



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL
CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS



ESTRUCTURA HISTOLÓGICA, CARACTERÍSTICAS
HISTOQUÍMICAS Y ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DEL
TUBO DIGESTIVO DEL CABALLITO DEL PACÍFICO
Hippocampus ingens (GIRARD, 1858)

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS

PRESENTA

DANIELA ALEJANDRA CORONA ROJAS

LA PAZ, B.C.S., JUNIO DE 2018



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 14 del mes de Mayo del 2018 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:

“ESTRUCTURA HISTOLÓGICA, CARACTERÍSTICAS HISTOQUÍMICAS Y ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DEL TUBO DIGESTIVO DEL CABALLITO DEL PACÍFICO *Hippocampus ingens* (GIRARD, 1858)”

Presentada por el alumno:

CORONA

ROJAS

DANIELA ALEJANDRA

Apellido paterno

materno

nombre(s)

Con registro:

A	1	6	0	9	6	4
---	---	---	---	---	---	---

Aspirante de:

MAESTRIA EN CIENCIAS EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS

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. RANATO PEÑA MARTÍNEZ
Director de Tesis



DRA. MARÍA DEL CARMEN RODRÍGUEZ JARAMILLO
2ª. Directora de Tesis



DR. MARCIAL ARELLANO MARTÍNEZ



DRA. CLAUDIA JUDITH HERNÁNDEZ GUERRERO



DR. DARIEL TOVAR RAMÍREZ

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES



DR. SERGIO HERNÁNDEZ TRUJILLO



I.P.N.
CICIMAR
DIRECCIÓN



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., el día 25 del mes de Mayo del año 2018

El (la) que suscribe BM. DANIELA ALEJANDRA CORONA ROJAS Alumno (a) del Programa
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS

con número de registro A160964 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 DRA. MARÍA DEL CARMEN RODRÍGUEZ JARAMILLO

y cede los derechos del trabajo titulado:

"ESTRUCTURA HISTOLÓGICA, CARACTERÍSTICAS HISTOQUÍMICAS Y ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

DEL TUBO DIGESTIVO DEL CABALLITO DEL PACÍFICO *Hippocampus ingens* (GIRARD, 1858)"

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: danielacorona_2006@hotmail.com - rpenam@ipn.mx - jaramilo04@cibnor.mx

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

BM. DANIELA ALEJANDRA CORONA ROJAS

Nombre y firma del alumno

AGRADECIMIENTOS

Al Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas (CICIMAR) del Instituto Politécnico Nacional (IPN), por su apoyo y haber hecho posible la realización de mis estudios de Maestría. De igual forma a todos los profesores que estuvieron implicados en mi preparación y aprendizaje durante estos 2 años. Agradezco enormemente cada una de sus clases, pues de ellas aprendí conocimientos increíbles y reforcé los míos propios. Muchas gracias.

A mi director de tesis, el Dr. Renato Peña Martínez, por haberme dado la oportunidad de realizar el presente trabajo bajo su dirección, así como sus consejos, su orientación y sobre todo, respetando mis ideas desde el principio de la Maestría. Por haberme brindado los conocimientos básicos del desarrollo del sistema digestivo en larvas y juveniles de los peces. Y el haber accedido a trabajar con una especie de la cual no tenía experiencia, pero aun así me concedió el placer de continuar estudiando con los caballitos de mar.

A la granja de producción “INGENS, Cultivos Marinos” (Mazatlán, Sinaloa) particularmente a Eliezer Zúñiga Villareal, por haberme facilitado la obtención de los ejemplares de *Hippocampus ingens*.

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C. (CIBNOR) por el préstamo de sus instalaciones y servicios. Así como su hospitalidad al haber admitido a una alumna externa.

De esta manera agradezco a la Dra. María del Carmen Rodríguez Jaramillo, por haber aceptado ser mi co-directora de tesis. Por brindarme su valioso tiempo y dedicación a mi trabajo, así como su gran asesoría y consejos en la parte de histología e histoquímica. Por su calidad bienvenida, y principalmente por su gran confianza, invaluable y sincera amistad brindada. Sobre todo, por tolerar mi impulso compulsivo sobre la perfección de las cosas. Así como también, a todos los integrantes y a mis nuevos amigos del Laboratorio de Histología e Histoquímica (Tec. Eulalia Meza Chávez, Dr. Edgar Esquiver, Andrés, Ana, Libertad, etc.), que van y vienen, pero me permitieron entablar una gran amistad y confianza con ellos.

Al Dr. Dariel Tovar Ramírez por su atención prestada y por haberme brindado sus grandes consejos y opiniones para mi manuscrito. Agradezco también, las mini clases de fisiología digestiva y enzimas, así como su confianza y amabilidad durante todo este tiempo.

A la Biol. Patricia Hinojosa Baltazar por su invaluable paciencia y apoyo en la realización de los protocolos de las determinaciones de las enzimas. Así como todo el equipo del Laboratorio de Genética Molecular y Fisiología Comparada (Joan, Andressa, Marce, Laura, Yoya, etc.), por haberme recibido de manera cálida y amigable a pesar del poco tiempo que estuve en el laboratorio.

Al resto de los miembros del comité tutorial, a la Dra. Claudia Edith Hernández Guerrero, al Dr. Marcial Arellano Martínez y al Dr. Víctor Hugo Cruz Escalona por sus valiosas y acertadas críticas en la mejora de mi manuscrito.

A mis amigos y compañeros del posgrado, Zulema, Norinely, Roberto, Juan, Laura, Valeria, Gina, etc., de quienes me llevo grandes recuerdos y experiencias durante toda mi estancia en CICIMAR.

A mis mejores amigos, Ricardo y Dulce, que me han acompañado desde la Universidad hasta este último gran logro. Agradezco a Dulce por haber compartido conmigo momentos, recuerdos y clases durante la Maestría, pues habrían sido muy solitarios y aburridos mis días sin su compañía y amistad. A Ricardo por haber estado en los buenos y malos momentos de mis estudios, así como en mi vida y que a pesar de los tropiezos que tuvimos, siempre estaremos ahí para apoyarnos el uno al otro.

A mi pequeña y linda familia, a mi madre Paola y mi hermana Rebeca por su apoyo y paciencia durante el tiempo de mi Maestría. A mis queridos canes (Bruno, Layla, Winnie, Oso y Gizmo), por haberles robado tiempo de juegos y atención por la realización de mi tesis. Y a pesar de que mi padre, Omar (Q.E.P.D), ya no está con nosotras, en donde sea que se encuentre, nos está cuidando y espero que esté orgulloso de lo que he logrado hasta este momento.

A todos, muchas gracias.

Dedico esta tesis a mi familia, que fueron base y apoyo incondicional.

Omar, Paola y Rebeca

INDICE

LISTA DE TABLAS	i
LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE ANEXOS	ii
GLOSARIO	iii
RESUMEN	iv
ABSTRACT	v
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	6
2.1. Estudios en cultivo	7
2.2. Estudios en otras especies de caballitos de mar	8
3. JUSTIFICACIÓN	9
4. OBJETIVOS	11
4.1. Objetivo general	11
4.2. Objetivos particulares.....	11
5. MATERIALES Y MÉTODOS	12
5.1. Obtención de muestras	12
5.2. Análisis histológico e histoquímico	12
5.3. Análisis enzimático.....	15
5.4. Cálculo de actividades enzimáticas	17
5.5. Análisis estadístico.....	18
6. RESULTADOS	19
6.1. Análisis estructural	19

6.1.1. <i>Esófago</i>	20
6.1.2. <i>Intestino</i>	25
6.1.3. <i>Glándulas accesorias</i>	32
6.2. Análisis enzimático.....	34
7. DISCUSIÓN	35
7.1. Análisis estructural	35
7.1.1. <i>Esófago</i>	36
7.1.2. <i>Intestino</i>	39
7.1.3. <i>Glándulas accesorias</i>	43
7.2. Análisis enzimático.....	45
8. CONCLUSIONES	53
9. BIBLIOGRAFÍA	54
10. ANEXOS	75

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Actividad enzimática total y específica (promedio \pm desv. est.) de <i>H. ingens</i>	34
---	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ejemplo de las mediciones de las diferentes estructuras histológicas.....	14
Figura 2. Ejemplar de <i>H. ingens</i>	19
Figura 3. Estructura del esófago anterior.....	21
Figura 4. Estructura del esófago posterior.....	22
Figura 5. Área de músculo en las diferentes regiones del esófago de <i>H. ingens</i> ...	23
Figura 6. Altura de vellosidades en las diferentes regiones del esófago de <i>H. ingens</i>	23
Figura 7. Altura de vellosidades en las diferentes regiones del esófago de <i>H. ingens</i>	24
Figura 8. Estructura del intestino anterior.....	27
Figura 9. Estructura del intestino medio.....	28
Figura 10. Estructura del intestino posterior.....	29
Figura 11. Área de mucinas ácidas en las diferentes regiones del intestino de <i>H. ingens</i>	30
Figura 12. Área de músculo en las diferentes regiones del intestino de <i>H. ingens</i> ..	30
Figura 13. Altura de vellosidades en las diferentes regiones del intestino de <i>H. ingens</i>	31
Figura 14. Altura de enterocitos en las diferentes regiones del intestino de <i>H. ingens</i>	31
Figura 15. Estructura del hígado y páncreas.....	33

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Solución de Fijación Davidson.....	75
Anexo 2. Procesamiento de Tejidos.....	76
Anexo 3. Técnicas de Tinción.....	77
<i>Anexo 3a. Tinción de Hematoxilina de Harris - Eosina-Floxina.....</i>	77
<i>Anexo 3b. Tinción de Azul Alciano-PAS.....</i>	78
<i>Anexo 3c. Tinción de Azul de Toluidina.....</i>	79
<i>Anexo 3d. Tinción de Sudán Negro.....</i>	80
<i>Anexo 3e. Tinción de Tricrómica de Masson.....</i>	81
<i>Anexo 3f. Tinción de Ninhidrina-Schiff.....</i>	82

GLOSARIO

Agastros: peces que no cuentan con un estómago desarrollado y funcional, como es característico de la etapa larvaria (Dantagnan-Dantagnan *et al.*, 2006).

Carbohidrasas: enzimas que tienen la función de hidrolizar los polisacáridos descomponiéndolos en cadenas de oligosacáridos y monosacáridos (Moguel-Hernández, 2015).

Enterocitos: células absortivas especializadas en el transporte de sustancias desde la luz del intestino hacia el torrente sanguíneo (Ross & Pawlina, 2010).

Enzima: proteínas especializadas en la catálisis de las reacciones biológicas (Nelson & Cox, 2009).

Lipasas: enzimas que poseen la función de hidrolizar los enlaces éster en los lípidos complejos (Moguel-Hernández, 2015).

Mucinas: glicoproteínas producidas por las células mucosas ubicadas en el ápice de la lámina propia (Murillo-Higuera, 2017).

Neoténico / Neotenia: conservación de la forma juvenil en los organismos debido al retardo del desarrollo corporal pero poseen madurez sexual (Girbert, 2005).

Parénquima Hepático: componente funcional de hígado y está constituido por cordones de hepatocitos y sinusoides hepáticos (Bernabé-Salazar *et al.*, 2013).

Proteasas: enzimas que catalizan la hidrolisis de los enlaces peptídicos de las proteínas (Álvarez-González, 2003).

Vena Centrolobular: vena de tamaño grande también llamada vena central en la cual desembocan los sinusoides hepáticos (Ross & Pawlina, 2010).

RESUMEN

Los peces poseen gran variedad de adaptaciones estructurales y fisiológicas que les permite capturar, digerir y absorber alimento. En *Hippocampus ingens* se ha reportado que no poseen dientes o estómago. Sin embargo, presenta la misma estructura intestinal que en otros teleósteos. En el presente trabajo se describen las características histológicas, histoquímicas y la presencia de actividad enzimática digestiva del tubo digestivo de *H. ingens* con la finalidad de aportar información que pueda ser empleada en el desarrollo del cultivo de esta especie. Se obtuvieron 15 juveniles provenientes de una granja en Mazatlán, Sinaloa, México. Cinco de ellos se fijaron en solución Davidson, se realizaron cortes a 4 μm y se tiñeron con H-E, Azul Alciano-PAS, Azul de Toluidina, Tricrómica de Masson, Sudán Negro y Ninhidrina-Schiff. Al resto se les extrajo el tubo digestivo y órganos accesorios para la determinación de la presencia de actividad de tripsina, quimotripsina, lipasa, amilasa, aminopeptidasa, fosfatasa ácida y fosfatasa alcalina. Se confirmó la presencia de un esófago anterior y posterior, en donde sólo la región anterior presenta numerosas células mucosas de tipo ácidas, mientras que la región posterior posee epitelio cilíndrico simple. Con base al tipo de epitelio, presencia y altura de vellosidades así como tipo y cobertura de mucinas presentes, el intestino se diferencia en tres regiones. La región anterior presenta mucinas ácidas y neutras, mientras que en las regiones media y posterior se presentan mucinas ácidas en mayor producción. Se observó la presencia de vacuolas que contenían triglicéridos dentro de los enterocitos del intestino anterior, así como proteínas en los hepatocitos. La actividad enzimática total y específica de aminopeptidasa, quimotripsina y amilasa mostraron valores muy bajos, y con respecto a lipasa y fosfatasa alcalina fueron los más altos, siendo tripsina y fosfatasa ácida los valores intermedios. Estos resultados confirman que *H. ingens* presenta una digestión intestinal alcalina y sugieren que poseen altos requerimientos de lípidos.

Palabras clave: caballitos de mar, histología, histoquímica, actividad enzimática y específica, digestión alcalina.

ABSTRACT

Fishes have a great variety of structural and physiological adaptations that allow them to capture, digest and absorb food. In *Hippocampus ingens* it has been reported that they do not have teeth or stomach. However, it has the same intestinal structure as in other teleosts. In the present work the histological, histochemical characteristics and the presence of digestive enzymatic activity of the digestive tract of *H. ingens* are described with the purpose of providing information that can be used in the development of the culture of this species. We obtained 15 juveniles from a farm in Mazatlan, Sinaloa, Mexico. Some of them were fixed in the Davidson's solution, sectioned at 4 μm using a rotatory microtome and stained with H-E, Alcian Blue-PAS, Toluidine Blue, Masson's Trichrome, Black Sudan and Ninhydrin-Schiff. To the rest, the digestive tract and the accessories were extracted to determine the presence of trypsin activity, chymotrypsin, lipase, amylase, aminopeptidase, acid phosphatase and alkaline phosphatase. The presence of an anterior and posterior esophagus was confirmed. Only the anterior region presents numerous acid-type mucosal cells, while the posterior region has simple cylindrical epithelium. Based on the type of epithelium, presence and height of villi as well as type and coverage of mucins present, the intestine differentiates into three regions. The anterior region presents acidic and neutral mucins, whereas in the middle and posterior regions it presents acidic mucins in greater production. The presence of vacuoles containing triglycerides within the enterocytes of the anterior intestine was recorded, as well as the proteins in the hepatocytes. The activity of aminopeptidase, chymotrypsin and amylase showed very low values with respect to lipase and alkaline phosphatase, which were the highest. Trypsin and acid phosphatase showed intermediate values. These results confirm that *H. ingens* presents an alkaline intestinal digestion and that it has high lipid requirements.

Key words: seahorses, histology, histochemistry, enzymatic and specific activity, alkaline digestion.



1. INTRODUCCIÓN

Los peces son el grupo de vertebrados más diverso, y debido a esa inmensa variedad han adoptado muchos hábitos alimentarios. Su sistema digestivo se encuentra bien desarrollado y estructuralmente acondicionado para adecuar variedades de alimentos. Existe una gran diversidad de adaptaciones estructurales y fisiológicas que les permite capturar, digerir y absorber su alimento, y dependiendo de la especie y el hábitat, los peces consumirán alimentos que van desde los organismos del plancton, algas marinas, invertebrados a partículas de origen orgánico indeterminado (Fänge & Grove, 1979; Oliveira-Ribeiro & Fanta, 2000; Horn & Gawlick, 2001). Sobre la base de la naturaleza de los alimentos que ingieren los peces, éstos pueden clasificarse en detritívoros, herbívoros, carnívoros y omnívoros, y a menudo la dieta llega a mezclarse. Con respecto a la diversidad de su alimento, los peces se pueden clasificar a su vez, como eurípagos (dieta mixta), estenófagos (surtido limitado de tipos de alimentos) y monófagos (consumiendo sólo un tipo de alimento). Sin embargo, una gran mayoría de peces se consideran carnívoros eurípagos (Kapoor *et al.*, 1975; Martínez-Palacios & Ríos-Martínez, 2000; Deshmukh *et al.*, 2015).

Ante esto, es de esperarse que la anatomía del tubo digestivo de los peces sea altamente variable, cambiando según los hábitos de alimentación, tipo de alimento, posición filogenética, estilo de vida, etc. A pesar de las diferencias existentes en la estructura, la función básica del sistema digestivo es similar entre todas las especies: llevar a cabo la digestión y absorción de alimento; participar en la osmorregulación; secreción de hormonas involucradas en la regulación de la digestión, metabolismo y función inmune mediante la protección contra organismos extraños y patógenos que pueden llegar al tubo digestivo con el alimento y el agua (Bakke *et al.*, 2001; Gómez-Ramírez *et al.*, 2010; Karasov & Douglas, 2013; Cardoso *et al.*, 2015; Şenol, 2015).

La capacidad de los peces para utilizar los nutrientes depende de la actividad de las enzimas digestivas presentes en el tubo digestivo. Las enzimas digestivas son catalizadores biológicos que hidrolizan los nutrientes en sus unidades estructurales

para que puedan ser asimilados por el organismo; éstas se pueden encontrar a lo largo del tubo digestivo con diferentes funciones y capacidades catalíticas. La clasificación de las enzimas se basa en los sustratos sobre los que actúan: proteasas, lipasas y carbohidrasas. Dentro de este tipo de enzimas también se encuentran las fosfatasas ácida y alcalina que participan en los procesos de desfosforilación de sustratos como nucleótidos y proteínas, pero también en los de absorción de nutrientes (Tengjaroenkul, 2000; Zambonino-Infante & Cahu, 2001; Chong *et al.*, 2002; Moguel-Hernández, 2015; Susilo *et al.*, 2016).

El estómago, el páncreas exocrino y el intestino, son los principales productores de las diferentes enzimas para la digestión de los nutrientes. Las diferentes enzimas presentes en el tubo digestivo son a menudo complementarias y en conjunto, permiten la digestión total de los alimentos facilitando su absorción a través de los enterocitos y/o el transporte. A su vez, la distribución y la intensidad de la actividad enzimática a lo largo del intestino varían con los hábitos alimentarios (carnívoros, omnívoros y herbívoros) y con la morfología intestinal (Zambonino-Infante & Cahu, 2001; Natalia *et al.*, 2004; Langeland *et al.*, 2013) o con el estado de desarrollo del organismo (Zambonino-Infante *et al.*, 2008).

En los teleósteos, igual que en otros fila, el tubo digestivo suele dividirse en cinco regiones. 1) La boca (o bucofaringe en algunas especies), está adaptada a su comportamiento alimentario, y su principal función es adquirir alimentos y procesarlo mecánicamente; 2) El esófago, el cual transfiere el alimento de la cavidad bucal al estómago o al intestino en aquellas especies agástricas; 3) El estómago (si está presente), es donde comienza la digestión química de los alimentos; 4) El intestino, cuya anatomía es homogénea en las familias primitivas, pero variable en las familias más evolucionadas, presentando una gran plasticidad con respecto a la alimentación, y es el sitio de la digestión química alcalina y de absorción; Finalmente 5) el recto, tiene como función la expulsión final de las heces (Barrington, 1957; Wilson & Castro, 2011).

Morfológicamente se pueden encontrar tubos digestivos con el esófago corto o largo, con o sin estómago, con el intestino corto y rectilíneo o largo y contorneado, y

con diversos tipos de pliegues o de enrollamientos en los casos intermedios, con o sin ciegos pilóricos, así como también pueden o no presentar un abultamiento llamado “bulbo” especialmente en algunas familias de ciprínidos, e incluir o no la presencia de una válvula espiral (también conocida como espiral o intestino valvular) observada en los condrictios (Hassanpour & Joss, 2009; Guillaume *et al.*, 2004; Argyriou *et al.*, 2016).

La relación entre la longitud intestinal con la corporal, varía mucho de especie a especie y está influenciada, además de por los hábitos alimenticios, por una serie de factores que incluyen el tamaño y la forma del cuerpo, y así mismo la longitud intestinal se ha utilizado como un indicador morfológico de nivel trófico en la ecología nutricional de los peces (Barrington, 1957; Al-Abdulhadi, 2005; Banan-Khojasteh *et al.*, 2009; Wilson & Castro, 2011).

Sin embargo, histológicamente, el tubo digestivo presenta una estructura similar entre todas las especies: formado por cuatro capas, a partir de la luz; mucosa, submucosa, muscular y adventicia o serosa. Las principales diferencias observadas entre especies radican en el tipo de epitelio, y está relacionado con los hábitos alimenticios, absorción y producción de mucosubstancias (Banan-Khojasteh *et al.*, 2009; Nazlić *et al.*, 2014; Dos-Santos *et al.*, 2015). A su vez, el tubo digestivo presenta una capa de células secretoras de mucus, detectadas con técnicas histoquímicas y cuya producción varía entre las diferentes especies de peces, así como en la ubicación en el tubo digestivo. Estas secreciones juegan un papel muy importante en la lubricación, absorción y transporte de macromoléculas, el aumento de la eficiencia digestiva y la prevención contra la degeneración proteolítica y microorganismos patógenos (Marchetti *et al.*, 2006; Vieira-Lopes *et al.*, 2013; Cardoso *et al.*, 2015).

El caballito del Pacífico *Hippocampus ingens* (Girard, 1858) es una especie que vive en aguas templadas y tropicales poco profundas. Se encuentra a lo largo de la línea de costa entre 1 - 15 m hasta los 45 - 60 m de profundidad (Vincent, 1996). Se distribuye desde San Diego, California hasta el norte de Perú incluyendo el Golfo de California y las Islas Galápagos (Lourie *et al.*, 2004).



Los caballitos de mar son peces depredadores y utilizan técnicas de emboscada para succionar rápidamente a su presa. Se alimentan de alimento vivo y en movimiento, como pequeños crustáceos, copépodos, anfípodos y huevos de los mismos (Teixeira & Musick, 2001; CITES, 2002). No presentan dientes, lengua o estómago. Ellos usan sus hocicos largos, delgados y tubulares para crear una fuerte succión con el que realizan la rápida ingesta de su alimento. Como no poseen un estómago, se argumenta que la pepsina del estómago presente en otras especies de peces, está ausente, lo que podría reducir la capacidad de los caballitos de mar para hacer frente a las dietas artificiales al momento de su cultivo (Palma *et al.*, 2014; Winter, 2014).

Actualmente, las poblaciones silvestres del caballito de mar están siendo sobreexplotadas a nivel mundial por su uso en la medicina tradicional China y Europea, consumo alimenticio humano, ornamento y su pesca incidental en las pesquerías de camarón (Vincent, 1996; Foster & Vincent, 2004). Ante ello, *H. ingens*, está catalogada como especie vulnerable por la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN). En México está listada en la NOM-059-SEMARNAT-2010 como especie Sujeta a Protección Especial (Pr).

Debido al potencial incremento de la comercialización, se deben desarrollar técnicas de cultivo que permitan, por un lado, satisfacer su demanda comercial y por el otro, profundizar en el conocimiento de su biología de modo que, ante la destrucción de su hábitat, se tengan los fundamentos necesarios para favorecer la preservación de estos organismos (Semarnat, 2006).

Sin embargo, la escasez de información sobre nutrición, reproducción y biología en la mayoría de las especies, entre ellas *Hippocampus ingens*, frena el desarrollo de un protocolo de cultivo adecuado. Generalmente, los intentos para mantener y/o cultivar caballito de mar, terminan en problemas biológicos o económicos, y los más comunes están relacionados con la falta de un alimento adecuado y el tratamiento de enfermedades (Bisso-Bustamante, 2006; Sandoval-Muy & Barón-Sevilla, 2007; Encomendero *et al.*, 2011).



