 to 263)  
**AUTHORS** Moguel-Hernandez,I. and Andree,K.B.  
**TITLE** Direct Submission  
**JOURNAL** Submitted (28-MAY-2014) Pathology, IRTA, Crta. Poble Nou, Km. 5,5,  
San Carlos de la Rapita, Tarragona 43540, Spain  
**COMMENT** Bankit Comment: TOTAL # OF SEQS:9.

##Assembly-Data-START##  
Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing  
##Assembly-Data-END##

**FEATURES** Location/Qualifiers  
source 1..263  
/organism="Lutjanus guttatus"  
/mol\_type="mRNA"  
/db\_xref="taxon:455479"  
/country="Mexico"  
gene <1..>263  
/gene="amylase"  
CDS <1..>263  
/gene="amylase"  
/note="digestive enzyme"  
/codon\_start=1  
/product="amylase"

/translation="YVDAVINHMCAGGGEGTHSSCGSWFSAGRKDFPSIPFGHLDFN  
DHKCRTGSGNIENYGDANQVRDCRLVGLLDLALEKDYVRGKVA"

**BASE COUNT** 57 a 65 c 82 g 59 t

**ORIGIN**

1 tacgtggacg ctgtcatcaa ccacatgtgt ggcgccggcg gtggagaggg aaccctct

61 tcatgtggaa gctggtcag tgccggcagg aaggactcc cctctatccc ctfcggccac  
121 ttgacttca atgaccacaa atgcaggact ggcagtggca acattgagaa ctatggtgac  
181 gctaatacagg tacgtgactg ccgtctggtt ggactgttg acctcgctct ggagaaggat  
241 tatgtcaggg gcaaggtggc tga

**LOCUS** Seq2 934 bp mRNA linear VRT 28-MAY-2014  
**DEFINITION** Lutjanus guttatus, lipase partial CDS.  
**ACCESSION** Seq2  
**VERSION**  
**KEYWORDS** .  
**SOURCE** Lutjanus guttatus (spotted rose snapper)  
**ORGANISM** Lutjanus guttatus  
Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;  
Actinopterygii; Neopterygii; Teleostei; Neoteleostei;  
Acanthomorphata; Percomorpharia; Lutjanidae; Lutjanus.  
**REFERENCE** 1 (bases 1 to 934)  
**AUTHORS** Moguel-Hernandez,I., Andree,K.B., Gisbert,E., Pena,R. and Tovar,D.  
**TITLE** Analysis of ontogeny digestive functions of larvae of Lutjanus  
guttatus  
**JOURNAL** Unpublished  
**REFERENCE** 2 (bases 1 to 934)  
**AUTHORS** Moguel-Hernandez,I. and Andree,K.B.  
**TITLE** Direct Submission  
**JOURNAL** Submitted (28-MAY-2014) Pathology, IRTA, Crta. Poble Nou, Km. 5,5,  
San Carlos de la Rapita, Tarragona 43540, Spain  
**COMMENT** Bankit Comment: TOTAL # OF SEQS:9.

##Assembly-Data-START##  
Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing  
##Assembly-Data-END##

**FEATURES** Location/Qualifiers  
source 1..934  
/organism="Lutjanus guttatus"  
/mol\_type="mRNA"  
/db\_xref="taxon:455479"  
/country="Mexico"  
gene <1..>934  
/gene="Lipase"  
/note="gene encoding lipase"  
CDS <1..>934  
/gene="Lipase"  
/note="Digestive Enzyme"  
/codon\_start=1  
/product="Lipase"

/translation="PKLVSALYEREPNANVIVVDWLTRANQHYPTSAAYTKLVGRDVA

KFVTWLQSELQLPWERIHLLGYS LGAHVAGIAGDLTDHKISRITGLDPAGPTFEHADN  
QNTLSRDDAQFVDVLHTNTRGSPDRSIGIQRPVGHIDIYPNGGTFQPGCDIQNTLLGI  
ALEGIRGLQNMDQLVKCSHERSIHLFIDSLLNIRQQSMAYRCGSKESFNKGLCLSCR  
KNRCNTLGYNINKVRMTRSAKMYLKTREMPYKVFHYQVKVHVFSTDQLNFKEQP  
MKISLYGTHGEKEDIPFVLSDAEHLTPPCPSSSPPMWTS"

