



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS



FISIOLOGÍA DIGESTIVA DE LA MOJARRA
CASTARRICA *Cichlasoma urophthalmus*
(TELEOSTEI: CICHLIDAE)

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS
MARINAS

PRESENTA

CARLOS ALBERTO CUENCA SORIA

LA PAZ B.C.S., NOVIEMBRE DE 2013



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 07 del mes de Noviembre del 2013 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CICIMAR para examinar la tesis titulada:

"FISIOLOGÍA DIGESTIVA DE LA MOJARRA CASTARRICA
Cichlasoma urophthalmus (TELEOSTEI: CICHLIDAE)"

Presentada por el alumno:

CUENCA

Apellido paterno

SORIA

materno

CARLOS ALBERTO

nombre(s)

Con registro:

A	1	0	0	1	4	0
---	---	---	---	---	---	---

Aspirante de:

DOCTORADO EN CIENCIAS MARINAS

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

LA COMISION REVISORA

Directores de Tesis

DR. JOSÉ LUIS ORTIZ GALINDO
Director de Tesis

DR. CARLOS ALFONSO ÁLVAREZ GONZÁLEZ
2º Director de Tesis

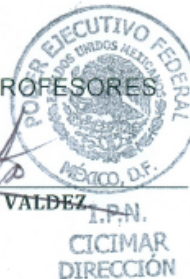
DRA. ROSA ISABEL OCHOA BÁEZ

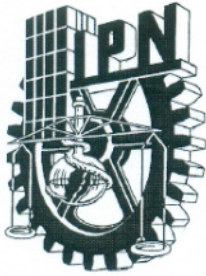
DR. JESÚS IVÁN MURILLO ÁLVAREZ

DR. DARIEL TOVAR RAMÍREZ

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

DRA. MARÍA MARGARITA CASAS VALDEZ





INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., el día 11 del mes Noviembre del año 2013
el (la) que suscribe MC. CARLOS ALBERTO CUENCA SORIA alumno(a) del
Programa de DOCTORADO EN CIENCIAS MARINAS
con número de registro A100140 adscrito al CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS
manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de tesis, bajo la dirección de:
DR. JOSÉ LUIS ORTIZ GALINDO y DR. CARLOS ALFONSO ÁLVAREZ GONZÁLEZ
y cede los derechos del trabajo titulado:

"FISIOLOGÍA DIGESTIVA DE LA MOJARRA CASTARRICA

Cichlasoma urophthalmus (TELEOSTEI: CICHLIDAE)"

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: ccuencas0900@ipn.mx - jortiz@gmail.com - alvarez_alfonso@hotmail.com

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

MC. CARLOS ALBERTO CUENCA SORIA

nombre y firma

AGRADECIMIENTOS

Al Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas (CICIMAR) y al Instituto Politécnico Nacional (IPN) por abrirme sus puertas y brindarme la oportunidad para continuar mi trayectoria académica. Al CONACYT, por el apoyo económico otorgado, mediante la beca nacional para estudios doctorales (número de registro 1100006) y beca para mi estancia de investigación internacional (becas mixtas) en el Recerca I Tecnologia Alimentaries (IRTA, España). A la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco (UJAT) por el apoyo económico beca-salario, mediante el convenio DAMR-02 UJAT-PROFESOR/2010, que me han permitido solventar los gastos para llevar a buen término, la realización de mis estudios doctorales. Agradezco sobremanera también, el apoyo financiero de la UJAT, por cubrir el costo viaje redondo de avión (México-España-México, IRTA año 2011), así como por cubrir los gastos derivados (vuelo viaje redondo, registro en evento y viáticos) para la presentación de mi poster en el Simposio Larvi-2013, Universidad de Ghent, Bélgica; y por solventar los costos de traducción y publicación de artículos científicos. Al IRTA por su fraterna hospitalidad.

A mi comité doctoral, Dr. José Luis Ortíz Galindo, Dr. Carlos Alfonso Álvarez González, Dra. Rosa Isabel Ochoa Báez, Dr. Dariel Tovar Ramírez y el Dr. Jesús Iván Murillo Álvarez, por su digna labor académica, que ha servido de guía en el cauce exitoso de mi tesis. De nuevo al Dr. José Luis Ortiz Galindo, por su apoyo incondicional y su destacable calidad humana.

A la maestra Candita Gil Giménez, ex rectora de la UJAT, a la maestra Sandra Aguilar Hernández, actual directora de la DAMR-UJAT, al Dr. José Manuel Piña Gutiérrez, actual rector de la UJAT, y al maestro Mario Flores Vidal, ex director de la DAMR-UJAT, por la autorización otorgada en su momento, para realizar mis estudios doctorales y a las maestras María Concepción de la Cruz Leyva e Irlanda Ordóñez Sánchez, por colaborar en la gestión de los apoyos financieros proporcionados por la UJAT.

Al Dr. Álvarez-González (UJAT), al Dr. Tovar Ramírez (CIBNOR) y al Dr. Gisbert Casas (IRTA), por permitirme el uso de sus respectivos laboratorios y la también loable calidad humana que les caracteriza. A los técnicos de laboratorio Olga Bellot (IRTA), Carlos Alfonso Frías Quintana (UJAT) y Hever Latisnere Barragán (CIBNOR), por sus asistencias siempre acertadas.

Al C. P. Humberto Ceseña Amador, por su trato siempre ameno y afable.

DEDICATORIA

De corazón, dedico y comparto este gran logro, a mi esposa Meche, a mi Chuchito y Pedrito, por su apoyo decidido e incondicional, pero sobre todo por su afecto y cariño siempre sinceros.

A mi madre dedico este gran paso en mi vida académica, en su memoria. A mis hermanos, dedico estos logros, especialmente a mis sobrinos, sirvan de ejemplo la presente y humilde contribución.

A mi familia política, que me abrieron las puertas de su casa, y de su corazón también. Muchas gracias.

ÍNDICE

Índice de figuras.....	iv
Índice de tablas.....	vii
Glosario.....	viii
Resumen.....	xii
Abstract.....	xiii
1. Introducción.....	1
1.1. Indicadores como evaluación de desarrollo digestivo.....	1
1.2. Ontogenia inicial de peces teleósteos.....	1
1.3. Tipos de ontogenia e indicadores de madurez digestiva.....	2
1.3.1. Ontogenia indirecta.....	4
1.3.1.1. Peces eurípagos carnívoros.....	5
1.3.1.2. Peces eurípagos omnívoros con tendencia carnívora.....	8
1.3.1.3. Peces eurípagos omnívoros con tendencia herbívora.....	11
1.3.2. Ontogenia de transición.....	13
1.3.3. Ontogenia directa.....	15
1.4. Estudios de digestibilidad <i>in vitro</i>	16
2. Antecedentes.....	17
2.1. Desarrollo morfofuncional en peces de ontogenia indirecta.....	18
2.1.1. Peces eurípagos carnívoros.....	18
2.1.2. Peces eurípagos omnívoros con tendencia carnívora.....	20
2.1.3. Peces eurípagos omnívoros con tendencia herbívora.....	21
2.2. Desarrollo morfofuncional en peces de ontogenia de transición.....	22
2.3. Desarrollo morfofuncional en peces de ontogenia directa.....	22
2.4. Digestibilidad <i>in vitro</i> de ingredientes proteínicos en peces.....	23
3. Justificación.....	24
4. Objetivo General.....	25
5. Desarrollo morfofuncional del tracto digestivo de <i>C. urophthalmus</i> (I).....	26
5.1. Objetivos específicos.....	26
5.2. Material y Métodos.....	26
5.2.1. Confinamiento de larvas.....	26
5.2.2. Régimen alimentario y muestreo.....	27
5.2.3. Estudios histológicos e histoquímicos.....	28
5.3. Resultados.....	30
5.3.1. Saco vitelino.....	31
5.3.2. Bucofaringe.....	33
5.3.3. Esófago.....	36
5.3.4. Estómago.....	39
5.3.5. Intestino.....	45
5.3.6. Glándulas accesorias.....	51
5.4. Discusión.....	55
6. Desarrollo morfofuncional del tracto digestivo de <i>C. urophthalmus</i> (II).....	61

6.1. Objetivos específicos.....	61
6.2. Material y Métodos.....	61
6.2.1. Estudios moleculares.....	61
6.2.1.1. Extracción y purificación de RNA.....	61
6.2.1.2. Síntesis de cDNA.....	61
6.2.1.3. Amplificación de cDNA por PCR.....	62
6.2.1.4. Electroforésis en gel de agarosa.....	63
6.2.1.5. Purificación en gel de bandas de electroforesis.....	63
6.2.1.6. Clonación y transformación de células.....	63
6.2.1.7. Purificación de plásmidos.....	64
6.3. Resultados.....	65
6.3.1. Amplificación de genes clonados.....	67
6.3.2. Secuencias nucleotídicas de enzimas digestivas.....	70
6.3.4. Análisis de distancias filogenéticas entre secuencias..	77
6.3.5. Curvas de calibración.....	80
6.3.6. Expresión relativa con PCR en tiempo real.....	85
6.4. Discusión.....	87
7. Estudios bioquímicos en juveniles.....	91
7.1. Objetivos específicos.....	91
7.2. Material y Métodos.....	91
7.2.1. Reproducción, larvicultivo y obtención de juveniles.....	91
7.2.2. Obtención de extractos multienzimáticos.....	91
7.2.3. Análisis bioquímicos.....	92
7.2.4. Efecto del pH y temperatura sobre la actividad proteasas.....	95
7.2.5. Caracterización de proteasas por inhibición bioquímica.....	96
7.2.6. Caracterización de proteasas por inhibición electroforética...96	
7.3. Resultados.....	97
7.3.1. Caracterización enzimática de juveniles.....	97
7.3.2. Efecto del pH y preincubación sobre la actividad y estabilidad de proteasas.....	98
7.3.3. Efecto de la temperatura y preincubación sobre la actividad de proteasas.....	102
7.3.4. Caracterización de proteasas por inhibición bioquímica.....	101
7.3.5. Caracterización de proteasas por inhibición electroforética..	102
7.4. Discusión.....	104
8. Digestibilidad <i>in vitro</i> de ingredientes proteínicos.....	110
8.1. Objetivos específicos.....	110
8.2. Material y Métodos.....	110
8.2.1. Obtención de extractos multienzimáticos.....	110
8.2.2. Materias primas.....	111
8.2.3. Digestibilidad <i>in vitro</i> en condiciones ácidas y alcalinas.....	114
8.2.4. Determinación de aminoácidos libres totales (ALT) en condiciones ácidas y alcalinas.....	115
8.2.5. Análisis estadístico.....	115
8.3. Resultados.....	116
8.3.1. Grados de hidrólisis de ingredientes proteínicos (GH).....	116
8.3.2. Concentración de aminoácidos libres totales (ALT).....	119

8.4. Discusión.....	122
9. Discusión general.....	127
9.1. Cambios morfofuncionales durante la ontogenia inicial.....	127
9.2. Bioquímica y digestibilidad <i>in vitro</i> en juveniles.....	131
10. Conclusiones.....	133
10.1. Cambios morfofuncionales durante la ontogenia inicial.....	133
10.2. Bioquímica y digestibilidad <i>in vitro</i> en juveniles.....	133
11. Recomendaciones.....	134
11.1. Cambios morfofuncionales durante la ontogenia inicial.....	134
11.2. Bioquímica y digestibilidad <i>in vitro</i> en juveniles.....	135
12. Literatura citada.....	136
13. Anexo.....	151

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. La derivación, secuencia del canal alimentario y formación de órganos en larvas de peces teleósteos (tomado de Govoni <i>et al.</i> , 1986).....	2
Figura 2. Indicadores morfológicos durante la ontogenia inicial del pez carnívoro <i>Scophthalmus rhombus</i> (tomado de Hachero-Cruzado <i>et al.</i> , 2009).....	8
Figura 3. Desarrollo morfoestructural de un pez ciprínido omnívoro (tomado de Kolkovsky, 2001).....	9
Figura 4. Indicadores notables durante la ontogenia inicial del pez omnívoro <i>Pagellus erythrinus</i> (tomado de Micale <i>et al.</i> , 2006).....	11
Figura 5. Diseño anatómico del intestino de los diferentes procesos digestivos en peces teleósteos (tomado de Smith, 1980).....	13
Figura 6. Tren de tinción H&E.....	29
Figura 7. Preparaciones histológicas.....	29
Figura 8. Crecimiento en longitud estándar, y disminución de volumen del saco vitelino durante la ontogenia inicial de <i>Cichlasoma urophthalmus</i>	30
Figura 9. Saco vitelino de embrión libre, 3 dde, PAS 2.5.....	32
Figura 10. Saco vitelino de larva, 14 dde, H&E.....	32
Figura 11. Bucofaringe de embrión libre: Ionocitos 3 dde, H&E.....	33
Figura 12. Bucofaringe de embrión libre: diente caninos 3 dde, PAS 2.5.....	34
Figura 13. Bucofaringe de embrión libre: células mucosas 3 dde, PAS 2.5.....	34
Figura 14. Bucofaringe de juvenil: papila bucofaringea 19 dde, PAS 2.5.....	35
Figura 15. Bucofaringe de juvenil: corpúsculo gustativo 24 dde, H&E.....	35
Figura 16. Esófago incipiente de embrión libre, 2 dde, H&E.....	36
Figura 17. Esófago de embrión libre: células mucosas 3 dde, PAS 2.5.....	37
Figura 18. Esófago larvario: células mucosas 5 dde, PAS 2.5.....	37
Figura 19. Esófago diferenciado en juvenil, 17 dde, H&E.....	38
Figura 20. Esófago de juvenil: células mucosas 24 dde, PAS 2.5.....	38
Figura 21. Esófago diferenciado 4 dde, H&E.....	40
Figura 22. Estómago primordio de larva, 6 dde, H&E.....	40
Figura 23. Estómago larvario: origen de glándulas gástricas 7 dde, H&E.....	41
Figura 24. Estómago larvario: micropliegues 7 dde, PAS 2.5.....	41
Figura 25. Estómago larvario: glándulas gástricas 9 dde, H&E.....	42
Figura 26. Estómago larvario: mucopolisacáridos 9 dde, PAS 1.0.....	42
Figura 27. Estómago: comienzo de juvenil, glándulas gástricas 14 dde, H&E.....	43
Figura 28. Estómago diferenciado de juvenil: regionalización 19 dde, H&E.....	43
Figura 29. Estómago de juvenil: glándulas gástricas diferenciadas 24 dde, H&E.....	44
Figura 30. Estómago de juvenil: mucopolisacáridos 24 dde, PAS 2.5.....	44
Figura 31. Intestino incipiente de embrión libre, 2 dde, H&E.....	46
Figura 32. Intestino incipiente de embrión libre: cuerpos de inclusión 2 dde, dde, H&E.....	47
Figura 33. Intestino de embrión libre: células mucosas 3 dde, PAS 2.5.....	47
Figura 34. Recto de embrión libre, 3 dde, PAS 2.5.....	48
Figura 35. Intestino larvario inicial: división, 4 dde, H&E.....	48
Figura 36. Recto en larva: cambio de morfología celular 6 dde, H&E.....	49
Figura 37. Vacuolas lipídicas en juvenil, 23 dde, H&E.....	49
Figura 38. Intestino de juvenil, 29 dde, PAS 2.5.....	50

Figura 39. Quistes de Artemia en intestino posterior larvario, 12 dde, PAS 2.5....	50
Figura 40. Hígado de embrión libre, 3 dde, H&E.....	51
Figura 41. Hígado de embrión libre: lípidos escasos 2 dde, H&E.....	52
Figura 42. Hígado larvario: lípidos abundantes 7 dde, H&E.....	52
Figura 43. Conducto biliar en juvenil, 24 dde, PAS 2.5.....	53
Figura 44. Páncreas de embrión libre, 2 dde H&E.....	54
Figura 45. Páncreas exócrino y endócrino en larva, 4 dde PAS 2.5.....	54
Figura 46. Condiciones de la RT-PCR para síntesis de cDNA.....	62
Figura 47. Condiciones de la PCR para liberación de insertos plasmídicos de células <i>E. coli</i>	64
Figura 48. RNA de muestras de larvas de <i>C. urophthalmus</i> (de 0 ddf a 30 dde). Marcador de peso molecular 50 pb.....	65
Figura 49. Gel de agarosa con las bandas correspondientes a los genes amplificados.....	66
Figura 50. Colonias de células transformadas con (blanco) y sin (azul) insertos... 67	67
Figura 51. Gel de agarosa con bandas de genes por duplicado: amilasa (AMI), lipasa no dependiente de sales biliares (LIP), tripsina (TRIP), fosfatasa alcalina (FA), citosólica intestinal (CNP), lipasa dependiente de sales biliares (BAL) y factor de elongación (EF-1 α). Marcador de peso molecular, 100 pb (M).....	68
Figura 52. Gel de agarosa con bandas de genes por duplicado: lipasa no dependiente de sales biliares (LIP), fosfatasa alcalina (FA). Marcador de peso de peso molecular, 100 pb (M).....	69
Figura 53. Gel de agarosa con bandas de genes por duplicado: amilasa (AMI), lipasa no dependiente de sales biliares (LIP), tripsina (TRIP), fosfatasa alcalina (FA), citosólica intestinal (CNP), lipasa dependiente de sales biliares (BAL) y factor de elongación (EF-1 α). Marcador de peso molecular, 100 pb.....	70
Figura 54. Árbol filogenético de las secuencias nucleotídicas de α -amilasa presente en la ontogenia inicial de <i>Cichlasoma urophthalmus</i> y vecinos piscícolas más cercanos.....	77
Figura 55. Árbol filogenético de las secuencias nucleotídicas de fosfatasa alcalina, presente en la ontogenia inicial de <i>Cichlasoma urophthalmus</i> y vecinos piscícolas más cercanos.....	78
Figura 56. Árbol filogenético de las secuencias nucleotídicas de lipasa dependientes de sales biliares, presente en la ontogenia inicial de <i>Cichlasoma urophthalmus</i> y vecinos piscícolas más cercanos.....	79
Figura 57. Árbol filogenético de las secuencias nucleotídicas del factor de elongación EF-1 α , presente en la ontogenia inicial de <i>Cichlasoma urophthalmus</i> y vecinos piscícolas más cercanos.....	80
Figura 58. Curva de calibración Ct vs logaritmo (base 10) de la concentración de cDNA del gen interno EF-1 α	81
Figura 59. Curva de calibración Ct vs logaritmo (base 10) de la concentración de cDNA del gen asociado a lipasa dependiente de sales biliares.....	82
Figura 60. Curva de calibración Ct vs logaritmo (base 10) de la concentración de cDNA del gen asociado a fosfatasa alcalina.....	83
Figura 61. Curva de calibración Ct vs logaritmo (base 10) de la concentración de cDNA del gen asociado a amilasa.....	84

Figura 62. Expresión relativa génica de enzimas digestivas (LIPASA: lipasa dependiente de sales biliares, AMILASA: α -amilasa y FOSFATASA: fosfatasa fosfatasa alcalina), durante la ontogenia inicial de <i>Cichlasoma urophthalmus</i>	85
Figura 63. Extractos multienzimáticos de <i>Cichlasoma urophthalmus</i>	92
Figura 64. Caracterización de proteasas. a) pH óptimo de actividad de proteasas ácidas, b) Actividad residual, para evaluar estabilidad de proteasas ácidas, por efecto del pH y del tiempo de incubación, c) pH óptimo de actividad de proteasas alcalinas, d) Actividad residual, para evaluar estabilidad de proteasas alcalinas, por efecto del pH y del tiempo de incubación.....	99
Figura 65. Caracterización de proteasas. a) Temperatura óptima de actividad de proteasas ácidas, b) Actividad residual, para evaluar estabilidad de proteasas ácidas, por efecto de la temperatura y del tiempo de incubación, c) Temperatura óptima de actividad de proteasas alcalinas, d) Actividad residual, para evaluar estabilidad de proteasas alcalinas, por efecto de la temperatura y del tiempo de incubación.....	100
Figura 66. Zimograma de proteasas ácidas (a) y proteasas alcalinas (b) con acción de los inhibidores respectivos sobre las isoformas de los extractos multienzimáticos de <i>Cichlasoma urophthalmus</i> . Cl: Control con inhibidor Pestatina A, P: Pepsina de cerdo, PI: Pepsina de cerdo con inhibidor Pestatina A, PMSF: Ioduro de fenilmetilsulfonilo, SBTI: Inhibidor tripsínico de soja, TPCK: Tosil fenilalanina metil cetona, TLCK: Tosil-lisina-metil cetona, Fen = Fenantrolina, Ovo: Ovoalbúmina, EDTA: Ácido etilendiaminotetracético. M: Marcador de peso molecular (kDa): albúmina de suero bovino (66 kDa), Albúmina de huevo (43 kDa), Anhidrasa carbónica (29 kDa), tripsinógeno (24 kDa), Inhibidor de soja tripsínica (20 kDa).....	103

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Los tres tipos de ontogenia en peces teleósteos: indirecta, de transición y directa.....	3
Tabla 2. Secuencias y parámetros de los cebadores utilizados en los ensayos de PCR en tiempo real.....	76
Tabla 3. Actividad de enzimas digestivas de juveniles de <i>Cichlasoma urophthalmus</i>	97
Tabla 4. Efecto de inhibidores sobre la actividad de proteasas.....	101
Tabla 5. Contenido de proteína y de humedad de los ingredientes proteínicos utilizados.....	112
Tabla 6: Grados de hidrólisis (GH) ácida, de los ingredientes proteínicos de prueba e ingrediente de referencia (hemoglobina), concluida su digestibilidad <i>in vitro</i>	117
Tabla 7: Grados de hidrólisis (GH) alcalina, de ingredientes los proteínicos de prueba e ingrediente de referencia (caseína), concluida su digestibilidad <i>in vivo</i>	118
Tabla 8: Concentración de aminoácidos libres (ALT), de los ingredientes proteínicos de prueba e ingrediente de referencia (hemoglobina), concluida su digestibilidad <i>in vitro</i> ácida.....	120
Tabla 9: Concentración de aminoácidos libres (ALT), de los ingredientes proteínicos de prueba e ingrediente de referencia (caseína), concluida su digestibilidad <i>in vitro</i> alcalina.....	121

GLOSARIO

Absorción: Paso de los nutrimentos a través de los enterocitos del intestino anterior, para su aprovechamiento a nivel celular.

General Physiology

Actividad residual: Es la actividad enzimática remanente, por presencia de un inhibidor bioquímico, ya sea específico o general.

Enzyme Assays for Food Scientists

Alimentación endógena: Aquella que depende de fuentes alimentarias propias, como las presentes en el saco vitelino de un pez.

Larval Fish nutrition

Alimentación exógena: Aquella que depende de fuentes alimentarias externas, (v.g. un alimento inerte suministrado).

Larval Fish nutrition

Alevín: Es un período en peces de ontogenia de transición, con características de desarrollo similares a los de un pez juvenil.

Guelph Ichthyology Reviews

Clonación: Producción de células o individuos, con características genéticas idénticas entre sí.

Genetics

Crecimiento: Incremento en número de las células somáticas de un organismo, con respecto al tiempo.

The Science of Biology

Desarrollo: Toda la serie de cambios en la estructura y función que un organismo experimenta a lo largo de su ciclo de vida.

The Science of Biology

Digestibilidad *in vitro*: Simulación del proceso digestivo de ingredientes proteínicos de prueba, en condiciones de laboratorio.

Journal Nutrition

Digestión: Hidrólisis ácida y alcalina de los alimentos, para que puedan ser absorbidos a nivel de intestino medio.

Journal Nutrition

Digestión ácida: Digestión mediada por proteasas ácidas, secretadas por las glándulas gástricas del estómago, siendo indicador de un tracto digestivo maduro.

Enzyme Assays for Food Scientists

Digestión alcalina: Digestión mediada por proteasas alcalinas, secretadas por el páncreas, siendo indicador de un tracto digestivo inmaduro.

Enzyme Assays for Food Scientists

Eleuteroembrión: Embrión que se libera del corión y con capacidad de nado libre.

Guelph Ichthyology Reviews

Expresión génica relativa: Es el nivel de expresión de un gen determinado, en función de la expresión de un gen interno o doméstico.

Genetics

Glándulas gástricas: Estructuras internas del estómago con capacidad secretora del jugo gástrico y pepsina, necesarios para la digestión ácida y cuya presencia puede marcar el paso del período larvario a juvenil.

Histology and Histopathology

Gránulos de zimógeno: Cúmulos de precursores bioquímicos de tripsina o quimiotripsina en el páncreas.

Histology and Histopathology

Histoquímica: Técnica de tinción para el estudio de la naturaleza de las células mucosas del tracto digestivo de un organismo. La pigmentación de las células mucosas está en función del tipo de sustancias dentro de las mismas.

European Journal of histochemistry

Inhibidor: Agente químico con propiedad de inhibir total o parcialmente la actividad enzimática.

Enzyme Assays for Food Scientists

Juvenil: Individuo con características de desarrollo muy similares a los de un individuo adulto.

Guelph Ichthyology Reviews

Larva: Segunda categoría periódica en la escala ontogénica de un pez de ontogenia indirecta, y que es previo al período juvenil.

Guelph Ichthyology Reviews

Ontogenia: Cambios morfológicos y funcionales que experimenta un organismo desde que nace (o eclosiona) hasta su muerte biológica.