Las técnicas histológicas e histoquímicas son las más utilizadas en los estudios de fisiología digestiva, ya que permiten describir los cambios morfológicos y funcionales que ocurren en el sistema digestivo de las diferentes especies de peces (Oeda-Rodríguez *et al.*, 2010; Canan *et al.*, 2012; Dos-Santos *et al.*, 2015; Cota-Mamani, 2016). No obstante, el estudio sobre la estructura de las diferentes regiones del tubo digestivo y la actividad enzimática digestiva en *Hippocampus ingens* no se ha realizado. Por lo cual, el conocimiento de la estructura histológica y la actividad de las enzimas digestivas presentes en el tubo digestivo de juveniles de *H. ingens* es fundamental para la comprensión de su fisiología y capacidad digestiva, lo que puede ser de utilidad para establecer bases estructurales y funcionales para el estudio de su nutrición.

2. ANTECEDENTES

La anatomía del tubo digestivo en los peces teleósteos ha sido bien documentada en diferentes especies (Al-Hussaini, 1949; Kapoor *et al.*, 1975; Fänge & Grove, 1979; Nazlić *et al.*, 2014) y varios autores han confirmado el arreglo histológico típico del sistema digestivo; mucosa, submucosa, muscular y adventicia, aunque presentando algunas diferencias entre especies, y a su vez incluyendo estudios en el hígado y páncreas (Clarke & Witcomb, 1980; Ribelles *et al.*, 1995; Torres *et al.*, 2010; Cao *et al.*, 2011; Rojas *et al.*, 2012; Bočina *et al.*, 2017). De igual forma se han descrito sus características estructurales, con el fin de comprender su funcionalidad y las dinámicas nutricionales de los peces (Ribeiro *et al.*, 1999; Rodrigues *et al.*, 2009), resaltando la importancia del intestino en la regulación del metabolismo, balance electrolítico y función inmune (Buddington *et al.*, 1997).

Desde hace tiempo autores como Hoar *et al.* (1979), Govoni *et al.* (1986) y Buddington *et al.* (1997) han estudiado a fondo la fisiología digestiva de los peces, mientras que Manjakasy *et al.* (2009), Wilson & Castro (2011) y Banan-Knojasteh (2012) entre otros, se han encargado de estudiar su morfología y su importancia en las diferentes regiones del sistema digestivo de los peces.

Por otro lado, algunos autores como Oliveira-Ribeiro & Fanta (2000), Canan *et al.* (2012), Nazlić *et al.* (2014), Dos-Santos *et al.* (2015) y Şenol (2015) han descrito la estructura histológica y la reacción histoquímica de los tractos digestivos de varias especies de teleósteos. También Álvarez-González (2003), Cara-Torres *et al.* (2002), Natalia *et al.* (2004), Rungruangsak-Torrissen *et al.* (2006), Toledo-Cuevas *et al.* (2011) y Moguel-Hernández (2015) han evaluado la presencia y el nivel de actividad de las enzimas digestivas, con el fin de comprender la funcionalidad y digestibilidad de los nutrientes en el tubo digestivo, haciendo énfasis en las etapas tempranas de desarrollo en varias especies de peces.

2.1. Estudios en cultivo

El cultivo de *H. ingens* se considera una alternativa para cubrir su demanda comercial, por lo que existen algunos trabajos relacionados al cultivo de esta especie, Téllez-Mohedano *et al.* (1997) cultivaron en estanque exterior obteniendo sobrevivencia cercana al 70%, sin registrar enfermedades o mortalidades relevantes con excepción de la embolia gaseosa (formación de burbujas subcutáneas de oxígeno). Reyes-Bustamante & Ortega-Salas (1999) desarrollaron técnicas de cultivo bajo condiciones controladas de laboratorio, reportando una sobrevivencia de 60% y una baja tasa de crecimiento.

Otros autores se han enfocado en mejorar el entendimiento de la eficiencia reproductiva de *H. ingens*. Bisso-Bustamante (2006) a partir de la selección de parejas de reproducción, obtuvo nacimientos más de 800 crías, logrando mantener cinco juveniles hasta los 19 días de vida. A su vez, Ortega-Salas & Reyes-Bustamante (2006) estudiaron la fecundidad, supervivencia y crecimiento en condiciones semi-controladas y reportaron que los machos liberaron aproximadamente 1700 juveniles, mismos que fueron alimentados con rotífero y *Artemia*. Encomendero *et al.* (2011) determinaron la fecundidad absoluta y relativa, la sobrevivencia y el crecimiento con alimento vivo en condiciones de laboratorio, observando una fecundidad absoluta de 103 juveniles por macho y una sobrevivencia nula después de 30 días, debido al problema de la burbuja de aire (embolia gaseosa).

Por su parte, Sandoval *et al.* (2007) estudiaron el efecto de dos alimentos congelados naturales en la rutina metabólica y excreción de amoníaco en *H. ingens*, y Mones-Saucedo (2011) evaluó el uso de un copépodo calanoide (*Pseudodiaptomus euryhalinus*) como alimento vivo. Ambos trabajos tuvieron como finalidad identificar las necesidades nutricionales y determinaron que dichos alimentos son apropiados para mejorar el cultivo.

2.2. Estudios en otras especies de caballitos de mar

Algunos de los trabajos que se han realizado con juveniles del género *Hippocampus*, tales como *H. erectus* (Tindemans *et al.*, 2010), *H. guttulatus* (Palma *et al.*, 2013), *H. reidi* (Novelli *et al.*, 2015) e *H. ingens* (Corona-Rojas, 2015) describen de manera general las características histológicas del tubo digestivo alimentados con *Artemia*, haciendo hincapié en la ausencia de estómago así como de dientes y lengua, y mencionando la presencia de mucinas en la región esofágica e intestinal.

A pesar de que se ha hecho el seguimiento del desarrollo ontogénico del tubo digestivo, son pocos los trabajos que estudian la actividad de las enzimas digestivas, con el fin de comprender la capacidad digestiva de los caballitos de mar. Wardley (2006) y Blanco *et al.* (2016) con *H. guttulatus*, Novelli *et al.* (2016) con *H. reidi* y Segade *et al.* (2016) con *H. hippocampus*, describieron la anatomía del sistema digestivo y el desarrollo ontogenético de enzimas digestivas de proteasas, glucosidasas, lipasas y fosfatasas ácida y alcalina.

3. JUSTIFICACIÓN

Actualmente, existen varias causas que generan que las poblaciones silvestres de los caballitos de mar tiendan a disminuir, no sólo la pérdida de su hábitat debido a las capturas incidentales durante la pesca comercial de camarón (<95%), sino también a la sobreexplotación directa (Vincent, 1999; Foster & Vincent, 2004; Nijman, 2010; Murugan *et al.*, 2011; Otero *et al.*, 2012).

Los caballitos de mar son teleósteos populares en los acuarios marinos debido a su peculiar aspecto y su sistema de apareamiento, y esto los ha hecho particularmente susceptibles a disturbios antropogénicos, por lo que el interés en su biología y reproducción, ha aumentado en los últimos años (Koldewey & Martin-Smith, 2010; Murugan *et al.*, 2011; Olivotto *et al.*, 2011).

Adicionalmente, son explotados y comercializados por su uso en la medicina tradicional China (TCM) y Europea, así como peces de acuario y venta como curiosidades (Vincent, 1999; Foster & Vincent, 2004; Lourie *et al.*, 2004). También se les han atribuido propiedades para tratar enfermedades como el asma, bronquitis, hemorragias, desórdenes menstruales, trastornos después del parto, gastritis, tuberculosis y prevención de aborto (Alves & Alves, 2011).

Al menos 32 países de todo el mundo están involucrados en el comercio de caballitos de mar y su demanda anual en los países asiáticos es de alrededor de 45 toneladas de organismos secos. Países como India, Indonesia, Filipinas, Tailandia, Vietnam y Malasia se han reportado como exportadores de estos organismos, mientras que China, Hong Kong, Taiwán y Singapur, entre otros, son importadores (Vincent, 1996; Sandoval-Muy & Barón-Sevilla, 2007).

Todo el género *Hippocampus* está incluido en el Apéndice II de la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres (CITES) a partir de mayo de 2004 y se ha mencionado que pueden ser las especies más ampliamente y voluminosamente comercializadas (Bruckner *et al.*, 2004; Lourie *et al.*, 2004; Rosa *et al.*, 2011).



En este contexto, el cultivo de estos organismos se considera como alternativa para satisfacer su demanda y reducir la sobreexplotación (Koldewey & Martin-Smith, 2010; Otero-Ferrer, 2011). Sin embargo, el cultivo de los caballitos de mar es difícil en varios sentidos, aunque principalmente por la escasez de información sobre su biología y reproducción en la mayoría de las especies, lo cual frena el desarrollo de un protocolo adecuado. El limitado conocimiento de sus requerimientos nutricionales, así como de los patrones de alimentación durante los períodos de reproducción y etapas juveniles han sido identificados como los principales obstáculos para su éxito comercial (Sandoval-Muy & Barón-Sevilla, 2007; Otero *et al.*, 2012; Novelli *et al.*, 2016).

Varios estudios han descrito la estructura histológica y la reacción histoquímica de los tractos digestivos, así como la actividad enzimática digestiva en diferentes especies de teleósteos con la finalidad de mejorar los protocolos aplicados en la crianza larvaria y estudios de nutrición. Sin embargo, el estudio de la estructura histológica, las características histoquímicas y las relaciones entre las diferentes regiones del esófago e intestino, así como la actividad enzimática digestiva, en *Hippocampus ingens* no se ha reportado, por lo que este trabajo brindará información que puede ser utilizada en el cultivo de esta especie.



4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Analizar las características histológicas, histoquímicas y la actividad enzimática del tubo digestivo del caballito del Pacífico, *Hippocampus ingens*.

4.2. Objetivos particulares

Describir las características histológicas generales del tubo digestivo y órganos accesorios de *Hippocampus ingens*.

Diferenciar las características histoquímicas de las células mucosas presentes en el tubo digestivo.

Evidenciar la absorción de lípidos y carbohidratos en el tubo digestivo.

Evaluar y comparar las características morfométricas (área de mucinas y músculo, altura de vellosidades y enterocitos) de los segmentos esofágicos e intestinales.

Cuantificar la actividad enzimática de tripsina y quimiotripsina, leucina aminopeptidasa, α -amilasa, lipasa, fosfatasas ácida y alcalina.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Obtención de muestras

Los caballitos de mar (*Hippocampus ingens*) fueron donados por la granja de producción “INGENS, Cultivos Marinos” con sede en Mazatlán, Sinaloa, México, quien posee permiso comercial de exportación. Fueron donados 15 organismos juveniles, los cuales fueron enviados vía aérea a la ciudad de La Paz, B.C.S. y transportados a la Unidad Piloto de Maricultivos (UPIMA) del Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas (CICIMAR-IPN). A su llegada, los organismos fueron medidos, pesados y sacrificados uno por uno mediante una sobreexposición de una solución de fenoxietanol. Haciendo uso de un equipo de disección, a 10 organismos se les realizó una incisión en la región ventral y se les extrajo el tubo digestivo así como los órganos accesorios, los cuales fueron almacenados en un vial de plástico y mantenidos en un ultracongelador a -80°C hasta el posterior análisis de la actividad enzimática digestiva. Mientras que cinco organismos se fijaron en completo en una solución de Davidson (Anexo 1) para su posterior análisis histológico.

5.2. Análisis histológico e histoquímico

El trabajo se realizó en el Laboratorio de Histología del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR) bajo la supervisión y colaboración de la Dra. María del Carmen Rodríguez Jaramillo.

Los organismos se deshidrataron en un procesador de tejidos (Leica ASP200 S) en una serie gradual de etanol (70, 80, 90, 96, y 100%) y después se aclararon con Xilol (Anexo 2). Una vez deshidratados, fueron incluidos en bloques de Paraplast y se cortaron en serie con un micrótopo de rotación (Leica RM 2155) a $4\ \mu\text{m}$ de grosor. Por medio de un teñidor automático (Leica ST 5020), dichos cortes fueron teñidos con diferentes técnicas histológicas para evidenciar las características generales del tubo digestivo y con técnicas histoquímicas para detectar compuestos específicos.

Las tinciones incluyeron: Hematoxilina-Eosina de Harris (H-E) (Anexo 3a), la cual permite observar las características histológicas generales de los tejidos; Azul Alciano-PAS (Ácido peryódico de Schiff) (Anexo 3b) permite detectar presencia de glucógeno, mucopolisacáridos ácidos y neutros; Azul de Toluidina (Anexo 3c) para diferenciar estructuras del tipo mucopolisacáridos neutros; Sudán Negro (Anexo 3d), que tiñe los triglicéridos y lípidos, así como algunas lipoproteínas; Tricrómica de Masson (Anexo 3e) detecta capas musculares; mientras que la tinción Ninhidrina-Schiff (N-S) (Anexo 3f) permite diferenciar entre las proteínas absorbidas y constituyentes (Sheehan & Hrapchak, 1973; Peña, 2000; Oliveira *et al.*, 2010).

Todas las secciones histológicas fueron observadas con un microscopio óptico (Olympus BX41) adaptado a una cámara (Nikon DS-Ri1) para describir las características de los tejidos, así como para registrar los sitios de reacción en las pruebas histoquímicas. Se tomaron fotografías digitales con un sistema de captura y análisis de imágenes (Image Pro-Plus v.9).

Se les realizaron mediciones del área de mucinas (Fig. 1A) y músculo (Fig. 1B), así como la altura de vellosidades (Fig. 1C) y enterocitos (Fig. 1D), con la finalidad de diferenciar entre las distintas regiones del esófago e intestino.

Para el análisis de imágenes se utilizó la identificación automática de píxeles del color específicos de cada tinción. Se calculó el área de píxeles de un color, el cual se expresa como el área (μm^2) (Rodríguez-Jaramillo *et al.*, 2008.) de forma automática. El área de la cobertura de mucinas y músculo en cada tejido se determinó utilizando las siguientes fórmulas;

a) Cálculo del área de cobertura de mucinas ácidas:

$$IMA = \frac{SAC}{AT} \times 100$$

b) Cálculo del área de cobertura de músculo:

$$IMU = \frac{SAC}{AT} \times 100$$

Dónde:

IMA= es el índice de mucinas,

IMU= es el índice de músculo,

SAC= es la suma de áreas de cobertura específica del color azul (mucinas ácidas) / rojo (músculo) en las imágenes de las laminillas a 40X,

AT= es la suma del área del epitelio alrededor del tejido, expresada en número de pixeles normalizados por el área (μm^2).

Para el cálculo de la altura de vellosidades y enterocitos, se utilizaron las herramientas de medición del mismo programa (Image Pro-Plus v.9) convirtiendo los números de pixeles en altura (μm) y utilizando también imágenes a 40X. En el caso de la altura de las vellosidades se tomó desde la lámina propia hasta la parte apical del pliegue. Mientras que la altura de los enterocitos, fue desde la parte basal de la célula hasta su parte apical, incluyendo las microvellosidades.

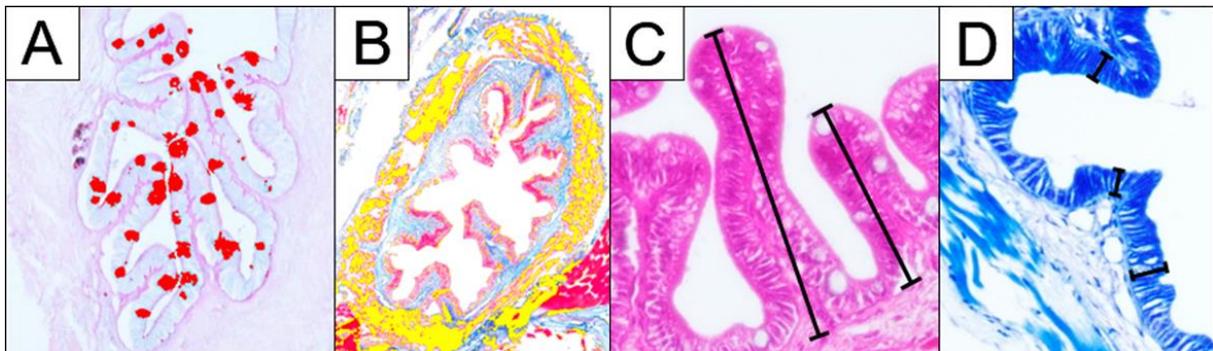


Figura 1. Ejemplo de las mediciones de las diferentes estructuras histológicas. A. Área de mucinas, B. Área de músculo, C. Altura de vellosidades, D. Altura de enterocitos.

5.3. Análisis enzimático

El trabajo se realizó en el Laboratorio de Fisiología Comparada del CIBNOR bajo la supervisión y colaboración del Dr. Dariel Tovar Ramírez y la Biol. Patricia Hinojosa Baltazar.

Para la preparación del extracto enzimático, los intestinos y órganos accesorios, se homogenizaron en un sólo vial con agua mili-Q y perlas de vidrio (5 mm y 425-600 μ m) en un homogenizador de muestras (FastPrep-24™ 5G) a una velocidad de 4 m/seg y con un tiempo de 40 seg hasta que su homogenización fuera total. Estos a su vez, fueron mantenidos en hielo todo el tiempo para evitar la desnaturalización de las enzimas. Posteriormente, los extractos fueron centrifugados en una centrifuga (Eppendorf 5430 R) a 17949 g por 10 min a 5°C. Finalmente el sobrenadante fue almacenado en una alícuota de 1.5 ml a -80°C en un ultracongelador para su posterior utilización.

La concentración de proteínas se determinó a partir de la técnica de Bradford (1976) adaptada a microplaca. Se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 595 nm en un lector de microplacas (Varioskan™ Flash). Todas las medidas se realizaron por triplicado. La curva de calibración se llevó a cabo a partir de una solución estándar de albúmina bovina (0-0.5 mg/ml).

Se determinó por triplicado la actividad de las enzimas digestivas Tripsina (E.C. 3.4.21.4), Quimotripsina (E.C. 3.4.21.1), α -Amilasa (E.C. 3.2.1.1), Lipasa (E.C. 3.1.1.3), Leucina Aminopeptidasa (E.C. 3.4.11.1), Fosfatasas Acidas (E.C. 3.1.3.2) y Alcalinas (E.C. 3.1.3.1), adaptadas a microplaca utilizando métodos fluorométricos y fotométricos.

Para la actividad de tripsina se utilizó el método de Toledo-Cuevas *et al.* (2011). Se utilizó 6 mM de Boc-Gln-Ala-Arg-7 amido-4 metilcoumarin hidrocloreto (Sigma B4153) como sustrato en dimetilsulfóxido (DMSO) y usando un buffer 50 mM de Tris-HCl y 10 mM de CaCl₂ a un pH 7.5. Se colocaron 10 μ l del extracto enzimático, 5.2 μ l de sustrato y 194.8 μ l de buffer. La absorbancia se midió a una

longitud de onda a 355 nm de excitación y a 460 nm de emisión con una temperatura de incubación a 30°C en un lector de microplacas (Varioskan™ Flash).

La actividad de quimotripsina se determinó con el método de Rotllant *et al.* (2008). Se utilizó 6 mM de N-succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-7 amido-4 metilcoumarin (Sigma S9761) como sustrato en dimetilsulfóxido (DMSO) y usando un buffer 50 mM de Tris-HCl y 10 mM de CaCl₂ a un pH 7.5. Se colocaron 10 µl del extracto enzimático, 5.2 µl de sustrato y 194.8 µl de buffer. La absorbancia se midió a una longitud de onda a 355 nm de excitación y a 460 nm de emisión con una temperatura de incubación a 30°C en un lector de microplacas (Varioskan™ Flash).

Para la actividad de amilasa se utilizó el método de Vega-Villasante *et al.* (1993). Se colocaron 500 µl de buffer 50 mM de Tris-HCl a un pH 7.5 con 5 µL de extracto crudo (glucosa), se agregaron 500 µl de almidón al 1% y se dejó incubar por 10 min. Posteriormente se adicionaron 200 µl de carbonato de sodio a 2 N y 1.5 ml de DNS. Finalmente se dejó incubar por 15 min a temperatura de ebullición (Baño María) y la absorbancia se leyó a una longitud de onda a 550 nm en un espectrofotómetro (JENWAY 6505 UV/Vis. Spectrophotometer).

La actividad de lipasa se determinó con el método de Toledo-Cuevas *et al.* (2011). Se utilizó 50 mM de 4 Metilumbeliferol butirato (MUB) como sustrato en DMSO y usando un buffer de 0.1 M de bifosfato de sodio a un pH 8. Se colocaron 20 µl de extracto con 237.4 µl de buffer y 2.6 µl de sustrato. La absorbancia se midió a una longitud de onda a 355 nm de excitación y a 460 nm de emisión en un lector de microplacas (Varioskan™ Flash).

Para la actividad de fosfatasa ácida y alcalina se utilizó el método de Toledo-Cuevas *et al.* (2011). Se preparó un stock de 10 mM con DMSO de sustrato 6,8-Difluoro-4-Metilumbeliferil Fosfato (DiFMUP). Se utilizó 0.5 M de Acetato de Sodio a un pH 5 para el buffer de fosfatasa ácida, mientras que para el buffer de fosfatasa alcalina fueron 100 mM de Glicina con 1 mM de MgCl₂ y 1 mM ZnCl₂ a pH 10.4. Para cada determinación colocaron 140 µl de buffer respectivo, 10 µl de extracto y 50 µl

de sustrato. La absorbancia se midió a una longitud de onda a 358 nm de excitación y a 455 nm de emisión en un lector de microplacas (Varioskan™ Flash).

La actividad de aminopeptidasa se determinó con el método de Maraux *et al.* (1973). Se utilizó como sustrato 0.1 M de L-leucina p-nitroanilida en DMSO y usando un buffer de 80 mM de bifosfato de sodio a un pH 7. Se colocaron 10 µl de extracto, 245 µl de buffer y 5 µl de sustrato. La absorbancia se leyó a una longitud de onda a 410 nm a 37°C en un lector de microplacas (Varioskan™ Flash).

5.4. Cálculo de actividades enzimáticas

La actividad enzimática de los extractos de *H. ingens* se determinó utilizando las siguientes ecuaciones;

a) Cálculo de la actividad en unidades por µl (Método fluorométrico)

$$Unidad / \mu = \frac{\Delta abs \times volumen\ final_{reacción} (\mu l) \times FD}{volumen\ extracto(\mu l)}$$

b) Cálculo de la actividad en unidades por µl (Método fotométrico)

$$Unidad / \mu l = \frac{\Delta abs \times volumen\ final_{reacción} (\mu l) \times FD}{CEM \times tiempo(min) \times volumen\ extracto(\mu l)}$$

c) Cálculo de la actividad en unidades por mg de proteína soluble en el extracto.

$$Unidades / mg\ de\ Proteína\ Soluble = \frac{Unidades / \mu l}{mg\ proteína\ soluble / \mu l}$$

Dónde:

Δ_{abs} = es el incremento de absorbancia a una determinada longitud de onda,

Volumen final _{reacción}= es el volumen final de la reacción,

FD= es el factor de dilución,

CEM= es el coeficiente de extinción molar.

5.5. Análisis estadístico

Se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía a las áreas de mucosa y músculo, y a las alturas de las vellosidades y enterocitos obtenidas de las diferentes regiones del esófago e intestino de *H. ingens*. La normalidad de los datos se verificó con la prueba Kolmogorov-Smirnov, mientras que la homogeneidad de varianza se determinó utilizando la prueba Levene. Los resultados fueron transformados a Log_{10} antes del ANOVA, pero se presentan las medias y el error estándar de los datos no transformados. Posteriormente se aplicó una prueba *post-hoc* de Tukey para identificar las interacciones entre los tratamientos. En todos los análisis el nivel de significancia fue de $p < 0.05$. Para el análisis estadístico de los datos se utilizó el software Statistica v.12.

6. RESULTADOS

La longitud promedio de los 15 ejemplares de *Hippocampus ingens* fue de 56.95 ± 3.43 mm, mientras que el peso promedio fue de 0.43 ± 0.06 gr (Fig. 2).

El sistema digestivo de *H. ingens* comprende un canal alimenticio que se divide en esófago, intestino, hígado y páncreas. El intestino se arregla en varios pliegues. El estómago no está presente. En su boca no se observó la presencia de dientes ni lengua.