BASE COUNT 233 a 288 c 226 g 187 t

ORIGIN

1 cccaagctgg tgtctgccct ctacgagcgt gaaccaatg ccaatgtgat tgtgggtggac  
61 tggctgaccc gcgccaacca gcactacccg acctctgcag cctacaccaa actgggtgggc  
121 cgcgacgtg ccaagttgt tacctggcta caaagcgagc tgcagttgcc ttgggagagg  
181 attcatctgc tgggatacag tctgggagca catgtggctg gaatcgctgg agatctcacc  
241 gaccataaaa tcagcaggat cacaggtctc gatcccgtg gtcccacctt tgagcatgcc  
301 gacaaccaga acacctgtc ccgagatgac gccagtttg tggacgtcct gcacaccaac  
361 accaggggct cccagaccg cagcatcggc atccaaagac ctgtgggcca catcgacatt  
421 taccccaatg gaggcactt ccagccaggc tgcgacatcc agaacacact tctggggatt  
481 gcattagaag gcatcagggg cctccaaaat atggaccagc tctgcaaatg ttccatgag  
541 cgctccatcc acctgttcat tgactctctg ctgaacatcc ggcagcagag catggcctac  
601 cgctgcggct ccaaagagtc gttcaacaag ggctgtgcc tcagctgcag aaagaaccgc  
661 tgcaacacgc ttggctacaa tatcaacaag gtccgcatga ctcgcagtgc caagatgtac  
721 ctcaagacc gtgaaatgat gccttataaa gtttccact accaagtga ggtgcatgtc  
781 ttacgacgg accaactgaa ctcaaggag cagccaatga agatttctct gtatggaacc  
841 cacggagaga aggaggacat tccctcgtc ctgtccgatg ctgaacacct aactccacca  
901 tgtccttct catcaccacc gatgtggaca tcgg

**LOCUS** Seq3 232 bp mRNA linear VRT 28-MAY-2014

**DEFINITION** Lutjanus guttatus, phospholipase A2 partial CDS.

**ACCESSION** Seq3

**VERSION**

**KEYWORDS** .

**SOURCE** Lutjanus guttatus (spotted rose snapper)

**ORGANISM** Lutjanus guttatus

Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;  
Actinopterygii; Neopterygii; Teleostei; Neoteleostei;  
Acanthomorpha; Percomorpharia; Lutjanidae; Lutjanus.

**REFERENCE** 1 (bases 1 to 232)

**AUTHORS** Moguel-Hernandez,I., Andree,K.B., Gisbert,E., Pena,R. and Tovar,D.

**TITLE** Analysis of ontogeny digestive functions of larvae of Lutjanus  
guttatus

**JOURNAL** Unpublished

**REFERENCE** 2 (bases 1 to 232)

**AUTHORS** Moguel-Hernandez,I. and Andree,K.B.

TITLE Direct Submission  
JOURNAL Submitted (28-MAY-2014) Pathology, IRTA, Crta. Poble Nou, Km. 5,5,  
San Carlos de la Rapita, Tarragona 43540, Spain  
COMMENT Bankit Comment: TOTAL # OF SEQS:9.

##Assembly-Data-START##  
Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing  
##Assembly-Data-END##

FEATURES Location/Qualifiers  
source 1..232  
/organism="Lutjanus guttatus"  
/mol\_type="mRNA"  
/db\_xref="taxon:455479"  
/country="Mexico"  
gene <1..>232  
/gene="Phospholipase A2"  
/note="gene encoding phospholipase"  
CDS <1..>232  
/gene="Phospholipase A2"  
/note="digestive enzyme"  
/codon\_start=2  
/product="Phospholipase A2"

/translation="DSWPVLDYADYGCYCGKGGSGKPVDELDRCCHVHDQCYS DAMQH  
DECWPILDNPYTEFYDYSCDEPNKKVTCGKDND"

BASE COUNT 58 a 59 c 67 g 48 t  
ORIGIN

1 tgatagctgg cctgttttgg actacgccga ctacggctgc tactgcgga aaggaggctc  
61 tggcaaacct gtggatgagc tggacaggtg ctgccatgtg catgaccagt gttacagcga  
121 tgctatgcag cacgatgagt gttggcccat cctggacaat ccttacaccg agttctacga  
181 ctacagctgt gacgagccca acaagaaggt cacctgtgga aaggacaacg ac

**LOCUS Seq4** 602 bp mRNA linear VRT 28-MAY-2014

DEFINITION Lutjanus guttatus, chymotrypsinogen 1 partial CDS.