Guelph Ichthyology Reviews

Ontogenia de transición: En peces, constituye el tipo de ontogenia que pasa por un período ontogénico denominado alevín.

Guelph Ichthyology Reviews

Ontogenia directa: En peces, constituye el tipo de ontogenia, que da paso al período juvenil, sin pasar por el período larvario.

Guelp Ichthyology Reviews

Ontogenia indirecta: En peces, constituye el tipo de ontogenia en el que el individuo pasa por un período larvario, previo al período juvenil.

Guelp Ichthyology Reviews

PCR: Reacción en cadena para amplificación del DNA, mediada por la enzima Taq-polimerasa.

Genetics

Pez eurífago carnívoro: Pez con hábitos estrictamente carnívoros, esto es, con énfasis en fuente alimentaria animal.

Fish Food Technology

Pez eurífago omnívoro: Peces con hábitos alimentarios omnívoros, pero que los puede haber con tendencias alimentarias carnívoras, o bien con tendencias alimentarias herbívoras.

Fish Food Technology

Plásmido: Vector que se utiliza para insertar una carga genética extraña a otro microorganismo.

Genetics

RESUMEN

El estudio de la fisiología digestiva de los peces cíclidos nativos es de importancia capital, como es el caso de la mojarra castarrica *Cichlasoma urophthalmus*, ya que puede contribuir a sentar las bases científicas y técnicas para el diseño de alimentos balanceados inertes, lo que puede implicar mejoras en los protocolos de cultivo, que esto conlleva. El objeto del presente estudio fue estudiar los cambios morfológicos y de expresión génica a lo largo de la ontogenia inicial; así como la caracterización enzimática, y evaluación del grado de hidrólisis de 29 ingredientes proteínicos de origen animal y vegetal, con extractos crudos de estómago e intestino de juveniles de *C. urophthalmus*. La fase experimental de la presente investigación se dividió en dos etapas: 1) Estudios histológicos y de expresión génica de enzimas digestivas en eleuteroembriones y larvas, y 2) Estudios bioquímicos y de digestibilidad *in vitro* en juveniles. Los resultados histológicos mostraron que *C. urophthalmus* es capaz de desarrollar cambios morfofuncionales relativamente rápidos en estómago. A este respecto, a los 14 días después de la eclosión (dde), *C. urophthalmus* presenta un estómago desarrollado, con presencia de glándulas gástricas posiblemente funcionales, hecho que se confirma por la presencia de células mucosas en estómago, con capacidad secretora de mucopolisacáridos neutros, aún antes de esta edad. Paralelamente, los estudios moleculares revelaron que la expresión génica de α -amilasa y lipasa dependiente sales biliares es importante a partir de los 3 dde y se acentúa a los 25 dde (principalmente lipasa), lo que implica funcionalidad temprana del páncreas, mientras que la expresión génica de fosfatasa alcalina experimentó actividad prominente a los 25 dde, lo que indica la funcionalidad intestinal a esta edad. Los resultados bioquímicos confirmaron que *C. urophthalmus* es una especie de amplio espectro trófico, con atributos de una especie omnívora, con cierta tendencia a la carnivoría oportunista, ya que presenta actividad importante en una amplia gama de enzimas digestivas. Los resultados de digestibilidad *in vitro* mostraron que ingredientes proteínicos como la harina de vísceras y carne de pollo, harina de cerdo y pasta de coco, pueden constituir fuentes potenciales de proteína para *C. urophthalmus*.

ABSTRACT

The study of the digestive capacity and physiology, during the early ontogeny of the cichlid fishes is very important, as the native Mayan cichlid *Cichlasoma urophthalmus*, towards the establishment of the technician and scientists supports for designing of inert foods, which might improve nutritional protocols of its culture. The aim of the present investigation was to study the morphological changes and the gene expression of digestive enzymes, during the initial ontogeny of *C. urophthalmus*, as well as the enzymatic characterization and the assessment of the hydrolysis grade of 29 protein ingredients from vegetable and animal origin, using crude extracts of stomach and intestine of *C. urophthalmus* juveniles. The present work was divided in two general steps: 1) Histological and digestive enzymes expression studies, on eleutheroembryos and larvae, and 2) Biochemical and *in vitro* digestibility studies on juvenile fish. According to the histologic al results, the stomach of *C. urophthalmus* showed rapid morphological and functional changes. At this respect, at 14 days after the hatching (dah), the gastric glands into the stomach are possibly functional, which is supported for the presence of goblet cell secreting neutral glycoconjugates, even before this age. Concurrently, the molecular studies revealed that the α -amylase and bile salt activated lipase gene expression is very important at 3 dah, and being prominent at 25 dah (mainly lipase), demonstrating the functionality of the pancreas at the early age; whereas the alkaline phosphatase gene expression, is important at 25 dah too, which imply the full differentiation of the intestine. The biochemical and characterization of digestive enzymes results in *C. urophthalmus* juveniles, showed that it presents a wide trophic spectrum, of omnivorous features with certain tendency to be opportunistic carnivorous specie. The *in vitro* digestibility results indicated that protein ingredients such as, the meat and viscera of chicken, meat of pig and coconout paste, could be important protein sources for *C. urophthalmus* nutrition.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Indicadores como evaluación de desarrollo digestivo

Hoy en día, la optimización de la calidad nutricional de los alimentos en peces teleósteos cultivables, ha dirigido la investigación hacia el empleo del alimento vivo, con miras a consolidar las fases de la ontogenia inicial, tal vez las más críticas del cultivo. No obstante que esto ha significado avances innegables en el cultivo de peces marinos y aún dulceacuícolas, los altos costos que implican el establecimiento de infraestructura para los cultivos secundarios, han menguado seriamente la rentabilidad de la acuicultura. Más aún, la calidad nutricional del alimento vivo no siempre es garantía de cubrir los requerimientos nutricionales de los organismos de cultivo. La producción del alimento vivo puede enfrentar dificultades como una provisión y calidad nutricional variables (Sorgeloos, 1980; Watanabe *et al.*, 1983). Desde hace algunas décadas, los trabajos de investigación han intentado dilucidar la habilidad fisiológica propia del organismo, para degradar los ingredientes presentes en la dieta, desde la óptica de su maquinaria enzimática, con resultados cada vez más alentadores. De acuerdo con Rosenlund *et al.* (1997), las dietas inertes ofrecen la oportunidad de introducir nutrientes que no están disponibles en el alimento vivo.

1.2. Ontogenia inicial en peces teleósteos

La ontogenia es toda la serie de cambios morfológicos y funcionales que experimenta un organismo, a lo largo de su vida biológica. En peces, el desarrollo exitoso del sistema digestivo es esencial para la supervivencia y crecimiento de las larvas, que le permita ser capaz de capturar, ingerir, digerir y absorber el alimento (Kjorsvik *et al.*, 2004). Aunque las larvas de peces pueden ser morfológicamente capaces de capturar elementos alimentarios al instante de su primera alimentación exógena (Segner *et al.*, 1994; Bisbal & Bengtson, 1995), el sistema digestivo requiere una serie de cambios de desarrollo antes de ser totalmente funcional (Govoni *et al.*, 1986; Canino & Bailey, 1995). El esquema general de la secuencia de eventos durante la ontogenia de los peces teleósteos se puede mostrar en la figura 1, de acuerdo con Govoni *et al.* (1986).

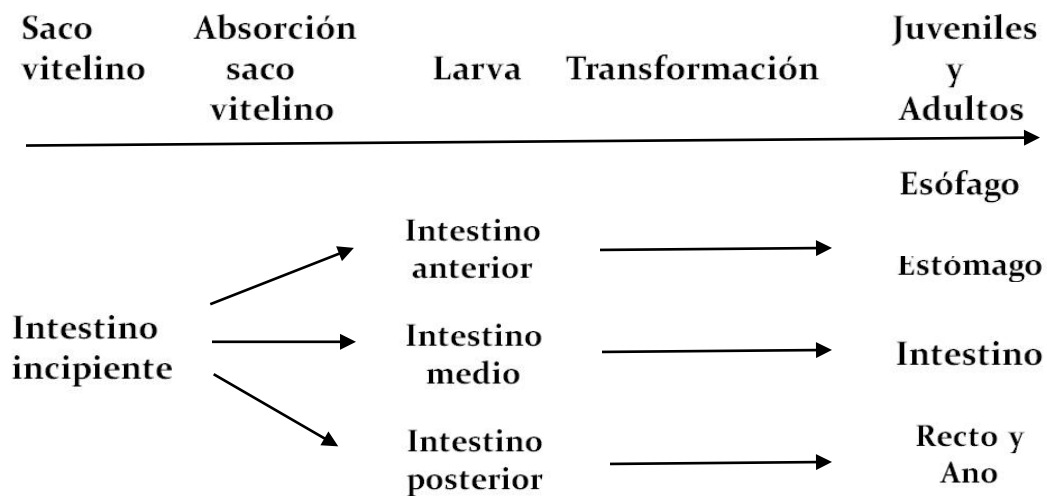


Figura 1: La derivación, secuencia del canal alimentario y formación de órganos en larvas de peces teleósteos, (Tomado de Govoni *et al.*, 1986).

A rasgos generales, en la figura 1 se observa que a partir de un intestino incipiente (simple), se derivan el intestino anterior, medio y posterior, producto de su segmentación en tres. A su vez, el intestino anterior da origen al esófago y estómago; mientras que el recto y ano se originan a partir del intestino posterior.

1.3. Tipos de ontogenia e indicadores de maduración digestiva

Con lo que respecta a los tipos de ontogenia de peces teleósteos Balon (2002) establece tres tipos de ontogenia: indirecta, de transición y directa. En la tabla 1, se muestra un bosquejo de los tres tipos de ontogenia referida, así como los períodos y fases que experimentan cada una de ellas.

Tabla 1. Los tres tipos de ontogenia en peces teleósteos: indirecta, de transición y directa.

Indirecta		De transición		Directa	
Período	Fase	Período	Fase	Período	Fase
Embrión	Segmentación	Embrión	Segmentación	Embrión	Segmentación
	Embrión		Embrión		Embrión
	Eleuteroembrión (embrión libre)		Eleuteroembrión		Eleuteroembrión
Larva	pterolarva apterolarva	Alevín	Alevín		
		Juvenil	Parr Smolt	Juvenil	
Juvenil			Juvenil		
Adulto		Adulto		Adulto	
Senectud		Senectud		Senectud	

La teoría de la ontogenia en saltos (Balon, 2002), establece que la ontogenia es un modelo jerárquico de la historia de vida de los peces. Por tanto, la ontogenia indirecta se puede desglosar en períodos secuenciales de embrión, larva, juvenil, adulto y maduro (senectud); y embrión, juvenil, adulto y maduro para el caso de la ontogenia directa (nótese la ausencia del período larvario). Para el caso de la ontogenia de transición, el modelo propone los períodos embrión, alevín, juvenil, adulto y maduro (nótese el período alevín, una especie de vestigio larvario, según Balon (2002)). Cada período se encuentra separado por fronteras naturales, y comprenden una secuencia de intervalos de organización en “saltos”, o estados “homeoréticos” denominados pasos (la unidad básica en la escala ontogénica), separados por umbrales estabilizados.

Por consiguiente, el período es el más largo intervalo, separados uno de otro por umbrales. La fase la define como el siguiente intervalo en el cual, los períodos son divididos por unidades morfológicas, principalmente para propuestas de identificación, pero de menor significancia ontogénica. El paso es el más corto intervalo natural, separado por umbrales y el concepto de estadio, es un estado instantáneo de ontogenia, por lo que no debe ser denotado como un intervalo (tabla 1). A continuación, se abordan aspectos de los tipos de ontogenia referidos.

1.3.1. *Ontogenia indirecta*

La morfogénesis a partir de la fertilización del embrión, sigue el mismo patrón básico en peces teleósteos, siendo los huevos telolécitos (con una gran masa de vitelo) y con un vitelo libre relativamente pequeño (blastodisco), donde comienza la división celular (Falk-Petersen, 2005). Los cambios morfológicos típicos que tienen durante el desarrollo embrionario, tras la fecundación y la formación del embrión, comienzan con la segmentación dentro de aquel en dos células hijas, éstas a su vez en 4, 8, 16, 32, 64 células, lo que da origen a los blastómeros, quienes van a permitir la formación de la mórula a nivel del polo animal.

El blastocele se origina a partir de la disposición de los blastómeros en una capa, originando una cavidad. La blástula consiste en la segmentación que va a envolver al blastocele y da origen a una esfera hueca, cuyas paredes conforman el blastodermo. Después, las células se extienden sobre el polo vegetativo, englobándolo. El blastodisco cubre el vitelo, hasta que sus bordes convergen y se cierran en el extremo posterior del embrión, conformando la gástrula.

En la etapa de neurulación, se observan los primordios del corazón, un protocerebro y notocordio, tubo neural y somitos. Para entonces, el corazón se encuentra bien desarrollado. El primer período es el embrionario, es caracterizado por la alimentación endógena es decir, por la adquisición de nutrientes a partir de fuentes parentales (Balon, 1999). El tiempo desde la eclosión, hasta la pigmentación de los

ojos representa presumiblemente el tiempo en el cual las larvas pueden nutrirse sólo de sus reservas vitelinas y no de fuentes exógenas (Houde, 1974).

La alimentación endógena presenta un intervalo que tiende a ser muy estrecho de tiempo y un período larvario largo (dependiente de alimento exógeno), lo que hace a la larva sumamente vulnerable y proclive a altas mortalidades. Muchas especies desarrollan tamaños de huevo y embriones libres (o eleuteroembriones) con un estatus de muchos órganos y tejidos presumiblemente inmaduros al momento de la eclosión (Falk-Petersen, 2005). Sin embargo, los peces de ontogenia indirecta producen una gran cantidad de embriones y larvas, para compensar tal vulnerabilidad. Además las larvas adicionalmente, pueden ocupar numerosos nichos tróficos (plancton en teleósteos), por lo que no compiten por el alimento (Holcík 1986). De acuerdo con Gisbert *et al.* (2008), los embriones libres de peces generalmente eclosionan más prematuramente en su desarrollo, que en otros vertebrados, sugiriendo que las secuencias espacio-temporales en larvas de teleósteos son muy diferentes al de los vertebrados superiores. Consecuentemente, durante las primeras semanas de vida, las larvas de los peces sufren cambios morfoestructurales y fisiológicos significativos, hasta el punto zenit de maduración del sistema digestivo. Las configuraciones digestivas serán establecidas de acuerdo con Smith (1980) y son las que siguen:

1.3.1.1. Peces eurípagos carnívoros

En la bucofaringe entre los 1 y 2 dde, los rasgos morfohistológicos que se muestran son algunas capas de células escamosas y muy pocas papilas gustativas. En estos días, el intestino es rudimentario conformado por epitelio columnar ciliado simple. Durante la presencia del saco vitelino, la región posterior del intestino sufre una torción de 90° y aparece una válvula intestinal, dividiendo al intestino en dos regiones, el intestino prealvular y el postalvular. Ambas regiones presentan citoplasma basofílico y prominentes microvellosidades eosinofílicas (Gisbert *et al.*, 2004). El intestino postalvular está desprovisto de células mucosas (Govoni, 1980), mientras tiene lugar la aparición de las glándulas gástricas (lo cual es un indicador de

inmadurez digestiva). Sin embargo, es necesaria la actividad de ciertas enzimas para que tenga lugar la digestión larvaria inmediatamente después de la eclosión.

Durante el período larvario, el intestino prevalvular ha sido descrito también como el sitio principal del tracto digestivo para la digestión extracelular, debido a su pH alcalino y a la presencia de tripsina, secretada en el páncreas exócrino (Walford & Lam, 1993; Zambonino Infante & Cahu, 2001). Poco después, tiene lugar la diferenciación del canal alimentario en bucofaringe, esófago, intestino pre y postvalvular y recto, coincidiendo con la primera alimentación exógena (Gisbert *et al.*, 2004). Esto ha sido observado para otras especies eurípagas carnívoras como el *Paralichthys senegalensis* (Ribeiro *et al.*, 1999) y *Limanda ferruginea* (Baglolle *et al.*, 1997).

En *P. californicus* según Gisbert *et al.* (2004) a los 4 dde, un pliegue formado por células columnares ciliadas, comienza a diferenciarse en la región terminal del esófago, a partir del intestino prevalvular anterior. Alrededor de los 10 dde, el número de células mucosas aumenta. Dichas células, secretan glicoproteínas y mucinas, que son las sustancias que componen la mucosa lubricante, a nivel de la bucofaringe anterior y en el esófago, en el que no se observaron cambios histológicos hasta la metamorfosis, como en *P. californicus*. A esta edad se logra apreciar también un diente canino en la parte posterior de esta cavidad. En este punto, la mucosa del intestino es mayormente rectilínea con varios pliegues cortos. Las primeras células mucosas, están presentes en ambas regiones del intestino.

Las células mucosas incrementan en número con la diferenciación de la mucosa intestinal, siendo más abundantes, en el intestino prevalvular. Histológicamente, estas células se tiñen de azul oscuro, lo cual se relaciona a la presencia de mezcla de glicoproteínas carboxiladas y sulfatadas y glicoproteínas neutras. Entre los 19 y 23 dde, el plegamiento del intestino prevalvular se incrementa ya que los pliegues ocupan la mayor parte del lumen intestinal; en tanto que el intestino postvalvular muestra muy pocos pliegues en una mucosa que se muestra rectilínea (Gisbert *et al.*, 2004).

Cuando *P. californicus* experimenta la migración del ojo (27-30 dde), coincide con la diferenciación de las glándulas gástricas y el decaimiento de los cuerpos supranucleares a nivel del intestino postvalvular (Gisbert *et al.*, 2004), lo cual indica la presencia de absorción pinocítica y digestión proteolítica en el medio intracelular, mediante un proceso de cinco etapas: pinocitosis, transporte, acumulación, digestión y extinción (Watanabe, 1984).

En peces con ontogenia indirecta, al inicio del desarrollo la digestión larvaria se hace vía intracelular, que posteriormente se volverá extracelular cuando tiene lugar la transformación al juvenil (Govoni *et al.*, 1986). La digestión intracelular compensa la digestión incompleta que se da a nivel del intestino medio primigenio, ya que decremента su aporte digestivo, a medida que tiene lugar la maduración del canal alimentario, sobre todo con la aparición de un estómago funcional, que posiblemente sea el indicador más trascendente de la maduración digestiva en peces eurípagos carnívoros.

A su vez, está ampliamente documentado que, un indicador morfohistológico de la madurez plena del estómago es la presencia de glándulas gástricas a nivel del estómago fúndico; en tanto que un indicador enzimático significativo, de la madurez estomacal son los altos niveles de pepsina, precisamente secretada a partir de las glándulas gástricas. La aminopeptidasa y la fosfatasa alcalina son enzimas intestinales que se encargan de la digestión de pequeños péptidos y asimilación de nutrientes, respectivamente. Sus incrementos sostenidos a lo largo de la ontogenia inicial, son indicadores de mejoramiento de la capacidad digestiva intestinal (Guerreiro *at al.*, 2010). Tales cambios pueden ser indicadores útiles, que marcan la pauta del proceso de maduración digestiva. El acontecimiento de estos tres cambios son indicadores del umbral de un tracto digestivo en estado avanzado de madurez. Govoni *et al.* (1986) señalan que presencia de inclusiones supranucleares y vacuolas son indicadores de un canal alimentario funcional. En la figura 2 se pueden apreciar

los cambios trascendentales durante la ontogenia inicial de un pez carnívoro típico, según Hachero-Cruzado *et al.* (2009).

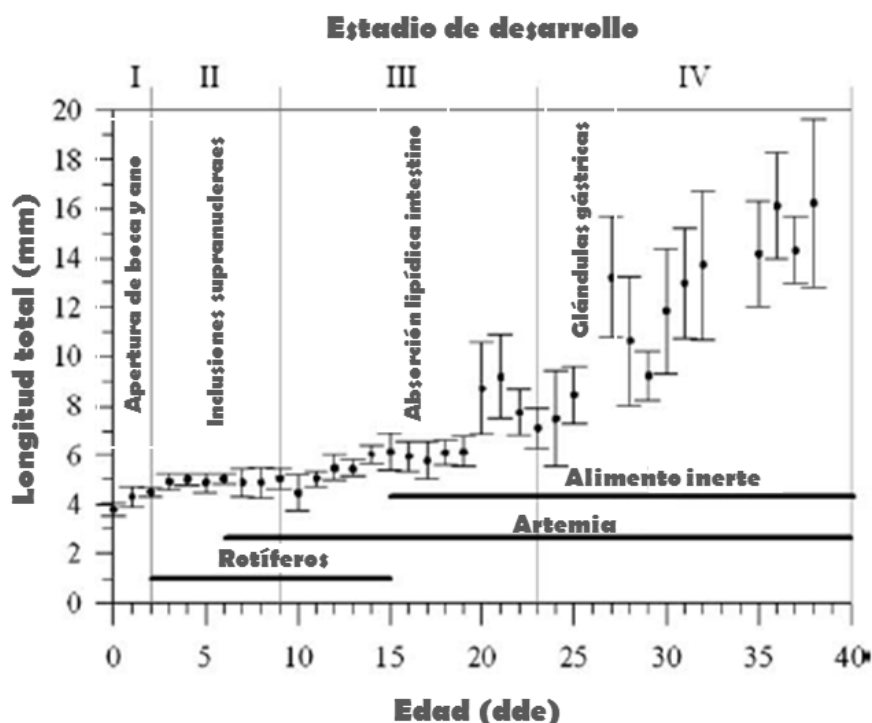


Figura 2. Indicadores morfológicos importantes durante la ontogenia inicial del pez carnívoro *Scophthalmus rhombus*. (Tomado de Hachero-Cruzado *et al.*, 2009).

1.3.1.2. Peces eurípagos omnívoros con tendencia carnívora

A la fecha, pocos estudios sobre la dinámica ontogénica han sido llevados a cabo en peces de este grupo. En su trabajo del desarrollo de enzimas digestivas en la ontogenia inicial de *Cichlasoma urophthalmus*, López-Ramírez *et al.* (2010) sugieren la presencia de tripsina, quimiotripsina, aminopeptidasa y catepsina (indicador de la proteólisis intracelular y por tanto de un tubo alimentario primigenio o inmaduro) antes de la eclosión (0 dde) y a los 3 dde, respectivamente al visualizar sus bandas respectivas en zimogramas a las edades señaladas. En larvas de otro pez eurípagos omnívoro, *Pagellus erythrinus* (con cierta tendencia a la carnivoría, como *C. urophthalmus*), la diferenciación del tracto digestivo tiene lugar en bucofaringe, esófago, un estómago presuntivo e intestino, a los 3 dde (Micale *et al.*, 2006), indicadores morfohistológicos que coincidieron con la primera alimentación exógena.

A partir de estos hallazgos se deduce cierta capacidad funcional del tracto digestivo a esta edad.

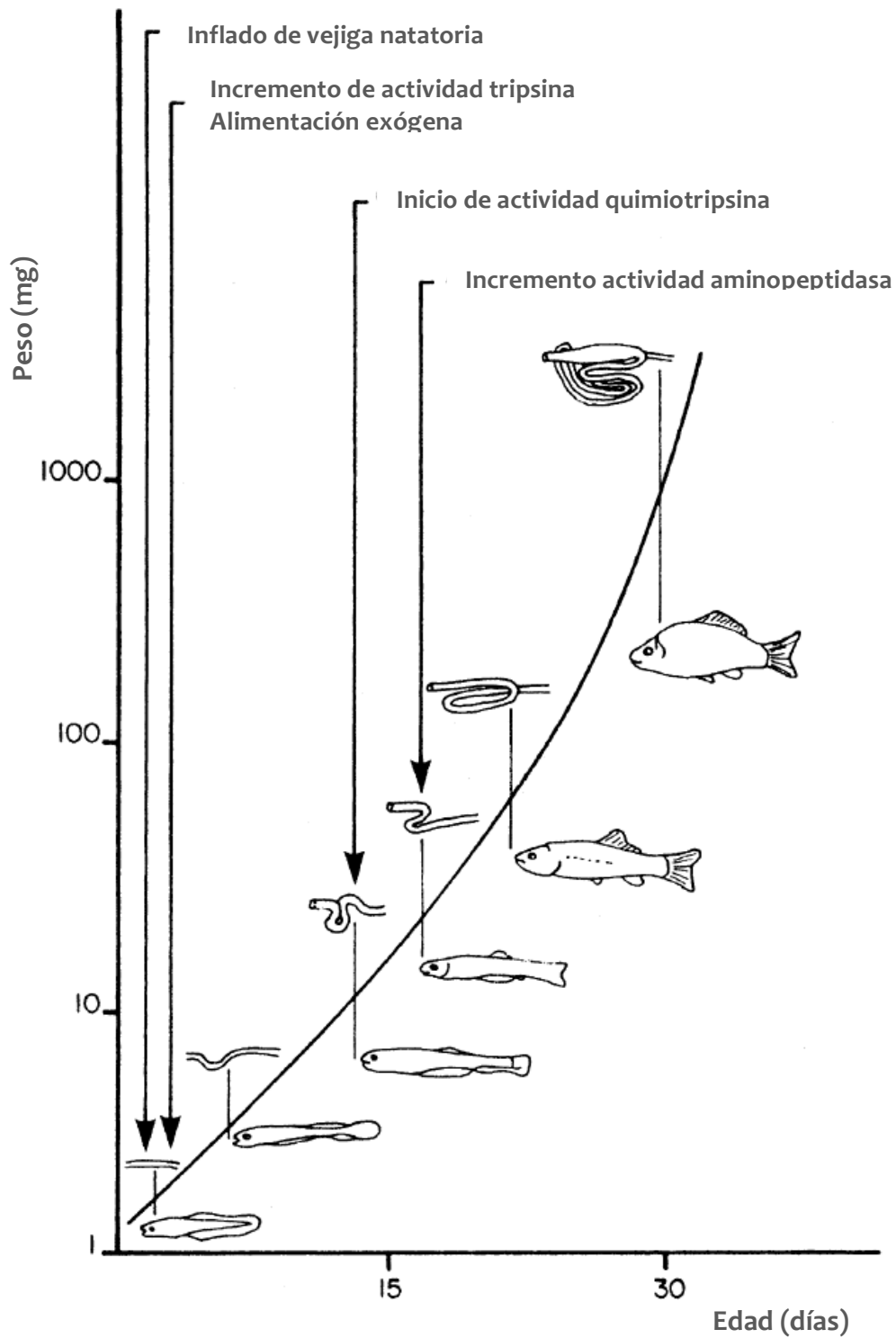


Figura 3. Desarrollo morfoestructural de un pez ciprínido eurífago omnívoro, con tendencia carnívora (Tomado de Kolkovsky, 2001).