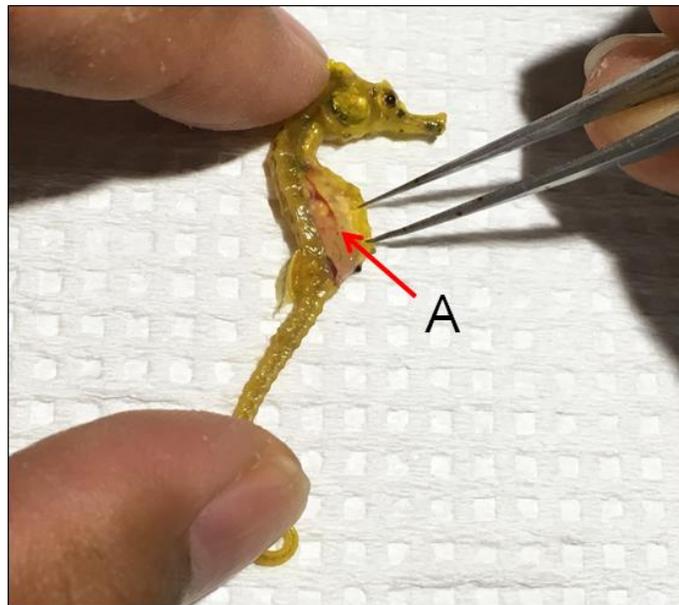


Figura 2. Ejemplar de *H. ingens*. A) Sistema digestivo.

6.1. Análisis estructural

Histológicamente, el tubo digestivo está conformado por cuatro capas principales ordenadas concéntricamente de adentro hacia afuera: mucosa, submucosa, muscular y adventicia. La capa mucosa a su vez presenta tres subcapas; epitelio, lámina propia y *muscularis mucosae* (estas dos últimas son poco distinguibles). Este arreglo en capas se observó a lo largo de todo el tubo digestivo. No obstante, se distinguieron algunas variaciones y diferencias celulares que

permitieron distinguir entre cada segmento del tubo digestivo. A continuación se presenta la descripción detallada de cada uno de los componentes del tubo digestivo.

6.1.1. Esófago

En el esófago se distinguieron dos regiones; la región anterior y la región posterior. La capa mucosa de la región anterior se compone de un epitelio cilíndrico simple conformado de células mucosas (Fig. 3A), las cuales se tiñeron de color azul con la tinción de Azul Alciano-PAS lo que indica la presencia de mucopolisacáridos ácidos (Fig. 3B), mientras que con Azul de Toluidina se tiñeron de color morado indicando presencia de glucoproteínas (Fig. 3C). Su lámina propia se compone de una capa de tejido conjuntivo y vasos sanguíneos, y está situada centralmente entre el pliegue de la mucosa. La capa submucosa usualmente comprende tejido conjuntivo y también se observa la presencia de vasos sanguíneos. La capa muscular está constituida de fibras musculares del tipo estriado esquelético que se tiñen de un tono rojizo con Tricrómica de Masson (Fig. 3D).

La región posterior del esófago, carece de células mucosas en su capa mucosa, solamente presenta epitelio cilíndrico simple (Fig. 4A). No hubo una reacción positiva a la tinción de Azul Alciano-PAS (Fig. 4B) ni con Azul de Toluidina (Fig. 4C), lo que indica la ausencia de secreción de mucopolisacáridos ácidos y neutros en ésta región del esófago. La capa submucosa también se compone de tejido conjuntivo aunque visiblemente mayor cantidad que la región anterior. La capa muscular igualmente presenta músculo estriado esquelético aunque con mayor grosor y son más notables los paquetes musculares, rodeados de tejido conjuntivo denso, denominado también como perimísio, el cual se tiñe de verde azulado con Tricrómica de Masson (Fig. 4D), y al final se observan que están rodeados por la túnica adventicia, una delgada capa de tejido conjuntivo.

Se registró el área de mucinas y músculo, así como la altura de vellosidades y altura de los enterocitos presentes en las diferentes regiones del esófago. Se observó que las mucinas ácidas en el esófago cubren una mayor área en la región anterior ($27,508.92 \pm 1,807.10 \mu\text{m}^2$), debido a que en la región posterior sólo se

encuentra epitelio cilíndrico simple. Caso contrario sucedió con el área de músculo ($p=0.03248$) (Figura 5), la región anterior ($36,417.06 \pm 823.48 \mu\text{m}^2$) presentó menor área ($39,189.09 \pm 960.93 \mu\text{m}^2$) con respecto a la región posterior, a pesar de que ambas presentaron músculo estriado esquelético. La altura de las vellosidades ($p=0.00001$) (Figura 6) en la región anterior mostró mayores valores ($123.39 \pm 1.74 \mu\text{m}$) a comparación con la región posterior ($91.85 \pm 2.47 \mu\text{m}$). Este mismo comportamiento se vio reflejado en la altura de los enterocitos ($p=0.00001$) (Figura 7), donde la región anterior posee células más altas ($13.29 \pm 0.09 \mu\text{m}$) a diferencia de la región posterior ($11.03 \pm 0.13 \mu\text{m}$).

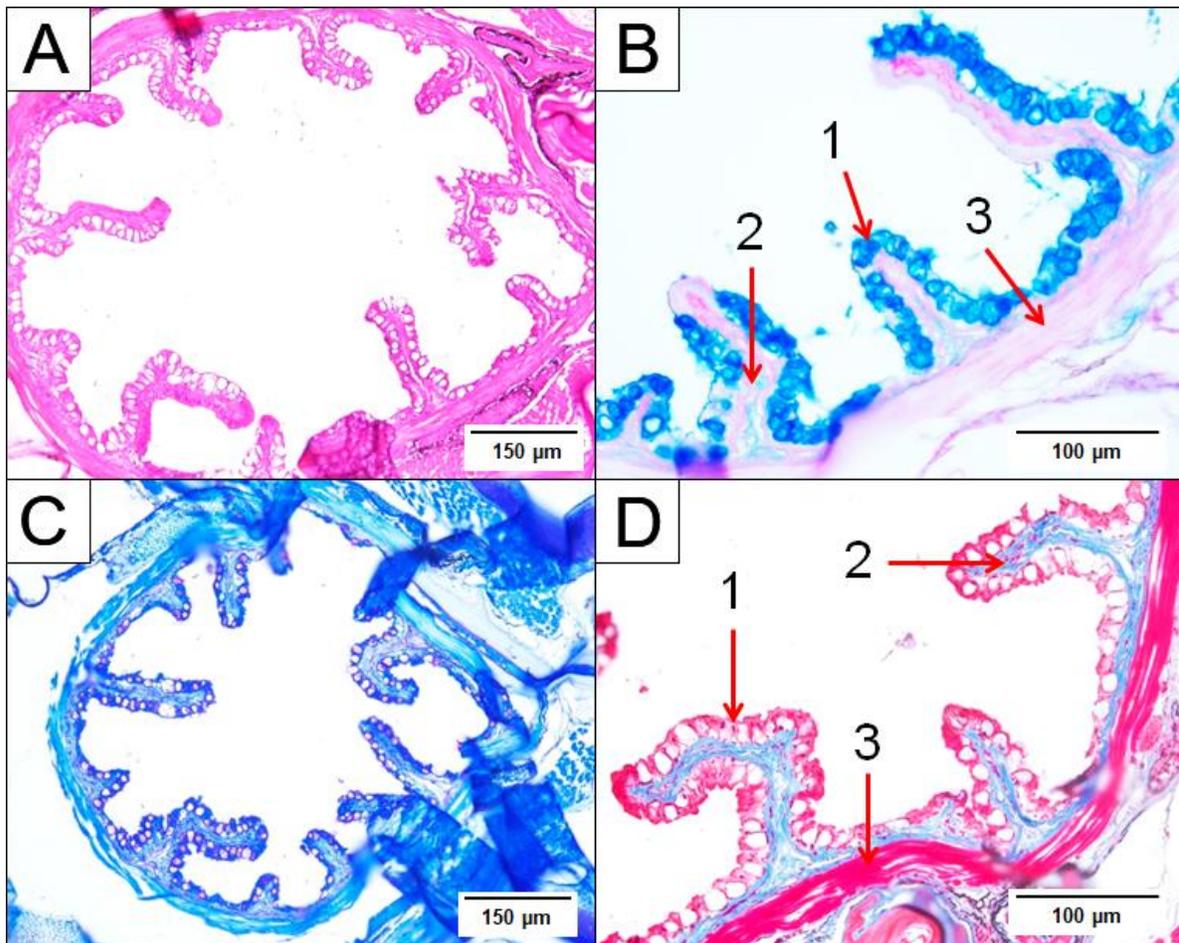


Figura 3. Estructura del esófago anterior. Cortes en plano transversal. A. Hematoxilina-Eosina (20x), B. Azul Alciano-PAS (40x), C. Azul de Toluidina (20x), D. Tricrómica de Masson (40x).
1) Capa mucosa, 2) Capa submucosa, 3) Capa muscular.

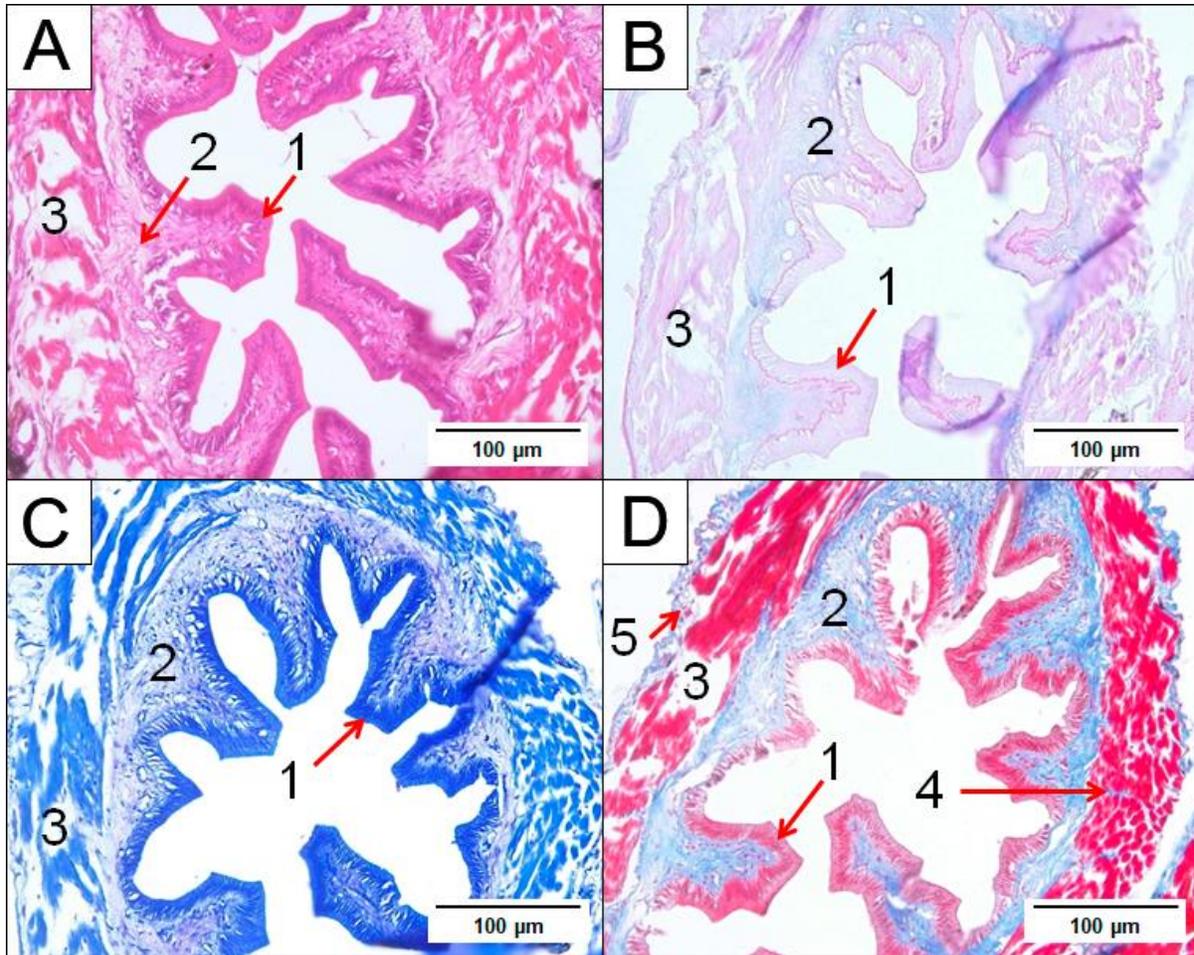


Figura 4. Estructura del esófago posterior. Cortes en plano transversal. A. Hematoxilina-Eosina (40x), B. Azul Alciano-PAS (40x), C. Azul de Toluidina (40x), D. Tricrómica de Masson (40x).
1) Capa mucosa, 2) Capa submucosa, 3) Capa muscular, 4) Perimisiso, 5) Capa adventicia.

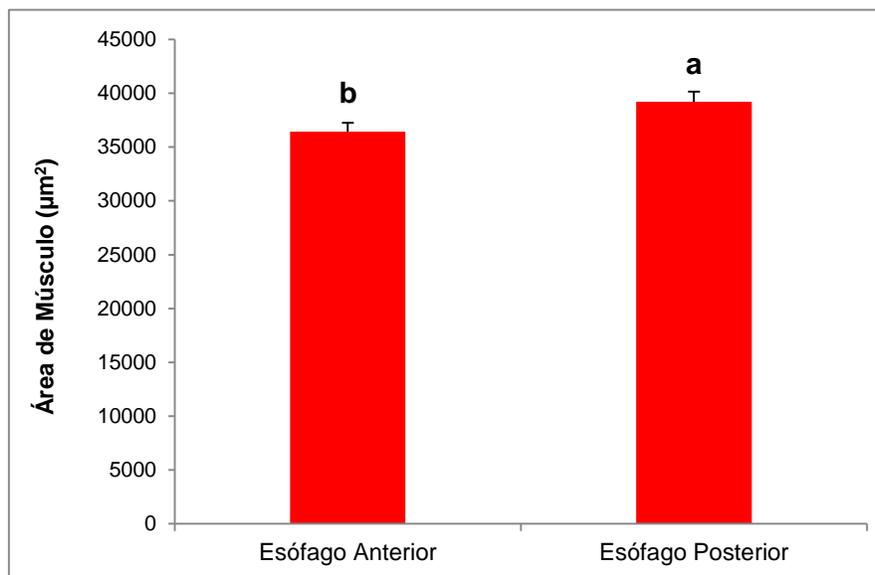


Figura 5. Área de músculo en las diferentes regiones del esófago de *H. ingens*. Los resultados se reportan como media \pm error estándar. Se realizó un ANOVA de una vía ($p=0.03248$). Se aplicó un *post hoc* de Tukey para comparar las medias. Las letras distintas indican diferencia significativa entre medias.

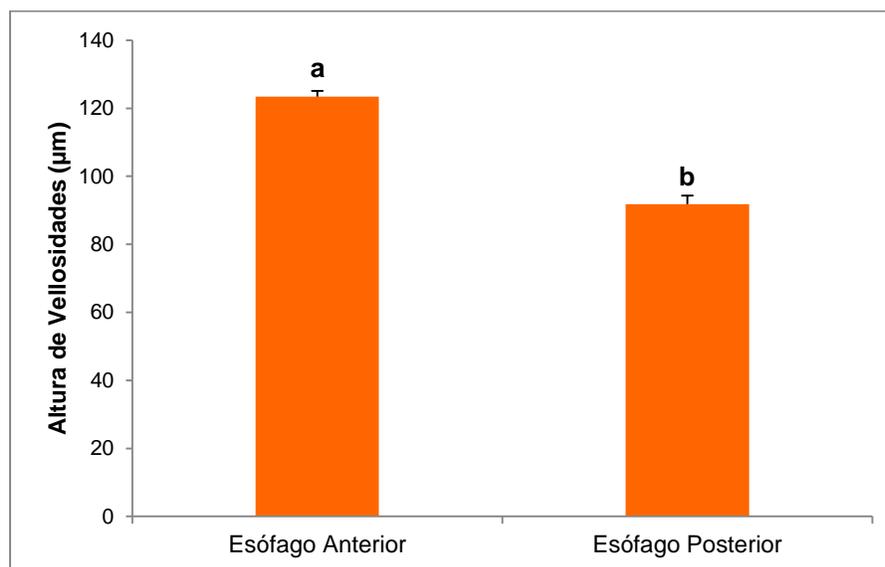


Figura 6. Altura de vellosidades en las diferentes regiones del esófago de *H. ingens*. Los resultados se reportan como media \pm error estándar. Se realizó un ANOVA de una vía ($p=0.00001$). Se aplicó un *post hoc* de Tukey para comparar las medias. Las letras distintas indican diferencia significativa entre medias.

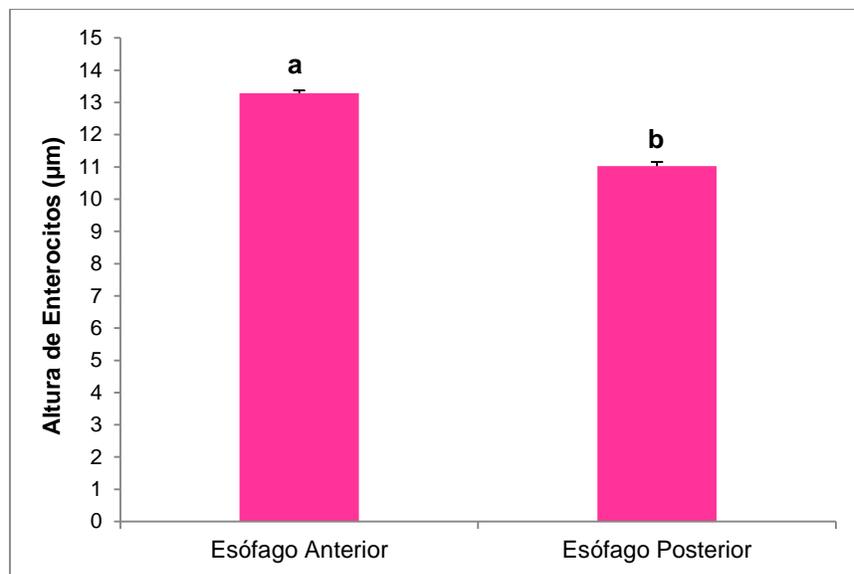


Figura 7. Altura de vellosidades en las diferentes regiones del esófago de *H. ingens*. Los resultados se reportan como media \pm error estándar. Se realizó un ANOVA de una vía ($p=0.00001$). Se aplicó un *post hoc* de Tukey para comparar las medias. Las letras distintas indican diferencia significativa entre medias.

6.1.2. Intestino

Hippocampus ingens no presenta estómago, de modo que el esófago se conecta directamente con el intestino. El intestino se extiende hasta el recto, pero arreglado en pliegues. Con base en diferentes caracteres como tipos de células mucosas, producción de las mismas y tamaño, y tipo de vellosidades, se distinguieron tres regiones intestinales: anterior, media y posterior. Dichas regiones presentan las mismas capas histológicas observadas en el esófago aunque se distinguieron algunas diferencias en cuanto al grosor y arreglo histológico en cada una de ellas.

La región anterior intestinal posee una capa mucosa que presenta un epitelio, lámina propia y *muscularis mucosae* (muy poco distinguibles las últimas dos). Su epitelio es del tipo cilíndrico simple con microvellosidades en la región apical y arreglado en vellosidades (Fig. 8A). Se observaron algunas células mucosas que teñidas con Azul Alciano-PAS son del tipo mucopolisacáridos ácidos (azul) y mucopolisacáridos neutros (magenta) (Fig. 8B), mientras que con Azul de Toluidina algunas células mucosas se tiñeron de color morado indicando la presencia de glucoproteínas, mientras que otras fueron ausentes de color (Fig. 8C). La capa submucosa se compone de una capa densa de tejido conjuntivo con vasos sanguíneos. La capa muscular está formada por una capa gruesa de músculo liso (Fig. 8D). La tinción Sudán Negro logró evidenciar vacuolas en la parte apical de los enterocitos, que indican la presencia de triglicéridos (Fig. 8E).

La región media del intestino presenta una capa mucosa revestida de epitelio cilíndrico simple con microvellosidades y arreglado en vellosidades, las cuales se encuentran con mayor cantidad y levemente más gruesas y largas en la otras regiones del intestino (Fig. 9A), también posee células mucosas pero únicamente se presentan las de tipo ácidas y en mayor producción, las cuales se tiñen de azul con Azul Alciano-PAS (Fig. 9B), mientras que con Azul de Toluidina éstas se tiñen de color morado (Fig. 9C). La capa submucosa se compone de una capa delgada de tejido conjuntivo con algunos vasos sanguíneos. La capa muscular está formada por una capa gruesa de músculo liso (Fig. 9D). A diferencia de la región anterior, en la región media del intestino no presentó ninguna reacción con la tinción Sudán Negro.

La región posterior del intestino posee una capa mucosa de epitelio cilíndrico simple con microvellosidades y arreglado en vellosidades (Fig. 10A), también posee células mucosas de tipo ácidas las cuales se tiñen de azul con Azul Alciano-PAS aunque en menor producción (Fig. 10B), mientras que con Azul de Toluidina se tiñeron de color morado (Fig. 10C). La capa submucosa se compone de tejido conjuntivo con algunos vasos sanguíneos. La capa muscular está formada por una capa gruesa de músculo liso (Fig. 10D).

Se registró el área de mucinas ácidas y el área del músculo, la altura de vellosidades y la altura de los enterocitos en las diferentes regiones del intestino. El área de mucinas ácidas presentó diferencias significativas ($p=0.00001$) (Figura 11), siendo con mayor cobertura la región media ($13,330.9 \pm 872.69 \mu\text{m}^2$) del intestino, en comparación con las otras regiones. Se obtuvieron valores medios en la región posterior ($8,167.28 \pm 372.62 \mu\text{m}^2$) y áreas menores en la región anterior ($1,911.8 \pm 194.91 \mu\text{m}^2$) debido a que ésta última fue la única que presentaba ambos tipos de mucinas (ácidas y neutras). Con respecto al área de cobertura de músculo ($p=0.03961$) (Figura 12), la región media ($38,060.04 \pm 2,142.77 \mu\text{m}^2$) y la región posterior ($43,555.00 \pm 1,738.33 \mu\text{m}^2$) presentaron diferencias entre ellas generándose dos grupos, siendo la región posterior la que presentó mayor área de músculo, sin embargo la región anterior ($41,527.51 \pm 1,762.39 \mu\text{m}^2$) mostró valores similares en relación a las otras dos regiones. Para la altura de vellosidades ($p=0.00001$) (Figura 13), se obtuvieron dos grupos diferentes. En la región media ($100.88 \pm 1.33 \mu\text{m}$) y la región posterior ($98.96 \pm 1.04 \mu\text{m}$) del intestino, la altura de las vellosidades es similar y a su vez, sus valores son más altos a diferencia de la región anterior ($94.06 \pm 0.99 \mu\text{m}$), que presentó valores menores. En la altura de los enterocitos ($p=0.00001$) (Figura 14), también se distinguieron dos grupos. La región posterior ($13.49 \pm 0.07 \mu\text{m}$) del intestino fue la que mostró valores más elevados, mientras que la región anterior ($12.63 \pm 0.09 \mu\text{m}$) y la región media ($12.66 \pm 0.07 \mu\text{m}$) revelaron poseer alturas similares entre ellas.