ACCESSION Seq4

VERSION

KEYWORDS .

SOURCE Lutjanus guttatus (spotted rose snapper)

ORGANISM Lutjanus guttatus

Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;  
Actinopterygii; Neopterygii; Teleostei; Neoteleostei;  
Acanthomorpha; Percomorpharia; Lutjanidae; Lutjanus.

REFERENCE 1 (bases 1 to 602)

AUTHORS Moguel-Hernandez,I., Andree,K.B., Gisbert,E., Pena,R. and Tovar,D.

TITLE Analysis of ontogeny digestive functions of larvae of *Lutjanus guttatus*  
JOURNAL Unpublished  
REFERENCE 2 (bases 1 to 602)  
AUTHORS Moguel-Hernandez,I. and Andree,K.B.  
TITLE Direct Submission  
JOURNAL Submitted (28-MAY-2014) Pathology, IRTA, Crta. Poble Nou, Km. 5,5,  
San Carlos de la Rapita, Tarragona 43540, Spain  
COMMENT Bankit Comment: TOTAL # OF SEQS:9.

##Assembly-Data-START##  
Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing  
##Assembly-Data-END##

FEATURES Location/Qualifiers  
source 1..602  
/organism="Lutjanus guttatus"  
/mol\_type="mRNA"  
/db\_xref="taxon:455479"  
/country="Mexico"  
gene <1..>602  
/gene="Chymotrypsinogen I"  
/note="gene encoding chymotrypsinogen"  
CDS <1..>602  
/gene="Chymotrypsinogen I"  
/note="digestive enzyme"  
/codon\_start=1  
/product="Chymotrypsinogen I"

/translation="WPWQVSLQDGRGFHFCGGSLISPYWVVTAHCRVSPRNHRVILGEH  
DRQYNSEIQVKSISRATHPHYNSQNFNNDITLLKLSSPVQMTSRVSPVCLASSSTS  
IPSGTRCVTTGWGRTGQTSSPRYLQQTALPLLSPDQCKQYWGYNRITDAMICAGAS  
GVSSCQGDSSGGLVLCERSGMWHLVGIVSWGTSNCNVRAPAV"

BASE COUNT 119 a 192 c 153 g 138 t  
ORIGIN

1 tggccctggc aggtttcact tcaggatggt agaggattcc acttctgtgg aggatccctg  
61 atcagcccgt actgggtcgt cactgctgct cactgccgcg tgtctccaag aaaccaccgt  
121 gttattctgg gagaacatga tcgccagtac aacagtgagc aaattcaggt caagtccatt  
181 tccagggcta tcaactaccc ctactacaac tcccagaact tcaacaacga catcaccctt  
241 ctgaagctgt catccccagt gcagatgacc tcccgtgtgt ctctgtgtg cctggcctcc  
301 tccagcacca gcatcccctc cggaaccaga tgtgtacca ctgggtgggg caggaccggc  
361 caaacctcaa gccccgcta cctccagcag actgccctgc ctctgctcag cctgaccag  
421 tgcaagcagt actggggta taacagaatc actgacgcca tgatctgtgc tgggtctct  
481 ggagtatcct cctgtcaggg tgactctggt ggcctctgg tctgtgagag gagtggaatg  
541 tggcacctcg tgggtattgt gtccctggggc acctctaact gcaacgtgcg cgccccctgcc  
601 gt

**LOCUS** Seq5 206 bp mRNA linear VRT 28-MAY-2014  
**DEFINITION** Lutjanus guttatus, chymotrypsinogen 2 partial CDS.  
**ACCESSION** Seq5  
**VERSION**  
**KEYWORDS** .  
**SOURCE** Lutjanus guttatus (spotted rose snapper)  
**ORGANISM** Lutjanus guttatus  
Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;  
Actinopterygii; Neopterygii; Teleostei; Neoteleostei;  
Acanthomorpha; Percomorpharia; Lutjanidae; Lutjanus.  
**REFERENCE** 1 (bases 1 to 206)  
**AUTHORS** Moguel-Hernandez,I., Andree,K.B., Gisbert,E., Pena,R. and Tovar,D.  
**TITLE** Analysis of ontogeny digestive functions of larvae of Lutjanus  
guttatus  
**JOURNAL** Unpublished  
**REFERENCE** 2 (bases 1 to 206)  
**AUTHORS** Moguel-Hernandez,I. and Andree,K.B.  
**TITLE** Direct Submission  
**JOURNAL** Submitted (28-MAY-2014) Pathology, IRTA, Crta. Poble Nou, Km. 5,5,  
San Carlos de la Rapita, Tarragona 43540, Spain  
**COMMENT** Bankit Comment: TOTAL # OF SEQS:9.