Desde el punto de vista morfológico y estructural, Dabrowsky (1984) y Person-Le Ruyet (1989), muestran un esquema sintético de la dinámica de eventos que tienen lugar durante la ontogenia inicial de un ciprínido típico eurífago omnívoro, con énfasis en fuente alimentaria animal (o de tendencia carnívora). Nótese los cambios significativos en la longitud total del intestino, así como la serie de pliegues y curvaturas que experimenta el intestino, a lo largo de su ontogenia inicial (figura 3). Aquí, uno de los indicadores que pueden ser meritorios de cambios del inicio de la alimentación exógena son incrementos de la actividad de la tripsina, y el inicio de la actividad de la quimiotripsina como indicador de un posible inicio de alimentación mixta (mezcla de suministros alimentarios endógenos con exógenos).

A pesar de que la mayor parte de los estudios acerca de la ontogenia inicial en peces, han sido enfocados a especies eurípagas carnívoras del Mar Mediterráneo, y del Atlántico Norte, es posible resumir los cambios relevantes, que pueden ser utilizados como indicadores del grado de maduración en que se encuentra el pez, en la escala ontogénica.

El trabajo de Micale *et al.* (2006) de la figura 4, permite ilustrar indicadores cruciales (tiempos de apertura de la boca, absorción del saco vitelino, formación de las glándulas gástricas y otros más) en larvas de un pez eurífago omnívoro, con énfasis en fuente alimentaria animal típico como *Pagellus erythrinus*, que permitan disponer de un mayor número de elementos para ayudar a dilucidar el proceso de maduración digestiva, en peces eurípagos omnívoros con tendencia carnívora.

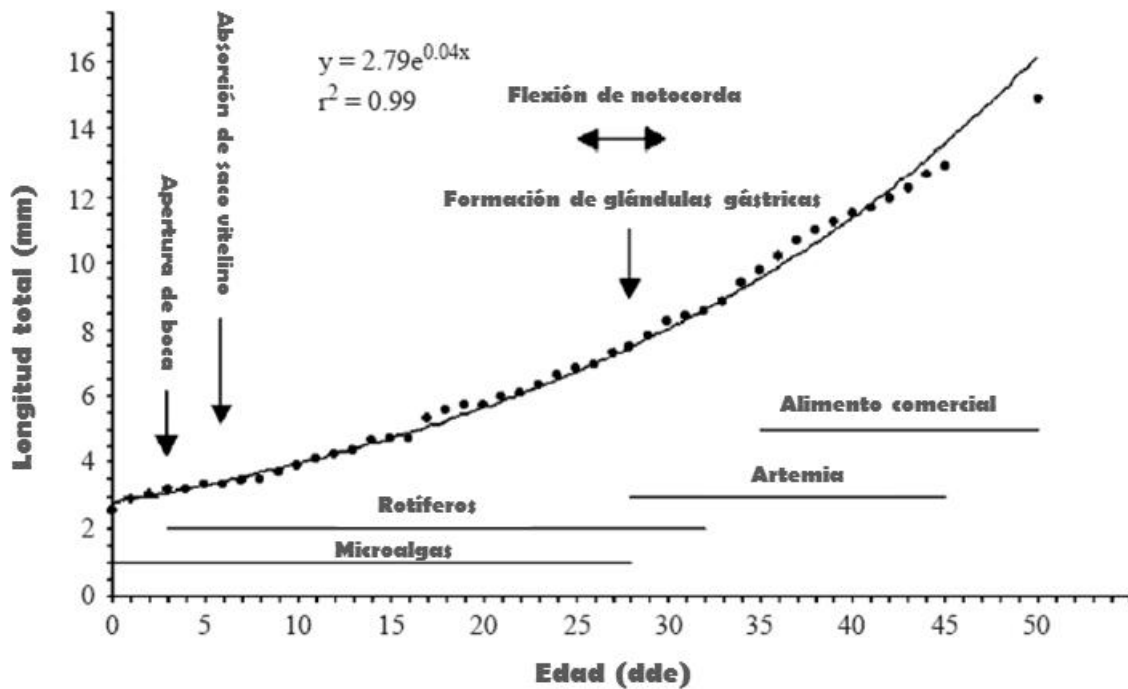


Figura 4. Indicadores notables durante la ontogenia inicial del pez eurífago omnívoro, con énfasis en fuente alimentaria animal *Pagellus erythrinus* (Tomado de Micale *et al.*, 2006).

1.3.1.3. Peces eurífagos omnívoros con tendencia herbívora

La eclosión en ciprínidos eurífagos omnívoros, con énfasis en fuente alimentaria vegetal, como *Ctenopharyngodon idellus*, deriva en organismos incompletos, por lo que la diferenciación de órganos continúa durante el período postembrionario (Stroband & Dabrowski, 1979), particularmente el tracto digestivo (Dabrowski, 1984, Govoni *et al.*, 1986). Por otro lado, cuando la tasas de crecimiento alcanzan hasta el 30% d^{-1} , (Bryant & Matty, 1980), la digestión alcanza actividades enzimáticas extremadamente pronunciadas.

La alimentación exógena comienza aún antes de la absorción del saco vitelino y en este período el tubo alimentario es corto y recto (Hofer, 1991), que puede llegar a medir un 50% de la longitud corporal (Stroband & Dabrowski, 1979). El intestino

larvario corto tiene capacidad de desdoblarse y asimilar elementos fácilmente digeribles, principalmente zooplancton (Mark *et al.*, 1987).

El intestino crece lentamente durante el período larvario (Hoffer & Nasir-Uddin, 1985). Dado que el tiempo de pasaje intestinal está positivamente correlacionado con la longitud relativa intestinal de (Hoffer & Nasir-Uddin, 1985), el tiempo disponible para los procesos de digestión y absorción es gradualmente extendido, hasta que finalmente el pez alcanza el período adulto (Hofer, 1991). Por consiguiente, tanto el tiempo de pasaje, como la longitud intestinal pueden ser considerados como elementos indicadores, de la madurez digestiva en ciprínidos, principalmente eurífagos omnívoros con énfasis en fuente alimentaria vegetal. La depleción de la actividad de tripsina en el intestino posterior, conforme tiene lugar la ontogenia inicial, puede ser un serio indicador de desarrollo digestivo, al menos durante el período larvario.

La actividad de enzimas digestivas es baja en el primer período de alimentación, aunque incrementa durante el desarrollo larvario (Stroband & Dabrowski, 1979). Las enzimas digestivas de las presas naturales del zooplancton, sobreviven al tubo digestivo del predador y logran aumentar la actividad enzimática (Hofer, 1991).

Por otro lado, *C. idellus*, es un pez carente de estómago, lo cual implica que todo el proceso digestivo se efectúa a lo largo de su intestino (principalmente anterior y medio), el cual está diseñado para optimizar al máximo la digestión y asimilación de nutrientes. La maquinaria enzimática intestinal de *C. idellus*, compuesta por proteasas, lipasas, celulasas y amilasas ha sido abordada por Das & Tripathi (1991); Wu & Zhu (1994). A su vez, los peces eurífagos omnívoros con énfasis en fuente alimentaria vegetal adultos, deben su alta eficiencia digestiva a la enorme área superficial intestinal, para los procesos digestivos y de asimilación, producto de un intestino sumamente elongado. La figura 5, muestra un comparativo sintético del diseño anatómico intestinal de peces con tendencia a la herbivoría, con otros peces teleósteos, en función de su proceso digestivo y por ende, de sus hábitos alimentarios, según Smith (1980).

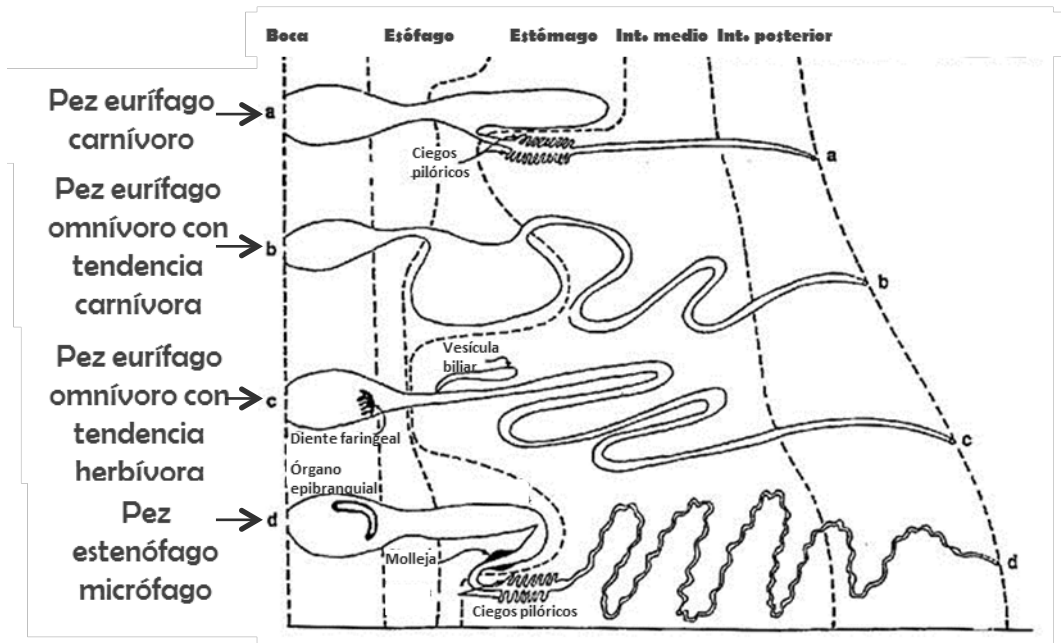


Figura 5. Diseño anatómico del intestino de los diferentes procesos digestivos en peces teleósteos, (tomado de Smith, 1980).

No obstante, en peces sin estómago y por tanto con mecanismos de digestión estomacal ausente, es necesario recurrir en parte, a la digestión intracelular que comúnmente tiene lugar en estadios de la ontogenia inicial de peces teleósteos (hasta que ocurre la formación de las glándulas gástricas, indicadores de la diferenciación desarrollada de un estómago funcional).

1.3.2. Ontogenia de transición

Durante el período embrionario, el vitelo en peces de ontogenia de transición es muy abundante y denso, lo que da las condiciones para el paso al período juvenil en un lapso de tiempo relativamente corto (al menos en comparación con los peces de ontogenia indirecta, de período larvario más largo). Las especies más representativas de este grupo son los peces de la familia Salmonidae, quienes producen grandes huevos demersales y alevines bien desarrollados (Pavlov y Moksness, 1994).

Los huevos de los salmónidos muestran que a las 6 h después de la fertilización tienen pequeños blastodiscos, estrechos espacios perivitelinos, mientras que los glóbulos de lípidos se sitúan alrededor del polo animal y se conectan a la región citoplasmática, en tanto que el embrión y la gota de aceite se encuentran dispuestos en la parte superior del vitelo (Pavlov & Moksness, 1994).

Uno de los indicadores más emblemáticos en peces de este grupo, es la presencia de pepsina y tripsina, en la eclosión de *Onco gairdneri* (Dabrowsky, 1982). Rungruangsak-Torrissen *et al.* (2006) estudiaron la expresión de tripsina y quimiotripsina y su efecto en el crecimiento de *Salmo salar*, determinando que la primera ve afectada su actividad cuando se promueve el crecimiento por factores externos (temperatura y composición de la dieta) e internos (fase de vida); mientras que la actividad de la segunda aumenta en condiciones de limitación del alimento (ayuno). Por consiguiente, la actividad enzimática, al menos en los salmónidos, es un indicador de la manera en que interactúan factores internos y externos de cultivo.

Paralelamente, técnicas histológicas e histoquímicas han revelado escasa acumulación de cuerpos de inclusión proteínicos a nivel de las células epiteliales del intestino medio larvario, haciendo de la digestión intracelular, menos importante en peces de ontogenia digestiva de transición, pues ya disponen de un estómago funcional, antes de la absorción del saco vitelino y al instante de la primera alimentación exógena, cuya función no será muy diferente del estómago del pez adulto (Govoni, 1986). Por lo tanto, el alevín (período exclusivo de peces de ontogenia de transición) presenta la mayor parte de las características de un juvenil, poco después de la eclosión (pues también eclosiona como embrión libre), que lo hace un vestigio de larva muy desarrollada. Lo anterior ofrece ventajas al alevín, puesto que en este estado de escala ontogénica, presenta un tracto digestivo estructural y funcionalmente avanzado.

A este respecto, en el salmón *Hucho taimen*, Guan *et al.* (2010), estudiaron los cambios morfológicos del sistema digestivo durante el desarrollo postembrionario. Los mencionados autores hallaron que a los 30 después de la fertilización (ddf), las aletas y branquias están completamente formadas y tiene lugar la apertura de la boca, mientras que presenta un gran saco vitelino y el tracto digestivo es un tubo recto. Se encuentra que a los 60 ddf, el alevín consume la totalidad del saco vitelino y ya se encuentran presentes una gran cantidad de glándulas gástricas distribuidas en un estómago tipo “U”, los ciegos pilóricos en la porción pilórica de un estómago dividido en la porción antes mencionada y otra porción cardiaca. Tales cambios morfofuncionales, se consideran indicadores clave de la completa diferenciación del sistema digestivo, en peces de ontogenia de transición.

1.3.3. Ontogenia directa

El desarrollo embrionario para este grupo, sigue la misma pauta general para los peces teleósteos, aunque hay diferencias notables. Se ha demostrado que *Anarhichas lupus* presenta fertilización tipo interna (Pavlov, 1993) En algunas especies como *Xenomelaniris brasiliensis*, (un aterínido de aguas salobres, cuyo período embrionario dura 143 h aproximadamente, instante en que ocurre la eclosión), los ojos pueden estar bien pigmentados y se observaron los primeros esbozos de las aletas pectorales, aún antes de que la eclosión tenga lugar (del Río *et al.*, 2005), indicadores típicos de los peces de ontogenia directa; mientras que las larvas de la mayoría de los peces marinos, no poseen la capacidad de alimentarse inmediatamente después de su eclosión, sino que dependen del saco vitelino (poco denso) hasta que sus ojos y boca son funcionales. Por otra parte, al momento de la eclosión de *A. lupus* es un eleuteroembrión con las características de un juvenil prematuro, que lo hace adaptarse inmediatamente al medio pelágico (Pavlov, 1994). Al comienzo de la primera alimentación exógena, *A. lupus* se caracteriza por tener un alto grado morfológico, especialmente el sistema digestivo (Pavlov, 1994). Estas modificaciones rápidas, proporcionan mayor probabilidad de supervivencia, pues hacen a estos peces mucho menos vulnerables en su ontogenia inicial.

1.4. Estudios de digestibilidad *in vitro*

Las altas mortalidades que se presentan en el período larvario de los peces nativos, se deben en parte, al desconocimiento de la capacidad digestiva del pez para digerir los ingredientes presentes en la dieta. Inclusive, a nivel juvenil es frecuente observar crecimiento y sobrevivencia bajos, si la calidad del alimento, no es acorde con la fisiología digestiva del pez. A este respecto, los estudios sobre secreciones digestivas en peces, pueden elucidar aspectos sobre su fisiología nutritiva, además de que ayudan a resolver problemas nutricionales, tales como la composición de una dieta artificial, en función de las capacidades nutricionales del pez (Furné *et al.*, 2005). La comprensión del funcionamiento de las enzimas digestivas permite explicar la digestibilidad de nutrientes (Glass *et al.*, 1989; Kolkovski, 2001). De un grupo de fuentes proteínicas, es posible determinar que ingredientes son susceptibles de formar parte de una dieta adecuada, por medio de métodos como el pH Stat, que evalúa su digestibilidad *in vitro* (Álvarez-González, 2003).

Con lo que respecta a los aspectos de digestibilidad *in vitro* los trabajos se enfocaron en el camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, como el desarrollado por Nolasco *et al.* (2006) aunque recientemente se ha estudiado la digestibilidad *in vitro* de peces marinos (Álvarez-González, 2006) y de agua dulce (Fenerci & Sener, 2005; Frías-Quintana *et al.*, 2010).

Sin embargo, no existe información relevante con lo que respecta a la caracterización de enzimas digestivas ni de digestibilidad *in vitro* de ingredientes proteínicos en *Cichlasoma urophthalmus*, que permitan dilucidar rasgos de su maquinaria enzimática, en sus períodos larvario y juvenil. La presente investigación tuvo como objeto efectuar la caracterización de enzimas digestivas, en larvas y juveniles (estómago e intestino) de *C. urophthalmus*. Los estudios de caracterización y digestibilidad en esta especie, contribuirán a sentar las bases técnicas y científicas para el diseño de dietas inertes, en función de su capacidad y fisiología digestiva.

2. ANTECEDENTES

La finalidad de estudios acerca del desarrollo morfofuncional de los peces, durante su ontogenia inicial, que de algún modo han revolucionado la arista desde donde se observan los procesos de ingestión, asimilación y digestión del alimento, suele ser el profundizar en el conocimiento de los acontecimientos morfológicos más relevantes a lo largo de este período crítico, a la par de los acontecimientos funcionales (puesto que la evidencia de laboratorio y de campo ha demostrado más de una vez que, morfología y función, no son eventos de naturaleza mutuamente excluyente).

Muchas investigaciones han sido conducidas en las últimas dos décadas para estudiar la habilidad digestiva y requerimientos nutricionales de larvas y juveniles de peces (Cahu & Zambonino Infante, 2001). Existe documentación diversa, respecto al estudio de enzimas digestivas en peces marinos, como *D. labrax*, *Pagrus major*, *Sardinops sagax caerulea*, *Thunnus orientalis* y *Paralabrax maculatofasciatus* (Lindner *et al.*, 1995; Iijima *et al.*, 1998; Castillo-Yáñez *et al.*, 2005; Matus de la Parra *et al.*, 2007 y Álvarez-González *et al.*, 2008).

Cada vez son más relevantes los trabajos de fisiología digestiva en peces de agua dulce como en trucha arco iris *O. mykiss*, el pejelagarto *A. tropicus*, la carpa herbívora *C. idellus* y tilapia *O. niloticus* (Furné *et al.*, 2005; Zhong-Yi *et al.*, 2008, Guerrero-Zarate, 2010). Los indicadores morfohistoquímicos, bioquímicos y moleculares, se abordan siguiendo la ontogenia digestiva del modelo de Balon (2002), acotando también en función de los hábitos alimentarios de la especie y a los trabajos hasta ahora realizados en cada caso.

2.1. Desarrollo morfofuncional en peces de ontogenia indirecta

2.1.1. Peces eurípagos carnívoros

Para el caso de este grupo de peces, la organogénesis, las características de desarrollo del tracto digestivo y la ontogenia de las enzimas digestivas han sido bien documentadas en varias especies, tales como *D. labrax* (Zambonino Infante & Cahu, 1994), *P. californicus* (Ribeiro *et al.*, 1999), *Sciaenops ocellatus* (Buchet *et al.*, 2000), *Paralichthys olivaceus* (Kurokawa & Suzuki, 1996) y *O. mykiss* (Hoehne-Reitan & Kjoersvik., 2001).

Desde el punto de vista morfológico y cuando ocurre la eclosión, la boca y ano están cerrados en algunas especies (Engen, 1968; Tanaka, 1969; Fukusho, 1972; Govoni, 1980). Esta y otras más características fueron observadas por Gisbert *et al.* (2004) en el lenguado *P. californicus*, además de que el tubo recto fue cerrado (bucofaringe y ano no diferenciados). Los autores referidos, indican que gránulos de zimógeno acidofílicos (precuroras de enzimas pancreáticas), fueron detectadas en el páncreas exócrino al 1 dde, antes del inicio de la alimentación exógena, y su número se incrementa con el comienzo de la alimentación exógena en *P. californicus*. Por otro lado, los trabajos de Ribeiro *et al.* (1999) y Zambonino-Infante & Cahu (2001), resaltan la importancia de las secreciones pancreáticas para el desarrollo larvario, durante el período agástrico.

Treviño *et al.* (2011) determinaron el desarrollo morfológico e histológico de larvas de *Petenia splendida* y encontraron la aparición de hígado y páncreas a la eclosión (con gránulos de zimógeno a los 2 dde); así como una rápida aparición de glándulas gástricas y por consiguiente, una rápida diferenciación del estómago, con relación a los peces marinos de importancia comercial. En un estudio para observar el comportamiento de las enzimas pancreáticas de *Dicentrarchus labrax*, Alliot *et al.* (1977) detectaron tripsina y quimiotripsina por técnicas bioquímicas, inmediatamente después de la eclosión.

García-Gasca *et al.* (2006) hallaron expresión génica de tripsina en huevos (75 horas después de la fertilización, ddf) de *Sphoeroides annulatus*, utilizando técnicas moleculares, reportando también un sensible decremento de la intensidad de las bandas en el zimograma de tripsinógeno mRNA, a partir de los 28 dde, en *S. annulatus*, coincidiendo con el cambio de dieta de nauplios de *Artemia* a microdieta formulada.

No obstante, este cambio de alimentación de *Artemia* a alimentos inertes, han sido observados más prematuramente (13 dde), en otras especies eurifagas carnívoras como *P. californicus* (Álvarez-González *et al.*, 2006) y *S. ocellatus* (Lazo *et al.*, 2007), siendo factor determinante la especie, en los tiempos de maduración digestiva.

Péres *et al.* (1998) probaron dos dietas isoproteicas y dos dietas isocalóricas para ver su efecto sobre la expresión molecular y actividad enzimática de tripsina y amilasa, en *D. labrax*. La expresión molecular y la actividad de tripsina, guardó relación con la proteína de la dieta, no así la expresión molecular de amilasa, aunque su actividad fue independiente a cualquier composición de la dieta, sugiriéndose una tendencia al decremento, debido a su programación genéticamente.

Natalia *et al.* (2004) realizaron la caracterización de enzimas digestivas de juveniles de *Scleropages formosus*, revelando que pese a sus hábitos eurifagos carnívoros, puede asimilar una amplia gama de nutrientes. Lundstedt *et al.*, (2004) manejaron niveles entre 20 y 50% de proteína cruda en la dieta para encontrar su relación con la actividad enzimática en juveniles de *Pseudoplatystoma corruscans*, observando un metabolismo intermedio en el pez.

Álvarez-González *et al.* (2008) estudiaron el desarrollo de las enzimas digestivas durante la ontogenia inicial (embrión, larva y juvenil) de *P. maculatofasciatus*, revelando que la actividad enzimática de proteasas, lipasas, amilasas y fosfatasa fue acorde con el desarrollo morfofisiológico de las larvas, principalmente durante los cambios de alimento vivo (rotíferos a la *Artemia*).

Gisbert *et al.* (2009) abordaron la ontogenia enzimática inicial del pez marino *Dentex dentex*. Las enzimas estudiadas fueron pancreáticas (tripsina, quimiotripsina, lipasas y amilasas), intestinales (aminopeptidasa, leucina-alanin, peptidasa, fosfatasa alcalina y maltasa) y gástricas (pepsina). Se encontró que la actividad de las serin proteasas fue esencial para el desdoblamiento de proteínas del saco vitelino, decreciendo con el tiempo. Los autores determinaron un decremento sustancial de la actividad de lipasas después del cambio del alimento vivo al alimento inerte, probablemente debido al cambio de dieta y en los requerimientos nutricionales de la especie.

2.1.2. Peces eurípagos omnívoros con tendencia carnívora

A la fecha, existen pocos estudios sobre la dinámica ontogénica que han sido llevados a cabo en este grupo de peces. Martínez-Palacios & Ross (1994), abordaron aspectos diversos de cultivo de *C. urophthalmus*, tales como su biología, ecología, reproducción, nutrición y sanidad acuícola. En su trabajo del desarrollo de enzimas digestivas en la ontogenia inicial de *C. urophthalmus*, López-Ramírez *et al.* (2010) revelaron que tripsina y quimiotripsina muestran actividad antes de la eclosión. Esto también ha sido resaltado en el ciprínido *Labeo rohita* ya que a los 4 dde muestra actividad de enzimas como amilasa, proteasa, lipasa y fosfatasa alcalina (Mitra *et al.*, 2008).