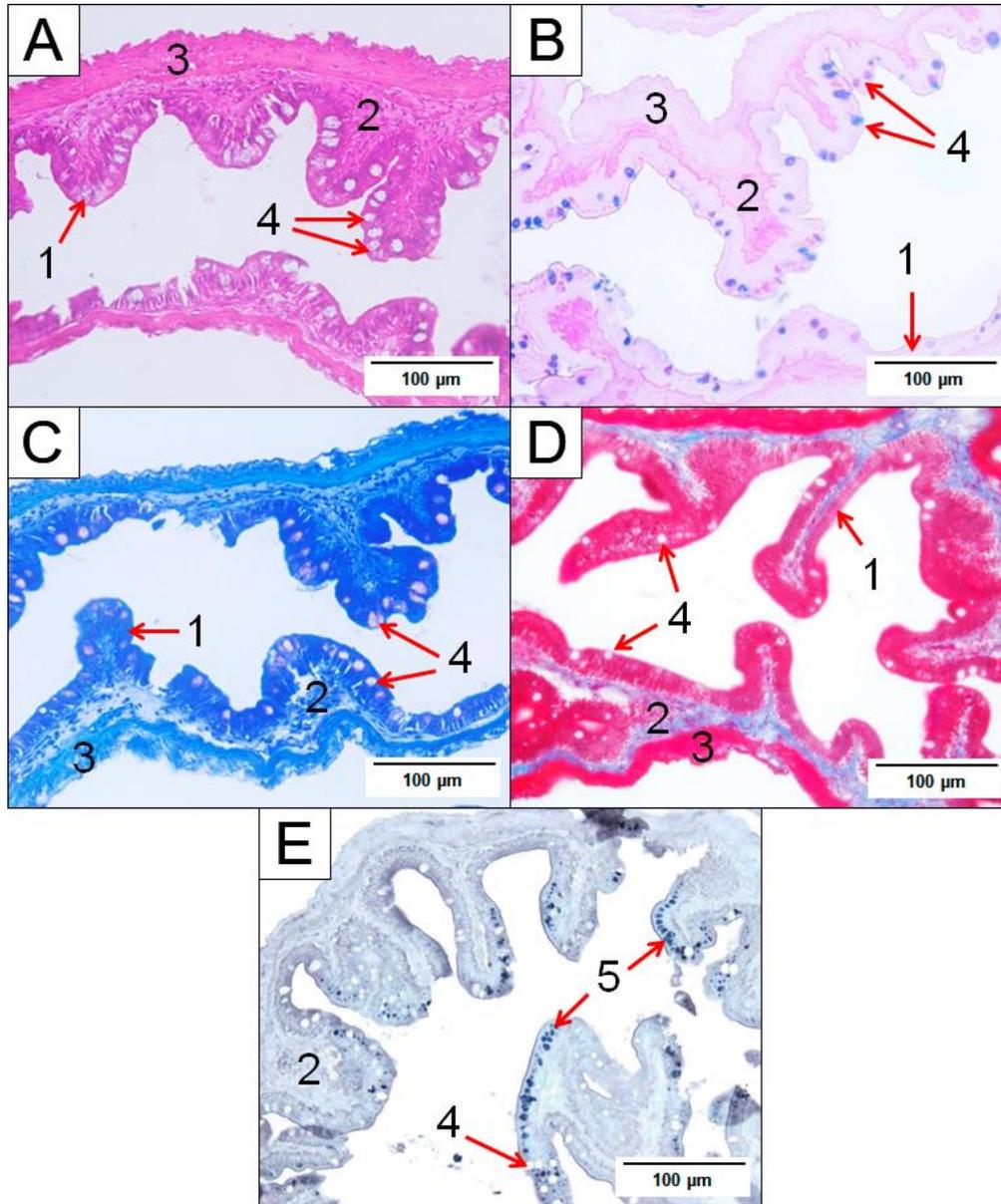


Figura 8. Estructura del intestino anterior. Cortes en plano transversal. A. Hematoxilina-Eosina (40x), B. Azul Alciano-PAS (40x), C. Azul de Toluidina (40x), D. Tricrómica de Masson (40x), E. Sudan Negro (40x). 1) Capa mucosa, 2) Capa submucosa, 3) Capa muscular, 4) Células mucosas, 5) Triglicéridos.

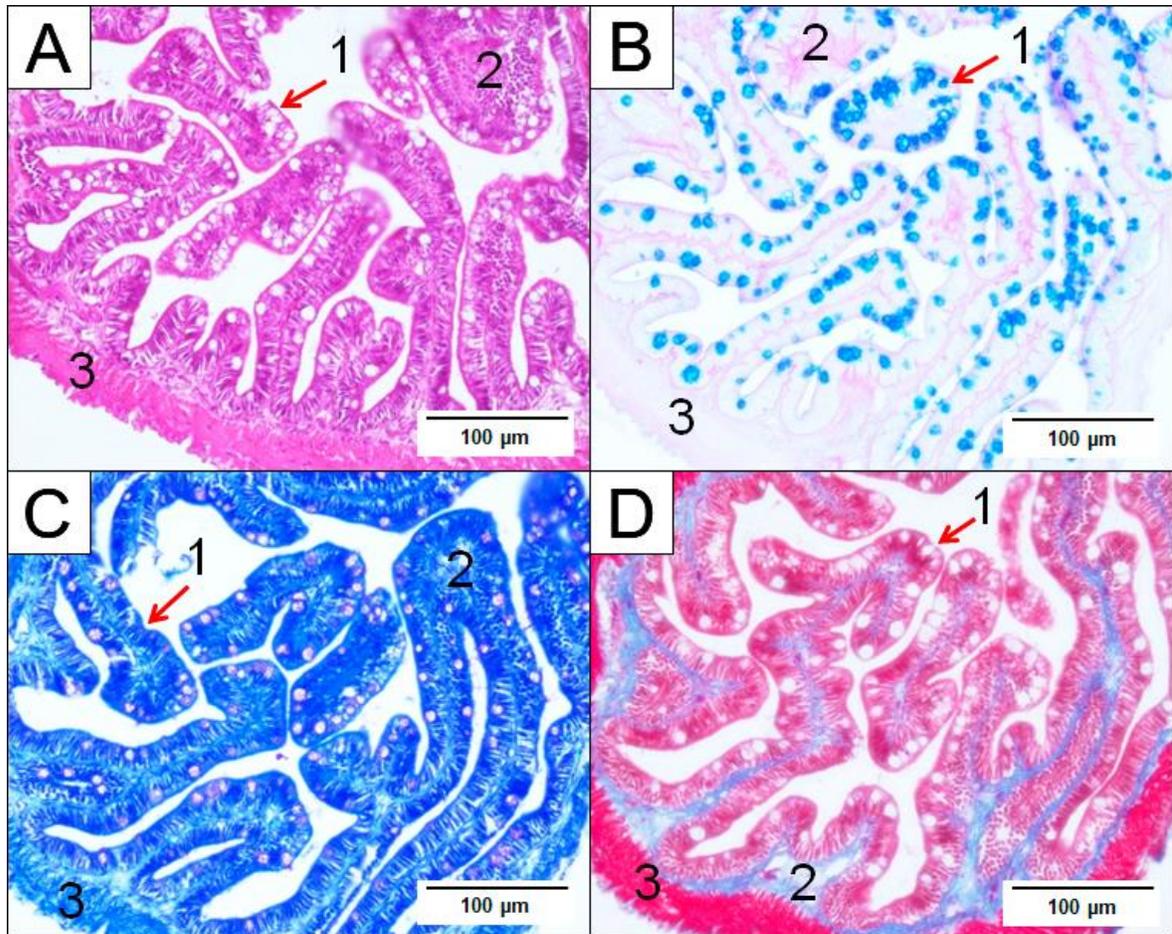


Figura 9. Estructura del intestino medio. Cortes en plano transversal. A. Hematoxilina-Eosina (40x), B. Azul Alciano-PAS (40x), C. Azul de Toluidina (40x), D. Tricrómica de Masson (40x).
1) Capa mucosa, 2) Capa submucosa, 3) Capa muscular.

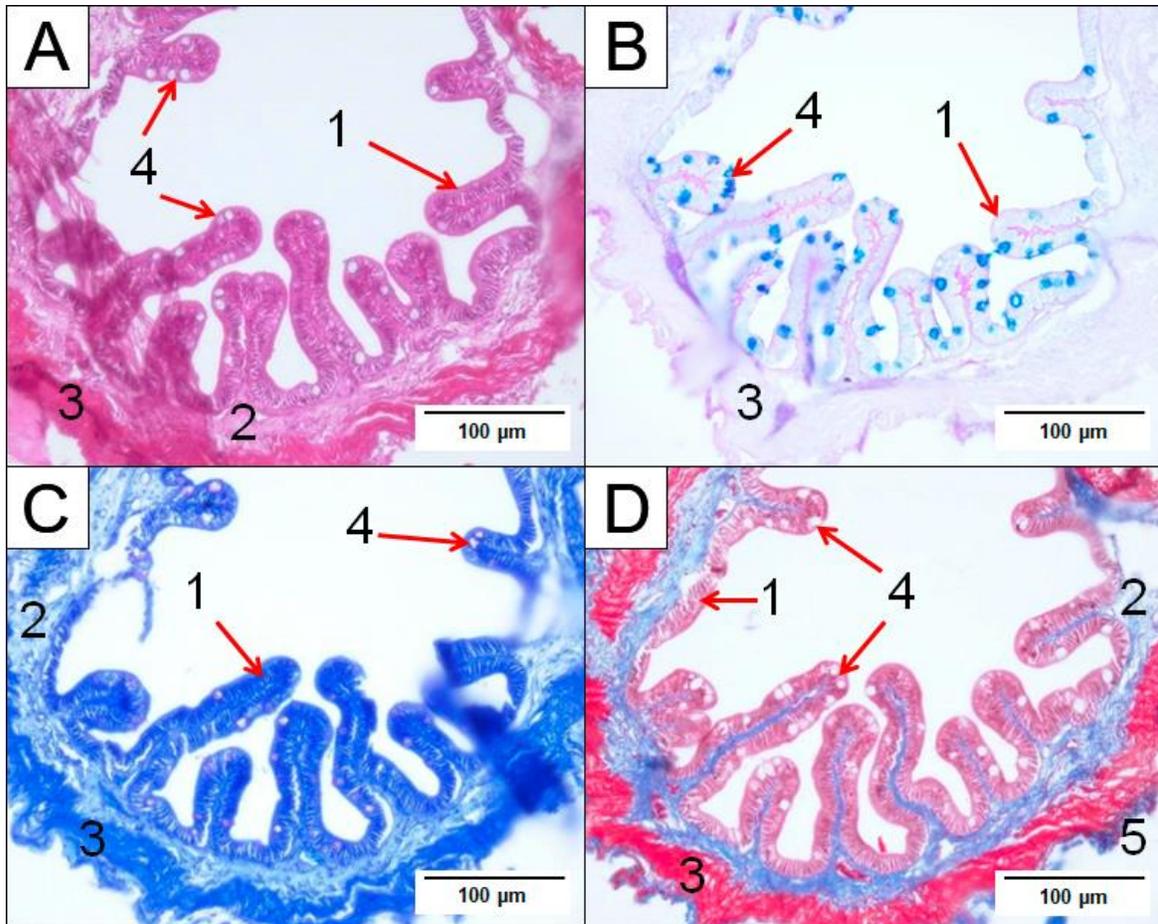


Figura 10. Estructura del intestino posterior. Cortes en plano transversal. A. Hematoxilina-Eosina (40x), B. Azul Alciano-PAS (40x), C. Azul de Toluidina (40x), D. Tricrómica de Masson (40x).
1) Capa mucosa, 2) Capa submucosa, 3) Capa muscular, 4) Células mucosas, 5) Capa adventicia

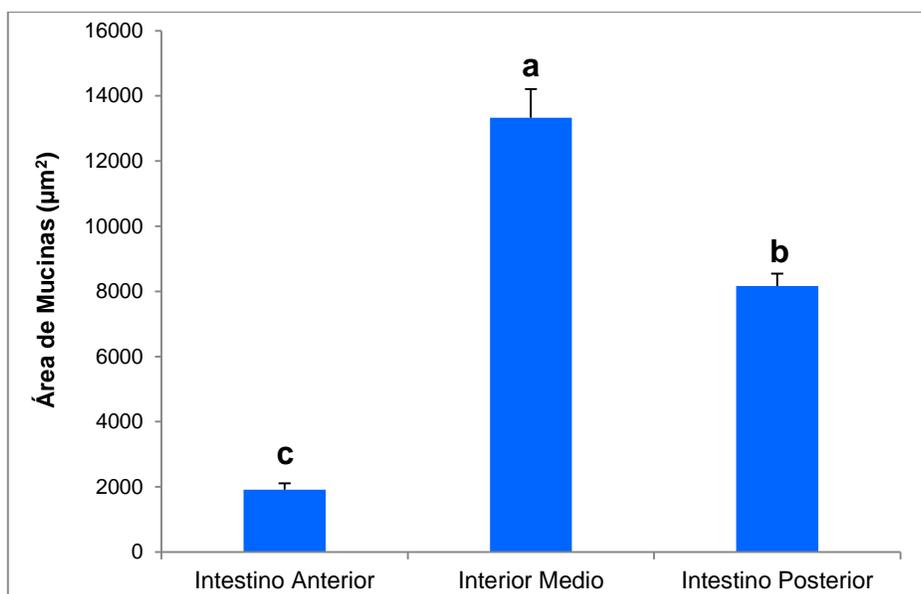


Figura 11. Área de mucinas ácidas en las diferentes regiones del intestino de *H. ingens*. Los resultados se reportan como media \pm error estándar. Se realizó un ANOVA de una vía ($p=0.00001$). Se aplicó un *post hoc* de Tukey para comparar las medias. Las letras distintas indican diferencia significativa entre medias.

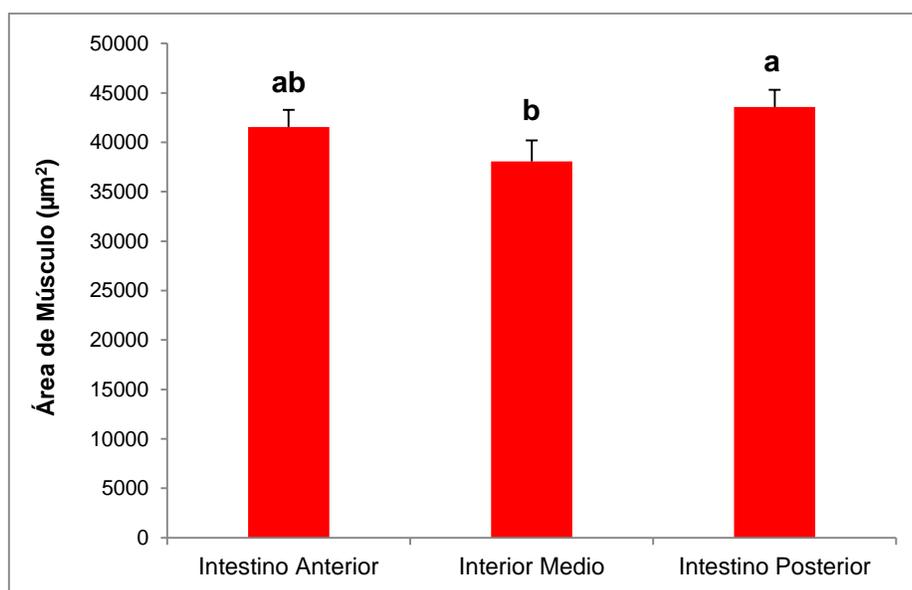


Figura 12. Área de músculo en las diferentes regiones del intestino de *H. ingens*. Los resultados se reportan como media \pm error estándar. Se realizó un ANOVA de una vía ($p=0.03961$). Se aplicó un *post hoc* de Tukey para comparar las medias. Las letras distintas indican diferencia significativa entre medias.

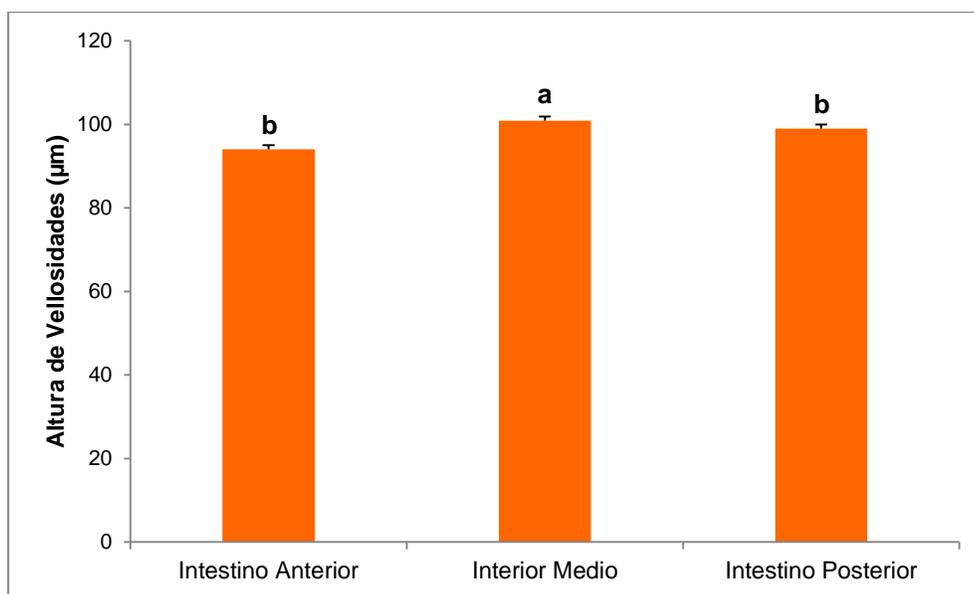


Figura 13. Altura de vellosidades en las diferentes regiones del intestino de *H. ingens*. Los resultados se reportan como media \pm error estándar. Se realizó un ANOVA de una vía ($p=0.00001$). Se aplicó un *post hoc* de Tukey para comparar las medias. Las letras distintas indican diferencia significativa entre medias.

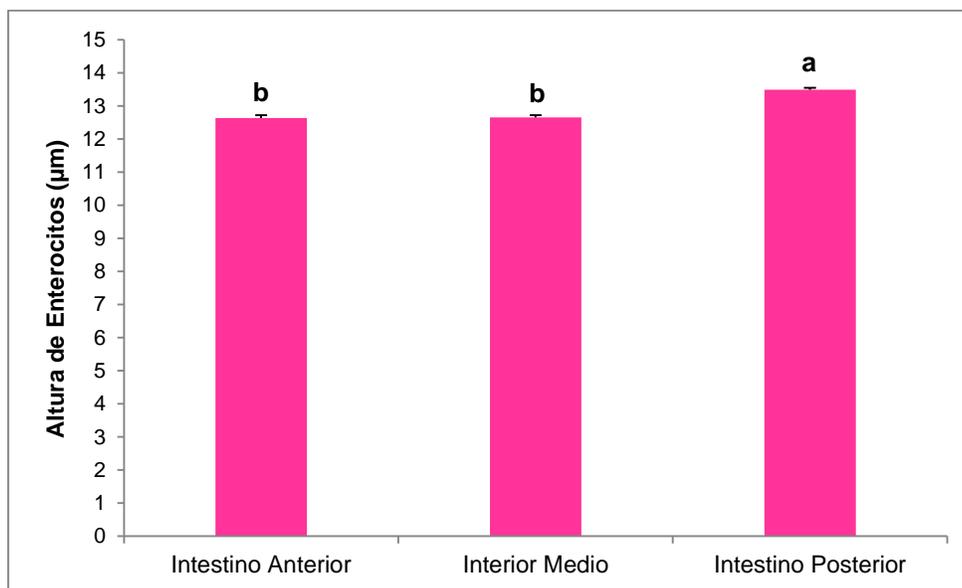


Figura 14. Altura de enterocitos en las diferentes regiones del intestino de *H. ingens*. Los resultados se reportan como media \pm error estándar. Se realizó un ANOVA de una vía ($p=0.00001$). Se aplicó un *post hoc* de Tukey para comparar las medias. Las letras distintas indican diferencia significativa entre medias.

6.1.3. Glándulas accesorias

Las glándulas accesorias del sistema digestivo son el hígado y el páncreas. El hígado de *H. ingens* es unilobular, se encuentra rodeando al intestino en su gran mayoría y está delimitado por una capa delgada de tejido conjuntivo (Fig. 15A). La parénquima se compone de hepatocitos arreglados en cordones separados por capilares sinusoidales (Fig. 15B y 15C). Dichos hepatocitos poseen una forma poliédrica con un núcleo central y esférico, y se encuentran irrigados por venas centrales o centrolobulillares (Fig. 15B y 15E). Con la tinción de Ninhidrina-Schiff se evidencia las proteínas presentes en los tejidos. Así que hubo una reacción positiva en algunas regiones del hígado, teniendo una coloración rosa muy apreciable en una zona (Fig. 15E). Y para el caso de Sudán Negro, algunos hepatocitos tuvieron una coloración negra y azulada en su centro, lo que correspondería a la presencia de triglicéridos (Fig. 15F).

El tejido pancreático se encuentra en lóbulos y disperso por todo el tubo digestivo. La mayor parte del páncreas la componen los acinos pancreáticos, en donde en su interior se ubican vasos sanguíneos. Dicho tejido tuvo una coloración más oscura con Azul de Toluidina y Tricrómica de Masson con respecto al hígado (Fig. 15C y 15D), mientras que con Azul Alciano-PAS fue un tono más claro (Fig. 15B). No se observó presencia de islotes de Langerhans.

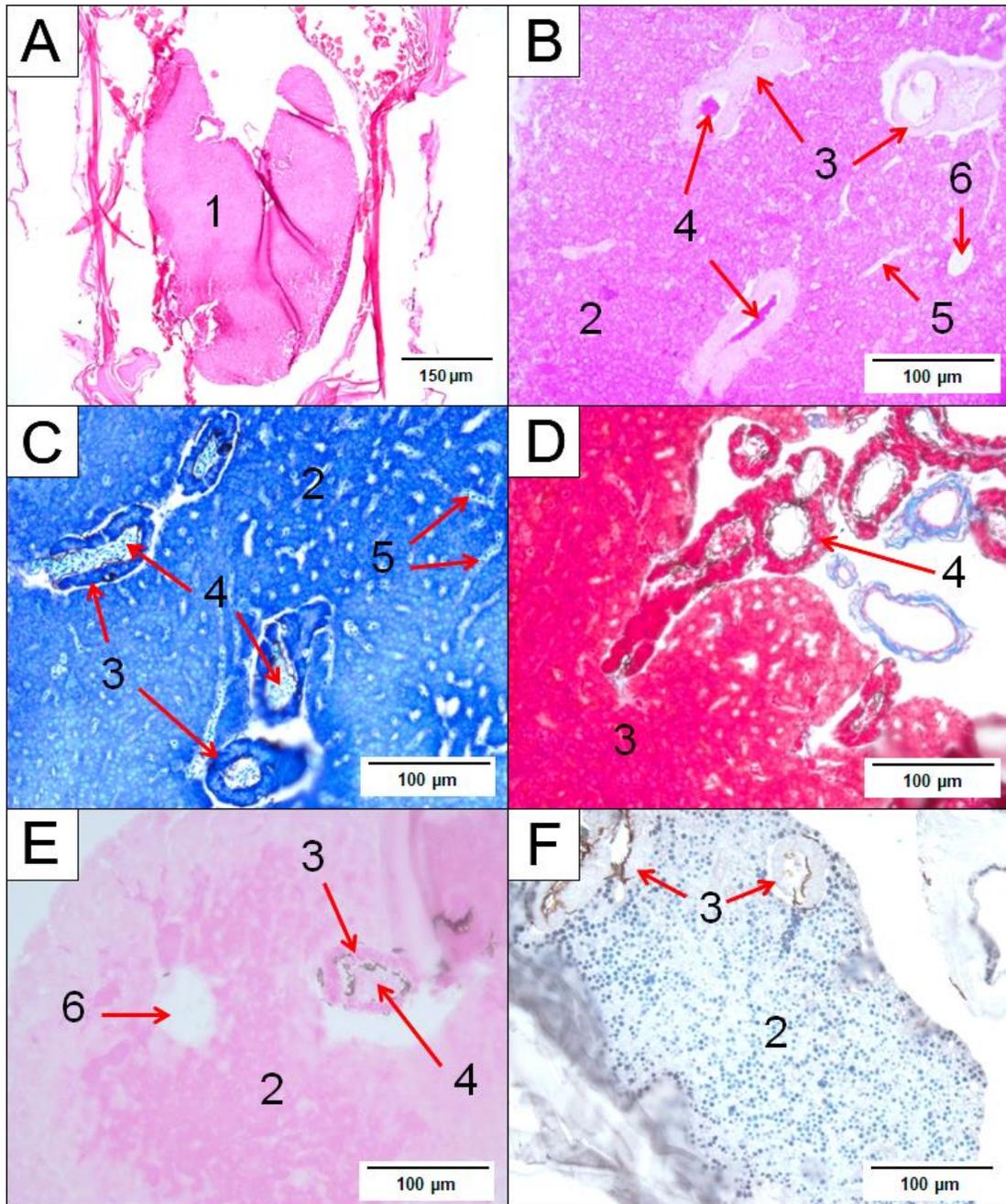


Figura 15. Estructura del hígado y páncreas. A. Hematoxilina-Eosina (20x), B. Azul Alciano-PAS (40x), C. Azul de Toluidina (40x), D. Tricrómica de Masson (40x), E. Nihidrina-Shiff (40x), F. Sudán Negro (40x). 1) Parenquima, 2) Hepatocitos, 3) Acinos pancreáticos, 4) Vasos sanguíneos, 5) Capilares sinudales, 6) Vena centrolobulillar

6.2. Análisis enzimático

Se registró la actividad enzimática digestiva de todas las enzimas en los ejemplares de *H. ingens* de tres meses de edad, a excepción de la pepsina. La actividad enzimática de aminopeptidasa, quimotripsina y amilasa mostraron valores muy bajos con respecto a lipasa y fosfatasa alcalina que tuvieron los valores más altos, siendo tripsina y fosfatasa ácida los valores intermedios (Tabla 1).