##Assembly-Data-START##  
Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing  
##Assembly-Data-END##

**FEATURES** Location/Qualifiers  
**source** 1..206  
/organism="Lutjanus guttatus"  
/mol\_type="mRNA"  
/db\_xref="taxon:455479"  
/country="Mexico"  
**gene** <1..>206  
/gene="Chymotrypsinogen II"  
/note="gene encoding chymotrypsinogen II"  
**CDS** <1..>206  
/gene="Chymotrypsinogen II"  
/note="digestive enzyme"  
/codon\_start=1  
/product="Chymotrypsinogen II"

/translation="WQVSLQDYTGFFHFCGGSLINENWVVTAAHCNVRTSHRVILGEHD  
RSSNAEDIQVMKVGVFKHPRYNG"

**BASE COUNT** 43 a 66 c 56 g 41 t  
**ORIGIN**

1 tggcaggtgt ccctgcagga ttacaccggc ttccacttct gtggcggctc cctcatcaat  
61 gagaactggg tggtagcggc cgctcactgc aacgtcagga ctcccaccg tgtgacacct  
121 ggagaacacg accgttctc caacgtgag gacatccagg tcatgaaggt cggcaaggtg  
181 ttcaagcacc cccgctaca cggcta

**LOCUS** Seq6 277 bp mRNA linear VRT 28-MAY-2014  
**DEFINITION** Lutjanus guttatus, cholecystokinin CCK partial CDS.  
**ACCESSION** Seq6  
**VERSION**  
**KEYWORDS** .  
**SOURCE** Lutjanus guttatus (spotted rose snapper)  
**ORGANISM** Lutjanus guttatus  
Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;  
Actinopterygii; Neopterygii; Teleostei; Neoteleostei;  
Acanthomorphata; Percomorpharia; Lutjanidae; Lutjanus.  
**REFERENCE** 1 (bases 1 to 277)  
**AUTHORS** Moguel-Hernandez,I., Andree,K.B., Gisbert,E., Pena,R. and Tovar,D.  
**TITLE** Analysis of ontogeny digestive functions of larvae of Lutjanus  
guttatus  
**JOURNAL** Unpublished  
**REFERENCE** 2 (bases 1 to 277)  
**AUTHORS** Moguel-Hernandez,I. and Andree,K.B.  
**TITLE** Direct Submission  
**JOURNAL** Submitted (28-MAY-2014) Pathology, IRTA, Crta. Poble Nou, Km. 5,5,  
San Carlos de la Rapita, Tarragona 43540, Spain  
**COMMENT** Bankit Comment: TOTAL # OF SEQS:9.

##Assembly-Data-START##  
Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing  
##Assembly-Data-END##

**FEATURES** Location/Qualifiers  
source 1..277  
/organism="Lutjanus guttatus"  
/mol\_type="mRNA"  
/db\_xref="taxon:455479"  
/country="Mexico"  
gene <1..>277  
/gene="cholecystokinin"  
/note="gene encoding peptide hormone CCK"  
CDS <1..>277  
/gene="cholecystokinin"  
/note="peptide hormone"  
/codon\_start=2  
/product="cholecystokinin"

/translation="SCLGLPFSSQLLDEGHRSL SAPSEALLEADHTLGEPHLQHRRSAPQL  
KALPLAEEDADSRANLSELLARLISSRKGSVRRNSTANRGGGLS"

BASE COUNT 50 a 106 c 72 g 49 t

ORIGIN

1 gagctgtttg gggctcccct tctcctcca gctcctgac gagggccacc gctccctctc  
61 cgctccttct gaagctctcc tcgaggcgga cacccacacc ttgggagagc ctcacctcca  
121 acaccgccgc tctgcccccc agctgaaggc tctcctctg gctgaggagg atgcagactc  
181 ccgagccaac ctcagcgagc tgctggcaag actcatctcc tccaggaaag gttctgtgcg  
241 cagaaactcc acggcgaaca gaggcgggcg actgagc

**LOCUS** Seq7 219 bp mRNA linear VRT 28-MAY-2014

DEFINITION Lutjanus guttatus, neuropeptide Y partial CDS.