La presencia de las enzimas digestivas importantes, han sido mostradas al momento de la apertura de la boca ha sido demostrada en los trabajos de Gawlicka *et al.* (1995); Moyano *et al.* (1996); Martínez *et al.* (1999); Tengjaroenkul *et al.* (2000) y Cara *et al.* (2003). La apertura de la boca, y por consiguiente, el comienzo de la alimentación exógena, determina la diferenciación regional del intestino en muchas especies de teleósteos (Stroband & Kroon, 1981; Boulhic & Gabaudan, 1992; Sarasquete *et al.*, 1995; Gisbert *et al.*, 2004).

Siguiendo con *C. urophthalmus* las larvas observan fuerte actividad de varias enzimas (a los 13 dde), en el que han sido reportados también para especies como *P. californicus* (Álvarez-González *et al.*, 2006). Los resultados de caracterización bioquímica, en larvas de *C. urophthalmus* indican que es justamente a los 13 dde, el mejor momento para sustituir el alimento vivo por alimento artificial, ya que coincide con un aumento visible de enzimas como tripsina, quimiotripsina, aminopeptidasa, carboxipeptidasa y fosfatasas ácida y alcalina (López-Ramírez *et al.*, 2010). La tripsina ha sido reportada como la mayor responsable de la proteólisis alcalina en larvas de *P. maculofasciatus* (Álvarez-González *et al.*, 2008), en tanto que para *C. urophthalmus* muestran que la actividad proteolítica, es representada por la quimiotripsina. Esto explica el por qué la quimiotripsina ha sido reportada como parte importante de la maquinaria enzimática de peces eurípagos omnívoros con tendencias carnívora y herbívora, más que la tripsina que ha sido detectada en peces eurípagos carnívoros (Jonas *et al.*, 1983). Furné *et al.* (2005) realizaron un estudio comparativo, al evaluar la actividad de proteasas, amilasas y lipasas del esturión *Acipenser naccarii* y trucha arco iris *Oncorhynchus mykiss*, encontrando que el primero mostró características de un pez eurípagos omnívoro con tendencia carnívora, por su predisposición a digerir amilasas y en menor grado las proteasas y lipasas.

2.1.3. Peces eurípagos omnívoros con tendencia herbívora

La actividad de tripsina en adultos es significativa en el intestino anterior y medio, no así en el posterior, donde la actividad de las enzimas prácticamente desaparece (Hofer *et al.*, 1982); en larvas sin embargo, la hidrólisis continúa en el intestino posterior (Hofer, 1991). A este respecto, Guo-Liang *et al.* (2010) estudiaron la expresión molecular de tripsinógeno, así como la actividad específica de tripsina, a lo largo de la ontogenia de *C. idellus*, encontrándose una importante actividad de tripsina en larvas. Liu *et al.* (2008) demostraron la presencia de catepsina D, principalmente involucrada en la digestión intracelular proteica de *C. idellus*. Zhong-Yi *et al.* (2008) aislaron una enzima proteolítica a partir de intestino de *C. idellus* con el fin de efectuar pruebas de inhibición y obtener el pH y temperatura óptimas de la catepsina D.

2.2. Desarrollo morfofuncional en peces de ontogenia de transición

El trabajo de Dahl *et al.* (2006) presenta un estudio comparativo de las características morfológicas de la prole de *Salmo trutta*, obtenida a partir del medio silvestre, laboratorio, así como de híbridos obtenidos a partir de reproductores de ambos lotes, encontrando diferencias mínimas de crecimiento, en las proles. Con lo que respecta al estudio ontogénico en salmónidos está el trabajo de Gorodilov (1996) quién hace una descripción de la ontogenia inicial de *Salmo salar*, para el que establece un modelo matemático con el fin de identificar los estados de embriogénesis, tomando como unidad mínima la formación de un par de somitos, sugiriendo tal modelo para otras especies.

2.3. Desarrollo morfofuncional en peces de ontogenia directa

Son pocos los estudios de desarrollo digestivo en especies que obedecen al tipo de ontogenia directa (y más las susceptibles de cultivo). En su trabajo Pavlov & Moksness (1994), diseñaron un bosquejo comparativo entre *S. salar* y *A. lupus*, en la ontogenia inicial de ambas especies, haciendo énfasis en el período embrionario. Savoie *et al.* (2006) probaron tres niveles de concentrado de proteína prehidrolizada en la dieta (0, 10 y 20%), para determinar su efecto en el crecimiento y supervivencia de *Anarhichas minor*, sugiriendo elevar el concentrado hidrolizado proteínico, para estimular la síntesis enzimática, y con ello el crecimiento y la supervivencia, en individuos recién eclosionados.

2.4. Digestibilidad *in vitro* de ingredientes proteínicos en peces

Álvarez-González (2003) probó harinas de langostilla, sardina, sangre de res e hidrolizado de pescado como fuentes proteínicas en juveniles de cabrilla arenera *P. maculatofasciatus*, para medir su digestibilidad *in vitro*, con fines de diseño de dietas inertes; siendo la harina de sangre de res la que mejor grado de hidrólisis (GH) obtuvo. Fenerci & Sener (2005) exploraron la digestibilidad *in vitro* e *in vivo*, de cuatro alimentos comerciales en función de sus procesos de fabricación, para trucha arco iris *Oncorhynchus mykiss*, resultando con mayor GH los alimentos extruidos, que los presurizados.

Muchos estudios de digestibilidad de ingredientes se han centrado al empleo de marcadores como el óxido crómico para estimar digestibilidad, aunque el empleo de marcadores no digeribles para determinar la digestibilidad *in vivo*, conlleva algunos problemas y solamente nos da una medida indirecta de la digestibilidad, lo cual resulta complicado debido al lento crecimiento de las especies, la dificultad de recolectar las heces en el medio acuático y la influencia de los niveles de inclusión de éstos sobre el aprovechamiento de algunos combustibles (March *et al.*, 1985; Shiau y Liang, 1995).

3. JUSTIFICACIÓN

Hoy en día, los altos costos por concepto de alimento vivo, han mermado seriamente la actividad piscícola en el Sureste de México. No obstante que especies nativas como *C. urophthalmus* son proclives a aceptar alimentos inertes comerciales, resultan sumamente costosos, por su baja oferta y cada vez mayor demanda. Por otro lado, poco se sabe acerca de si la calidad de estos alimentos comerciales (para trucha o tilapia), es acorde con la capacidad y fisiología de esta especie.

Paralelamente, se desconoce el desarrollo morfofuncional durante la ontogenia inicial de *C. urophthalmus*. Adicionalmente, poco conocimiento se tiene en lo que concierne a las enzimas digestivas y su actividad en período juvenil.

Por otro lado, es necesario considerar que existen diversas fuentes proteínicas no convencionales, de origen animal y vegetal en la región Sureste de México, que son abundantes, muchas de ellas la mayor parte del año y de mucho menor coste que la harina de pescado, materia prima cuyos altos costos suelen encarecer los alimentos comerciales para peces. Tales fuentes proteínicas no convencionales, pudieran significar un notorio aporte proteínico para *C. urophthalmus* y otras especies con potencial de cultivo.

Con base a un conocimiento más amplio de los elementos antes mencionados, se pudiera disponer de mayor información, que permita contribuir de manera íntegra, a sentar más bases técnicas y científicas, con miras al diseño de alimentos inertes, acordes con la capacidad y fisiología digestiva de *C. urophthalmus* y potenciar su cultivo en la región Sureste de México.

4. OBJETIVO GENERAL

Elucidar la fisiología digestiva durante la ontogenia inicial de la mojarra castarrica *Cichlasoma urophthalmus*.

5. DESARROLLO MORFOFUNCIONAL DEL TRACTO DIGESTIVO DE *Cichlasoma urophthalmus* (I)

5.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar los cambios morfofuncionales e histológicos generales del tracto digestivo, durante la ontogenia inicial de *C. urophthalmus*, (0 a los 30 dde).

Determinar la naturaleza de las células mucosas del tracto digestivo, durante la ontogenia inicial de *C. urophthalmus* (0 a los 30 dde).

5.2. MATERIAL Y MÉTODOS

5.2.1. Confinamiento de larvas

Las larvas de *C. urophthalmus* fueron obtenidas a partir del lote de reproductores, mantenidos en las instalaciones del Laboratorio de Acuicultura Tropical de la División Académica de Ciencias Biológicas (DACBIOL) en la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco (UJAT), Tabasco, México; para lo cual, los peces se mantuvieron en tinas de plástico circulares de 1.7 m³ de capacidad, dentro de un sistema de recirculación abierto

Las larvas fueron confinadas en un sistema de recirculación abierto, con tanques de 200 L. Los parámetros de la calidad del agua (temperatura, oxígeno disuelto y pH) fueron medidos diariamente con un termómetro (Brannan USA), un oxímetro (YSI 55, California USA) y un potenciómetro (Denver Instrument UB-10, Denver, Colorado, USA), manteniéndose en $28.7 \pm 0.6^{\circ}\text{C}$, $5.73 \pm 0.38 \text{ mg L}^{-1}$ y 7.31 ± 0.14 , respectivamente.

5.2.2. Régimen alimentario y muestreo

Las larvas fueron alimentadas con nauplios de *Artemia* no enriquecidos (INVE Aquaculture Nutrition, Bélgica) tres veces por día a saciedad, a partir de los 6 días después de la eclosión (dde) a los 15 dde. De esta edad en adelante, las larvas fueron alimentadas, con un alimento artificial para trucha Silver Cup® (45% de proteína, 12% de lípidos, Nelson and Sons Inc., USA), hasta el día 30 dde. La ración de alimentación fue el 10% de la biomasa día⁻¹, y el tamaño de partícula fue ajustado según la talla de los organismos (125-250 µm desde 15 a los 25 dde, y 250-500 µm desde 25 a los 30 dde).

Los individuos fueron muestreados a los días 1, 3 (embriones libres), 6, 8, 12, 15, 18, 21, 24, 27 y 30 dde (larvas) para las pruebas histológicas; de los cuales, doce individuos (por día) fueron sacrificados con MS-222 y divididas en dos partes para fijado: 6 individuos en líquido de Bouin y otros tantos en formalina al 4%. Los eleuteroembriones y larvas fueron procesadas con cuatro lavados con agua de la llave, y otros dos con etanol (30 y 40%) para finalmente ser conservadas en alcohol al 50%, hasta los estudios histológicos e histoquímicos.

5.2.3. Estudios histológicos e histoquímicos

Previo a los estudios histológicos, los eleuteroembriones y larvas fueron fotografiadas con un microscopio equipado con cámara fotográfica (Analysis™ Soft Imaging Systems GmbH, Münster, Alemania). Las imágenes fueron utilizadas para las medidas morfométricas (longitud estándar, altura y saco vitelino). El volumen del saco vitelino fue estimado con la fórmula propuesta por Heming & Buddington (1988), $V = (1/6)ab^2$, donde V (mm^3) = volumen del saco, a y b longitud máxima y mínima (mm), respectivamente.

Los 12 individuos muestreados fueron deshidratados con series crecientes de alcohol (50, 75 y 100%) y embebidas en parafina, con el procesador automático de tejidos Histolab ZX-60 Myr (Especialidades Médicas MYR SL, Tarragona, España). Los bloques de parafina fueron elaborados en un dispensador de parafina AP280-2 Myr y cortados en secciones sagitales de 3 μm de grosor, con un micrótopo automático Microm HM (Leica Microsystems Nussioch GmbH, Alemania). Los cortes fueron mantenidos a 40 °C, toda la noche.

Posteriormente, las muestras fueron desparafinadas en series crecientes de xileno y teñidas según Treviño *et al.* (2011), con hematoxilina-eosina (H&E), para las observaciones morfológicas generales del tracto digestivo de larvas. La tinción histoquímica a base de ácido peryódico, Reactivo de Schiff (PAS) y Alcian Blue (AB) a pH 0.5, 1.0 y 2.5 fueron realizados para la detección de compuestos neutros, carboxílicos y sulfatados (respectivamente), en células mucosas del tracto digestivo (Pearse, 1985). Finalmente, las preparaciones histológicas de larvas fueron observadas en un microscopio, Leica DMLB, equipado con una cámara digital Olympus DP70 (Leica Microsystems Nussioch GmbH, Alemania).



Figura 6. Tren de tinción H&E.



Figura 7. Preparaciones histológicas.

5.3. RESULTADOS

En la figura 8, es posible visualizar el crecimiento en longitud estándar, de embriones libres y larvas de *C. urophthalmus* hasta los 30 días de estudio. Se puede observar un crecimiento tipo potencial, según la ecuación $SL \text{ (mm)} = 2.08\ln(T) + 0.58$ ($R^2 = 0.99$, $p < 0.05$), donde SL = Longitud estándar (mm) y T = Edad (días).

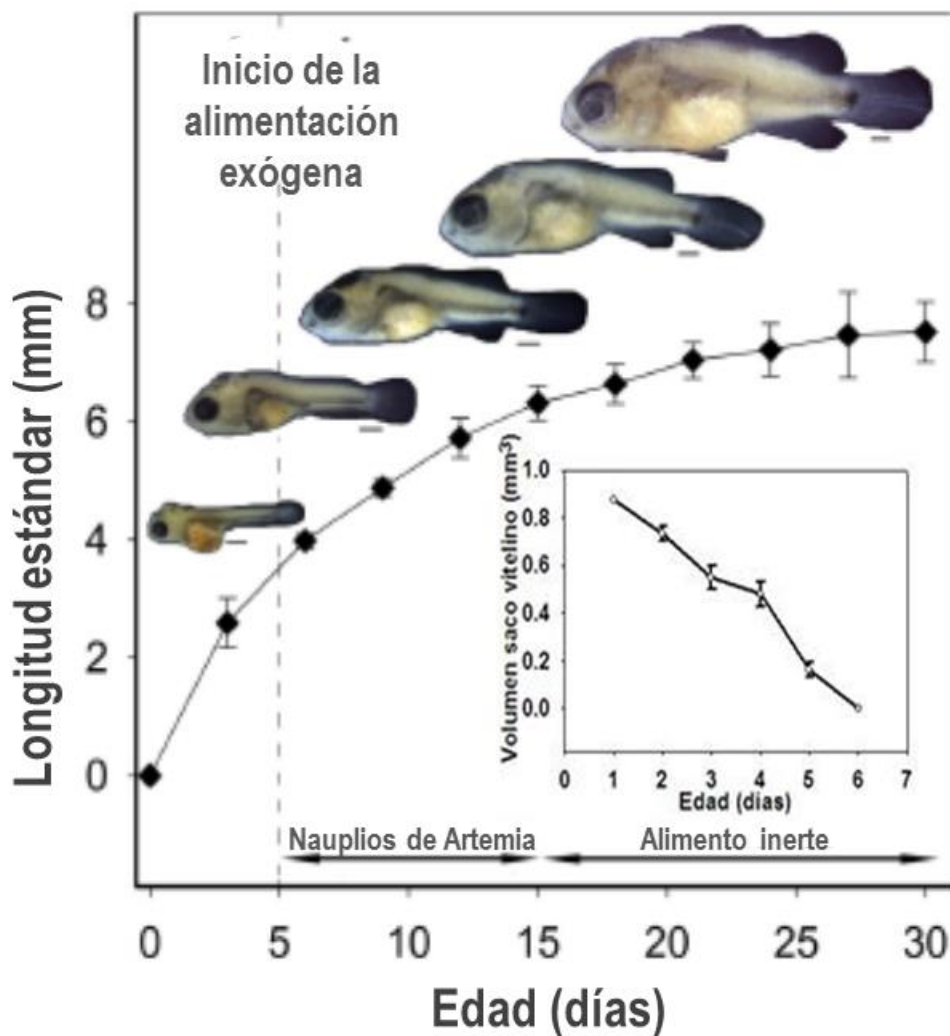


Figura 8. Crecimiento en longitud estándar, y disminución del volumen del saco vitelino, durante la ontogenia inicial de *Cichlasoma urophthalmus*.

En las figuras (9-45), se ilustran los cambios morfológicos e histológicos relevantes, durante la ontogenia inicial de *C. urophthalmus*. A la eclosión, el sistema digestivo de *C. urophthalmus* es un tubo recto, situado dorsalmente sobre el saco vitelino. Cúmulo de células basofílicas situadas anterior y ventralmente a la región cardíaca, dieron origen a las glándulas digestivas accesorias, hígado y páncreas exócrino. A esta edad, la boca y poro anal permanecieron aún cerrados y abrieron al exterior a los 2 dde, cuando los embriones libres midieron 2.64 ± 0.2 mm (longitud estándar, LP). Las observaciones histológicas revelaron que las larvas comenzaron la alimentación exógena entre los 5 y 6 dde (3.98 ± 0.12 mm LP). Durante este período, el sistema digestivo de *C. urophthalmus* experimentó una transformación notable, con el casi completo desarrollo y diferenciación de todos los órganos digestivos, con la excepción del estómago gástrico, que completa su diferenciación entre los 11 y 14 dde, (5.75 y 6.35 mm LP). Desde entonces y hasta el final del estudio (30 dde), la mayoría de los cambios morfológicos del sistema digestivo, fueron asociados a cambios en la complejidad y tamaño de órganos, conforme el crecimiento de las larvas tuvo lugar.

5.3.1. Saco vitelino

A la eclosión, el saco vitelino ocupó la mayor parte de la cavidad abdominal (figura 9), con un volumen promedio de 1.08 ± 0.05 mm³ no obstante, tal volumen fue reducido en 59.3% (0.44 ± 0.07 mm³) después de 3 dde (3.14 ± 0.01 mm LP) y 81.2% a los 5 dde (3.91 ± 0.13 mm LP). El consumo del saco vitelino estuvo correlacionado con la edad larvaria y descrita por la ecuación $YSV = -0.18 (T) + 0.18$ ($R^2 = 0.98$, $p < 0.01$), donde YSV = volumen del saco vitelino (mm³) y T = edad (días). Macroscópicamente, el saco no fue más visible a los 6 dde sin embargo, remanentes de saco vitelino fueron microscópicamente visibles junto al tejido hepático (figura 10), el cual rodeó los remanentes a los 16 dde (6.61 ± 0.4 mm LP). Microscópicamente, el saco vitelino estuvo rodeado por un epitelio sincitial, el cual consistió en cúmulos eosinofílicos de acumulación de proteína (yolk platelets, figura 9).

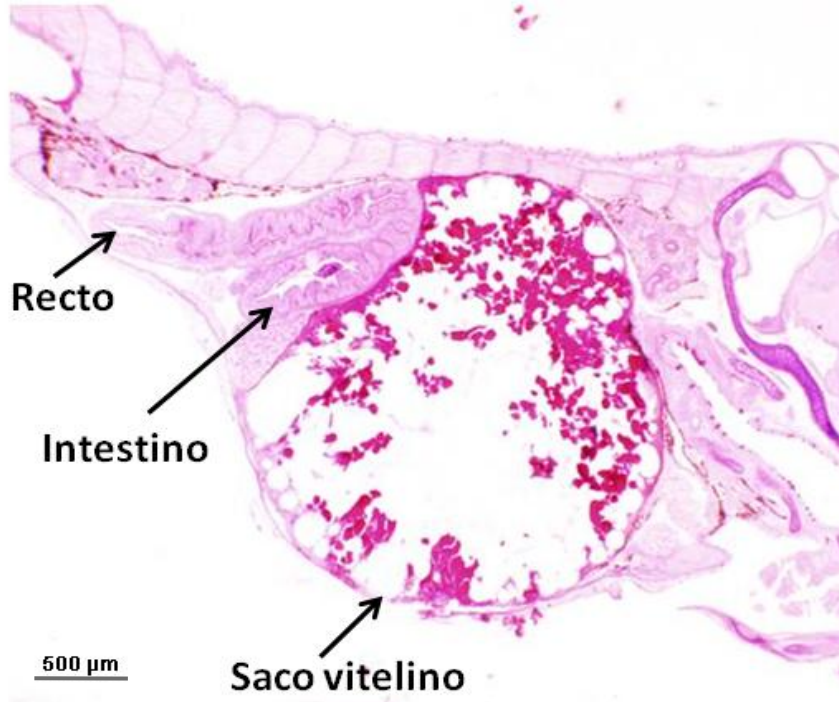


Figura 9. Saco vitelino de embrión libre, 3 dde, PAS 2.5.

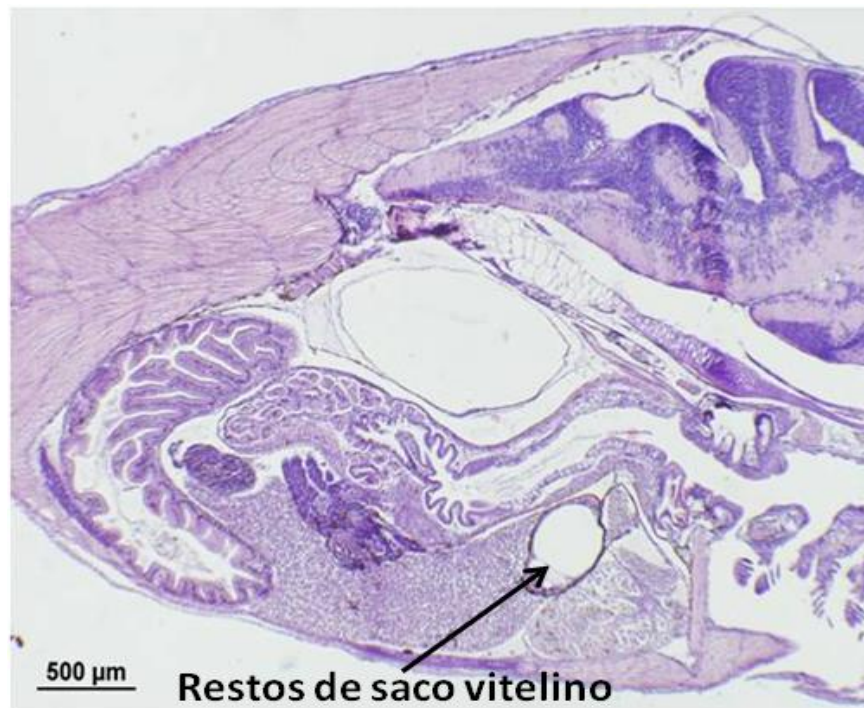


Figura 10. Saco vitelino de larva, 14 dde, H&E.

5.3.2. Bucofaringe

A la eclosión, la cavidad bucofaringea fue corta y con escasas células mucosas. Estas células secretoras se tiñeron de azul y púrpura con PAS y AB pH 2.5, 1.0 y 0.5, indicando la presencia de una combinación de mucinas neutras y acídicas (carboxiladas y sulfatadas). A los 3 dde (3.14 ± 0.11 mm LP) comienza la aparición de los primeros dientes caninos (figura 12) hacia el lumen bucofaringeo. Se observaron ionocitos distribuidos en la parte anterior de la cavidad oral (figura 11), mientras los primeros corpúsculos gustativos (figura 13), estuvieron presentes en la región posterior de la bucofaringe. A los 7 dde (4.45 ± 0.23 mm LP), surgen las primeras papilas bucofaringeas. El número de células mucosas, dientes caninos y papilas bucofaringeas se incrementan conforme tiene lugar el desarrollo larvario.

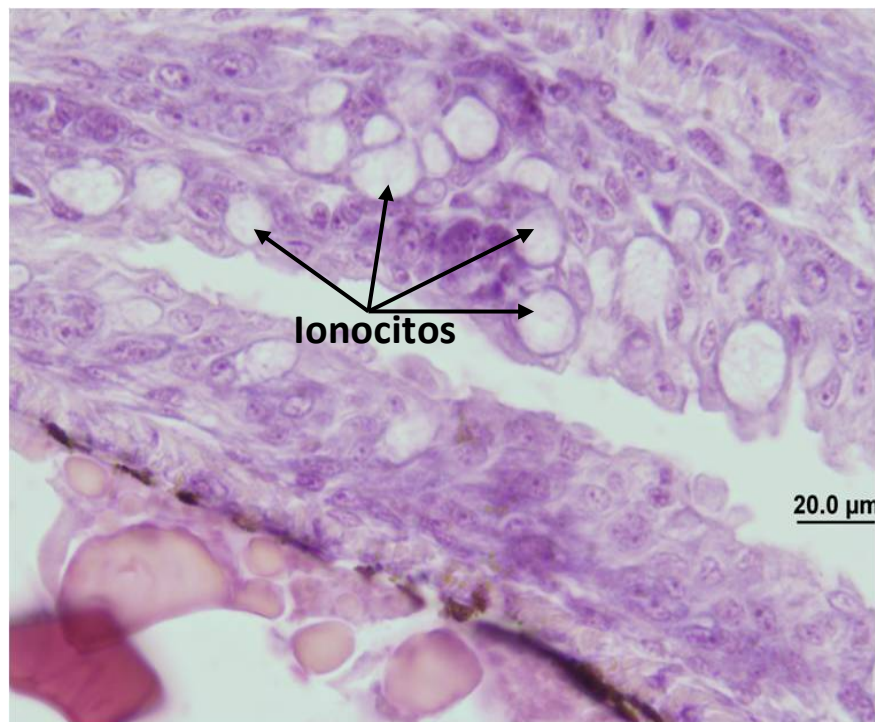


Figura 11. Bucofaringe de embrión libre: Ionocitos 3 dde, H&E.