Tabla 1. Actividad enzimática total y específica (promedio \pm desv. est.) de *H. ingens*.

Enzima	Actividad Enzimática (U/ μ l)	Actividad Específica (U/mg proteína)
Aminopeptidasa	6.22 \pm 0.23	1.42 \pm 0.05
Quimotripsina	20.69 \pm 2.18	4.72 \pm 0.50
Amilasa	39.37 \pm 5.55	0.001 \pm 0.01
Tripsina	261.27 \pm 20.24	59.56 \pm 4.61
Fosfatasa ácida	1074.55 \pm 84.06	244.95 \pm 19.16
Lipasa	1791.01 \pm 152.65	408.28 \pm 34.80
Fosfatasa alcalina	2115.17 \pm 104.14	482.18 \pm 23.74

7. DISCUSIÓN

7.1. Análisis estructural

El sistema digestivo de las diferentes especies de teleósteos varía en cuanto a su morfología y estructura, y también está relacionado con su taxonomía y sus distintos hábitos alimenticios (Al-Abdulhadi, 2005; Sango-Woo *et al.*, 2016; Bočina *et al.*, 2017). En la gran mayoría de ellos, el sistema digestivo se compone de una cavidad oral, esófago, estómago, intestino, recto y ano, así como también un hígado y un páncreas (Logothetis *et al.*, 2001; Nazlić *et al.*, 2014; Bočina *et al.*, 2017). La ausencia de un estómago como en el caso de *H. ingens* se ha reportado en especies de familias como Atherinidae, Blenniidae, Callionymidae, Cobitidae, Cyprinidae, Cyprinodontidae, Poeciliidae, Gobiesocidae, Gobiidae, Labridae, Mugilidae, Poeciliidae, Scaridae y Syngnathidae (Chao *et al.*, 1973; Genten *et al.*, 2009; Sango-Woo *et al.*, 2016).

Histológicamente, la pared del tubo digestivo de *H. ingens* está organizado de manera similar a la reportada en otros teleósteos, constituida por cuatro capas tisulares; mucosa (epitelio y enterocitos), submucosa (tejido conjuntivo), muscular (músculo) y adventicia o serosa (tejido conjuntivo) (Díaz *et al.*, 2006; Gómez-Ramírez *et al.*, 2010; Cao *et al.*, 2011; Wilson & Castro, 2011; Kierszenbaum & Tres, 2012; Guzmán-Beltran *et al.*, 2013; Bočina *et al.*, 2017). Las subcapas lámina propia y *muscularis mucosae* fueron poco distinguibles en *H. ingens*, lo cual también es común en peces como en *Neogobius gymnotrachelus* (Jaroszevska *et al.*, 2008) y *Culter alburnus* (Cao *et al.*, 2011).

Las células epiteliales, también llamadas enterocitos, recubren el tubo digestivo de los peces y en sus microvellosidades (cuando están presentes) presentan una capa de glicoproteínas, llamada glicocáliz que los protege de las enzimas proteolíticas (Guillaume *et al.*, 2004; Cohen *et al.*, 2013). Los enterocitos están encargados de la absorción y de la digestión intracelular. Secretan dos tipos de enzimas: las enzimas citosólicas que se encuentran en el citoplasma y las enzimas de la membrana que actúan a nivel de las microvellosidades en la región apical de la

célula (Gawlicka *et al.*, 1995; Zambonino-Infante *et al.*, 2001; Guillaume *et al.*, 2004; Galaviz *et al.*, 2011; Cohen *et al.*, 2013). En algunas especies de teleósteos, los cambios en los enterocitos durante la ontogenia incluyen una mayor capacidad digestiva de las microvellosidades, debido al aumento de la actividad de las enzimas asociadas a la membrana (Sarasquete *et al.*, 1995; Zambonino-Infante *et al.*, 2008; Rønnestad *et al.*, 2013).

7.1.1. Esófago

En la mayoría de los peces teleósteos, el esófago se compone de una capa mucosa formada por epitelio plano estratificado y con presencia de pliegues que también reciben el nombre de vellosidades. Se han observado dichas características en especies como *Tautoglabrus adspersus* (Chao *et al.*, 1973), *Esox lucius*, y *Silurus glanis* (Petrinec *et al.*, 2005), *Claris batrachus* y *Serrasalmus nattereri* (Raji & Norouzi, 2010), *Ariopsis seemanni* (Gómez-Ramírez *et al.*, 2010), *Pimelodus blochii* (Guzmán-Beltran *et al.*, 2013), *Scorpaena porcus* (Nazlić *et al.*, 2014), *Sphoeroides testudineus* (Fagundes *et al.*, 2015), *Schizodon knerii* (Dos-Santos *et al.*, 2015), *Belone belone* (Bočina *et al.*, 2017); y también en otras especies de caballitos de mar tales como *Hippocampus abdominalis* (Wardley *et al.*, 2006), *H. guttulatus* (Palma *et al.*, 2013) e *H. reidi* (Novelli *et al.*, 2015). Los múltiples estratos epiteliales presentes en el esófago lo protegen contra abrasiones mecánicas y la invasión de microorganismos a medida que los alimentos ingresan al tubo digestivo (Dos-Santos *et al.*, 2015; Vieira-Lopes *et al.*, 2013). Sin embargo, en *H. ingens* únicamente se observó epitelio cilíndrico simple arreglado en varias vellosidades.

Las vellosidades en el tubo digestivo aumentan el número de enterocitos presentes, de modo que, en conjunto, aumentan el área de absorción de nutrientes, proteínas y lípidos, así como agua, electrolitos y macromoléculas de proteína (Banan-Khojasteh, *et al.*, 2009; Rodrigues da Silva *et al.*, 2012; Cohen *et al.*, 2013). Las vellosidades del esófago anterior de *H. ingens* presentan mayor altura y visualmente son más delgadas que la región posterior, observándose también que el esófago posterior es más estrecho y las vellosidades más cortas con respecto a la

región anterior. En *Pseudosciaena crocea* (Mai *et al.*, 2005), *Dentex dentex* (Carrassón *et al.*, 2006) y *Pseudophoxinus antalya* (Çinar & Şenol, 2006) se han observado también vellosidades más altas y delgadas en la región anterior del esófago. Sin embargo, en *Proterorhinus semilunaris* (Wołczuk *et al.*, 2014) el patrón es inverso, las vellosidades son más cortas en la región anterior del esófago y van incrementando su altura hacia la región posterior.

Por debajo de la capa mucosa, se encuentra la capa submucosa, formada por tejido conjuntivo (o conectivo) y también contiene algunos vasos sanguíneos. En ambas regiones del esófago de *H. ingens* se presentó una mucosa de epitelio cilíndrico simple y una submucosa de tejido conjuntivo, lo mismo ha sido reportado en especies como *Misgurnus mizolepis* (Park & Kim, 2001) y *Lates calcarifer* (Purushothaman *et al.*, 2016), aunque en *Atractosteus tropicus* (Frías-Quintana *et al.*, 2015) reportó un epitelio cilíndrico pseudoestratificado, mientras que en teleósteos como *Chalcalburnus tarichi* (Ünal *et al.*, 2001), *Engraulis anchoita* (Cohen *et al.*, 2013) y *Belone belone* (Bočina *et al.*, 2017) presentan un epitelio cúbico simple.

En la región anterior del esófago de *H. ingens* se presentó una gran cantidad de células mucosas ricas en glicoproteínas, las cuales han sido observadas en una gran variedad de especies de peces (Chao *et al.*, 1973; Wardley *et al.*, 2006; Gómez-Ramírez *et al.*, 2010; Cohen *et al.*, 2013; Guzmán-Beltran *et al.*, 2013; Nazlić *et al.*, 2014; Dos-Santos *et al.*, 2015; Murillo-Higuera, 2017). En *Misgurnus anguillicaudatus* (Zhang *et al.*, 2016) la región anterior del esófago carece de células mucosas, mientras que en la región posterior las presenta atribuyéndoles la función de protección de la capa mucosa. La secreción de las células mucosas puede clasificarse en mucinas ácidas y neutras (Neuhaus *et al.*, 2007; Murillo-Higuera, 2017) y su presencia se ha reportado en diferentes especies como *Chalcalburnus tarichi* (Ünal *et al.*, 2001), *Sphoeroides testudineus* (Fagundes *et al.*, 2015) y *Belone belone* (Bočina *et al.*, 2017), que presentan mucinas ácidas al igual que en *H. ingens*, mientras que *Tylosurus gavioloides* y *Strongylura leiura ferox* (Manjakasy *et al.*, 2009) reportan mucinas neutras, aunque en ocasiones como *Esox lucius* y *Silurus glanis* (Petrinec *et al.*, 2005), *Claris batrachus* y *Serrasalmus nattereri* (Raji & Norouzi, 2010) y *Lates calcarifer* (Purushothaman *et al.*, 2016), poseen ambos tipos

de mucinas. El mucus secretado contribuye a la lubricación del alimento a través del esófago hacia el tracto intestinal, y al aumento de la eficiencia digestiva. A su vez, también cumple una función de protección contra el daño proteolítico del epitelio y como parte del sistema inmune contra las bacterias y microorganismos (Deplancke & Gaskins, 2001; Marchetti *et al.*, 2006; Genten *et al.*, 2009; Guzmán-Beltran *et al.*, 2013; Nazlić *et al.*, 2014; Cardoso *et al.*, 2015).

La mayor particularidad del esófago de los peces radica en la naturaleza de su musculatura, la cual está conformada de fibras estriadas de contracción voluntaria. Es decir, los peces poseen mayor libertad que los otros vertebrados para regurgitar sus alimentos en caso de que la talla, textura o gusto no sea de su interés (Collette, 2000; Guillaume *et al.*, 2004). La gran mayoría de los peces presentan un músculo estriado esquelético con dos orientaciones: longitudinal interna y circular externa, seguida de una delgada y externa capa adventicia o serosa de tejido conjuntivo recubriendo el músculo (Ünal *et al.*, 2001; Gómez-Ramírez *et al.*, 2010; Raji & Norouzi, 2010; Wilson & Castro, 2011; Guzmán-Beltran *et al.*, 2013; Sayed-Awaad *et al.*, 2014; Nazlić *et al.*, 2014; Fagundes *et al.*, 2015; Dos-Santos *et al.*, 2015; Purushothaman *et al.*, 2016). En el caso de *H. ingens*, se observó que ambas regiones del esófago están compuestas de una sola capa de músculo estriado esquelético longitudinal y transversal al igual que el esófago en *Tautogolabrus adspersus* (Chao *et al.*, 1973), *Engraulis anchoita* (Cohen *et al.*, 2013), *Seriola lalandi* (Chen *et al.*, 2006), *Belone belone* (Bočina *et al.*, 2017) y en otros caballitos de mar como *Hippocampus abdominalis* (Wardley *et al.*, 2006), *H. guttulatus* (Palma *et al.*, 2013) y *H. reidi* (Novelli *et al.*, 2015). No obstante, se observó que la región posterior del esófago de *H. ingens* presentó mayor área de músculo con respecto a la región anterior, de modo que el poco músculo en la región anterior del esófago, se compensa con la gran área de mucinas. De ésta forma, el esófago anterior funciona como la primera barrera contra bacterias y como lubricante del alimento, mientras que el esófago posterior funciona como transportador del alimento hacia el intestino con ayuda de la amplia área muscular presente y a la vez que cubre las funciones de un esfínter esofágico (Mai *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2016).

7.1.2. Intestino

Hippocampus ingens no presenta estómago lo cual es común en caballitos de mar (Wardley *et al.*, 2006; Palma *et al.*, 2013; Winter, 2014; Novelli *et al.*, 2015; Segade *et al.*, 2016), y en algunas especies de teleósteos (Chao *et al.*, 1973; Fänge & Grove, 1979; Hamlin *et al.*, 2000; Logothetis *et al.*, 2001; Horn *et al.*, 2006; Banan-Khojasteh, *et al.*, 2009; Wilson & Castro, 2011; Zhang *et al.*, 2016; Bočina *et al.*, 2017). De modo que el alimento ingerido pasa a través del esófago, directamente hacia el intestino (Fänge & Grove, 1979; Palma *et al.*, 2013). Los estudios de los peces agastros se enfocan principalmente por su estructura ausente (estómago), dando como resultado escasez de información sobre los procesos de digestión y absorción en su tubo digestivo (Day *et al.*, 2011). La ausencia de un estómago no impone restricciones dietéticas, ya que los peces sin estómago cubren todo el espectro trófico, incluyendo herbívoros, carnívoros, omnívoros y detritívoros (Logothetis *et al.*, 2001; Horn *et al.*, 2006; Day *et al.*, 2011; Bočina *et al.*, 2017). Muchos de los peces sin estómago están provistos de elementos de masticación faríngeos que permiten que el alimento ingerido llegue al intestino en una condición fragmentada (Fänge & Grove, 1979; Genten *et al.*, 2009). Sin embargo en *H. ingens* no se observó ninguna estructura asociada a ésta función de digestión mecánica.

Algunos autores consideran que la causa de la desaparición del estómago en los peces se debe a la alcalinización del jugo gástrico por el agua de mar ingerida con la comida o por el resultado de la adaptación a la ingestión de organismos alimenticios con recubrimientos calcáreos. Esta alcalinización inhibe la actividad péptica y conduce a la pérdida de la digestión gástrica. La pérdida de estómago también puede ser neoténico y se asocia frecuentemente con hábitos micrófagos. De modo, que todo el tubo digestivo presenta pH de neutro a alcalino (Kapoor *et al.*, 1975; Fänge & Grove, 1979; Vásquez-Torres, 2004; Wilson & Castro, 2011).

La longitud y forma del intestino es considerado un indicativo de los hábitos alimenticios de los peces; en carnívoros es más corto y muscular, mientras que en herbívoros y omnívoros es más largo y con menor área de músculo (Buddington *et al.*, 1997; Vásquez-Torres, 2004; Rodrigues da Silva *et al.*, 2012). En el presente

trabajo no se hizo la medición de la longitud del intestino debido al tamaño de los organismos, pero visualmente, el intestino de *H. ingens* parece ser un tubo largo con varias asas intestinales. Histológicamente se distinguieron tres regiones; anterior, media y posterior, al igual que en otras especie de teleósteos (Çinar & Şenol, 2006; Gómez-Ramírez *et al.*, 2010; Moguel-Hernández, 2015; Zhang *et al.*, 2016; Bočina *et al.*, 2017), aunque en gran variedad de especies de peces el intestino se divide en una región anterior y posterior (próximo y distal) (Peña *et al.*, 2003; Mai *et al.*, 2005; Carrassón *et al.*, 2006; Atencio-García *et al.*, 2008; Zambonino-Infante *et al.*, 2008; Wilson & Castro, 2011; Rodrigues da Silva *et al.*, 2012), así como en caballitos de mar (Wardley *et al.*, 2006; Palma *et al.*, 2013; Novelli *et al.*, 2015), aunque en *Danio rerio* (Ng *et al.*, 2005) su intestino es dividido en; bulbo intestinal, región media y región posterior.

En todos los peces, la mucosa intestinal está compuesta por un epitelio cilíndrico simple con microvellosidades y células mucosas. A su vez, está arreglado en vellosidades (pliegues intestinales), seguida por la capa submucosa, la cual se compone de tejido conjuntivo. Aunque en algunas especies como *Gambusia punctulata*, *Girardinus metallicus* (Rodríguez *et al.*, 2004) y *Petenia splendida* (Treviño *et al.*, 2010) poseen un epitelio de tipo cilíndrico pseudoestratificado. Las vellosidades o asas intestinales e incluso las microvellosidades, ayudan a retardar el paso del alimento y aumentan el área de absorción de los nutrientes (Guevara, 2003; Guillaume *et al.*, 2004; Vásquez-Torres, 2004; Atencio-García *et al.*, 2008; Banan Khojasteh *et al.*, 2009; Guzmán-Beltran *et al.*, 2013). Las vellosidades en *H. ingens* son visualmente más abundantes y concentradas en la región media del intestino, mientras que en *Engraulis anchoíta* (Cohen *et al.*, 2009) fueron las que se encontraban en la región posterior del intestino. En la región media y posterior del intestino, las vellosidades de *H. ingens* presentan mayores alturas, y las de menor altura se observaron en la región anterior, al igual que *Misgurnus anguillicaudatus* (Zhang *et al.*, 2016). Sin embargo, en la mayoría de las especies de teleósteos las vellosidades intestinales de mayor altura son las que se encuentran en la región anterior, como estrategia para aumentar la superficie de absorción (Zambonino-Infante *et al.*, 2008; Gómez-Ramírez *et al.*, 2010), como en *Anguilla anguilla* (Clarke

& Witcomb, 1980), *Danio rerio* (Ng *et al.*, 2005), *Oncorhynchus mykiss* (Banan Khojasteh *et al.*, 2009), *Pseudoplatystoma fasciatum* (Rodríguez *et al.*, 2009), *Petenia splendida* (Treviño *et al.*, 2010), *Culter alburnus* (Cao *et al.*, 2011) y *Oligosarcus hepsetus* (Vieira-Lopes *et al.*, 2013), aunque en otras especies como *Acipenser transmontanus* (Gawlicka *et al.*, 1995), las mayores alturas de las vellosidades se ubican en los ciegos pilóricos.

Las células mucosas son un carácter general del tubo digestivo de los teleósteos, y en el caso del intestino de *H. ingens*, su presencia varía en términos de proporción y tipo de secreción de acuerdo a la región intestinal (Neuhaus *et al.*, 2007; Murillo-Higuera, 2017). En la región anterior es abundante la presencia de células mucosas con secreciones (mucopolisacáridos) ácidas y neutras; mientras que en la región media y posterior se presentaron únicamente células con secreción de mucinas ácidas (mucopolisacáridos ácidos), siendo más abundantes en la región media. En la mayoría de los peces, las células mucosas con secreción del tipo neutra se reportan en la región anterior del intestino, mientras que las células con mucosas de tipo ácidas se registran en las regiones posteriores (Ribeiro *et al.*, 1999; Carrassón *et al.*, 2006; Banan-Khojasteh *et al.*, 2009; Cohen *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2016).

La función de las mucinas ácidas está relacionada con la protección ante infecciones, prevenir la degradación de la glicoproteína y principalmente como lubricante, mientras que las mucinas neutras se encargan de la neutralización del pH, la protección de la mucosa intestinal y el proceso de digestibilidad de alimentos (Manjakasy *et al.*, 2009; Cabrera & García, 2010; Murillo-Higuera, 2017).

De manera general, las células mucosas junto con las microvellosidades, poseen una gran variedad de funciones reportadas por varios autores; funcionan como lubricante facilitando el transporte de los alimentos a través del tubo digestivo (Treviño *et al.*, 2010; Nazlić *et al.*, 2014; Dos-Santos *et al.*, 2015; Purushothaman *et al.*, 2016; Sang-Woo *et al.*, 2016; Şenol, 2016; Bočina *et al.*, 2017) y representan una gran importancia en la digestión y absorción de los alimentos (Cao *et al.*, 2011; Cohen *et al.*, 2013), así como además de ser la primera barrera protectora contra

factores físicos y químicos, así como prevención del daño proteolítico al epitelio por la acción de enzimas digestivas, finalmente posee un papel importante en la capacidad inmune puesto que posee células defensivas y alberga ciertos niveles de inmunoglobulinas, por lo que actúa como barrera de defensa contra bacterias (Park & Kim, 2001; Carrassón *et al.*, 2006; Wegner *et al.*, 2009; Sang-Woo *et al.*, 2016; Şenol, 2016).

En la región anterior del intestino de *H. ingens* se evidenciaron vacuolas teñidas con Sudán Negro en la parte apical de los enterocitos, la cual es específica para la presencia de triglicéridos neutros y lípidos, respuesta que ha sido utilizada por varios autores en diferentes especies de teleósteos para evidenciar la absorción de lípidos (Sarasquete *et al.*, 1995; Gisbert *et al.*, 1999; Ribeiro *et al.*, 1999; Oliveira *et al.*, 2010; Moguel-Hernández, 2015). De ésta forma, la presencia de vacuolas lipídicas en la parte anterior del intestino es muy común en teleósteos juveniles, pero principalmente en las primeras etapas de desarrollo de las larvas de varias especies como *Melanogrammus aeglefinus* (Hamlin *et al.*, 2000), *Paralabrax maculatofasciatus* (Peña *et al.*, 2003), *Acipenser ruthenus* (Wegner *et al.*, 2009) y *Pelteobagrus fulvidraco* (Yang *et al.*, 2010), entre otras. La presencia de vacuolas lipídicas también es un indicador de absorción luminal, así como un mecanismo de almacenamiento temporal de lípidos en los enterocitos, debido a la deficiencia de transporte de sustancias lipídicas en etapas tempranas de desarrollo de los teleósteos (Sarasquete *et al.*, 1995; Gisbert *et al.*, 1999; Ribeiro *et al.*, 1999; Hamlin *et al.*, 2000; Guillaume *et al.*, 2004; Mai *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2006).

La mayoría de los teleósteos, incluyendo *Hippocampus abdominalis* (Wardley *et al.*, 2006), presentan una capa muscular intestinal compuesta por músculo liso organizado en dos capas en diferentes arreglos, una circular interna de mayor grosor y una longitudinal externa. Ambas capas están recubiertas por una delgada capa de tejido conjuntivo y mesotelio peritoneal correspondiente a la capa túnica serosa (Chao *et al.*, 1973; Ünal *et al.*, 2001; Rodríguez *et al.*, 2009; Gómez-Ramírez *et al.*, 2010; Raji & Norouzi, 2010; Guzmán-Beltran *et al.*, 2013; Nazlić *et al.*, 2014; Fagundes *et al.*, 2015; Bočina *et al.*, 2017). En ciprínidos, cobitidos y *Syngnathus*, se

pueden encontrar musculatura axial en la túnica muscular (Fänge & Grove, 1979). En la capa muscular del intestino de *H. ingens* únicamente se observó una capa de músculo liso, y en la región posterior el músculo está rodeado de la capa adventicia de tejido conjuntivo. La región posterior del intestino presentó mayor área de músculo con respecto a la región media y a su vez, la región anterior presentó valores intermedios. El músculo de tipo liso, así como su espesor, indica que hay movimientos peristálticos más débiles, un mayor tiempo en el paso del alimento y no está sujeto al control voluntario (Halver & Hardy, 2002; Genten *et al.*, 2009; Helfman *et al.*, 2009; Gómez-Ramírez *et al.*, 2010).

7.1.3. Glándulas accesorias

Así como ocurre en la mayoría de los teleósteos (Hale, 1965; Clarke & Witcomb, 1980; Wardley *et al.*, 2006; Cohen *et al.*, 2013; Guzmán-Beltran *et al.*, 2013; Faccioli *et al.*, 2014; Novelli *et al.*, 2015; Segade *et al.*, 2016; Bočina *et al.*, 2017), el hígado no presenta lobulaciones, al igual que *H. ingens*. Sin embargo, existen algunas excepciones en especies como *Tautogolabrus adspersus* (Chao *et al.*, 1973), *Chalcalburnus tarichi* (Ünal *et al.*, 2001), *Oreochromis niloticus* (Torres *et al.*, 2010), *Hemisorubim platyrhynchos* (Faccioli *et al.*, 2014) y *Scorpaena porcus* (Nazlić *et al.*, 2014) los cuales presentan de 2 a 3 lobulaciones en su hígado. No obstante, en todos los casos el hígado se compone de hepatocitos con forma poliédrica separados por capilares sinusoidales, los cuales acumulan grandes cantidades de lípidos y glucógeno en vacuolas (Clarke & Witcomb, 1980; Ribelles *et al.*, 1995; Wegner *et al.*, 2009; Wardley *et al.*, 2006; Pathan *et al.*, 2009; Novelli *et al.*, 2015; Bočina *et al.*, 2017), que con técnicas histoquímicas como Sudán Negro, fueron visibles en *H. ingens* y también en *Colossoma macropomum* (Rojas *et al.*, 2012). A su vez, con Ninhidrina-Schiff ciertos campos del hígado de *H. ingens* se tiñeron de color rosado correspondiente a la presencia de proteína, mientras que con otras especies de teleósteos se ha utilizado la tinción PAS como en *Prochilodus lineatus* (Camargo & Martínez, 2007), *Engraulis anchoita* (Cohen *et al.*, 2013) y *Hemisorubim platyrhynchos* (Faccioli *et al.*, 2014) para observar depósitos de

glicógeno en el citoplasma de los hepatocitos. El hígado además de ser depósito de almacenamiento de lípidos, posee una gran variedad de funciones; asimilación de sustancias nutritivas, hematopoyesis, excreción y desintoxicación, también es muy considerado para evaluar el estado de salud de los peces y para identificar biomarcadores, debido a su papel central en muchas funciones metabólicas, como la síntesis de proteínas y la acumulación de metabolitos, además de ser una valiosa herramienta en programas de monitoreo ambiental (Au, 2004; Wardley *et al.*, 2006; Torres *et al.*, 2010; Patnaik *et al.* 2011; Ikpegbu *et al.*, 2012; Guzmán-Beltran *et al.*, 2013; Segade *et al.*, 2016; Bočina *et al.*, 2017).