ACCESSION Seq7

VERSION

KEYWORDS .

SOURCE Lutjanus guttatus (spotted rose snapper)

ORGANISM Lutjanus guttatus

Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;  
Actinopterygii; Neopterygii; Teleostei; Neoteleostei;  
Acanthomorphata; Percomorpharia; Lutjanidae; Lutjanus.

REFERENCE 1 (bases 1 to 219)

AUTHORS Moguel-Hernandez,I., Andree,K.B., Gisbert,E., Pena,R. and Tovar,D.

TITLE Analysis of ontogeny digestive functions of larvae of Lutjanus  
guttatus

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 219)

AUTHORS Moguel-Hernandez,I. and Andree,K.B.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (28-MAY-2014) Pathology, IRTA, Crta. Poble Nou, Km. 5,5,  
San Carlos de la Rapita, Tarragona 43540, Spain

COMMENT Bankit Comment: TOTAL # OF SEQS:9.

##Assembly-Data-START##

Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing

##Assembly-Data-END##

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..219

/organism="Lutjanus guttatus"

/mol\_type="mRNA"

/db\_xref="taxon:455479"

/country="Mexico"

gene <1..>219

/gene="NPY"

CDS            /note="gene encoding neurotransmitter protein"  
               <1..>219  
               /gene="NPY"  
               /note="neurotransmitter"  
               /codon\_start=2  
               /product="Neuropeptide Y"

/translation="LLCLGALTEGYPVKPENPGEDAPAEELAKYYSALRHYINLITRQRYGKR  
SSPEILDTLVSELLLKESTDTLP"

BASE COUNT    57 a    67 c    63 g    32 t  
ORIGIN

   1 gctgctctgc ctggcgccc tgacggaggg ataccgggtg aaaccggaga acccggggga  
   61 ggacgccctt gcggaggagc tggccaagta ctactcagcc ctgagacact acatcaacct  
  121 catcacaaga cagaggtatg gaaagaggtc cagtcctgag atcctggaca cactcgtctc  
  181 agagctgctg ttgaaggaaa gcacagacac cctcccaca

**LOCUS**    **Seq8**                    536 bp    mRNA    linear    VRT 28-MAY-2014

DEFINITION    Lutjanus guttatus, elongation factor 1-alpha partial CDS.

ACCESSION    Seq8

VERSION

KEYWORDS    .

SOURCE      Lutjanus guttatus (spotted rose snapper)

   ORGANISM    Lutjanus guttatus

               Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;  
               Actinopterygii; Neopterygii; Teleostei; Neoteleostei;  
               Acanthomorpha; Percomorpharia; Lutjanidae; Lutjanus.

REFERENCE    1 (bases 1 to 536)

   AUTHORS    Moguel-Hernandez,I., Andree,K.B., Gisbert,E., Pena,R. and Tovar,D.

   TITLE      Analysis of ontogeny digestive functions of larvae of Lutjanus  
               guttatus

   JOURNAL    Unpublished

REFERENCE    2 (bases 1 to 536)

   AUTHORS    Moguel-Hernandez,I. and Andree,K.B.

   TITLE      Direct Submission

   JOURNAL    Submitted (28-MAY-2014) Pathology, IRTA, Crta. Poble Nou, Km. 5,5,  
               San Carlos de la Rapita, Tarragona 43540, Spain

COMMENT     Bankit Comment: TOTAL # OF SEQS:9.

   ##Assembly-Data-START##

   Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing

   ##Assembly-Data-END##

FEATURES                    Location/Qualifiers

   source                    1..536

                             /organism="Lutjanus guttatus"

/mol\_type="mRNA"  
/db\_xref="taxon:455479"  
/country="Mexico"  
gene <1..>536  
/gene="EF1"  
/note="gene encoding elongation factor 1"  
CDS <1..>536  
/gene="EF1"  
/note="translation elongation factor"  
/codon\_start=3  
/product="elongation factor 1"

/translation="DAILPPARPTDKPLRLPLQDVYKIGGIGTVPVGRVETGVLKPGMVVTFAPPSLTTEVKSVEMHESLPEAVPGDNVGFNIKNVSVKEIRRGYVAGDSKNDPPKGA GSFNAQVIILNHPGQISQGYAPVLDCHTAHIACKFSELIEKIDRRSGKKLEDSPKSVKS GDAAIVKLIPQKPM"