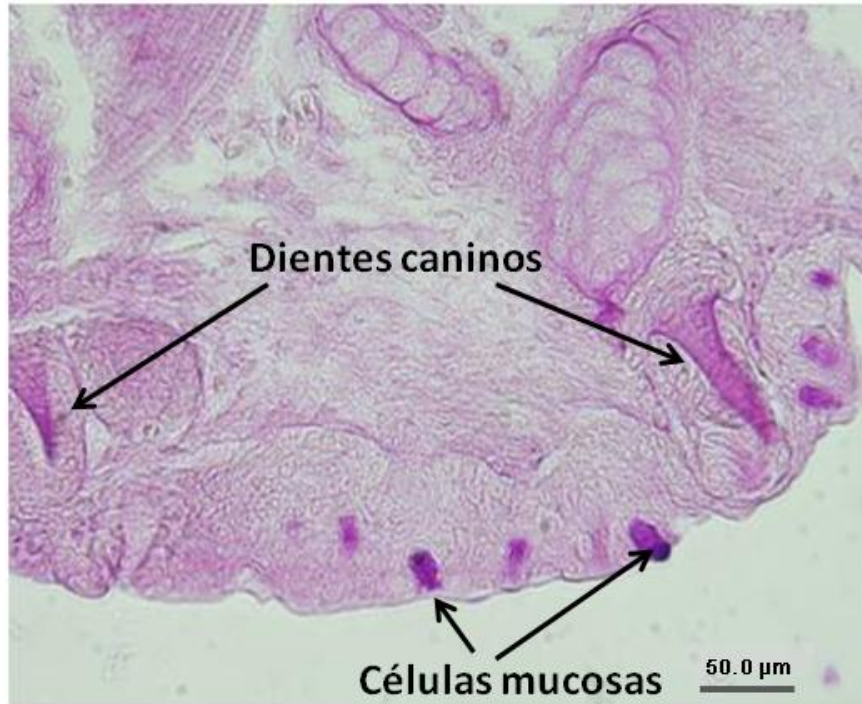


Figura 12. Bucofaringe de embrión libre: dientes caninos 3 dde, PAS 2.5.

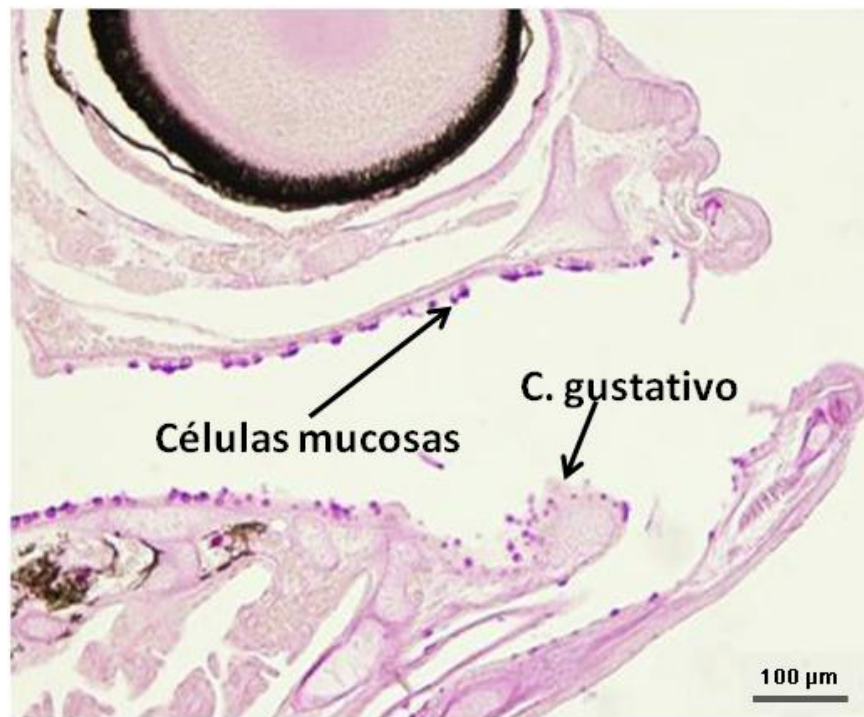


Figura 13. Bucofaringe de embrión libre: células mucosas 3 dde, PAS 2.5.

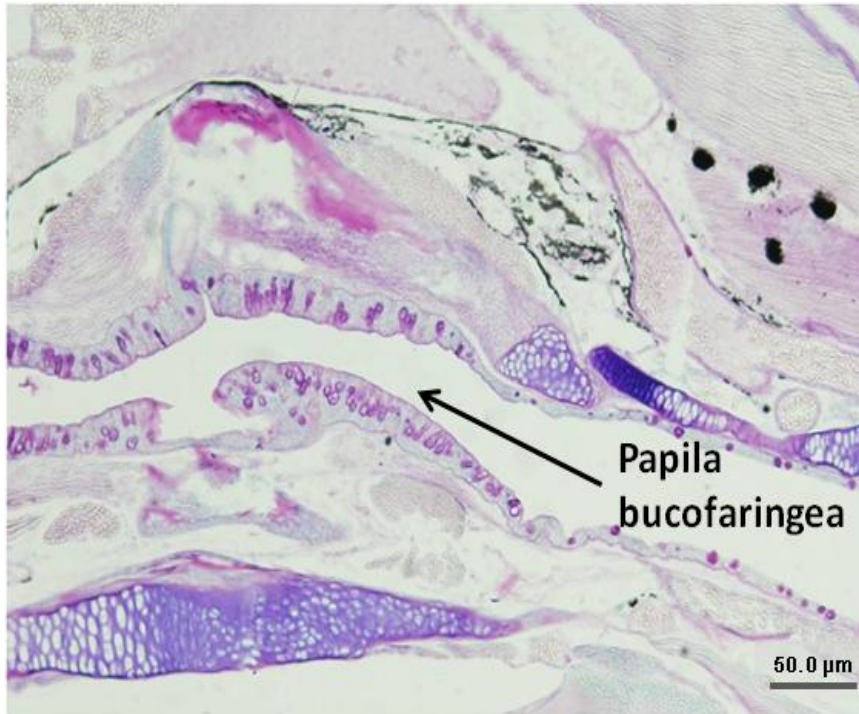


Figura 14. Bucofaringe de juvenil: papila bucofáringea 19 dde, PAS 2.5.

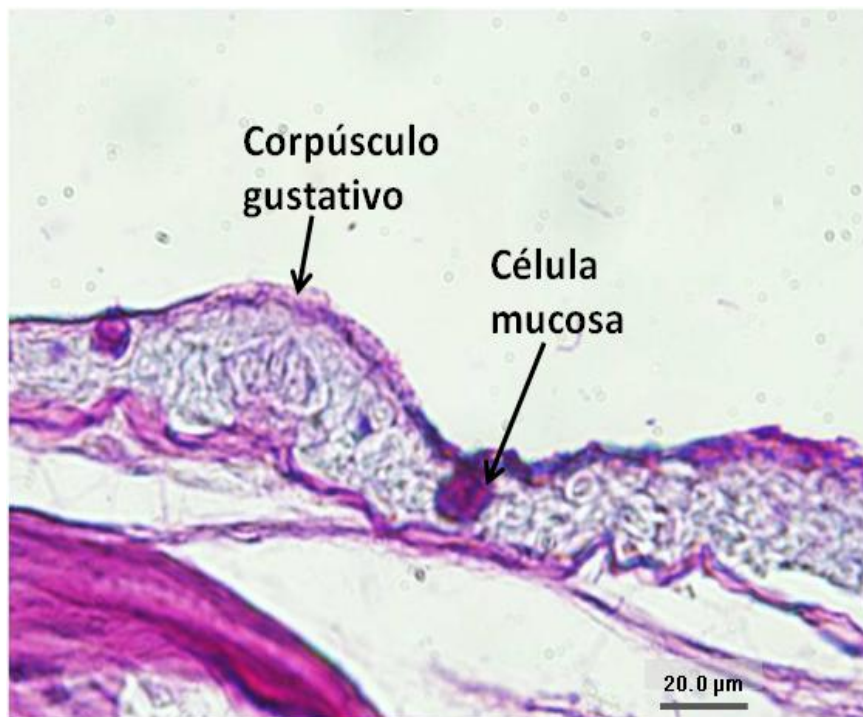


Figura 15. Bucofaringe de juvenil: corpúsculo gustativo 24 dde, H&E.

5.3.3. Esófago

Entre el 1 y los 2 dde, el esófago comienza a diferenciarse como un ducto corto cubierto por epitelio cúbico con células mucosas (18 ± 4 células in $100 \mu\text{m}$ de epitelio), conectado por la cavidad faríngea con el intestino anterior (figura 17). Los estudios histoquímicos revelaron que la mayoría de las células mucosas fueron teñidas en magenta (PAS positivo), mientras pocas fueron teñidas en azul pálido (AB pH 0.5, 1.0, 2.5), lo cual indica que contienen glicoproteínas neutras y acídicas (carboxiladas y sulfatadas), respectivamente (figura 17). Entre los 3 y 4 dde, el esófago crece en longitud y dos capas de tejido muscular circular fibroso fueron claramente distinguibles formando parte de la mucosa esofageal, así como una pequeña capa de tejido conectivo rodeándolas. A esta edad, la mayor parte de las células mucosas en esófago producen una mezcla de glicoproteínas neutras (PAS positivo) y acídicas (AB pH 0.5, 1.0 y 2.5). A los 24 dde, todo el epitelio esofageal estuvo cubierto por células mucosas (21.3 ± 2.5 células en $100 \mu\text{m}$ de tejido esofageal) (figura 20). En etapas posteriores de desarrollo, el esófago no sufre cambios mayores.

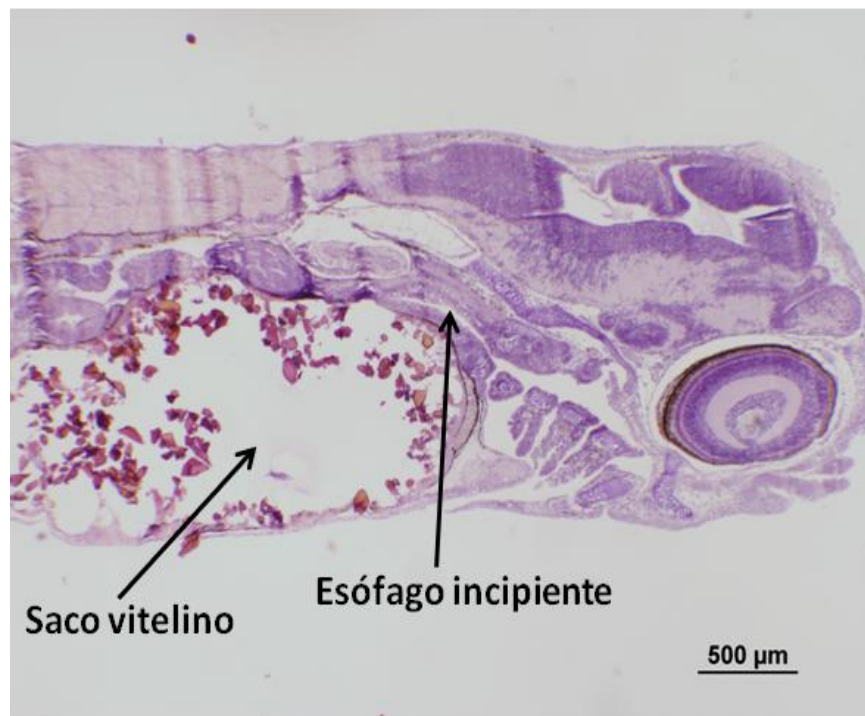


Figura 16. Esófago incipiente de embrión libre, 2 dde, H&E.

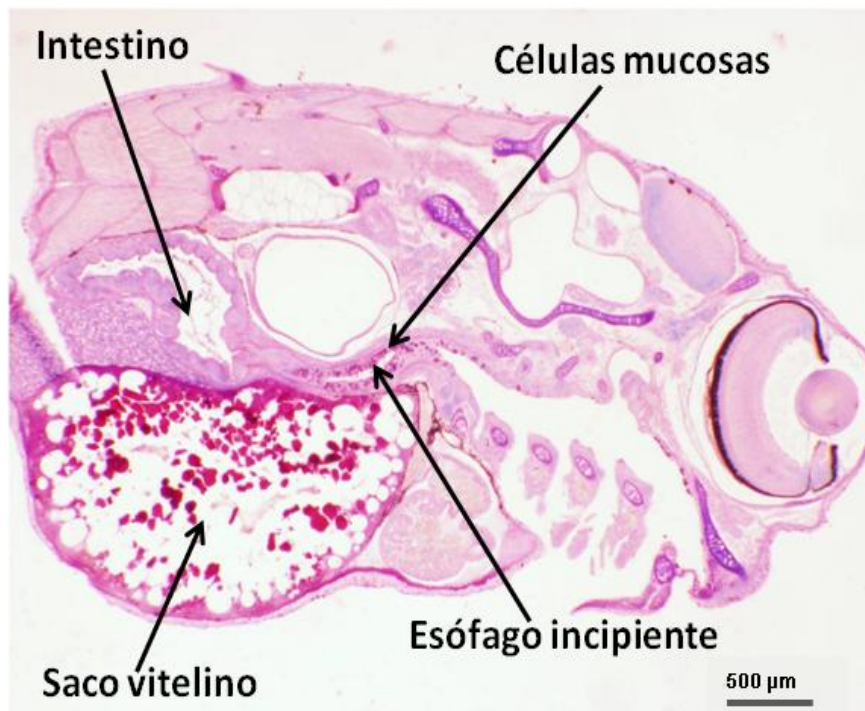


Figura 17. Esófago de embrión libre: células mucosas 3 dde, PAS 2.5.

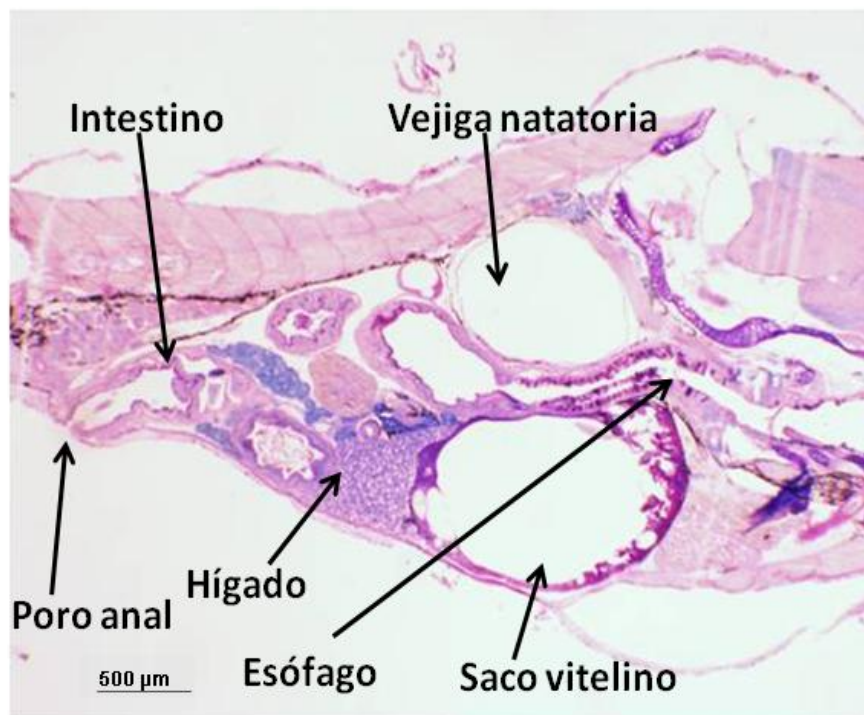


Figura 18. Esófago larvario: células mucosas 5 dde, PAS 2.5.

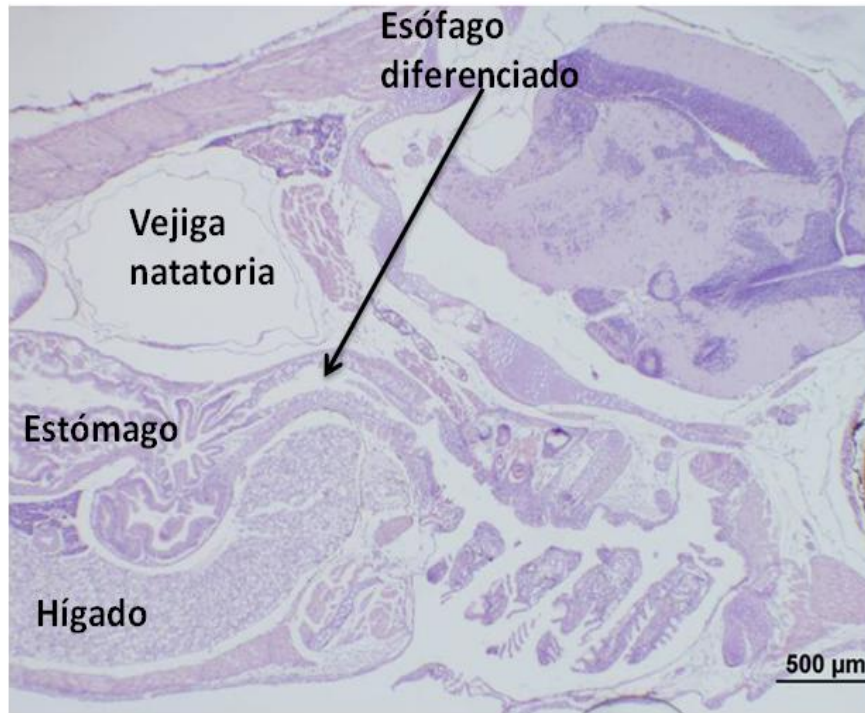


Figura 19. Esófago diferenciado en juvenil, 17 dde, H&E.

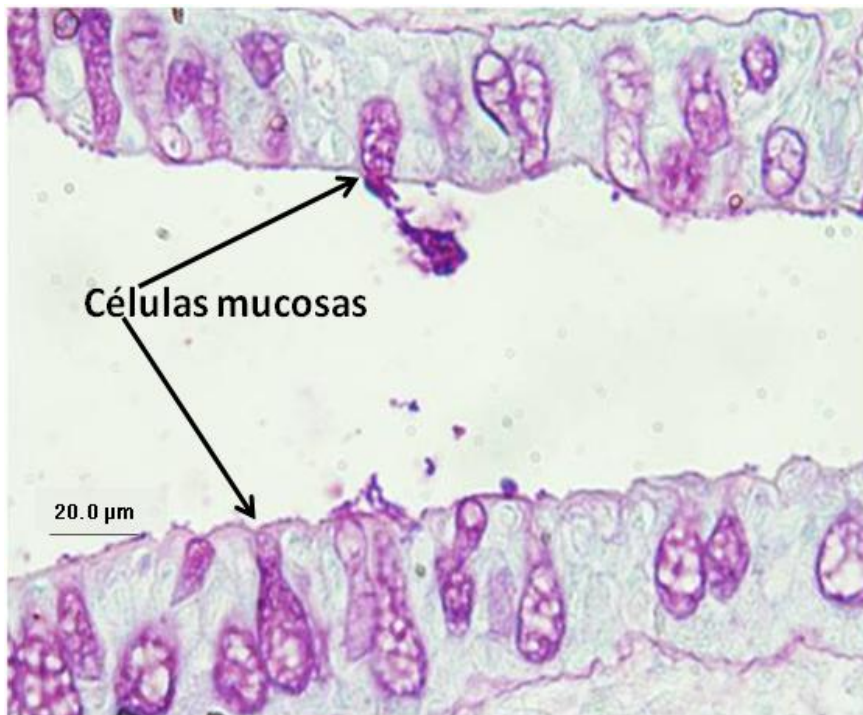


Figura 20. Esófago de juvenil: células mucosas 24 dde, PAS 2.5.

5.3.4. Estómago

Entre los 3 y 4 dde el estómago cardiaco comienza a formarse, como producto de una dilatación entre el esófago y el intestino medio (figura 21). Esta área fue cubierta por epitelio columnar pseudoestratificado, carente de células mucosas y los distinguibles incipientes pliegues mucosales. La constricción que separa el estómago del intestino visible a los 4 dde comprenderá el futuro esfínter pilórico. A los 7 dde (4.86 ± 0.09 mm LP), los primeros cúmulos (clusters) de células cúbicas formando las glándulas gástricas fueron observadas en la región media-posterior de un estómago en desarrollo (figura 23), mientras que en la superficie interna en forma de pólipo se observaron los micropliegues que se tornan eosinófilos con PAS 2.5 (figura 24). A los 9 dde (4.88 ± 0.14 mm LP), las primeras células mucosas secretaron glicoconjugados neutros (PAS positivo) las cuales, fueron visibles en la mucosa gástrica (figura 26). A los 14 dde (6.35 ± 0.17 mm LP) su número y reactividad al PAS positivo, incrementó. A los 19 dde (7.02 ± 0.25 mm LP) es posible distinguir tres regiones en el estómago: estómago cardias, estómago fundus y estómago pilórico (figura 28). El primero consiste en una amplia cavidad, cubierta por epitelio simple ciliado columnar y una delgada capa de mucosa y otra capa de tejido muscular liso. El segundo ocupó la mayoría del estómago y estuvo cubierto por epitelio ciliado columnar simple, con células mucosas y glándulas gástricas alargadas. La región pilórica del estómago fue corta y cubierta por epitelio columnar, desprovista de glándulas gástricas. Los rasgos histológicos del estómago no experimentaron cambios remarcables hasta el final del estudio, con la excepción del crecimiento en tamaño y cantidad de glándulas gástricas.



Figura 21. Estómago primordio de larva, 4 dde, H&E.

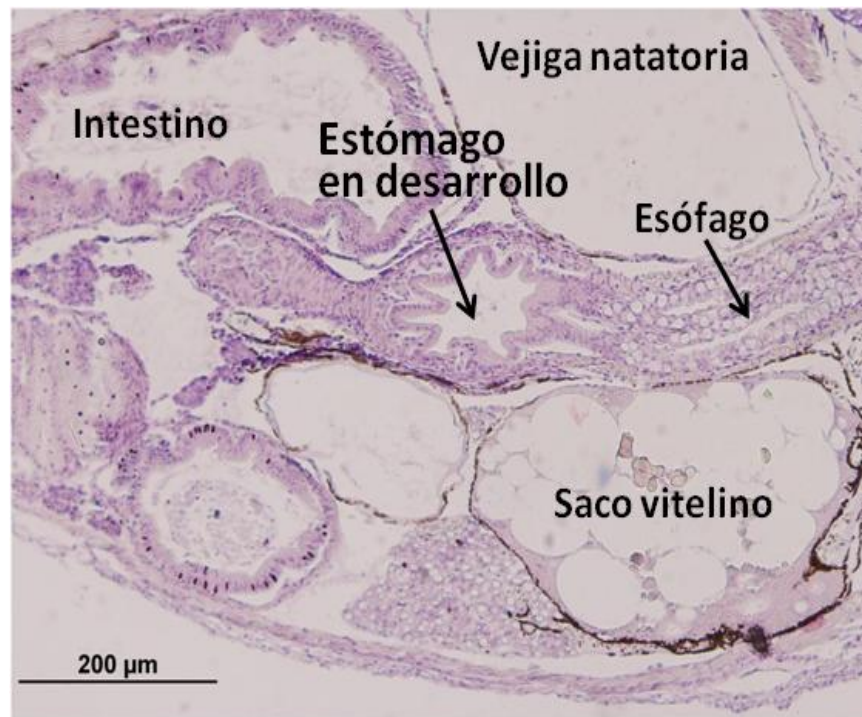


Figura 22. Estómago larvario, 6 dde, H&E.

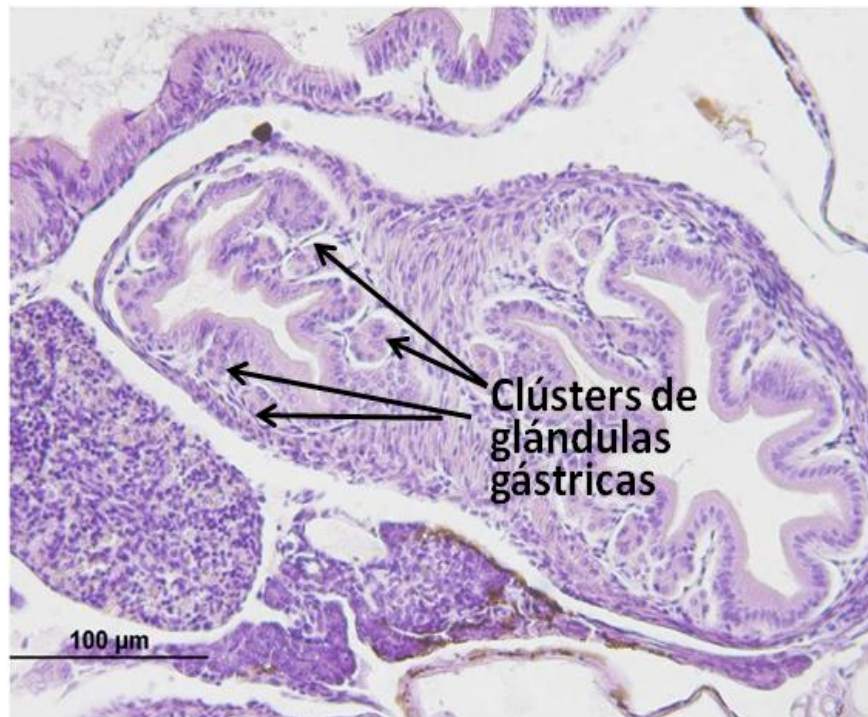


Figura 23. Estómago larvario: origen de glándulas gástricas 7 dde, H&E.