Hippocampus ingens presenta un páncreas difuso característico de la mayoría de los teleósteos (Chao *et al.*, 1973; Ribelles *et al.*, 1995; Ünal *et al.*, 2001; Wardley *et al.*, 2006; Guzmán-Beltran *et al.*, 2013; Faccioli *et al.*, 2014; Novelli *et al.*, 2015; Bočina *et al.*, 2017), a diferencia de *Pangasius hypophthalmus* (Reza *et al.*, 2009) e *H. hippocampus* (Segade *et al.*, 2016) que presentan un hepatopáncreas, y *Barbus pectoralis* (Mahmood & Morovvati, 2012) un splenopáncreas.

El páncreas en los peces no es una glándula individualizada, se observa como un conjunto difuso de células depositadas alrededor del intestino o en la región de los ciegos pilóricos, cuando éstos están presentes (Guillaume *et al.*, 2004; Genten *et al.*, 2009; Ikpegbu *et al.*, 2012; Bočina *et al.*, 2017). En *H. ingens*, así como en la mayoría de los peces, el páncreas se compone de acinos pancreáticos, vasos sanguíneos y conductos pancreáticos interlobulares (estos últimos no son fácilmente distinguibles). Estas células acinares presentan gránulos de zimógeno de forma irregular (Wardley *et al.*, 2006; Faccioli *et al.*, 2014; Nazlić *et al.*, 2014; Bočina *et al.*, 2017) que contienen enzimas digestivas en su forma inactiva como proteasas (tripsina, quimotripsina, elastasa y lipasa), amilasa, quitinasas y lipasas (Vásquez-Torres, 2004; Genten *et al.*, 2009; Ikpegbu *et al.*, 2012; Guzmán-Beltran *et al.*, 2013). Además de las células exocrinas, existen igualmente células endocrinas y los islotes de Langerhans observados en algunas especies de peces (Ribelles *et al.*, 1995; Ünal *et al.*, 2001; Guzmán-Beltran *et al.*, 2013; Ikpegbu *et al.*, 2012; Faccioli *et al.*, 2014), las cuales secretan insulina glucagón y somatostatina (Guillaume *et al.*, 2004; Genten *et al.*, 2009; Ikpegbu *et al.*, 2012).

7.2. Análisis enzimático

A los tres meses de edad de *H. ingens* presenta las mismas enzimas digestivas (tripsina, quimotripsina, lipasa, amilasa, leucina-aminopeptidasa y fosfatasa ácida y fosfatasa alcalina) que se han observado en la mayoría de los teleósteos (Cara *et al.*, 2002; Essed *et al.*, 2002; Natalia *et al.*, 2004; Sáenz de Rodrigáñez *et al.*, 2005; González-Álvarez, 2013), y en caballitos de mar como *Hippocampus abdominalis* (Wardley *et al.*, 2006), *H. erectus* (Yin *et al.*, 2012), *H. guttulatus* (Blanco *et al.*, 2016) e *H. reidi* (Novelli *et al.*, 2016). A excepción de la pepsina, la cual está ausente en los peces sin estómago como *Hypophthalmichthys molitvix* y *Avistichthys nobilis* (Bitterlich, 1965), *Carassius auratus* (Klaus-Dieter, 1976), *Atherinops affinis* (Logothetis *et al.*, 2001) y *Zenarchopterus buffonis* (Zainal-Abidin *et al.*, 2016) y en las primeras etapas de desarrollo de las larvas de los peces.

Desde que son liberados por el macho, los juveniles de caballitos de mar están completamente desarrollados y se alimentan directamente de fuentes de alimentos exógenos, lo cual implica que ya cuentan con la maquinaria enzimática necesaria para llevar a cabo la digestión del alimento. Sin embargo, son pocos los estudios que han evaluado la actividad enzimática digestiva de los caballitos de mar, de modo que se ha inferido que su digestión puede ser similar a la de otros peces sin estómago o ciegos pilóricos y a las larvas de peces, antes de la aparición del estómago. Aunque también existe la proteólisis ácida, llevada a cabo por la catepsina, enzima citosólica que degrada proteínas en condiciones ácidas, presente en estadios larvarios y en adultos de peces gástricos y agástricos (Wardley *et al.*, 2006; Corona-Rojas, 2015; Moguel-Hernández, 2015; Blanco *et al.*, 2016).

La actividad de la fosfatasa alcalina en *H. ingens* mostró una alta actividad enzimática (U/ μ l) y específica (U/mg), al igual que en *Hippocampus erectus* (Yin *et al.*, 2012) y en larvas de peces como *Paralabrax maculatofasciatus* (Peña-Martínez, 2005), *Oplegnathus fasciatus* (He *et al.*, 2012) y *Rutilus frisii kutum* (Hassanatabar *et al.*, 2013). Sin embargo, en otras especies de peces, la actividad de fosfatasa alcalina fue menor (Cara-Torres *et al.*, 2002; Álvarez-González, 2003; Toledo-Cuevas *et al.*, 2011; Frías-Quintana *et al.*, 2015; Moguel-Hernández, 2015) cuando la

actividad de la pepsina aún no se presentaba. Por otro lado, la actividad de la fosfatasa ácida de *H. ingens* fue menor con respecto a la fosfatasa alcalina. La baja actividad de la fosfatasa ácida también se ha presentado en *P. maculatofasciatus* (Peña-Martínez, 2005), *Odontesthes bonariensis* y *O. hatcheri* (Toledo-Cuevas *et al.*, 2011) e *Hippocampus reidi* (Novelli *et al.*, 2016), aunque en otras especies este comportamiento es al contrario, la fosfatasa ácida presenta valores altos que la fosfatasa alcalina como en *Diplodus sargus* (Cara-Torres *et al.*, 2002), *Atractosteus tropicus* (Frías-Quintana *et al.*, 2015) y *Lutjanus guttatus* (Moguel-Hernández, 2015).

Las enzimas fosfatasas ácida y alcalina están relacionadas en los procesos de absorción, nutrición y mineralización de los huesos, así como en procesos de transporte de nutrientes a través de membrana y en la hidrólisis del fósforo inorgánico. También están implicadas en la digestión, facilitando la actividad de otras enzimas por modificación de las cadenas fosfatadas laterales de aminoácidos. Ambas se asocian con el transporte activo de glucosa, proteínas y lípidos, e incluso de agua e iones (Cara-Torres *et al.*, 2002; Álvarez-González, 2003; Toledo-Cuevas *et al.*, 2011; Moguel-Hernández, 2015). Por un lado, la fosfatasa ácida está relacionada con los cuerpos de inclusión supranuclear y la absorción pinocitótica seguida de digestión intracelular en las etapas tempranas de desarrollo de los peces. Además, también la actividad de esta enzima se ha relacionado con la digestión intracelular en larvas de peces planos (Zambonino-Infante & Cahu, 2001; Cara-Torres *et al.*, 2002; Zacarías-Soto *et al.*, 2013; Novelli *et al.*, 2016). Mientras que la fosfatasa alcalina es una de las enzimas de membrana de las microvellosidades (borde en cepillo) y se utiliza como indicador del inicio de la función absorbente del epitelio intestinal en larvas de peces. También está relacionada con los mecanismos de transporte de la digestión extracelular y asociada con la absorción de nutrientes tales como lípidos, glucosa, calcio y fosfato inorgánico (Tengjaroenkul, 2000; Yin *et al.*, 2012; Novelli *et al.*, 2016). De modo que en *H. ingens* la presencia de la actividad de la fosfatasa ácida y principalmente los altos niveles de la fosfatasa alcalina durante la etapa juvenil, demuestran la maduración de los enterocitos del tubo digestivo y presencia de la función absorbente del epitelio intestinal (Toledo-Cuevas

et al., 2011; He *et al.*, 2012; Yin *et al.*, 2012; Zacarías-Soto *et al.*, 2013; Frías-Quintana *et al.*, 2015; Novelli *et al.*, 2016).

La lipasa es una de las enzimas más importantes para la digestión y en conjunto con otras enzimas, las lipasas son enzimas que tienen la capacidad de hidrolizar los enlaces éster en lípidos complejos liberando diglicéridos, monoglicéridos, glicerol y ácidos grasos (Álvarez-González, 2003; Moguel-Hernández, 2015). Los ácidos grasos son absorbidos por los enterocitos del intestino y posteriormente transformados a triglicéridos antes de ser transportados al hígado (Wardley *et al.*, 2006; Moguel-Hernández, 2015; Zainal-Abidin *et al.*, 2016). Se ha documentado la existencia de dos tipos de lipasas en las etapas tempranas de las larvas de peces, una relacionada con la absorción de las reservas endógenas del saco vitelino (el cual es rico en fosfolípidos y varias clases de ácidos grasos), y la otra, que está relacionada con la digestión de los alimentos exógenos (Cara-Torres *et al.*, 2002; Toledo-Cuevas *et al.*, 2011; González-Álvarez, 2013; Moguel-Hernández, 2015; Cota-Mamani, 2016).

La lipasa en *H. ingens* mostró una alta actividad, lo cual también se ha observado en *Hippocampus abdominalis* (Wardley *et al.*, 2006) y en larvas de peces en las cuales la pepsina aún no presentaba actividad como *Paralabrax maculatofasciatus* (Álvarez-González, 2003) y *Lutjanus guttatus* (Moguel-Hernández, 2015).

Varios autores han observado que los peces herbívoros presentan niveles de actividad más altos de la lipasa que en los carnívoros, lo que les permite maximizar la asimilación de lípidos (Day *et al.*, 2011; Zainal-Abidin *et al.*, 2016). La alta actividad de la lipasa en juveniles de *H. ingens*, así como en larvas de peces, está relacionada con la ausencia de un estómago funcional y puede considerarse un reflejo de un mayor requerimiento de lípidos durante el desarrollo temprano (Cara-Torres *et al.*, 2002; Álvarez-González, 2003; Wardley *et al.*, 2006; Frías-Quintana *et al.*, 2015).

La actividad de tripsina en *H. ingens* mostró mayor actividad que otras enzimas proteasas analizadas (aminopeptidasa y quimotripsina), lo cual también se ha observado en otras especies de teleósteos cuando la actividad de la pepsina aún

no se observa, por lo que se lleva a cabo una proteólisis alcalina (Bitterlich, 1965; Logothetis *et al.*, 2001; Álvarez-González, 2003; He *et al.*, 2012; Moguel-Hernández, 2015), al igual que en caballitos de mar como en *Hippocampus abdominalis* (Wardley *et al.*, 2006), *H. erectus* (Yin *et al.*, 2012) e *H. guttulatus* (Blanco *et al.*, 2016).

La tripsina es una endopeptidasa que se secreta del páncreas hacia el intestino en su forma precursora o zimógeno, el tripsinógeno. Tiene la capacidad de hidrolizar los enlaces peptídicos en donde la función carbonilo es aportada por el resto de lisina o de arginina, independientemente de la longitud o la secuencia de los aminoácidos en la cadena (Álvarez-González, 2003; Moguel-Hernández, 2015). Además, es considerada como una endoproteasa inicial para la activación de otras enzimas digestivas, catalizando la conversión de zimógenos en enzimas activas (Frías-Quintana *et al.*, 2015). A su vez, la tripsina participa de manera importante en la digestión de proteína de todos los animales, sin embargo no es la única proteasa, existen muchos tipos que igualmente están involucradas en dicho proceso, aunque en menor porcentaje (Álvarez-González, 2003).

La actividad de amilasa en *H. ingens* presentó una menor actividad al igual que en *Hippocampus abdominalis* (Wardley *et al.*, 2006) e *H. guttulatus* (Blanco *et al.*, 2016), en peces sin estómago como *Hypophthalmichthys molitrix* y *Aristichthys nobilis* (Bitterlich, 1965), y en algunas larvas de peces como *Seriola lalandi* (González-Álvarez, 2013) y *Atractosteus tropicus* (Frías-Quintana *et al.*, 2015) cuando la actividad de la pepsina aún no se presentaba.

La amilasa es una enzima pancreática que se encarga de catalizar la hidrólisis del enlace α 1-4 del almidón y glucógeno generando oligosacáridos (α -amilasa) y maltosa (β -amilasa). Se encuentra en el jugo pancreático de una gran cantidad de animales y ha sido reportada en larvas de varias especies de peces. Es un indicador de la maduración del páncreas de las larvas de los peces y su actividad está relacionada con el incremento de gránulos de zimógeno de otras enzimas pancreáticas como por ejemplo, la tripsina (Cara-Torres *et al.*, 2002; Álvarez-González, 2003; González-Álvarez, 2013; Moguel-Hernández, 2015; Frías-Quintana *et al.*, 2015; Blanco *et al.*, 2016; Cota-Mamani, 2016; Zainal-Abidin *et al.*, 2016). En varias especies de peces se ha observado que la actividad de amilasa es elevada

durante las etapas tempranas de desarrollo, dándoles la capacidad de digerir carbohidratos, sin embargo ésta disminuye progresivamente conforme el pez se desarrolla en juvenil (Logothetis *et al.*, 2001; Cara-Torres *et al.*, 2002; Álvarez-González, 2003; Moguel-Hernández, 2015).

Varios autores han reportado que los omnívoros y principalmente los herbívoros, poseen niveles más altos de amilasa, debido a su necesidad de descomponer los polisacáridos en azúcares de cadena corta, mientras que los carnívoros presentan un baja actividad de amilasa, por lo que tienen un limitada habilidad para digerir carbohidratos (Logothetis *et al.*, 2001; Natalia *et al.*, 2004; Day *et al.*, 2011; González-Álvarez, 2013; Hassanatabar *et al.*, 2013; Moguel-Hernández, 2015). En el caso de *H. ingens*, así como en otros caballitos de mar, al poseer una actividad moderada de amilasa, se les asocia a una naturaleza carnívora y a su vez, sugiere que tienen la capacidad de digerir los exoesqueletos quitinosos de algunos crustáceos (Wardley *et al.*, 2006; Blanco *et al.*, 2016), sin embargo, es necesario confirmar esta suposición mediante el análisis enzimático de la actividad de la enzima quitinasa.

En el caso de la actividad de quimotripsina en *H. ingens* mostró mayores valores que la aminopeptidasa, aunque fue menor que la tripsina.

La quimotripsina también es una endopeptidasa que se secreta en el páncreas e hidroliza los enlaces peptídicos que contienen grupos carboxilo de los aminoácidos aromáticos fenilalanina, triptófano y tirosina (Álvarez-González, 2003; Moguel-Hernández, 2015). La quimotripsina, junto con la tripsina, juega un papel importante en especies carnívoras y omnívoras (Natalia *et al.*, 2004). Se considera como indicadora del estado nutricional, así como de la capacidad de crecimiento en las larvas de peces. Su presencia desde edades tempranas coincide con el desarrollo del páncreas funcional, y además de contribuir a la digestión de proteínas, se ha mencionado que es responsable de la digestión de proteínas compensando la ausencia de un estómago funcional y la actividad de la pepsina (González-Álvarez, 2013; Frías-Quintana *et al.*, 2015; Moguel-Hernández, 2015).

La actividad de aminopeptidasa en *H. ingens* mostró valores extremadamente bajos y casi indetectables con respecto al resto de las enzimas digestivas analizadas. Esta actividad tan baja se ha observado en algunos peces herbívoros y carnívoros, ambos sin estómago como *Atherinops affinis* (Horn *et al.*, 2006) y *Zenarchopterus buffonis* (Zainal-Abidin *et al.*, 2016) respectivamente.

La aminopeptidasa se encarga de catalizar la hidrólisis de los enlaces peptídicos liberando el aminoácido en posición terminal, liberando péptidos más pequeños y aminoácidos libres que son absorbidos a través de las microvellosidades de los enterocitos. Se clasifican de acuerdo a los requerimientos de iones metálicos y la especificidad de determinados dipéptidos (Lazo *et al.*, 2007; Álvarez-González, 2003; Moguel-Hernández, 2015). Es una enzima que se localiza en la membrana de las microvellosidades de las células intestinales, aunque también se ha encontrado en orgánulos citoplásmicos y vesículas de las células epiteliales, y se ha usado desde hace tiempo como marcador de la diferenciación de los enterocitos en los mamíferos (Gawlicka *et al.*, 1995; Tengjaroenkul, 2000; Lazo *et al.*, 2007; Cota-Mamani, 2016).

El aumento de la actividad de la aminopeptidasa en las larvas de los peces es un indicativo de que los enterocitos están funcionalmente desarrollados y maduros, lo cual está relacionado con el estado nutricional de los organismos (Gawlicka *et al.*, 1995; Álvarez-González, 2003; Lazo *et al.*, 2007; Cota-Mamani, 2016). La aminopeptidasa también puede ser usada como un indicador del desarrollo relativo de la digestión extracelular (Cara-Torres *et al.*, 2002), se ha observado que en algunas larvas de peces se muestran bajos niveles de actividad durante los primeros días de vida y conforme crece, ésta se incrementa, marcando la transición del estadio larval a juvenil (Álvarez-González, 2003; Lazo *et al.*, 2007), así como la maduración de la función digestiva. También se ha mencionado que un aumento de la actividad de esta enzima ocurre con la presencia de alimento en el tubo digestivo (Moguel-Hernández, 2015). En este sentido, los ejemplares de *H. ingens* que se utilizaron en este trabajo se encontraban en ayunas al momento de su experimentación, lo que podría explicar de alguna manera la baja actividad de aminopeptidasa en su tubo digestivo.

Bajo el marco anterior, se resalta que los juveniles de tres meses de edad de *Hippocampus ingens* presentan un sistema digestivo bien desarrollado compuesto por un esófago, intestino y glándulas anexas (hígado y páncreas). El esófago está regionalizado en anterior y posterior; dicha estructura es el sitio en donde se presentará la primera barrera ante microorganismos y facilitará el tránsito de los alimentos hacia el intestino. El intestino está regionalizado en anterior, medio y posterior; en la región anterior se llevará un proceso inicial de digestión y absorción, continuando con la región media del intestino, en donde se llevará a cabo la degradación y se terminarán de completar estos procesos, para finalmente facilitar la expulsión de los desechos del intestino posterior hacia el recto. Presenta un hígado sin lobulaciones y un páncreas difuso alrededor del tubo digestivo, al igual que en muchos grupos taxonómicos de teleósteos.

De acuerdo a las características histológicas, en la región anterior de esófago así como la región media del intestino hay una mayor presencia de células mucosas de tipo ácidas y vellosidades más altas, atribuyéndoles una función inmune, una lubricación del alimento en el caso del esófago, y una mayor superficie de absorción en el intestino (Marchetti *et al.*, 2006; Banan-Khojasteh, *et al.*, 2009; Rodrigues da Silva *et al.*, 2012; Cohen *et al.*, 2013; Vieira-Lopes *et al.*, 2013; Cardoso *et al.*, 2015). Mientras que en las regiones donde hay una menor área de células mucosas, se compensa con mayor área de músculo, adjudicándoles una peristalsis más activa (Sarasquete *et al.*, 1995; Zambonino-Infante *et al.*, 2008; Rønnestad *et al.*, 2013) y esto va a depender del tipo de músculo. En el esófago hay una contracción voluntaria por ser músculo estriado esquelético (Mai *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2016), mientras que en el intestino se observa músculo liso, cuyas contracciones más débiles retrasan el paso del alimento y están reguladas hormonalmente (Halver & Hardy, 2002; Genten *et al.*, 2009; Helfman *et al.*, 2009; Gómez-Ramírez *et al.*, 2010).

Hippocampus ingens no presenta un estómago, así como en las etapas tempranas de los peces, lo que implica que no hay una secreción de pepsina ni de ácido clorhídrico, y compensa su ausencia con procesos de pinocitosis intestinal, seguida de digestión intracelular y la digestión intestinal alcalina (Govoni *et al.*, 1986;

Ng *et al.*, 2005 Peña-Martínez, 2010; Cara-Torres *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2006; Zacarías-Soto *et al.*, 2013; Moguel-Hernández, 2015; Zhang *et al.*, 2016), que será llevada a cabo por enzimas secretadas por el páncreas al lumen intestinal (amilasa, lipasa, tripsina, quimotripsina) y por enzimas que se encuentran en la membrana del epitelio intestinal (fosfatasa ácida y alcalina, aminopeptidasa) (Cara-Torres *et al.*, 2002; Wardley *et al.*, 2006; Lazo *et al.*, 2007; Zacarías-Soto *et al.*, 2013; Moguel-Hernández, 2015). De acuerdo a la actividad de las enzimas detectadas en el presente trabajo, se resalta que *H. ingens* es una especie carnívora y que tiene la capacidad de digerir tanto lípidos como proteínas y carbohidratos. Además de que su intestino al ser visualmente largo, podría suplir la deficiencia de un estómago (Vásquez-Torres, 2004; Furné-Castillo, 2008).

El presente trabajo es uno de los primeros estudios en *H. ingens* sobre su fisiología digestiva, de modo que hacen falta diferentes estudios que permitan analizar aspectos básicos sobre la nutrición y fisiología, por ejemplo, el efecto de la composición de la dieta sobre los perfiles enzimáticos en los juveniles, investigaciones básicas sobre su ontogenia, cambios en la fisiología digestiva y comportamiento de alimentación, estimación de los requerimientos nutricionales, etc. Esto permitirá generar información útil que pueda implementarse en el cultivo del caballito de mar, ya que la alimentación y la asimilación de nutrientes aún permanece como un factor principal de mortalidad durante su crecimiento.



8. CONCLUSIONES

- ★ Es el primer trabajo sobre la actividad enzimática digestiva (tripsina, quimotripina, amilasa, lipasa, aminopeptidasa y fosfatasa ácida y alcalina) del tubo digestivo de *Hippocampus ingens* a los 3 meses de edad, las cuales se encuentran presentes en la mayoría de los teleósteos.
- ★ *Hippocampus ingens* presenta una estructura histológica del tubo digestivo similar a la de otras especies de teleósteos, incluyendo otras especies de caballitos de mar.
- ★ Las actividades de la lipasa y las fosfatasas ácida y alcalina, presentaron mayor actividad que la tripsina, amilasa, quimotripsina y aminopeptidasa.
- ★ Se confirma que por sus características y los niveles de las enzimas digestivas, *Hippocampus ingens* es una especie carnívora y tiene altos requerimientos de lípidos y bajos requerimientos de carbohidratos y proteínas, a los 3 meses de edad.
- ★ Existe una relación inversa entre la presencia de mucinas y el músculo en el tubo digestivo, es decir en las regiones del esófago e intestino donde hubo una mayor área de células mucosas, el área de músculo era menor, mientras que en los sitios donde hubo menor área de células mucosas e incluso estaban ausentes, el músculo se encontraba con mayor área.
- ★ *Hippocampus ingens* no posee un estómago, y por lo tanto, no hay secreción de pepsina ni de ácido clorhídrico, lo cual se compensa con una digestión intestinal alcalina, basada en la actividad de proteasas alcalinas pancreáticas.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Al-Abdulhadi, H. A. 2005. Some comparative histological studies on alimentary tract of tilapia fish (*Tilapia spilurus*) and sea bream (*Mylio cuvieri*). *Egyptian Journal of Aquatic Research*, 31(1): 387-397.
- Al-Hussaini, A. H. 1947. The feeding habits and the morphology of the alimentary tract of some teleost living in the neighbourhood of the Marine Biological Station, Ghardaqa, Red Sea. *Publications of the Marine Biological Station, Ghardaqa*, 5: 1-61.
- Al-Hussaini, A. H. 1949. On the functional morphology of the alimentary tract of some fish in relation to differences in their feeding habits: Anatomy and histology. *Quarterly Journal Microscopical Science*, 90: 109-139.
- 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. Instituto Politécnico Nacional-CICIMAR. 179 pp.
- Alves, R. R. N. & H. N. Alves. 2011. The faunal drugstore: Animal-based remedies used in traditional medicines in Latin America. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 7: 9.
- Argyriou, T., M. Clauss, E. E. Maxwell, H. Furrer & M. R. Sánchez-Villagra. 2016. Exceptional preservation reveals gastrointestinal anatomy and evolution in early actinopterygian fishes. *Scientific Reports*, 6:18758, DOI: 10.1038/srep18758
- Atencio-García, V. J., J. Hernández-Muñoz & S. C. Pardo-Carrasco. 2008. Descripción morfológica del tubo digestivo de juveniles de rubio *Salminus affinis* (Pisces: Characudae). *Acta Biológica Colombiana*, 13(3): 99-112.
- Au, D. W. T. 2004. The application of histo-cytopathological biomarkers in marine pollution monitoring: a review. *Marine Pollution Bulletin*, 48: 817-834.