BASE COUNT 112 a 182 c 137 g 105 t  
ORIGIN

1 ttgatccat cctgccacct gccgcccc ctgacaagcc cctccgtctg ccctgcagg  
61 acgtctacaa aatcggcggg attggaactg tccccgtcgg ccgtgttgag accggtgtcc  
121 tgaagcccgg catggctgct accttcgctc cccctccct gacctgag gttaagtctg  
181 ttgagatgca ccacgagtc ctgcccagg ctgtccctgg tgacaacgtc ggcttcaaca  
241 tcaagaacgt gtccgcaag gaaatccgct gtggatacgt ggctggagac agcaagaacg  
301 accacccaa gggagctggc agcttcaacg cccaggtcat catcctgaac caccctggcc  
361 agatctccca gggttacgct cccgtgctgg attgccacac cgctcacatt gcctgcaagt  
421 tcagcgagct catcgagaag atcgaccgct gtccggcaa gaagcttgag gacagcccca  
481 agtctgtaa gtctggtgat gccgccattg tcaagctgat cccacagaag cccatg

**LOCUS** Seq9 424 bp mRNA linear VRT 28-MAY-2014  
**DEFINITION** Lutjanus guttatus, fructose-1 6-bisphosphatase partial CDS.  
**ACCESSION** Seq9  
**VERSION**  
**KEYWORDS** .  
**SOURCE** Lutjanus guttatus (spotted rose snapper)  
**ORGANISM** Lutjanus guttatus  
Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;  
Actinopterygii; Neopterygii; Teleostei; Neoteleostei;  
Acanthomorpha; Percomorpharia; Lutjanidae; Lutjanus.  
**REFERENCE** 1 (bases 1 to 424)  
**AUTHORS** Moguel-Hernandez,I., Andree,K.B., Gisbert,E., Pena,R. and Tovar,D.  
**TITLE** Analysis of ontogeny digestive functions of larvae of Lutjanus  
guttatus  
**JOURNAL** Unpublished  
**REFERENCE** 2 (bases 1 to 424)

AUTHORS Moguel-Hernandez,I. and Andree,K.B.  
TITLE Direct Submission  
JOURNAL Submitted (28-MAY-2014) Pathology, IRTA, Crta. Poble Nou, Km. 5,5,  
San Carlos de la Rapita, Tarragona 43540, Spain  
COMMENT Bankit Comment: TOTAL # OF SEQS:9.

##Assembly-Data-START##  
Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing  
##Assembly-Data-END##

FEATURES Location/Qualifiers  
source 1..424  
/organism="Lutjanus guttatus"  
/mol\_type="mRNA"  
/db\_xref="taxon:455479"  
/country="Mexico"  
gene complement(<1..>424)  
/gene="fructose1,6 biphosphate"  
/note="gene encoding fructose1,6 biphosphate"  
CDS complement(<1..>424)  
/gene="fructose1,6 biphosphate"  
/note="enzyme"  
/codon\_start=2  
/product="fructose1,6 biphosphate"

/translation="DRDVKIKKKGKIYSLNEGQAQHFYDPDVTEYLQKKKYPEDGSAPYGSRY  
VGSMVADVHRTLVIYGGIFLYPANVKSPKGKLRLLYECNPMAFIMEQAGGMATTGTM  
NVLDIKPTSIHERVPVVLGSPDDVQEYLSICKKHKK"

BASE COUNT 99 a 107 c 92 g 126 t  
ORIGIN

1 tcattttta tgcttttac agatggaaag atattcctgc acgtcatcgg gggatcccag  
61 gactacgggg actcgctcgt ggatgctggt gggctgatg tccagaacat tcatggtcc  
121 tgtagtggcc atgcctcctg cctgctccat gatgaaggcc atgggggtgc atcatacaa  
181 cagcctcagc ttgcccttag gactcttgac attagcaggg tataaaaaga tgctccata  
241 caccaaagta cgatgaacat cagcgacat tgaaccgaca tatcggctgc catatggagc  
301 agagccatcc tctgggtatt tcttctttg taggtactct gtcacatctg gataaaaatg  
361 ctgtgcatat cttcatca aactgtagat ttcccctt ttcttgatct tcacatcccg  
421 atcc