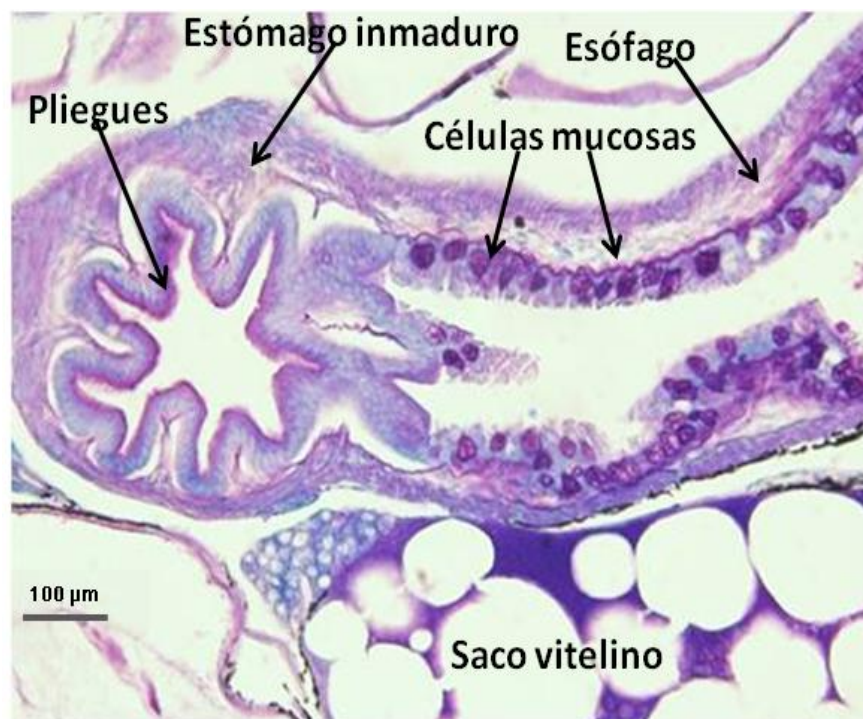


Figura 24. Estómago larvario: micropliegues 7 dde, PAS 2.5.

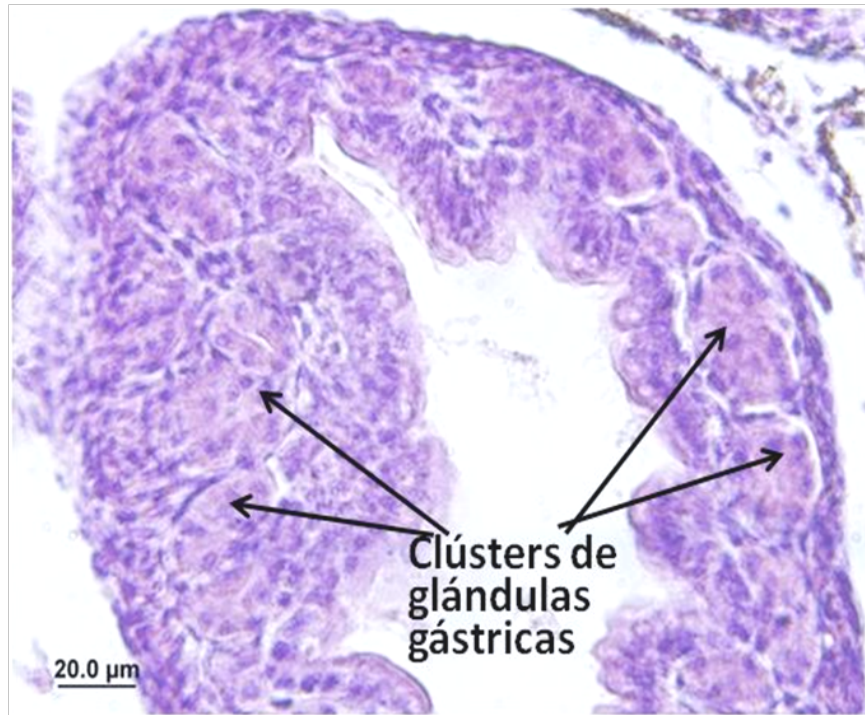


Figura 25. Estómago larvario: glándulas gástricas 9 dde, H&E.

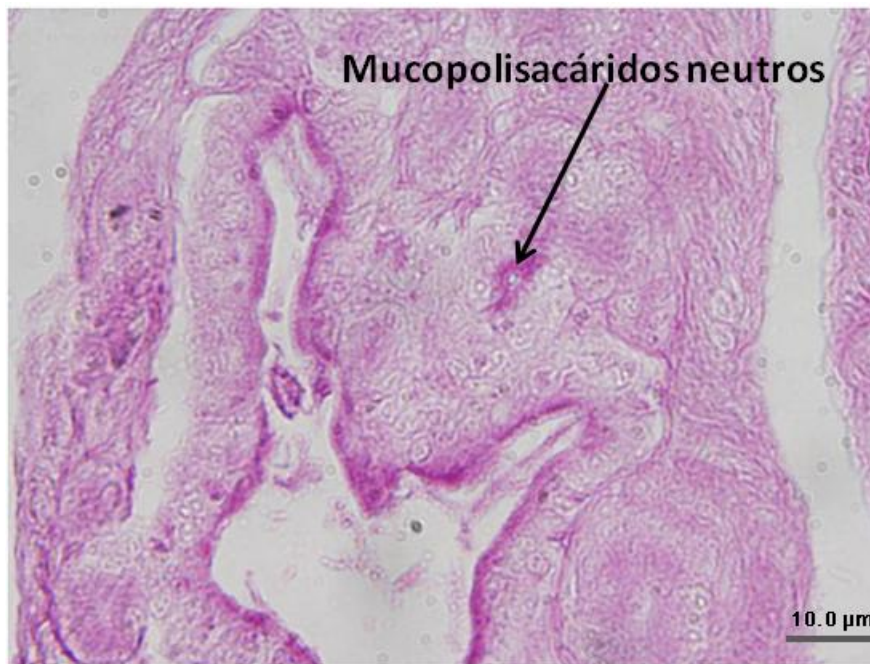


Figura 26. Estómago larvario: mucopolisacáridos 9 dde, PAS 1.0.

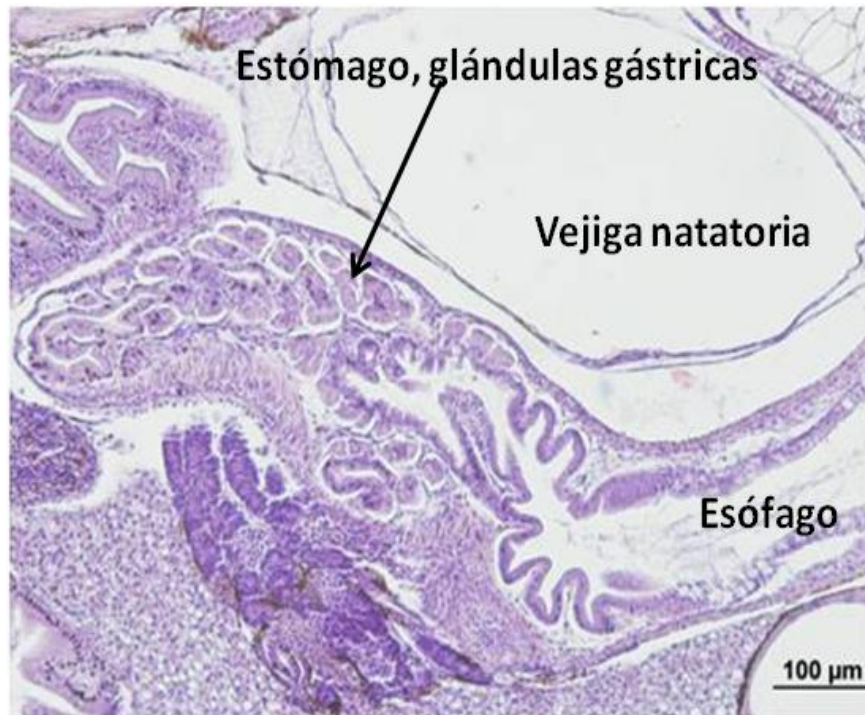


Figura 27. Estómago: comienzo de juvenil, glándulas gástricas 14 dde, H&E.

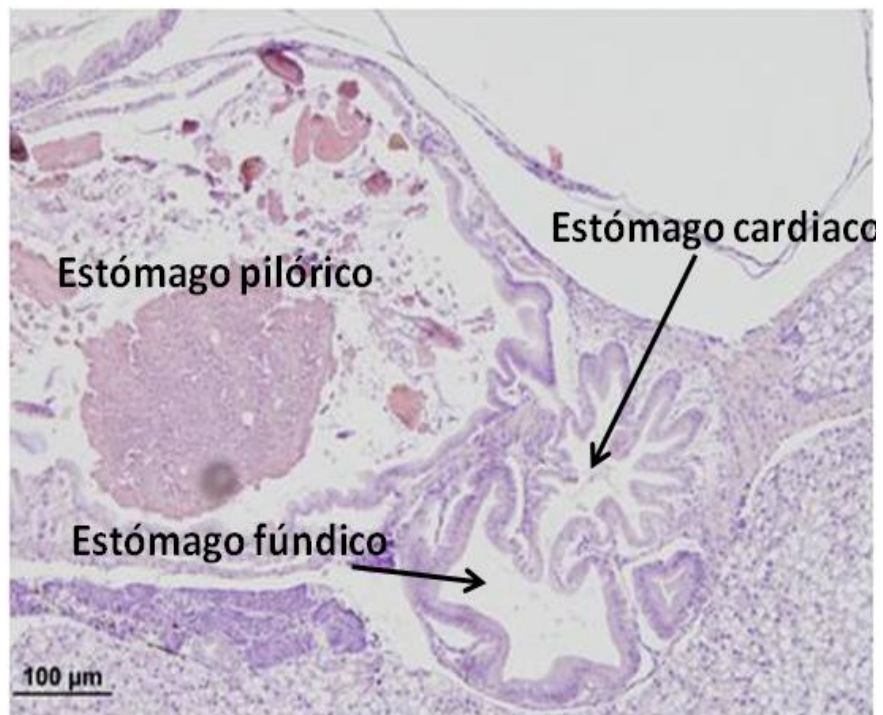


Figura 28. Estómago diferenciado de juvenil: regionalización 19 dde, H&E.

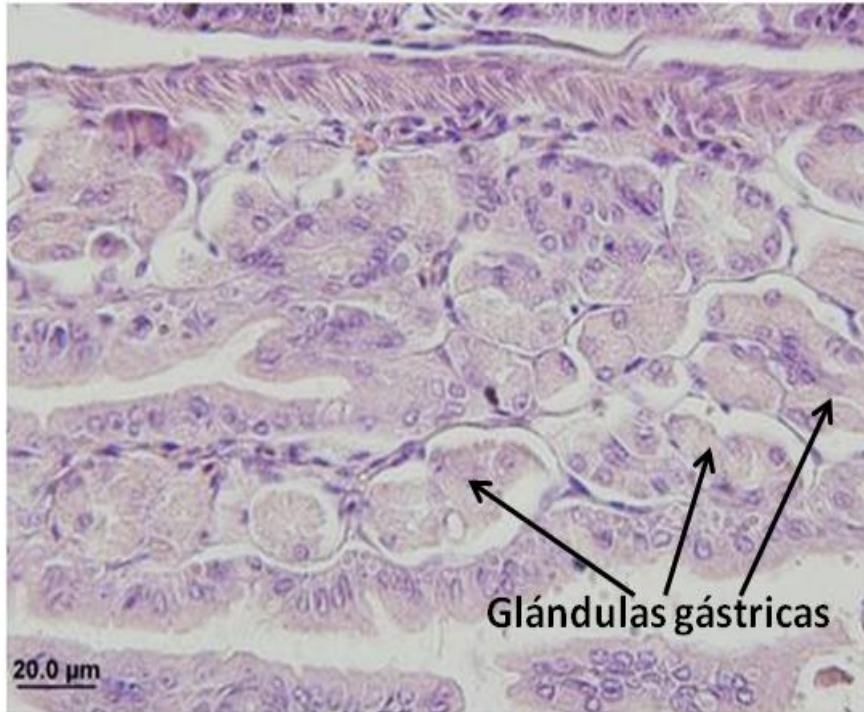


Figura 29. Estómago de juvenil: glándulas gástricas diferenciadas 24 dde, H&E.

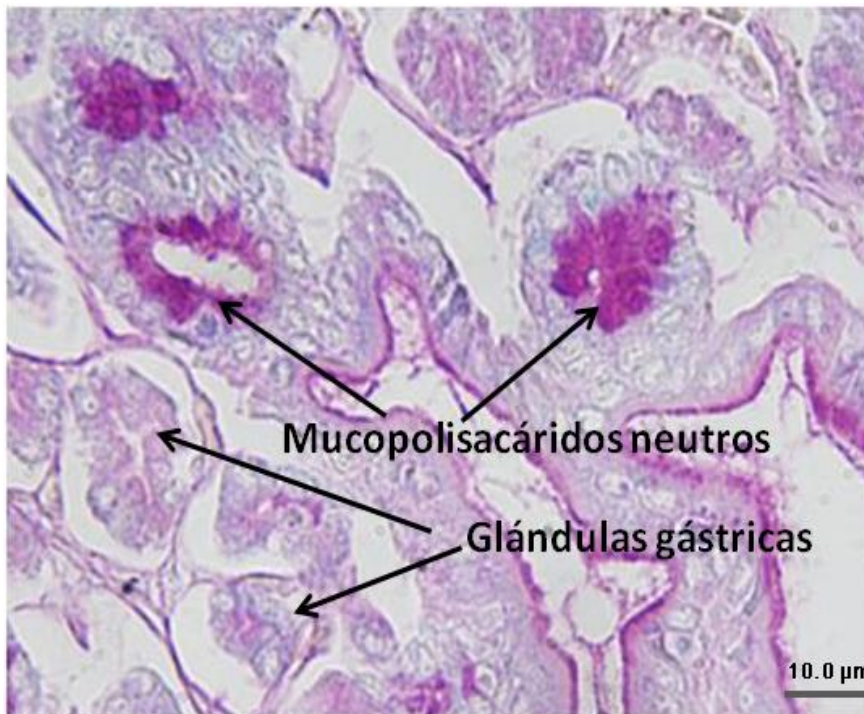


Figura 30. Estómago de juvenil: mucopolisacáridos 24 dde, PAS 2.5.

5.3.5. Intestino

A la eclosión, el intestino fue un tubo recto por tejido columnar con micropliegues y desprovisto de células mucosas. A los 2 dde, la mucosa intestinal comenzó a formar incipientes pliegues (figura 31) y las primeras células mucosas aparecieron entre los enterocitos del epitelio intestinal. A esta edad, cuerpos de inclusión supranucleares eosinofílicos (PAS positivo) fueron detectados en enterocitos del intestino anterior (figura 32).

A los 3 dde, estas células fueron teñidas de magenta (PAS positivo), mientras algunas otras en azul pálido (AB, pH 0.5, 1.0, 2.5 positivo), indicando diferentes contenidos de glicoproteínas neutras y ácidas (carboxiladas y sulfatadas), respectivamente (figura 33). Paralelamente, microvellosidades intestinales se observaron eosinofílicos (PAS 2.5, figura 33). A esta edad, la región posterior del intestino comenzó a diferenciarse en el recto, carente de pliegues y con escasas células mucosales (figura 34).

A los 4 dde (3.94 ± 0.03 mm LP), el intestino experimentó una curvatura y la válvula intestinal separando la región anterior de la posterior (figura 35). Ambas regiones fueron cubiertas con epitelio columnar simple con núcleos basales, un citoplasma ligeramente basofílico y prominentes micropliegues eosinófilos.

Entre el 5 y 6 dde, coincidiendo con el inicio de la primera alimentación exógena, las primeras vacuolas lipídicas estuvieron presentes dentro de los enterocitos en ambas regiones del intestino. Las células mucosas fueron teñidas en púrpura, indicando que su contenido fue una mezcla de glicoproteínas neutras (PAS positivo) y ácidas (AB pH 0.5, 1.0 y 2.5 positivo), mientras unas pocas contenían glicoproteínas neutras o ácidas.

Entre los 6 y 8 dde (4.52 ± 0.14 mm LP) varias diferencias morfológicas fueron visibles entre el intestino anterior y posterior, particularmente en la cantidad de vacuolas lipídicas (más abundantes en el primero que en el segundo), indicando que el intestino anterior fue el sitio primario de absorción de lípidos en intestino. Por otro lado, los pliegues intestinales fueron más altos y abundantes en intestino posterior que en intestino anterior (12.3 ± 1.9 vs. 2.7 ± 0.4 células en $100 \mu\text{m}$ de epitelio). Los pliegues del intestino incrementaron considerablemente entre los 11 y 14 dde, coincidiendo con el desarrollo de las glándulas gástricas en el estómago. A los 12 dde se apreciaron quistes no digeridos de *Artemia* a nivel del intestino posterior (PAS positivo, figura 39).

A partir de los 11 dde, no se hallaron cambios morfoanatómicos de significancia en la mucosa intestinal hasta el final del estudio, con la excepción del progresivo aumento de la longitud del intestino y grosor de la mucosa intestinal, así como en el incremento en tamaño y cantidad de pliegues intestinales. De manera atípica, entre los 21 y 24 dde (7.05 ± 0.41 mm LP) se visualizaron cuerpos supranucleares eosinófilos (PAS positivo) en intestino posterior.



Figura 31. Intestino incipiente de embrión libre, 2 dde, H&E.

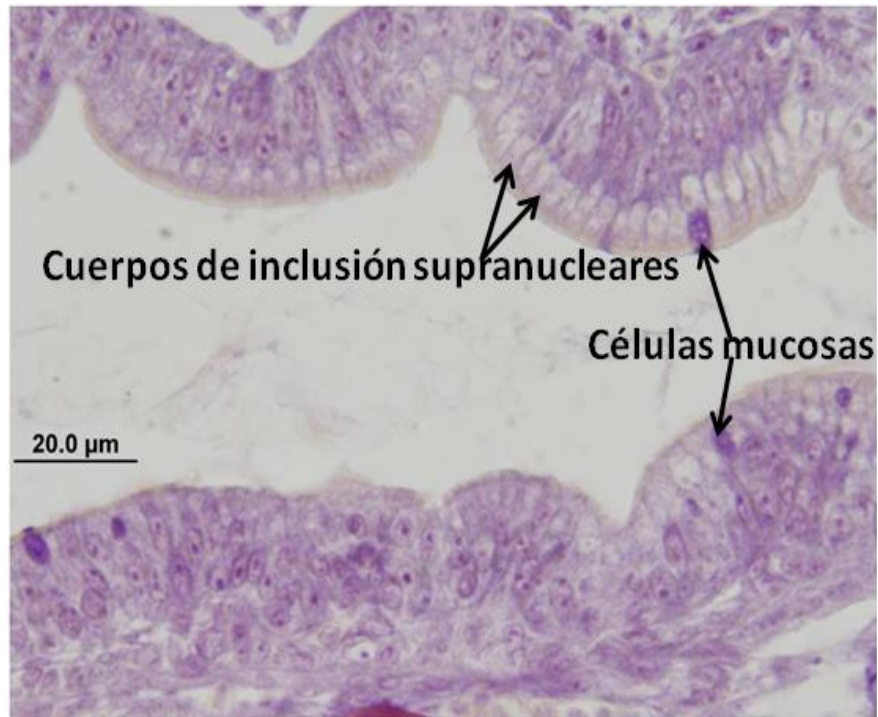


Figura 32. Intestino incipiente de embrión libre: cuerpos de inclusión, 2 dde, H&E.

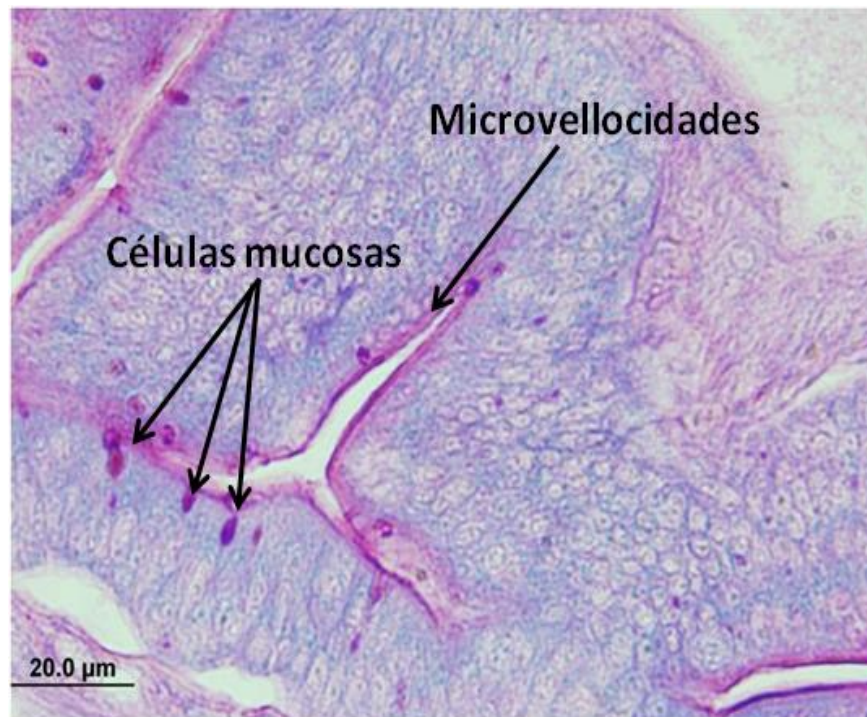


Figura 33. Intestino de embrión libre: células mucosas, 3 dde, PAS 2.5.

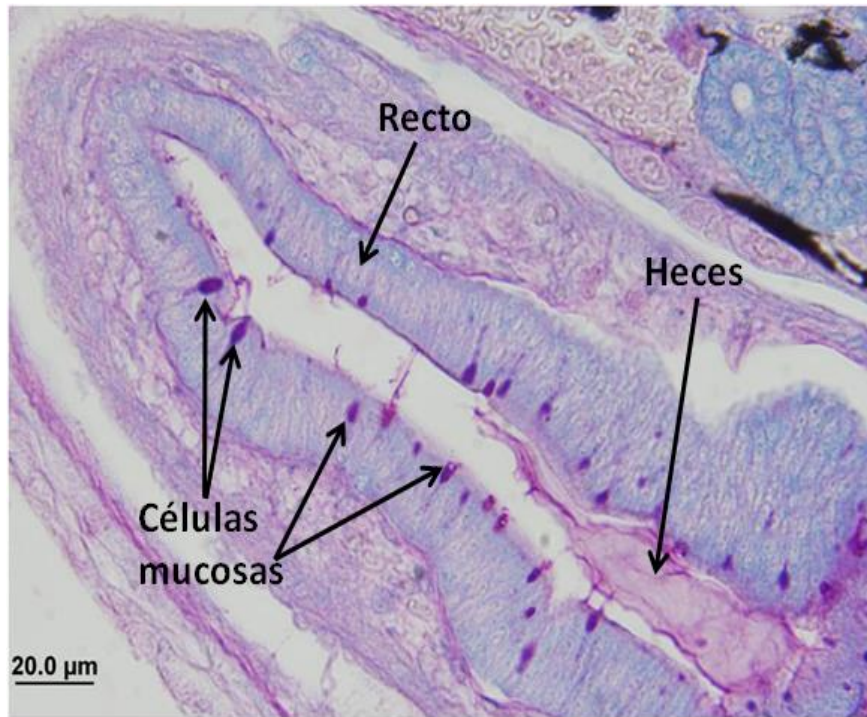


Figura 34. Recto de embrión libre, 3 dde, PAS 2.5.

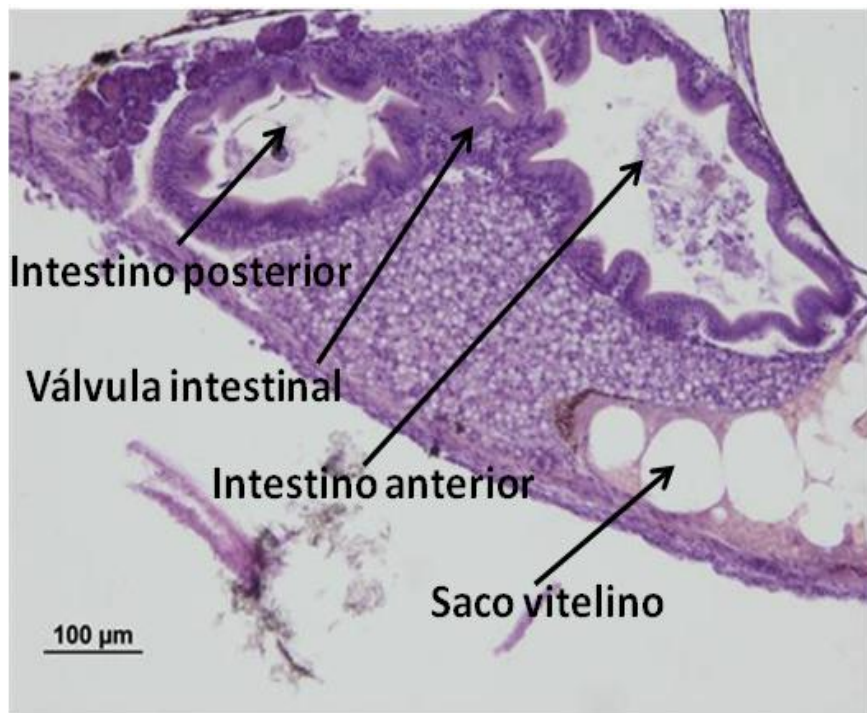


Figura 35. Intestino larvario inicial: división 4 dde, H&E.