-
- Bakke, A. M., C. Glover & A. Krogdahl. 2001. Feeding, digestion and absorption of nutrients. In: The multifunctional gut of fish. Academic Press, London. 30: 57-110.
- Banan-Khojasteh, S. M. 2012. The morphology of the post-gastric alimentary canal in teleost fishes: a brief review. *International Journal of Aquatic Science*, 3(2): 71-88.
- Banan-Khojasteh, S. M., F. Sheikhzadeh, D. Mohammadnejad & A. Azami. 2009. Histological, histochemical and ultrastructural study of the intestine of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *World Applied Sciences Journal*, 6(11): 1525-1531.
- Barrington, E. J. W. 1942. Gastric digestion in the lower vertebrates. *Biological Reviews*, 17:1-27.
- Barrington, E. J. W. 1957. The alimentary canal and digestion *In: The physiology of fishes*. Academic Press Inc, New York. 109-161 pp.
- Bernabé-Salazar, A., J. A. Navarro-Cámara & F. J. Pallarés-Martínez. 2013. Citología e histología veterinaria. Universidad de Murcia. 1-5 pp.
- Bisso-Bustamante, F. L. 2006. Reproducción de *Hippocampus ingens* Girard, 1859 en Cautiverio. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Federico Villarreal. Perú. 66 pp
- Bitterlich, G. 1985. Digestive enzyme pattern of two stomachless filter feeders, silver carp, *Hypophthalmichthys molitrix* Val., and bighead carp, *Avistichthys nobilis* rich. *Journal of Fish Biology*, 27: 103-112.
- Blanco, A., M. Planas & F. J. Moyano. 2016. Ontogeny of digestive enzymatic capacities in juvenile seahorses *Hippocampus guttulatus* fed on different live diets. *Aquaculture Research*, 47: 3558-3569.

-
- Bočina, I., Ž. Šantić, I. Restović & S. Topić. 2017. Histology of the digestive system of the garfish *Belone belone* (Teleostei: Belonidae). *The European Zoological Journal*, 84(1): 89-95.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.
- Brown, M. E. 1957. The physiology of fishes. Academic Press Inc., New York. 447 pp.
- Bruckner, A. W., J. D. Field & N. Daves. 2004. The proceedings of the international workshop on CITES implementation for seahorse conservation and trade. NOAA Technical Memorandum NMFS-OPR-36. Silver Spring, MD. 171 pp.
- Buddington, R. K., A. Kroghahl & A. M. Bakke-Mckellep. 1997. The intestines of carnivorous fish: Structure and functions and the relations with diet. *Acta Physiologica Scandinavica*, 161: 67-80.
- Cabrera, F. J. & G. C. García. 2010. Histoquímica de mucinas y lípidos del aparato urinario de la baba (*Caiman crocodilus crocodilus*). *Revista de la Facultad de Ciencias Veterinarias*, 51(1): 17-26.
- Camargo, M. M. P. & C. B. R. Martínez. 2007. Histopathology of gills, kidney and liver of a Neotropical fish caged in an urban stream. *Neotropical Ichthyology*, 5(3): 327-336.
- Canan, B., W. S. Nascimento, N. B. Silva & S. Chellappa. 2012. Morphohistology of the digestive tract of the damsel fish *Stegastes fuscus* (Osteichthyes: Pomacentridae). *The Scientific World Journal*, 1-10.
- Cao, X. J., W. M. Wang & F. Song. 2011. Anatomical and histological characteristics of the intestine of the topmouth culter (*Culter alburnus*). *Anatomia Histologia Embryologia*, 40: 292-298.

-
- Cara-Torres, J. B., F. J. Moyano, C. F. Díaz & M. Yúfera. 2002. Actividad de enzimas digestivas durante el desarrollo larvario del sargo (*Diplodus sargus*). CIVA 2002 (<http://www.civa2002.org>), 110-121.
- Cardoso, N. d. N., E. M. d. S. Firmiano, I. D. Gomes, A. A. Nascimento, A. Sales & F.G. Araújo. 2015. Histochemical and immunohistochemical study on endocrine cells (5HT, GAS, and SST) of the gastrointestinal tract of a teleost, the characin *Astyanax bimaculatus*. *Acta Histochemica*, 117:595-604.
- Carrassón, M., A. Grau, L. R. Dopazo & S. Crespo. 2006. A histological, histochemical and ultrastructural study of the digestive tract of *Dentex dentex* (Pisces, Sparidae). *Histology and Histopathology*, 21: 579-593.
- Chao, L. N. 1973. Digestive system and feeding habits of the cunner, *Tautoglabrus adspersus*, a stomachless fish. *Fishery bulletin*, 71(2): 565-586.
- Chen, B. N., J. G. Qin, M. S. Kumar, W. Hutchison & S. Clarke. 2006. Ontogenetic development of the digestive system in yellowtail kingfish *Seriola lalandi* larvae. *Aquaculture*, 256: 489-501.
- Chong, A. S. C., R. Hashim, L. Chow-Yang & A. B. Ali. 2002. Partial characterization and activities of proteases from the digestive tract of discus fish (*Symphysodon aequifasciata*). *Aquaculture*, 203: 321-333.
- Çinar, K. & n. Şenol. 2006. Histological and histochemical characterization of the mucosa of the digestive tract in flower fish (*Pseudophoxinus antalyae*). *Anatomia, Histologia, Embryologia*, 35: 147-151.
- Clarke, A. J. & D. M. Witcomb. 1980. A study of the histology and morphology of the digestive tract of the common eel (*Anguilla anguilla*). *Journal of Fish Biology*, 16: 159-170.
- Cohen, S., M. V. Díaz & A. O. Díaz. 2013. Histological and histochemical study of the digestive system of the Argentine anchovy larvae (*Engraulis anchoita*) at

-
- different developmental stages of their ontogenetic development. *Acta Zoologica* (Stockholm), 1-12.
- Collette, B., G. Collette, D. Facey. 2000. The diversity of fishes. Backwell Science editorial officers. Massachussets, USA. pp
- Convention on international trade in endangered species of wild fauna and flora (CITES). 2002. Conservation of seahorses and other members of the family Syngnathidae. 3 al 15 de Noviembre de 2002.
- Corona-Rojas, D. A. 2015. Descripción histológica de juveniles del Caballito del Pacífico (*Hippocampus ingens*) Girard, 1858. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Baja California Sur (UABCS). 71 pp.
- Cota-Mamani, N. J. 2016. Ontogenia del sistema digestivo y caracterización de la actividad enzimática de las larvas de chita *Anisotremus scapularis* (Tschudi, 1846). Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE). 118 pp.
- Dantagnan-Dantagnan, P., A. Bórquez-Ramírez, I. Valdebenito-Isler & A. Hernández-Arias. 2006. Producción de larvas de peces. Editorial UC TEMUCO. 191 pp.
- Day, R. D., D. P. German, J. M. Manjakasy, I. Farr, M. J. Hansen & I. R. Tibbetts. 2011. Enzymatic digestion in stomachless fishes: how a simple gut accommodates both herbivory and carnivory. *Journal of Comparative Physiology B*, 181: 603-613.
- Deplancke, B. & H. R. Gaskins. 2001. Microbial modulation of innate defense: Globet cells and the intestinal mucus layer. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 73: 1131S-41S
- Deshmukh, M. R., S. G. Chirde & Y. A. Gadhikar. 2015. Histological and histochemical study on the stomach and intestine of catfish *Heteropneustes*

-
- fossilis* (Bloch 1794). *Global Journal of Biology, Agriculture & Health Sciences*, 4(1): 16-23.
- Díaz, A. O., A. H. Escalante, A. M. García, & A. L. Goldemberg, 2006: Histology and histochemistry of the pharyngeal cavity and oesophagus of the silverside *Odontesthes bonariensis* (Cuvier and Valenciennes). *Anatomia, Histologia, Embryologia*, 35: 42-46.
- DOF. 2010. Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. Diario Oficial de la Federación, Segunda sección, 30 diciembre 2010. México, D.F. También disponible online en: http://www.profepa.gob.mx/innovaportal/file/435/1/NOM_059_SEMARNAT_2010.pdf
- Dos-Santos, M. L., F. P. Arantes, K. B. Santiago & J. E. Dos-Santos. 2015. Morphological characteristics of the digestive tract of *Schizodon knerii* (Steindachner, 1875), (Characiformes: Anostomidae): An anatomical, histological and histochemical study. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences*, 87(2): 867-878.
- Encomendero, E., J. Merino, A. Vásquez y F. R. Azañero. 2011. Fecundidad, supervivencia y crecimiento del caballito de mar *Hippocampus ingens* (Pisces: Syngnathiade), en condiciones de laboratorio. *Pueblo continente*, 22(1): 159-165.
- Essed, Z., I. Fernández, F. J. Alarcón & F. J. Moyano. 2002. Caracterización de la actividad proteasa digestiva de atún rojo *Thunnus thynnus* (Linnaeus, 1758). *Boletín. Instituto Español de Oceanografía*, 18(1-4): 99-107.
- Faccioli, C. K., R. A. Chedid, M. T. Siqueira-Bombonato, C. A. Vicenti & I. B. Franceschini-Vicentini. 2014. Morphology and histochemistry of the liver of

-
- carnivorous fish *Hemisorubim platyrhynchos*. *International Journal of Morphology*, 32(2): 715-720.
- Fagundes, K. R. C., M. M. Rotundo & R. B. Mari. 2015. Morphological and histochemical characterization of the digestive tract of the puffer fish *Sphoeroides testudineus* (Linnaeus 1758) (Tetraodontiformes: Tetraodontidae). *Annals of the Brazilian Academy of Sciences*, 1-10.
- Fänge, R. & D. Grove. 1979. Digestion. *In: Fish physiology*. Academic Press, London. 8: 161-260 pp.
- Foster, S. J. & A. C. Vincent. 2004. Life history and ecology of seahorses: implications for conservation and management. *Journal of Fish Biology*, 65: 1-61.
- Frías-Quintana, C. A., G. Márquez-Couturier, C. A. Álvarez-González, D. Tovar-Ramírez, H. Nolasco-Soria, M. A. Galaviz-Espinosa, R. Martínez-García, S. Camarillo-Coop, R. Martínez-Yañez & E. Gisbert. 2015. Development of digestive tract and enzyme activities during the early ontogeny of the tropical gar *Atractosteus tropicus*. *Fish Physiology and Biochemistry*, DOI 10.1007/s10695-015-0070-9.
- Furné-Castillo, M. 2008. Diferentes aspectos fisiológicos en el esturión *Acipenser naccarii*. Estudio comparado con la trucha *Oncorhynchus mykiss*. Tesis de Doctorado. Universidad de Granada. 229 pp.
- Galaviz, M. A., A. García-Gasca, M. Drawbridge, C. A. Álvarez-González & L. M. López. 2011. Ontogeny of the digestive tract and enzymatic activity in white seabass, *Atractoscion nobilis*, larvae. *Aquaculture*, 318: 162-168.
- Gawlicka, A., S. J. Teh, S. S. O. Hung, D. E. Hinton & J. de la Noüe. 1995. Histological and histochemical changes in the digestive tract of White sturgeon larvae during ontogeny. *Fish Physiology and Biochemistry*, 14(5): 357-371.

-
- Genten, F., E. Terwinghe & A. Danguy. 2009. Atlas of fish histology. Department of Histology and Biopathology of Fish Fauna. Science Publishers. Bruxelles, Belgium. 215 pp.
- Gilbert, S. F. 2005. Biología del desarrollo. Médica Panamericana. Buenos Aires. 902 pp.
- Gisbert, E., M. C. Sarasquete, P. Williot & F. Castelló-Orvay. 1999. Histochemistry of the development of the digestive system of siberian sturgeon during early ontogeny. *Journal of Fish Biology*, 55: 596-616.
- Gómez-Ramírez, E., M. O. Tovar-Bohorquez, M. J. Obando-Bulla & H. Hurtado-Giraldo. 2010. Estudio histológico del tracto digestivo del pez *Ariopsis seemanni* (Ariida). *Revista Facultad de Ciencias Básicas*, 6(2): 216-225.
- González-Álvarez, K. M. 2013. Desarrollo morfológico, crecimiento alométrico y actividad enzimática durante la ontogenia temprana del dorado *Seriola lalandi* Valenciennes, 1833 (Carangidae: Perciformes). Tesis de Licenciatura. Universidad Austral de Chile. 65 pp.
- Govoni, J. J., G. W. Boehlert & Y. Watanabe. 1986. The physiology of digestion in fish larvae. *Environmental Biology of Fishes*, 16: 56-77.
- Guevara, W. N. 2003. Formulación y elaboración de dietas para peces y crustáceos. Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann. Facultad de Ingeniería Pesquera. Tacna, Perú. 51 pp.
- Guillaume, J., S. Kaushik, P. Bergot & R. Métailler. 2004. Nutrición y alimentación de peces y crustáceos. Ediciones Mundi-Prensa, España, 475 pp.
- Guzmán-Beltran, L., D. Santana, H. Verdugo, E. Gómez-Ramírez & H. Hurtado-Giraldo. 2013. Descripción anatómica e histológica del tracto digestivo de Nicuro *Pimelodus blochii* (Valenciennes, 1840). *ORINOQUIA*, 17(1): 102-110.

-
- Hale, P. A. 1965. The morphology and histology of the digestive systems of two freshwater teleosts, *Poecilia reticulata* and *Gasterosteus aculeatus*. *Journal of Zoology*, 146: 132-149.
- Halver, J. E. & R. W. Hardy. 2002. Fish Nutrition. Academic Press. USA. 824 pp.
- Hamlin, H. J., I. H. von Herbing & L. J. Kling. 2000. Histological and morphological evaluations of the digestive tract and associated organs of haddock throughout post-hatching ontogeny. *Journal of Fish Biology*, 57: 716-732.
- Hassanatabar, F., H. Ouraji, A. Esmaeili & S. S. Babaei. 2013. Study of the activities of digestive enzymes, amylase and alkaline phosphatase, in kutum larvae, *Rutilus frisii kutum* fed *Artemia* nauplii. *World Journal of Fish and Marine Sciences*, 5(3): 266-270.
- Hassanpour, M. & J. Joss. 2009. Anatomy and histology of the spiral valve intestine in juvenile australian lungfish, *Neoceratodus forsteri*. *The Open Zoology Journal*, 2: 62-85.
- He, T., Z. Xiao, Q. Liu, D. Ma, S. Xu, Y. Xiao & J. Li. 2012. Ontogeny of the digestive tract and enzymes in rock bream *Oplegnathus fasciatus* (Temminck et Schlegel 1844) larvae. *Fish Physiology and Biochemistry*, 38: 297-308.
- Helfman, G. S., B. B. Collete, D. E. Facey & B. W. Bowen. 2009. Diversity of Fishes, Biology, Evolution and Ecology. Wiley-Blackwell. UK. 720 pp.
- Hoar, W. S., Randall D. J. y Brett J. R. 1979. Fish Physiology. Academic Press, London. 786 pp.
- Horn, M. H. & A. Gawlicka. 2001. Digestion in Fish. Encyclopedia of life sciences. 1-5 pp.
- Horn, M. H., A. K. Gawlicka, D. P. German, E. A. Logothetis, J. W. Cavanagh & K. S. Boyle. 2006. Structure and function of the stomachless digestive system in three related species of New World silverside fishes (Atherinopsidae)

-
- representing herbivory, omnivory, and carnivory. *Marine Biology*, 149: 1237-1245.
- Ikpegbu, E., U. C. Nlebedum, O. Nnadozie & I. O. Agbakwuru. 2012. Histological structures of the accessory glands of the digestive system in adult farmed african catfish (*Clarias gariepinus* B.). *Journal of Agriculture and Veterinary Science*, 1(6): 41-46.
- Ishida, J. 1936. Distribution of the digestive enzymes in the digestive system of the stomachless fishes. *Annotations Zoologicae Japonenses*, 15: 263-284.
- Jaroszewska, M., K. Dabrowski, B. Wilczynska & T. Kakareko. 2008: Structure of the gut of the racer goby *Neogobius gymnotrachelus* (Kessler, 1857). *Journal of Fish Biology*, 72: 1773-1786.
- Kapoor, B. G., H. Smit & I. A. Verighina. 1975. The alimentary canal and digestion in teleosts. *Advances in Marine Biology*, 13: 109-239 pp.
- Karasov, W. H. & A. E. Douglas. 2013. Comparative digestive physiology. *Comprehensive Physiology*, 3(2): 741-783.
- Kierszenbaum A. L. & L. L. Tres. 2012. Histology and cell biology. An introduction to pathology. Philadelphia, Elsevier. 701 pp.
- Klaus-Dieter, J. 1976. Studies on the digestive enzymes of the stomachless bonefish *Carassius auratus gibelio* (bloch): Endopeptidases. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 53: 31-38.
- Koldewey, H. J. & K. M. Martin-Smith. 2010. A global review of seahorse aquaculture. *Aquaculture*, 131-152.
- Langeland, M., J. E. Lindberg & T. Lundh. 2013. Digestive enzyme activity in eurasian perch (*Perca fluviatilis*) and arctic charr (*Salvelinus alpinus*). *Aquaculture Research & Development*, 5: 1-8.

-
- Lazo, J. P., R. Mendoza, G. J. Holt, C. Aguilera & C. R. Arnold. 2007. Characterization of digestive enzymes during larval development of red drum (*Sciaenops ocellatus*). *Aquaculture*, 265: 194-205.
- Logothetis, E. A., M. H. Horn & K. A. Dickson. 2001. Gut morphology and function in *Atherinops affinis* (Teleostei: Atherinopsidae), a stomachless omnivore feeding on macroalgae. *Journal of Fish Biology*, 59: 1298-1312.
- Lourie, S. A., S. J. Foster, E. W. T. Cooper & A. C. J. Vincent. 2004. A Guide to the identification of seahorses. University of British Columbia and World Wildlife Fund. Washington, D.C. 114 pp.
- Mahmood, K. M., M. Massam, A. Ameneh & K. Masoud. 2012. Anatomical and histomorphological study of spleen and pancreas in berzem (*Barbus pectoralis*). *World Journal of Fish and Marine Sciences*, 4(3): 263-267.
- Mai, K., H. Yui, H. Ma, Q. Duan, E. Gisbert, J. L. Zambonino-Infante & C. L. Cahu. 2005. A histological study on the development of the digestive system of *Pseudosciaena crocea* larvae and juveniles. *Journal of Fish Biology*, 67(4): 1094-1106.
- Manjakasy, J. M., R. D. Day, A. Kemp & I. R. Tibbetts. 2009. Functional morphology of digestion in the stomachless, piscivorous needlefishes *Tylosurus gaviatoides* and *Strongylura leiura ferox* (Teleostei: Beloniformes). *Journal of Morphology*, 270: 1155-1165.
- Maraux, S., D. Louvard & J. Baratti. 1973. The aminopeptidase from hog-intestinal brush border. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, Acta 321, 282-295.
- Marchetti, L., M. Capacchietti, M. G. Sabbieti, D. Accili, G. Materazzi & G. Menghi. 2006. Histology and carbohydrate histochemistry of the alimentary canal in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of Fish Biology*, 68: 1808-1821.

-
- Martínez-Palacios, C. A. & M. G. Ríos-Durán. 2000. Aspectos de la alimentación de los peces y el uso de microagregados en acuicultura. Instituto de la Amazonia Peruana, 15 pp.
- Moguel-Hernández, I. 2015. Fisiología digestiva durante el desarrollo larval del pargo lunarejo *Lutjanus guttatus*. Tesis de Doctorado. Instituto Politécnico Nacional-CICIMAR. 177 pp.
- Mones-Saucedo, J. 2011. Evaluación del copépodo *Pseudodiaptomus euryhalinus* como alimento vivo en juveniles de caballito de mar *Hippocampus ingens* (Girard, 1859). Tesis de Maestría. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. 75 pp.
- Murillo-Higuera, Y. 2017. Efecto de oligodeoxinucleótidos CpG sobre la modulación de la respuesta inmune, antioxidante y morfología intestinal de pargo amarillo (*Lutjanus argentiventris*). Tesis de Maestría. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. (CIBNOR). 89 pp.
- Murugan, A., S. Dhanya, A. B. Sarcar & V. Naganathan. 2011. Fishery biology, demography of three spotted seahorse, *Hippocampus trimaculatus* inhabiting Gulf of Mannar region, Southeast coast of India. *Indian Journal of Geo Marine Sciences*, 40(3): 411-423.
- Natalia, Y., R. Hashim, A. Ali & A. Chong. 2004. Characterization of digestive enzymes in a carnivorous ornamental fish, the Asian bony tongue *Scleropages formosus* (Osteoglossidae). *Aquaculture*, 233: 305-320.
- Nazlić, M., A. Paladin & I. Bočina. 2014. Histology of the digestive system of the black scorpionfish *Scorpaena porcus* L. *Acta Adriatica*, 55(1): 65-74.
- Neuhaus M., N. van Der Marel, W. Caspari, M. Meyer, L. Enss, D. Steinhagen. 2007. Biochemical and histochemical study on the intestinal mucosa of the common carp *Cyprinus carpio* L., with special consideration of mucin glycoproteins. *Journal of Fish Biology*, 70: 1523-1534.