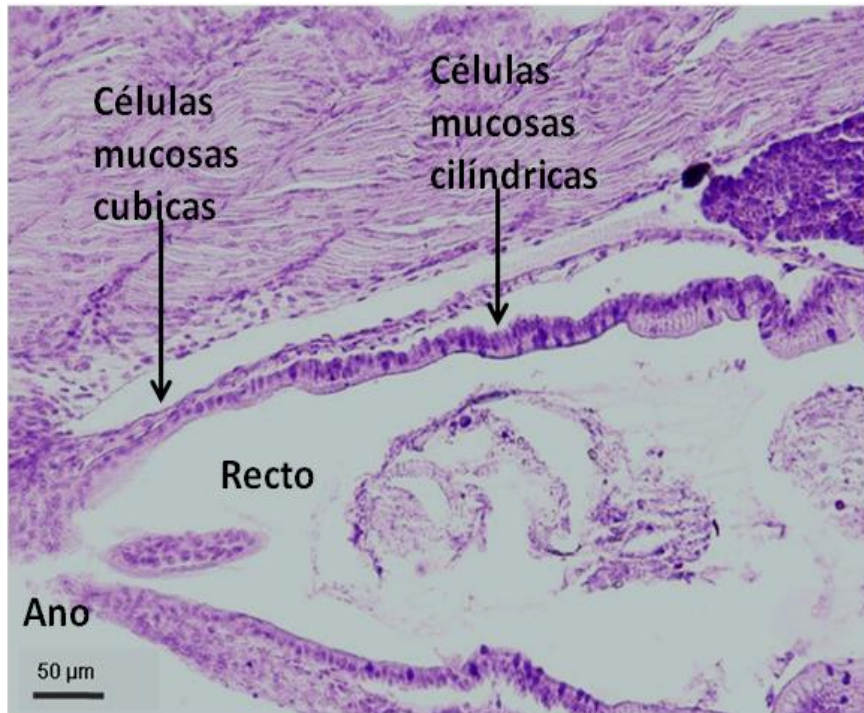


Figura 36. Recto en larva: cambio de morfología celular 6 dde, H&E.

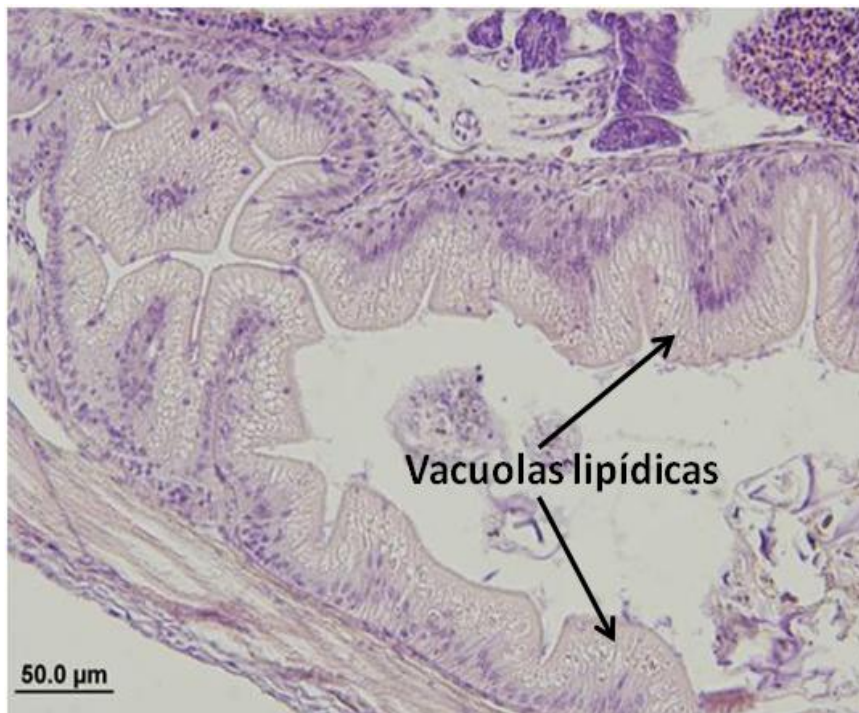


Figura 37. Vacuolas lipídicas en juvenil, 23 dde, H&E.

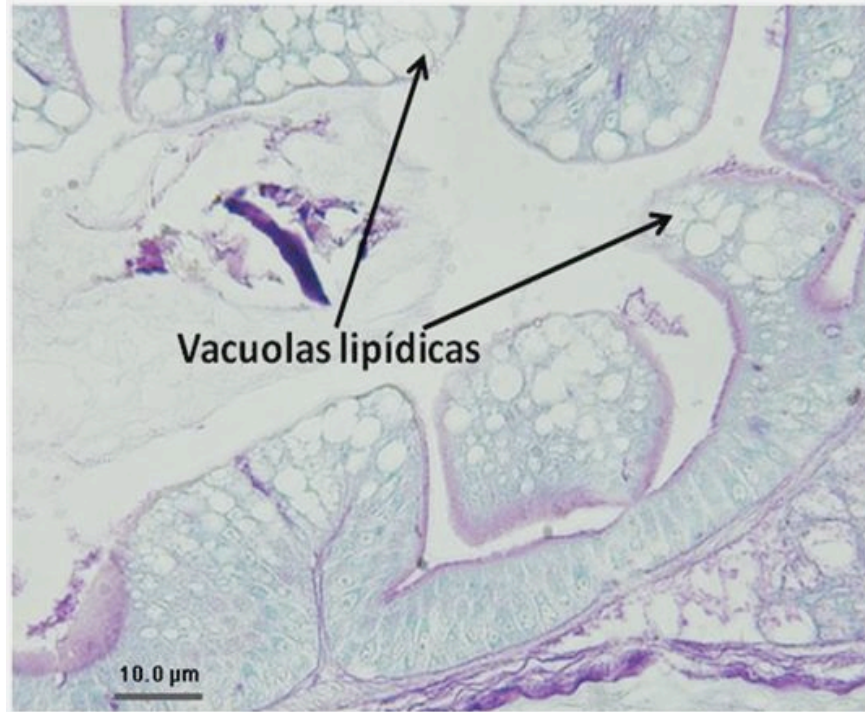


Figura 38. Intestino de juvenil, 29 dde, PAS 2.5.

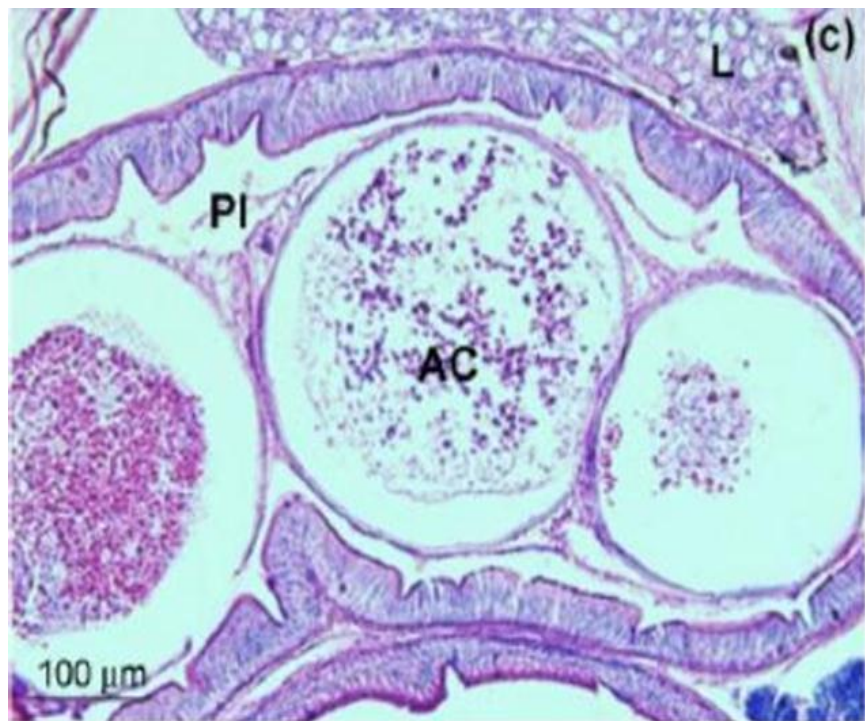


Figura 39. Quistes de Artemia en intestino posterior larvario tardío, 12 dde, PAS 2.5.

5.3.6. Glándulas accesorias

A la eclosión, el hígado de *C. urophthalmus* ya se encuentra desarrollado y aparece como una masa lobular que cubre gran parte de la cavidad abdominal, casi hasta el poro anal, (figura 40). El tejido hepático consistió de hepatocitos poliédricos con núcleo central, reducido citoplasma eosinófilo y pocas y pequeñas inclusiones lipídicas ($10.7 \pm 1.5 \mu\text{m}$ de diámetro). Los ductos biliares fueron visibles entre el 2 y los 3 dde y estuvieron cubiertos por epitelio ciliado columnar con núcleos basales, ocupando la mayor parte del citoplasma. A los 4 dde, los hepatocitos comienzan a acumular gran cantidad de lípidos ya que el diámetro de las vacuolas incrementó ($16.8 \pm 2.2 \mu\text{m}$). Coincidiendo con el inicio de la alimentación exógena, los depósitos de lípidos (figura 42) y glicógeno (PAS positivo) incrementaron progresivamente dentro de los hepatocitos. A los 16 dde ($6.61 \pm 0.40 \text{ mm LP}$), las vacuolas lipídicas ocuparon la mayor parte del citoplasma ($71.1 \pm 5.3 \mu\text{m}$), desplazando a los núcleos a la periferia de los hepatocitos lo cual, resultó en un decremento en el almacenamiento de glicógeno (PAS positivo) en el hígado.

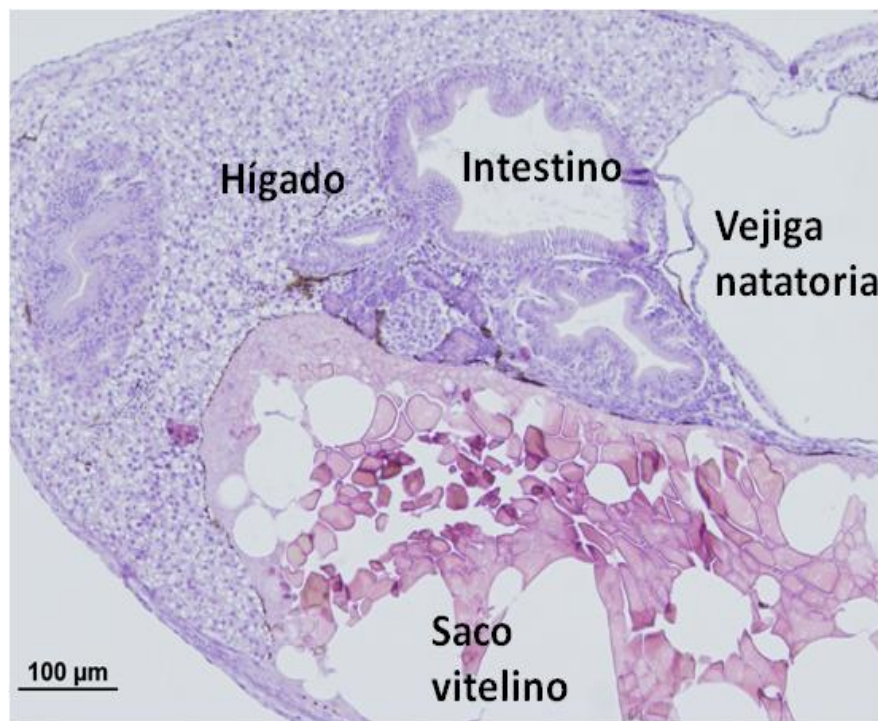


Figura 40. Hígado de embrión libre, 3 dde, H&E.

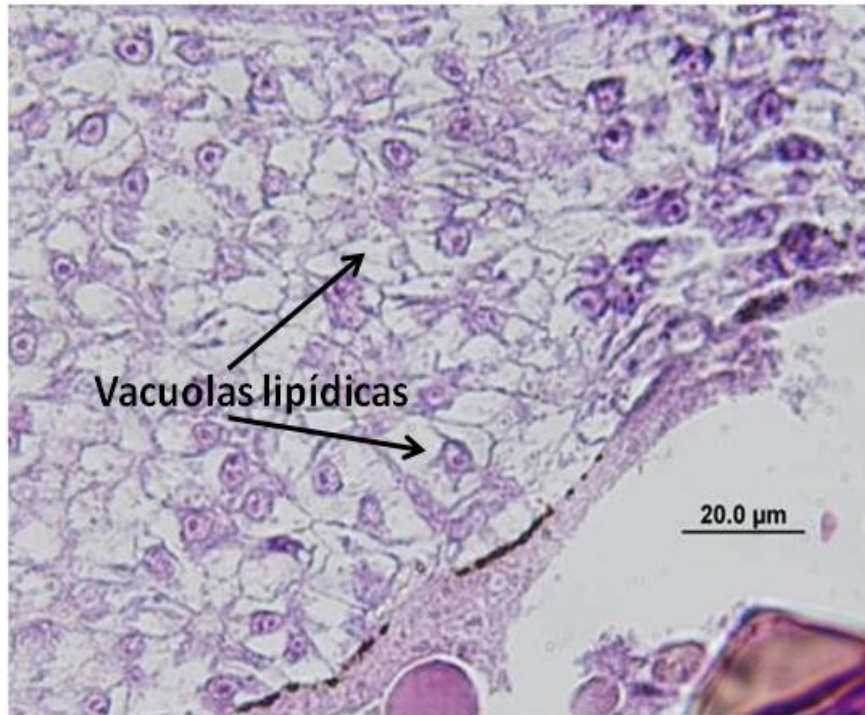


Figura 41. Hígado de embrión libre: lípidos escasos 2 dde, H&E.

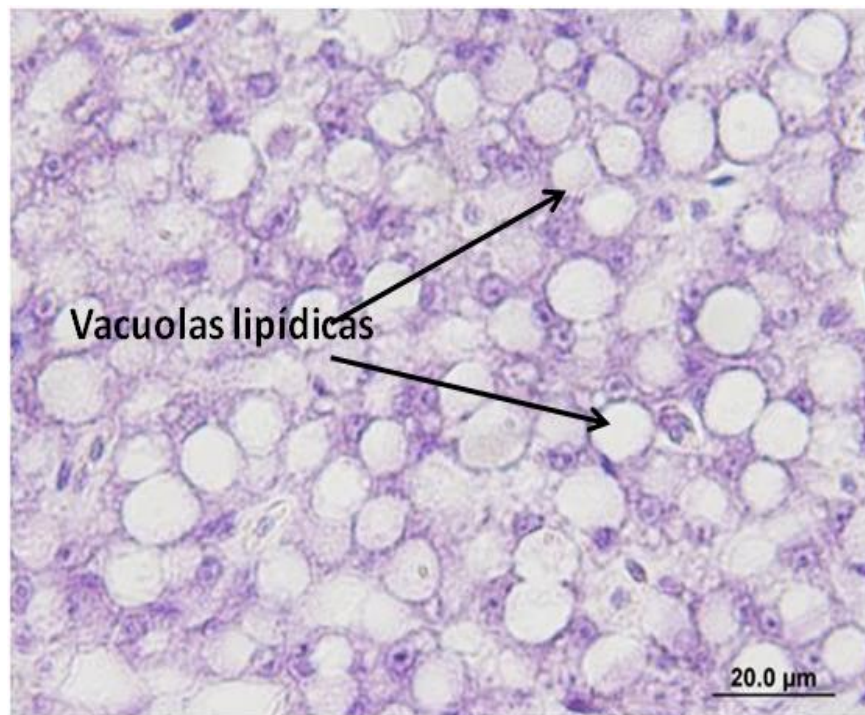


Figura 42. Hígado larvario: lípidos abundantes 7 dde, H&E.

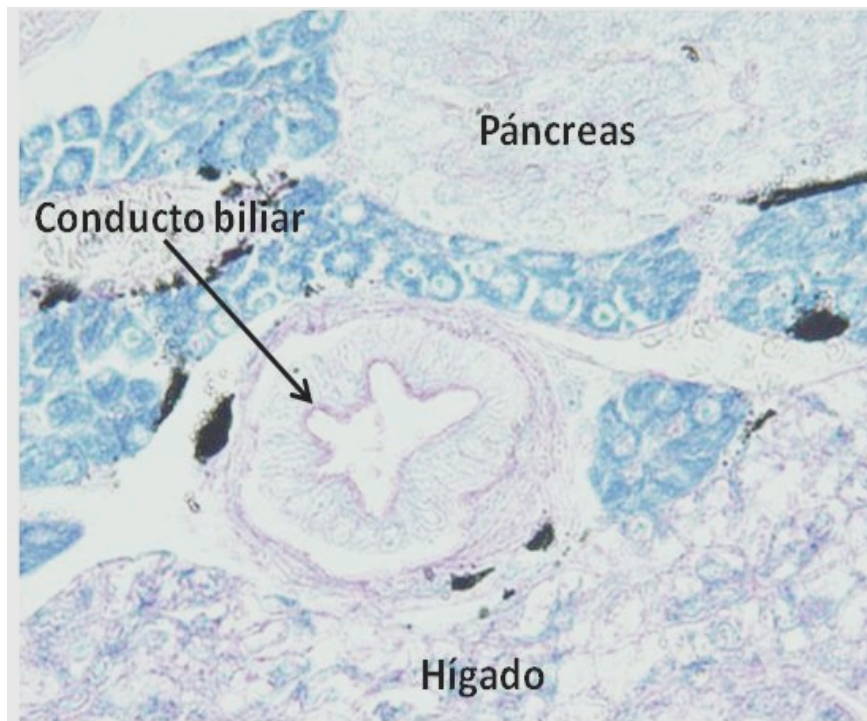


Figura 43. Conducto biliar en juvenil, 24 dde, PAS 2.5.

Paralelamente, el páncreas exócrino al igual que el hígado, ya se encontró diferenciado a la eclosión. El páncreas fue organizado por células basofílicas poliédricas, en cúmulos de células acinares en forma de roseta, con gránulos de zimógeno (PAS positivo). Entre los 2 y 4 dde, estos gránulos se tiñeron intensamente, lo que indica su aumento marcado dentro de las células acinares, con implicaciones de una importante síntesis de precursores de enzimas pancreáticas (figura 44). A los 3 dde, el páncreas endócrino fue notoriamente visible. Las células endócrinas estuvieron arregladas alrededor de pequeños capilares, conformando los islotes de Langerhans (figura 45). El cuantitativo crecimiento después de la diferenciación del páncreas endócrino y exócrino, incluye el incremento del contenido de los gránulos de zimógeno, mientras no se observaron nuevas estructuras en etapas posteriores de desarrollo.

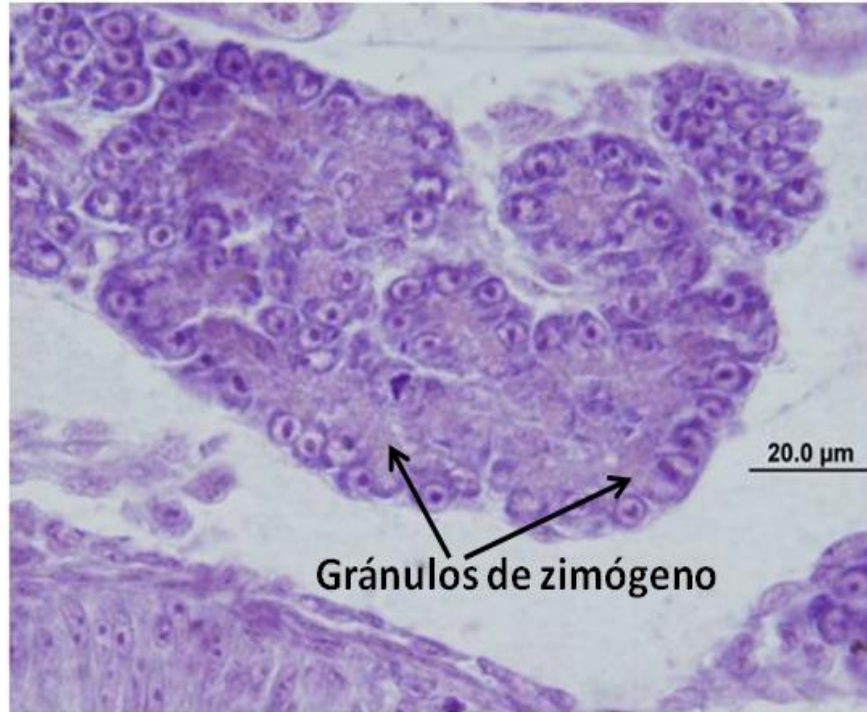


Figura 44. Páncreas de embrión libre, 2 dde H&E.

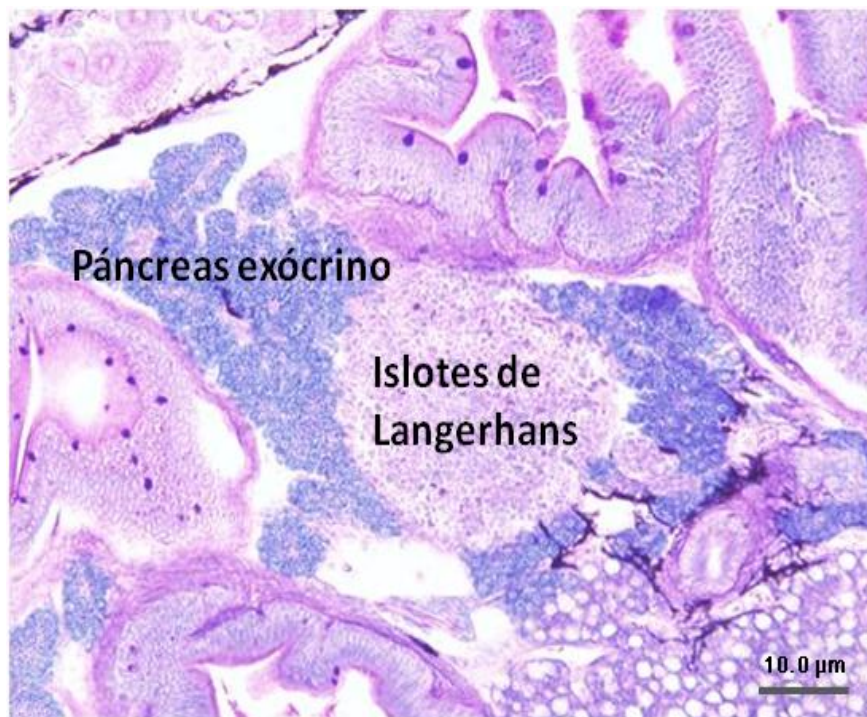


Figura 45. Páncreas exócrino y endócrino en larva, 4 dde PAS 2.5.

5.4. DISCUSIÓN

En la presente investigación, se describieron los cambios morfológicos e histológicos que tuvieron lugar en el tracto digestivo de *C. urophthalmus*, a lo largo de su ontogenia inicial. Tales cambios fueron comparados a su vez con los que desarrollan otros peces, con énfasis en cíclidos de agua dulce, y desde la óptica del desarrollo morfológico e histológico, son muy similares, como reportan Fishelson (1995), Morrison *et al.* (2001) y Treviño *et al.* (2010). No obstante, los tiempos en los que tienen lugar estos cambios son marcadamente distintos. A este respecto, mientras *C. urophthalmus* muestra un crecimiento (en longitud estándar) de tipo potencial, muchos peces marinos (Faulk *et al.*, 2003; Hachero-Cruzado *et al.*, 2009) y de agua dulce (Treviño *et al.*, 2010), muestran un crecimiento de tipo exponencial, respecto al tiempo. La tasa de crecimiento no tan solo responde a los protocolos de alimentación empleados en uno u otro caso, sino que también a otras condiciones de cultivo, tales como las densidades de carga, los parámetros físicos y químicos en agua (principalmente la temperatura), diferencias interespecíficas, entre otros.

En lo que respecta al proceso de desarrollo morfofuncional, el tracto digestivo incipiente, a la eclosión (0 dde) de *C. urophthalmus*, es un tubo recto cerrado y pobremente diferenciado, que se encuentra situado dorsalmente por encima del saco vitelino, y conforme aumenta la edad y la talla, experimenta cambios intensos durante el período de alimentación endógena. Similares características morfológicas han sido descritas en un gran número de especies, sin embargo durante el desarrollo lecitotrófico, la larva experimenta rápidos cambios que conducen a la diferenciación de regiones y órganos del sistema digestivo, aunque el desarrollo del estómago depende de la especie (Lazo *et al.*, 2011). A los 2 dde (2.64 ± 0.2 mm LP) en *C. urophthalmus*, es posible observar ya las células mucosas en esófago e intestino, lo que proporciona a la larva facilidad para ingerir partículas alimenticias (y evitar la abrasión de epitelios).