-
- Nelson, D. L. & M.M. Cox. 2009. *Lehninger Principios de Bioquímica*. 5ta Edición. Editorial Omega. 1296 pp.
- Ng, A. N. Y., T. A. de Jong-Curtain, D. J. Mawdsley, S. J. White, J. Shin, B. Appel, P. Duc Si Dong, D. Y. R. Stainer & J. K. Heath. 2005. Formation of the digestive system in zebrafish: III. Intestinal epithelium morphogenesis. *Developmental Biology*, 286: 114-135.
- Nijman, V. 2010. An overview of international wildlife trade from Southeast Asia. *Biodiversity and Conservation*, 19:1101-1114.
- Novelli, B., F. Otero-Ferrer, M. Díaz, J. A. Socorro, M. J. Caballero, L. Molina-Domínguez & F. J. Moyano. 2016. Digestive biochemistry as indicator of the nutritional status during early development of the long snouted seahorse (*Hippocampus reidi*). *Aquaculture*, 464: 196-204.
- Novelli, B., J. A. Socorro, M. J. Caballero, F. Otero-Ferrer, A. Segade-Botella & L. Molina-Domínguez. 2015. Development of seahorse (*Hippocampus reidi*, Ginsburg 1933): histological and histochemical study. *Fish Physiology and Biochemistry*, DOI 10.1007/s10695-015-0082-5.
- Oeda-Rodríguez, A. P., P. Pauletti, L. Kindlein, E. Francisquine-Delgado, J. E. Possebon-Cyrino & R. Machado-Neto. 2010. Intestinal histomorphology in *Pseudoplatystoma fasciatum* fed bovine colostrum as source of protein and bioactive peptides. *Scientia Agricola*, 67(5): 524-530.
- Oliveira, V. C., R. C. V. Carrana, D. L. C. Simoes, F. P. Saggiaro, C. G. Carlotti Jr, D. T. Covas & L. Neder. 2010. Sudan Black B treatment reduces autofluorescence and improves resolution of in situ hybridization specific fluorescent signals of brain sections. *Histology and Histopathology*, 25: 1017-1024.
- Oliveira-Ribeiro, C. A. & E. Fanta. 2000. Microscopic morphology and histochemistry of the digestive system of a tropical freshwater fish *Trichomycterus*

-
- brasiliensis* (Lütken) (Siluroidei, Trichomycteridae). *Revista Brasileira de Zoologia*, 17(4): 953-971.
- Olivotto, I., M. Planas, G. J. Holt, M. A. Avella & R. Calado. 2011. Advances in breeding and rearing marine ornamentals. *Journal of the World Aquaculture Society*, 42(2): 135-166.
- Ortega-Salas, A. A. & H. Reyes-Bustamante. 2006. Fecundity, survival, and growth of the seahorse *Hippocampus ingens* (Pisces: Syngnathidae) under semi-controlled conditions. *Revista de Biología Tropical*, 54(4): 1099-1102.
- Otero-Ferrer, F. 2011. Seahorses in Gran Canaria Island (Spain): Ecology and aquaculture. Combined tools for marine conservation issues. Tesis de Doctorado. Universidad de las Palmas de Gran Canaria. 290 pp.
- Otero-Ferrer, F., L. Molina, J. Socorro, H. Fernández-Palacios & M. Izquierdo. 2012. Effect of different live prey on spawning quality of short-snouted seahorse, *Hippocampus hippocampus* (Linnaeus, 1758). *Journal of the World Aquaculture Society*, 43(2): 174-186.
- Palma, J., D. P. Bureau & J. P. Andrade. 2014. The effect of diet on ontogenic development of the digestive tract in juvenile reared long snout seahorse *Hippocampus guttulatus*. *Fish Physiology and Biochemistry*, 40(3): 739-750.
- Park, J. Y. & I. S. Kim. 2001. Histology and mucin histochemistry of the gastrointestinal tract of the mud loach, in relation to respiration. *Journal of Fish Biology*, 58: 861-872.
- Pathan, T. S., P. B. Thete, S. E. Shinde, D. L. Sonawane & Y. K. Khillare. 2009. Histochemical changes in the liver of freshwater fish, *Rasbora daniconius*, exposed to paper mill effluent. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 21(2): 71-78.
- Patnaik, B. B., H. Howrelia, T. Mathews & M. Selvanayagam. 2011. Histopathology of gill, liver, muscle and brain of *Cyprinus carpio communis* L. exposed to

-
- sublethal concentration of lead and cadmium. *African Journal of Biotechnology*, 10(57): 12218-12223
- Peña, R., S. Dumas, M. Villalejo-Fuerte & J. L. Ortíz-Galindo. 2003. Ontogenetic development of the digestive tract in reared spotted sand bass *Paralabrax maculatofasciatus* larvae. *Aquaculture*, 219: 633-644.
- Peña-Martínez, R. 2005. Estudios de la función digestiva en larvas de la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus*: Aspectos alimenticios y sus aplicaciones prácticas. Tesis de Doctorado. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas Departamento de Desarrollo de Tecnologías (CICIMAR). 141 pp.
- Peña-Martínez, R. 2010. Histología e histoquímica del desarrollo ontogenético del tubo digestivo de larvas de la cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*) (Percoidei: Serranidae). Tesis de Maestría. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas Departamento de Desarrollo de Tecnologías (CICIMAR). 113 pp.
- Petrinec, Z., S. Nejedli, S. Kužir & A. Opačak. 2005. Mucosubstances of the digestive tract mucosa in northern pike (*Esox lucius* L.) and european catfish (*Silurus glanis* L.). *Veterinarski arhiv*, 75(4): 317-327.
- Purushothaman, K., D. Lau, J. M. Saju, S. Musthaq, D. Patrick-Lunny, S. Vij & L. Orbán. 2016. Morpho-histological characterisation of the alimentary canal of an important food fish, Asian seabass (*Lates calcarifer*). *PeerJ*. DOI 10.7717/peerj.2377.
- Raji, A. R. & E. Norouzi. 2010. Histological and histochemical study on the alimentary canal in Walking catfish (*Claris batrachus*) and piranha (*Serrasalmus nattereri*). *Iranian Journal of Veterinary Research*, 11(3): 255-261.
- Reyes-Bustamante, H. & A. A. Ortega-Salas 1999. Cultivo del caballito de mar, *Hippocampus ingens* (Pisces: Syngnathidae) en condiciones artificiales. *Revista de Biología Tropical*, 47(4): 1045-1049.

-
- Reza, S., N. Gholamreza & R. Hooman. Histological study of hepatopancrease in iridescent shark catfish (*Pangasius hypophthalmus*). *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 8(7): 1305-1307.
- Ribeiro, L., C. Sarasquete & M.T. Dinis. 1999. Histological and histochemical development of the digestive system of *Solea senegalensis* (Kaup, 1858) larvae. *Aquaculture*, 171: 293-308.
- Ribelles, A., M. C. Carrasco, M. Rosety & M. Aldana. 1995. Morphological and histochemical changes in the liver and pancreas of gilthead, *Sparus auratus* L., induced by acute action of the anionic detergent, sodium dodecyl sulphate. *Histology and Histopathology*, 10: 781-787.
- Rodríguez da Silva, M., M. R. Marçal-Natali & N. Segatti-Hahn. 2012. Histology of the digestive tract of *Satanoperca pappaterra* (Osteichthyes, Cichlidae). *Acta Scientiarum*, 34(3): 319-326.
- Rodrigues, A. P. O., P. Pauletti, L. Kindlein, J. E. P. Cyrino, E. F. Delgado & R. Machado-Neto. 2009. Intestinal morphology and histology of the striped catfish *Pseudoplatystoma fasciatum* (Linnaeus, 1766) fed dry diets. *Aquaculture Nutrition*, 15: 559-563.
- Rodríguez-Jaramillo, C., Hurtado, M., Romero-Vivas, E., Ramírez J. L., Manzano, M. & Palacios, E. 2008. Gonadal development and histochemistry of the tropical oyster, *Crassostrea corteziensis* (Hertlein, 1951) during an annual reproductive cycle. *Journal of Shellfish Research*, 27:1129-1141.
- Rodríguez, J., E. González, N. Hernández, V. Capó, I. García. 2004. Comparación morfológica e histológica del tubo digestivo de *Gambusia puniculata* y *Girardinus metallicus*, peces utilizados en el control biológico de mosquitos. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 56(1): 73-76.
- Rojas, L. M., C. Mata, A. Oliveros & R. Salazar-Lugo. 2012. Histología de branquias, hígado y riñón de juveniles del pez neotropical *Colossoma macropomum*

-
- (Characiformes, Characidae) expuesto a tres temperaturas. *Revista de Biología Tropical*, 61(2): 797-806.
- Rønnestad, I., M. Yúfera, B. Ueberschär, L. Ribeiro, Ø. Sæle & C. Boglione. 2013. Feeding behaviour and digestive physiology in larval fish: current knowledge, and gaps and bottlenecks in research. *Reviews in Aquaculture*, 5(1): 59-98.
- Rosa, I. L., T. P. R. Oliveira, F. M. Osório, L. E. Moraes, A. L. C. Castro, G. M. L. Barros & R. R. N. Alves. 2011. Fisheries and trade of seahorses in Brazil: historical perspective, current trends, and future directions. *Biodiversity and Conservation*, 20: 1951-1971.
- Ross, M. H. & W. Pawlina. 2010. Histología. Texto y atlas color con biología celular y molecular. *Médica Panamericana*, 992 pp.
- Rotllant, G., F. J. Moyano, M. Andrés, M. Díaz, A. Estévez & E. Gisbert. 2008. Evaluation of fluorogenic substrates in the assessment of digestive enzymes in a decapod crustacean *Maja brachydactyla* larvae. *Aquaculture*, 282: 90-96.
- Rungruangsak-Torrissen, H., R. Moss, L. H. Andresen, A. Berg & R. Waagbø. 2006. Different expressions of trypsin and chymotrypsin in relation to growth in atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Fish Physiology and Biochemistry*, 3: 7-23.
- Sáenz de Rodrigáñez, M., F. J. Alarcón, M. I. Martínez, F. Ruiz, M. Díaz & F. J. Moyano. 2005. Caracterización de las proteasas digestivas del lenguado senegalés *Solea senegalensis* Kaup, 1858. *Boletín. Instituto Español de Oceanografía*, 21(1-4): 95-104.
- Sandoval-Muy, M. A. & B. Barón-Sevilla. 2007. The effect of two frozen natural foods on the routine metabolism and ammonia excretion of the Pacific seahorse, *Hippocampus ingens*. *Journal of Fisheries International*, 2(1): 91-98.
- Sang-Woo, H., K. Shin-Kwon, K. Dae-Jung, L. Bae-Ik, P. Su-Jin, H. Hyung-Gyu, J. Je-Cheon, M. Jeong-In, L. Chi-Hoon & L. Young-Don. 2016. Digestive physiological characteristics of the Gobiidae. Characteristics of CCK-producing

-
- cells and mucus-secreting goblet cells of stomach fish and stomachless fish. *Development & Reproduction*, 20(3): 207-217.
- Sarasquete, M. C., A. Polo & M. Yúfera. 1995. Histology and histochemistry of the development of the digestive system of larval gilthead seabream, *Sparus aurata* L. *Aquaculture*, 130: 79-92.
- Sayed-Awaad, A., U. Kamal-Moawad & M. Gomaa-Tawfiek. 2014. Comparative histomorphological and histochemical studies on the oesophagus of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* and African catfish *Clarias gariepinus*. *Journal of Histology*, 1-10.
- Segade, Á., L. Robaina, B. Novelli, F. Otero-Ferrer & L. Molina-Domínguez. 2016. Effect of the diet on lipid composition and liver histology of short snout seahorse *Hippocampus hippocampus*. *Aquaculture Nutrition*, 22: 1312-1319.
- Şenol, N. 2015. Histochemistry of the alimentary canal of the rudd (*Scardinius erythrophthalmus* (L., 1758)) in Lake Uluabat-Turkey. *Indian Journal of Geo-Marine Sciences*, 44(5): 1-6.
- Semarnat. 2006. Manifestación de Impacto Ambiental Modalidad Particular. Granja Acuícola de Caballito Marino, en el Municipio de Mazatlán, Sinaloa. 124 pp.
- Sheehan, D. C. & B. B. Hrapchak. 1973. Theory and Practice of Histotechnology. 2da Edición. C. V. Mosby Company, Saint Louis. 218 pp.
- Susilo, U., P. Sukardi & R. Affandi. 2016. Alkaline protease, amylase and cellulase activities of yellow rasbora, *Rasbora lateristriata* Blkr., at different feeding levels. *MOLEKUL*, 11(2): 190-201.
- Suyehiro, Y. 1941. A study on the digestive system and feeding habits of fish. *The Ichthyological Society of Japan*, 10: 1-313.
- Teixeira, R. L. & J. A. Musick. 2001. Reproduction and food habits of the lined seahorse, *Hippocampus erectus* (Teleostei: Syngnathidae) of Chesapeake Bay, Virginia. *Revista Brasileira de Biologia*, 6(1): 79-90.

-
- Téllez-Mohedano, V., K. L. Morán-Sánchez, D. Medina-González & D. Voltolina. 1997. Cultivo a nivel piloto de caballito de mar *Hippocampus ingens* (Girard, 1859). *Oceanología*, 3(15): 98-109.
- Tengjaroenkul, B. 2000. Ontogenic morphology and enzyme activities of the intestinal tract of the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. Tesis de Doctorado. Instituto Politécnico de Virginia. 176 pp.
- Tindermans, D., A. Rekecki & W. Van den Broeck. 2010. Ontwikkeling van het maagdarmstelsel bij het zeepaardje (*Hippocampus erectus* P.) *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift*, 79: 207-212.
- Toledo-Cuevas, E. M., F. J. Moyano-López, D. Tovar-Ramírez, C. A. Strüssmann, C. A. Álvarez-González, C. C. Martínez-Chávez & C. A. Martínez-Palacios. 2011. Development of digestive biochemistry in the initial stages of three cultured Atheriopsids. *Aquaculture Research*, 42: 776-786.
- Torres, G. A., S. González & E. Peña. 2010. Descripción anatómica, histológica y ultraestructural de la branquia e hígado de tilapia (*Oreochromis niloticus*). *International Journal of Morphology*, 28(3): 703-712.
- Treviño, L., C. A. Álvarez-González, N. Perales-García, L. Arévalo-Galán, A. Uscanga-Martínez, G. Márquez-Couturier, I. Fernández & E. Gisbert. 2010. A histological study of the organogenesis of the digestive system in bay snook *Petenia splendida* Günther, 1862 from hatching to the juvenile stage. *Journal of Applied Ichthyology*, 27:73-82.
- Ünal, G., O. Çetinkaya, E. Kankaya & M. Elp. 2001. Histological study of the organogenesis of the digestive system and swim bladder of the *Chalcalburnus tarichi* Pallas, 1811 (Cyprinidae). *Turkish Journal of Zoology*, 25: 217-228.
- Vásquez-Torres, W. 2004. Principios de nutrición aplicada al cultivo de peces. Instituto de Acuicultura. Universidad de los Llanos. 66 pp.

-
- Vega-Villasante, F., H. Nolasco & R. Civera. 1993. The digestive enzymes of the Pacific brown shrimp *Penaeus californiensis*. I. Properties of amylase activity in the digestive tract. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 106: 547-550.
- Vieira-Lopes, D. A, N. L. Pinheiro, A. Sales, A. Ventura, F. G. Araújo, I. D. Gomes & A. A. Nascimento. 2013. Immunohistochemical study of the digestive tract of *Oligosarcus hepsetus*. *World Journal of Gastroenterology*, 19(12): 1919-1929.
- Vincent, A. C. J. 1996. The international trade in seahorses. Traffic international. United Kingdom. 162 pp.
- Wardley, T. R. 2006. A study on the feeding of the pot-bellied seahorse (*Hippocampus abdominalis*): Reducing the reliance on brine shrimp (*Artemia*). Tesis de Doctorado. Universidad de Tasmania, Launceston. 341 pp.
- Wegner, A., T. Ostaszewska & W. Rożek. 2009. The ontogenetic development of the digestive tract and accessory glands of sterlet (*Acipenser ruthenus* L.) larvae during endogenous feeding. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 19: 431-444.
- Wilson, J. M. & L. F. C. Castro. 2011. Morphological diversity of the gastrointestinal tract in fishes, *In: The multifunctional gut of fish*. Academic Press, London, 30: 1-55 pp.
- Winter. 2014. Seahorses and sea dragons. Pacific Currents. 27 pp.
- Wołczuk, K., J. Nowakowska, D. Płachocki & T. Kakareko. 2014. Histological, histochemical and ultrastructural analysis reveals functional division of the oesophagogastric segment in freshwater tubenose goby *Proterorhinus semilunaris* Heckel, 1837. *Zoomorphology*, DOI 10.1007/s00435-014-0250-7.
- Yang, R., C. Xie, Q. Fan, C. Gao & L. Fang. 2010. Ontogeny of the digestive tract in yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco* larvae. *Aquaculture*, 302:112-123.
- Yin, F., B. Tang, D. Zhang & X. Zou. 2012. Lipid metabolic response, peroxidation, and antioxidant defence status of juvenile lined seahorse, *Hippocampus*

erectus, fed with highly unsaturated fatty acids enriched *Artemia* nauplii. *Journal of the World Aquaculture Society*, 43(5): 716-726.

Zacarías-Soto, M., B. Barón-Sevilla & J. P. Lazo. 2013. Ontogeny and distribution of alkaline and acid phosphatases in the digestive system of California halibut larvae (*Paralichthys californicus*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 39: 1331-1339.

Zainal- Abidin, D. A., M. Hashim, S. K. Das, S. M. Rahim & A. Ghaffar-Mazlan. 2016. Enzymatic digestion of stomachless fish *Zenarchopterus buffonis*. *AAFL Bioflux*, 9(3): 695-703.

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

Zambonino-Infante, J. L., E. Gisbert, C. Sarasquete, I. Navarro, J. Gutiérrez & C.L. Cahu. 2008. Ontogeny and physiology of the digestive system of marine fish larvae. *In: Feeding and Digestive Functions of Fishes*. CRC Press. 281-348.

Zhang, J., R. Yang, X. Yang, Q. Fan, K. Wei & W. Wang. 2016. Ontogeny of the digestive tract in mud loach *Misgurnus anguillicaudatus* larvae. *Aquaculture Research*, 47: 1180-1190.



10. ANEXOS

Anexo 1. Solución de Fijación Davidson (Preparación para 1 galón stock).

COMPONENTES	CANTIDADES
Glicerina	400 ml
Formaldehído al 37 – 40 %	800 ml
Alcohol etílico 96 %	1200 ml
Agua de mar filtrada	1200 ml
Ácido acético	1 parte por 9 de stock

Indicaciones: El ácido acético se adiciona antes de usarse.

- Utilizar formaldehído al 37-40 % no buferado.
- Tiempo óptimo de fijación 36 a 48 horas a temperatura ambiente, dependiendo del tamaño del tejido, secciones mayores de 1 cm³ deberán dejarse mínimo 48 horas.
- El volumen de solución fijadora debe triplicar el volumen del tejido a fijar.
- Una vez cumplido el tiempo óptimo de fijación, pasar los tejidos al alcohol etílico al 70%
- Si no es posible pasar los tejidos al alcohol 70% en el tiempo indicado (a las 48 hrs. de haberlos fijado), es necesario utilizar la solución de Davidson sin ácido acético.



Anexo 2. Procesamiento de Tejidos.

Etapa de procesamiento	Reactivo	Tiempo en el reactivo
Deshidratación	Etanol 70 % I	60 minutos
	Etanol 70 % II	60 minutos
	Etanol 80 %	60 minutos
	Etanol 90 %	60 minutos
	Etanol 96 % I	60 minutos
	Etanol 96 % II	60 minutos
	Etanol 100 % I	60 minutos
	Etanol 100 % II	60 minutos
Aclaramiento	Etanol 100 % III	60 minutos
	Mezcla de Etanol absoluto y Xilol	20 minutos
	Xilol absoluto	10 minutos
Infiltración	Parafina y Xilol	30 minutos
	Parafina I	60 minutos
	Parafina II	120 minutos
	Parafina III	120 minutos
	Parafina IV	120 minutos



Anexo 3. Técnicas de Tinción.

Anexo 3a. Tinción de Hematoxilina de Harris - Eosina-Floxina

Etapa de Proceso	Reactivo	Tiempo en el Reactivo
Desparafinación	Xilol I	10 minutos
	Xilol II	10 minutos
	Xilol III	10 minutos
Hidratación	Etanol 96 %	2 minutos
	Etanol 70 % I	2 minutos
	Etanol 70 % II	2 minutos
	Agua Destilada	5 minutos
Tinción	Hematoxilina de Harris	4 minutos
	Agua corriente	5 minutos
	Agua Destilada	5 minutos
	Agua Ácido	15 segundos
	Agua Destilada	5 minutos
	Agua Amoniaca	15 segundos
	Agua Destilada	5 minutos
	Etanol 50 %	2 minutos
	Etanol 70 %	2 minutos
Eosina-Floxina alcohólica	3 minutos	
Deshidratación	Etanol 96 % I	2 minutos
	Etanol 96 % II	2 minutos
	Etanol 100 % I	1 minuto
	Etanol 100 % II	1 minuto
Aclaramiento	CitriSolv I	5 minutos
	CitriSolv II	5 minutos
	CitriSolv III	5 minutos
Montaje	Montar en Entellan y colocar un cubreobjetos del tamaño adecuado.	



Anexo 3b. Tinción de Azul Alciano-PAS

Etapa de Proceso	Reactivo	Tiempo
Desparafinación	Xilol I	5 minutos
	Xilol II	5 minutos
	Xilol III	5 minutos
Hidratación	Etanol 100 %	5 minutos
	Etanol 95 %	5 minutos
	Etanol 70 %	5 minutos
	Agua Destilada	5 minutos
Tinción	Azul Alciano	24 minutos
	Agua corriente	5 minutos
	Ácido Peryodico 0.5%	10 minutos
	Agua corriente	5 minutos
	Agua Destilada	5 minutos
	Reactivo Schiff	15 minutos
	Solución Sulfurosa	2 minutos
	Agua corriente	2 minutos
	Agua Destilada	2 minutos
Deshidratación	Etanol 95 % I	1 minuto
	Etanol 96 % II	1 minuto
	Etanol 98% III	1 minuto
	Etanol 100% I	5 minutos
	Etanol 100% II	5 minutos
	Etanol 100 % III	5 minutos
Aclaramiento	Xilol I	5 minutos
	Xilol II	5 minutos
	Xilol III	5 minutos
Montaje	Montar en Entellan y colocar un cubreobjetos del tamaño adecuado	



Anexo 3c. Tinción de Azul de Toluidina

Etapa de Proceso	Reactivo	Tiempo
Desparafinación	Xilol I	5 minutos
	Xilol II	5 minutos
	Xilol III	5 minutos
Hidratación	Etanol 100 %	5 minutos
	Etanol 95 %	5 minutos
	Etanol 70 %	5 minutos
	Agua Destilada	5 minutos
Tinción	Azul de Toluidina 0.01%	1 minuto
	Agua Destilada	1 minuto
Deshidratación	Etanol 95 % I	1 minuto
	Etanol 96 % II	1 minuto
	Etanol 98% III	1 minuto
	Etanol 100% I	5 minutos
	Etanol 100% II	5 minutos
	Etanol 100 % III	5 minutos
Aclaramiento	Xilol I	5 minutos
	Xilol II	5 minutos
	Xilol III	5 minutos
Montaje	Montar en Entellan y colocar un cubreobjetos del tamaño adecuado	



Anexo 3d. Tinción de Sudán Negro

Etapa de Proceso	Reactivo	Tiempo
Desparafinación	Xilol I	5 minutos
	Xilol II	5 minutos
	Xilol III	5 minutos
Hidratación	Etanol 100 %	5 minutos
	Etanol 95 %	5 minutos
	Etanol 70 %	5 minutos
	Agua Destilada	5 minutos
Tinción	Sudán Negro	30 minuto
	Etanol 70%	segundos
	Agua corriente	5 minutos
	Agua Destilada	5 minutos
Montaje	Montar en gelatina glicerinada caliente (60 °C) y colocar un cubreobjetos del tamaño adecuado	



Anexo 3e. Tinción de Tricrómica de Masson

Etapa de Proceso	Reactivo	Tiempo
Desparafinación	Xilol I	5 minutos
	Xilol II	5 minutos
	Xilol III	5 minutos
Hidratación	Etanol 100 %	5 minutos
	Etanol 95 %	5 minutos
	Etanol 70 %	5 minutos
	Agua Destilada	5 minutos
Tinción	Hematoxilina de Weigert	10 minutos
	Agua corriente	10 minutos
	Agua Destilada	10 minutos
	Escarlata de Biebrich-Fucsina Ácida	7 minutos
	Agua Destilada	2 minutos
	Ácido Fosfotungstico-Fosfomolibdico I	15 minutos
	Ácido Fosfotungstico-Fosfomolibdico II	15 minutos
	Anilina Azul	5 minutos
	Agua Destilada	5 minutos
Ácido Acético 1%	3 minutos	
Deshidratación	Etanol 95 % I	1 minuto
	Etanol 96 % II	1 minuto
	Etanol 98% III	1 minuto
	Etanol 100% I	5 minutos
	Etanol 100% II	5 minutos
	Etanol 100 % III	5 minutos
Aclaramiento	Xilol I	5 minutos
	Xilol II	5 minutos
	Xilol III	5 minutos
Montaje	Montar en Entellan colocar un cubreobjetos del tamaño adecuado	



Anexo 3f. Tinción de Ninhidrina-Schiff

Etapa de Proceso	Reactivo	Tiempo
Desparafinación	Xilol I	5 minutos
	Xilol II	5 minutos
	Xilol III	5 minutos
Hidratación	Etanol 100 %	5 minutos
	Etanol 95 %	5 minutos
	Etanol 70 %	5 minutos
	Agua Destilada	5 minutos
Tinción	Solución de Ninhidrina (37 °C)	12 horas
	Agua corriente	10 minutos
	Reactivo Schiff	45 minutos
	Agua corriente	5 minutos
	Hematoxilina de Weigert	5 minutos
	Agua corriente	5 minutos
	Agua Destilada	5 minutos
Deshidratación	Etanol 95 % I	1 minuto
	Etanol 96 % II	1 minuto
	Etanol 98% III	1 minuto
	Etanol 100% I	5 minutos
	Etanol 100% II	5 minutos
	Etanol 100 % III	5 minutos
Aclaramiento	Xilol I	5 minutos
	Xilol II	5 minutos
	Xilol III	5 minutos
Montaje	Montar en Entellan colocar un cubreobjetos del tamaño adecuado	