Así mismo, el hígado acusa un incremento notable de la deposición lipídica en hepatocitos, una vez que ocurre el cambio de alimentación endógena a exógena. En el pez de agua dulce *Sander luciperca* se demostraron cambios intensos en tracto digestivo durante el período de alimentación endógena, justo antes de la primera alimentación (Ostaszewska, 2005). En larvas en otro pez omnívoro, *Pagellus erythrinus*, la diferenciación del tracto digestivo tiene lugar en bucofaringe, esófago, así como un estómago presuntivo e intestino, a los 3 dde (Micale *et al.*, 2006), indicadores morfológicos que coincidieron con la primera alimentación exógena.

A la par de estos cambios intensos, aunque el saco vitelino de *C. urophthalmus* deja de ser macroscópicamente visible a los 6 dde (3.98 ± 0.12 mm LP), es posible observar remanentes a los 16 dde (6.61 ± 0.40 mm in LP). Paralelamente, en esta especie la tasa de consumo del saco vitelino, muestra una tendencia lineal, más que exponencial como muestra *P. splendida*. Sin embargo, las larvas de *P. splendida* observan remanentes del saco vitelino hasta los 24 dde, pese a la aparente mayor velocidad de consumo. Por otro lado, la presencia de reservas vitelinas a las 2 o 3 semanas después de la eclosión, puede amortiguar o facilitar el cambio de régimen de alimentación como deducen López-Ramírez *et al.* (2010), lo que puede permitir a estas especies incubadoras de sustrato, disponer de mayor plasticidad para con las presiones medioambientales.

Los elementos histológicos que caracterizan a *C. urophthalmus* (de 0 a 30 dde), van a la par con algunos de los elementos bioquímicos encontrados por López-Ramírez *et al.*, (2010), durante la ontogenia inicial de esta misma especie. No obstante que la presente investigación reveló la presencia de gránulos de zimógeno (PAS positivo) desde los 0 dde, éstos resultaron más intensos a los 2 y 4 dde (3.94 ± 03 mm LP), lo que coincide con un valor máximo relativo de actividad de quimiotripsina, alrededor de los 4 dde, justo antes del inicio de la alimentación exógena. La aparición de la actividad de quimiotripsina a la primera alimentación en larvas de *Solea*, es reportada por Alliot *et al.* (1980). La actividad de esta endoproteasa alcalina, compensa la falta de un estómago funcional en los primeros días de vida, en el período larvario de peces (Kolkovsky, 2001).

Por tanto, estos gránulos de zimógeno, observados justo antes de la primera alimentación exógena de *C. urophthalmus*, posiblemente correspondan a quimiotripsinógeno, más que a tripsinógeno, dado que de acuerdo con López-Ramírez *et al.* (2010), no se encontró mayor actividad de tripsina entre los 2 y 4 dde.

Paralelamente, alrededor del 3 y 4 dde y según los mismos autores, *C. urophthalmus* muestra un valor máximo relativo de actividad de L-aminopeptidasa, lo que coincide con la presencia de una prominente membrana borde de cepillo en intestino. Aunque, no se observaron valores máximos relativos de actividad de otras enzimas asociadas a la membrana borde de cepillo, como fosfatasa alcalina y carboxipeptidasa A, en tilapia del Nilo *O. niloticus* se ha encontrado actividad de L-aminopeptidasa y bipeptidasa IV en eleuteroembriones recién eclosionados en esta especie tilapina (Tengjaroenkul *et al.* 2002), y su presencia ha sido correlacionada con la maduración de los enterocitos (Cahu & Zambonino-Infante, 1995; Gawlicka *et al.*, 1995).

Por otro lado, López-Ramírez *et al.* (2010) señalaron que la mayoría de las enzimas del tracto digestivo de *C. urophthalmus* analizadas en su estudio (desde los 0 a los 60 dde), muestran una intensa actividad alrededor de los 13 dde. Entre estas enzimas están las proteasas ácidas y alcalinas; L-aminopeptidasa, carboxipeptidasa A, fosfatasa ácida y alcalina (intestinales); y en menor medida pero no menos importantes, quimiotripsina y tripsina (pancreáticas). Tales incrementos de actividad enzimática en general, van en sincronía con la completa diferenciación del tracto digestivo en su totalidad, hechos revelados en el presente estudio histológico. Por consiguiente, los estudios bioquímicos que llevan a los autores mencionados a sugerir la posible aceptación de alimentos inertes de larvas de *C. urophthalmus* a los 13 dde, es posible confirmar también, con la histología realizada en la presente investigación.

La aparición precoz de células mucosas en larvas de *C. urophthalmus*, es otro rasgo morfofuncional que le confiere un alto grado de plasticidad. Las observaciones histológicas permitieron visualizar que las mucosustancias y glicoproteínas tienen la función de lubricar y proteger los epitelios de la abrasión.

En estómago, el auge de células mucosas a los 14 dde (6.91 ± 0.25 mm LP), permitieron la secreción de glicoproteínas neutras, que juegan un papel fundamental de protección del epitelio interno del estómago (especialmente en el fundus), contra la acción hidrolítica del jugo gástrico de las glándulas gástricas, que a esta edad, ya se encuentran en estado avanzado de diferenciación. Esta sincronía de aparición de glándulas gástricas y células mucosas secretoras de glicoproteínas neutras, fue observada en *P. splendida* (Treviño *et al.*, 2010)

Los estudios histológicos confirman que, la estrategia reproductiva de *C. urophthalmus* marca una pauta importante en el desarrollo del tracto digestivo, que experimentan el embrión y la larva en peces cíclidos de agua dulce. Los resultados reafirman también que como especie de incubación de sustrato, *C. urophthalmus* presenta un desarrollo de tracto digestivo rápido lo cual, ha sido observado también en otros cíclidos con semejante estrategia reproductiva, como *Tilapia zillii* (Fishelson, 1995), *O. niloticus* (Morrison *et al.*, 2001) y *P. splendida* (Treviño *et al.*, 2010). Dado que estas larvas están sujetas a presiones medioambientales considerables (debido a los escasos cuidados parentales que implica la incubación de sustrato), es que observan cambios morfológicos abruptos, como respuesta a aquellas. De manera antagónica, los peces cíclidos de incubación bucal, como *Sarotherodon galilaeus* y *Pseudotropheus johanni*, presentan desarrollo de tracto digestivo más lento como señalan Balon (1990); Fishelson (1995), debido a los mayores cuidados parentales que implica la incubación bucal y por tanto, menor exposición a presiones medioambientales.

A la eclosión, *C. urophthalmus* ya presenta un hígado bien desarrollado. No obstante, la capacidad de los hepatocitos para almacenar lípidos es muy pobre. Entre los 5 y 6 dde, el almacén de lípidos y glicógeno se incrementa notablemente, puesto que los hepatocitos muestran depósitos de lípidos (PAS positivo), principalmente una vez que comenzó la alimentación exógena. El almacenaje lipídico en hepatocitos de *Sander lucioperca* se observó a partir de los 7 dde, dada una activa alimentación, así como en el éxito de la digestión del alimento (Ostaszewska, 2005).

Sin embargo, *C. urophthalmus* también mostró cúmulos importantes de vacuolas lipídicas en enterocitos, tanto en intestino anterior como en el posterior, lo cual va en sinergia con la baja actividad de lipasas, hasta los 43 dde, que es cuando acusa un importante incremento, según López-Ramírez *et al.* (2011). Lo anterior puede sugerir que, el intestino puede actuar como un sitio temporal de almacenaje en un principio (mientras el hígado se diferencia).

No obstante, los estudios histológicos demuestran que, la acumulación de lípidos prosiguió hasta el final del experimento, lo que permite suponer que la asimilación de lípidos en enterocitos, rebasa ampliamente la capacidad de esta especie para digerirlos y almacenarlos en hígado, dada la baja actividad de lipasas, lo que conlleva a una sobresaturación de lípidos en intestino. Esta sobreacumulación de lípidos, según Treviño *et al.* (2010), fue observada también en intestino de larvas de *P. splendida*, lo cual se generó también a partir del cambio de la alimentación mixta por exógena). Por tanto, es posible que el alimento artificial que se empleó durante la alimentación exógena de *C. urophthalmus* (el mismo que para *P. splendida*, a partir de los 15 dde), no incluya el requerimiento óptimo de contenido de lípidos para *C. urophthalmus*. Por consiguiente, es necesario realizar más estudios a este respecto.

Entre los 3 y 4 dde, *C. urophthalmus* observa el comienzo del desarrollo del estómago cardias y la aparición del esfínter pilórico. Estos rasgos de desarrollo precoz estomacal han sido observados también en peces cíclidos como *O. niloticus* (Morrison *et al.*, 2001) y *P. splendida* (Treviño *et al.*, 2010) e incluso, aunque menos precoz, en otros peces de agua dulce como *S. lucioperca* (Ostaszewska, 2005). Es menester hacer notar que, el primer repunte de proteasas ácidas alrededor de los 13 dde en *C. urophthalmus* observado por López-Ramírez *et al.* (2010), coincide con la total diferenciación de glándulas gástricas en un estómago con notorio avance de desarrollo reveladas en el presente estudio (H&E). Este evento relevante fue sincrónico con la aparición de las primeras células mucosas en estómago al 11 dde (5.75 ± 0.36 mm LP), cuyos glicoconjugados neutros (PAS positivo), permiten amortiguar la autodigestión del epitelio estomacal interno, generada por la actividad del ácido hidrociorhídrico y enzimas de las glándulas gástricas (Gisbert *et al.*, 2004).

Estos hechos, refuerzan lo sugerido por López-Ramírez *et al.* (2010) sobre el cambio de alimentación, mixta a alimento inerte (habitación alimentaria). El máximo pico de actividad de proteasas ácidas, reportado por estos autores alrededor del 20 dde, coincide con la observación histológica de un estómago total y plenamente diferenciado al 19 dde (7.02 ± 0.25 mm LP), ya que muestra la regionalización típica del estómago en cardias, fundus y pylorus. Por tanto, es posible sugerir que el tipo de digestión que lleva a cabo *C. urophthalmus* es química, lo que coincide con otro cíclido de agua dulce *P. splendida*, así como su correspondiente diferenciación estomacal en regiones, encontrado por Treviño *et al.* (2010).

Los quistes de *Artemia* no digeridos a nivel de intestino de *C. urophthalmus*, posiblemente debido a la incapacidad de su maquinaria enzimática para hidrolizar la cubierta del quiste, fue también hallado en intestino de *P. splendida*. Esto refleja el hecho de que es menester realizar mejoras en los protocolos de alimentación en la etapa de alimentación mixta que actualmente se llevan a cabo, con miras a optimizar el aspecto económico del cultivo o bien, continuar con más estudios, tales como de expresión molecular de enzimas digestivas durante la ontogenia inicial de *C. urophthalmus*, con el fin de reforzar la información hasta ahora obtenida, con miras a diseñar alimentos inertes, y poder prescindir más del alimento vivo.

La presente investigación concluye que como especie incubadora de sustrato, *C. urophthalmus* presenta un desarrollo morfológico y funcional rápido, sobre todo en lo que concierne a la precoz aparición y diferenciación del estómago, lo que sugiere continuar con los estudios que permitan disponer de más elementos, que conlleven al diseño de un alimento inerte (propio de su fisiología digestiva), con miras a consolidar su ciclo de cultivo.

6. DESARROLLO MORFOFUNCIONAL DEL TRACTO DIGESTIVO DE *Cichlasoma urophthalmus* (II)

6.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Clonar y secuenciar los genes asociados a la actividad de las principales enzimas digestivas de *C. urophthalmus*.

Determinar la expresión génica asociada a la actividad de enzimas digestivas, durante la ontogenia inicial de *C. urophthalmus*.

6.2. MATERIAL Y MÉTODOS

6.2.1. Estudios moleculares

6.2.1.1. Extracción y purificación de RNA

La extracción de RNA a partir de huevos, embriones libres y troncos de larvas de *C. urophthalmus*, se efectuó de acuerdo al protocolo del reactivo Trizol™ (Ambion Life Technologies). La homogenización de muestras fue a razón de 1:10 (muestra:Trizol). La precipitación de RNA tuvo lugar con isopropanol absoluto (1:2 isopropano:Trizol). El lavado de RNA fue con etanol al 75% (1:1 etanol/Trizol) y la resuspensión del RNA fue en 50 µL de agua DEPC (libre de ribonucleasas). Para la purificación de RNA las muestras resuspendidas fueron tratadas con DNAsa, que degrada otros ácidos nucleicos presentes en las muestras. Las muestras con RNA fueron mezcladas con buffer de reacción y DNAsa (8:1:1, respectivamente) e incubadas a temperatura ambiente por 15 min. Las reacciones fueron interrumpidas con EDTA al 25 Mm, calentadas a 65 °C por 10 min, y finalmente conservadas a -80 °C, hasta la síntesis de cDNA.

6.2.1.2. Síntesis de cDNA

Se sintetizó cDNA a partir de RNA de las muestras previamente extraído de *C. urophthalmus*. A 5 µL de RNA se añadió 1 µL de Random primer (oligonucleótido) e incubados a 70 °C por 10 min. La mezcla para una reacción (1X) de RT-PCR fue como sigue: 5.3 µL de agua DEPC, 4.0 µL de buffer 5X ImProm II, 2.4 µL de MgCl₂ 25 mM, 1.0 µL de dNTPs 10 mM, 0.5 µL de RNAsin, 0.8 µL de la enzima

transcriptasa inversa Improm II (Promega) y los 6 μ L de reacción (RNA) previamente incubada. Las condiciones para la reacción de la transcripción inversa (RT) fueron 25 °C por 10 min, 45 °C por 60 min y 90 °C por 5 min. Las muestras de cDNA fueron almacenadas a -20 °C.

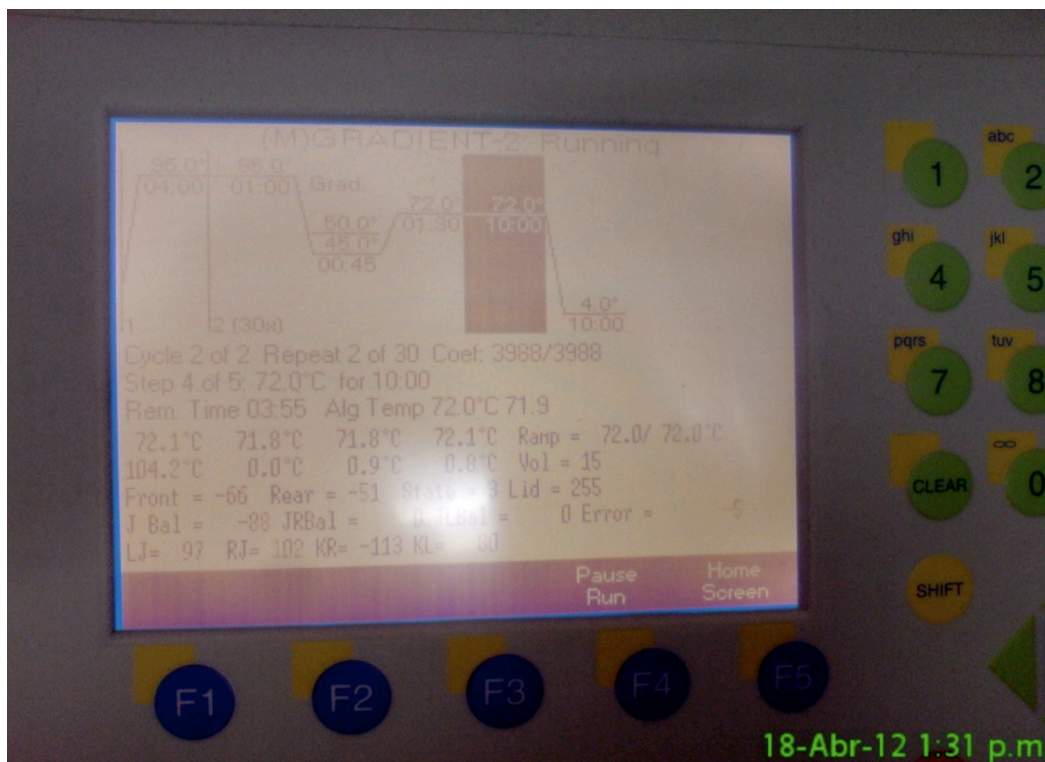


Figura 46. Condiciones de la RT para síntesis de cDNA.

6.2.1.3. Amplificación de cDNA por PCR

Se realizaron pruebas presuntivas de PCR (Polymerase Chain Reaction, por sus siglas en inglés) por gradiente, utilizando oligonucleótidos específicos previamente diseñados, a partir del pez marino *Pleuronectes americanus*, (Murray *et al.*, 2003), para genes de enzimas pancreáticas amilasa (AMI), lipasa (LIP, no dependiente de sales biliares), tripsina (TRIP), enzima citosólica intestinal (CNP), lipasa dependiente de sales biliares (BAL), la intestinal fosfatasa alcalina (FA), leucín-aminopeptidasa (AMP); así como para el gen de referencia EF-1 α (factor de elongación).

Para una reacción de 25 μL , a 1 μL de cDNA se añadieron 16.05 μL de agua mQ, 2.5 μL de buffer PCR 10X, 0.75 μL de MgCl_2 25 mM, 2.0 μL de primer direct, 2.0 μL de primer reverse (ambos 10 mM), 0.5 μL de 10 mM dNTPs y 0.2 μL de Taq DNA polimerasa (5 U μL^{-1}). Las condiciones de PCR por gradiente fueron 95 °C (0.5 min) para la desnaturalización; 52-60 °C (0.75 min) para la alineación y 72 °C (0.5 min) para la extensión. Se efectuaron tantas corridas de PCR hasta la detección de todos los genes buscados.

6.2.1.4. Electroforesis en gel de agarosa

La electroforesis se realizó a 90 V durante 30 min, con un gel de agarosa al 1.5%, en presencia de buffer TAE 1X y bromuro de etidio (0.7 μL para 35 μL de gel). Cada muestra (5 μL) fueron mezcladas con 2 μL de azul de bromofenol y cargadas junto con marcador de peso molecular de 50 pb.

6.2.1.5. Purificación en gel de bandas de electroforesis

Se efectuó purificación en gel de bandas de genes asociados a enzimas digestivas empleando el kit GeneClean[®]Spin y se procedió a la clonación.

6.2.1.6. Clonación y transformación de células

La solución de clonación consistió de 1 μL del plásmido pCR[®]2.1-TOPO[®] (Invitrogen Life Technologies), 1 μL de agua estéril, 1 μL NaCl y 3 μL de productos de PCR (correspondiente a cada banda de los genes de expresión enzimática). La transformación de células competentes de *Escherichia coli* fue a 42 °C por 30 seg, en presencia de medio SOC (250 μL). Los tubos con las distintas mezclas (un tubo por gen de expresión enzimática) se agitaron horizontalmente por 60 min. Las células transformadas con plásmidos inserto fueron sembradas en medio sólido LB con ampicilina (100 mg mL^{-1}), solución X Gal (40 mg mL^{-1}) y solución IPTG 100 mM, a 37 °C toda la noche. Las colonias de color blanco (bacterias con el plásmido inserto) fueron sembradas posteriormente en medio LB líquido con ampicilina (100 mg mL^{-1}).

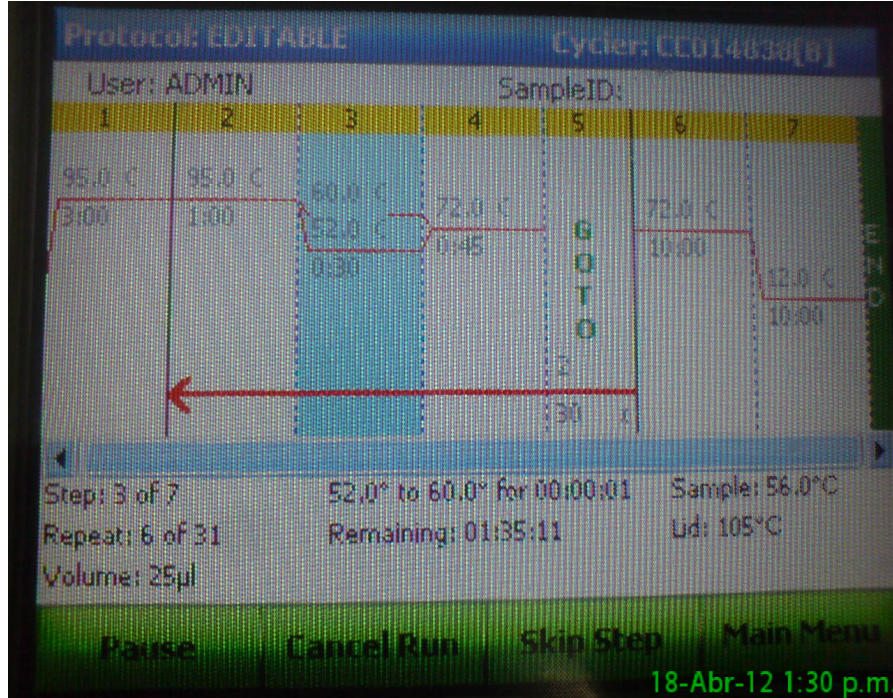


Figura 47. Condiciones de la PCR para liberación de insertos plasmídicos de células *E. coli*.

Los plásmidos clonados (con los genes insertos de expresión) fueron liberados de las células a 95 °C por 10 min mediante lisis de membranas celulares y reamplificados por PCR bajo las mismas condiciones antes descritas.

6.2.1.7. Purificación de plásmidos

La técnica de mini-prep, mediante la cual los plásmidos con los genes insertados fueron purificados, tuvo lugar con el Kit RMP[®], para posteriormente ser secuenciados (Sigma-Aldrich[®]), con miras a diseñar los oligonucleótidos específicos, de genes asociados a las enzimas digestivas de *C. urophthalmus*.

6.3. RESULTADOS

En la figura 48 se puede apreciar el gel teñido con bromuro de etidio, donde se aprecia el corrimiento del RNA extraído de larvas de *C. urophthalmus* a lo largo de su ontogenia inicial. Es posible observar las bandas asociadas al 28 y 18S del RNA ribosomal (en algunas muestras algo tenues) La presencia de RNA de calidad permitió a su vez, la obtención de cDNA de calidad que permitió la búsqueda de genes de enzimas digestivas por PCR. Las bandas electroforéticas de algunos genes asociados a las enzimas digestivas se pudieron observar en los geles de agarosa al 1.5% (figura 49), tras las pruebas PCR presuntivas. Sin embargo, las bandas correspondientes a la enzima citosólica CNP, así como leucín-aminopeptidasa (AMP), resultaron ausentes en todas las corridas de PCR presuntivas y por consiguiente, no fue posible su clonación y secuenciación.

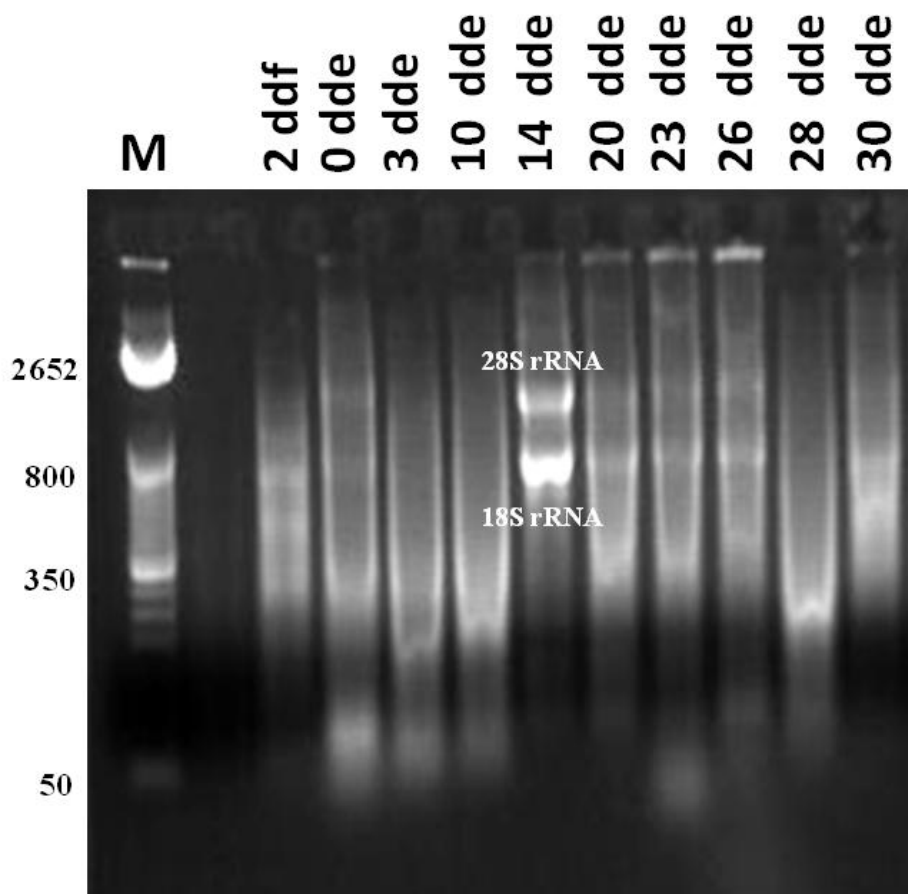


Figura 48. RNA de muestras de larvas de *Cichlasoma urophthalmus* (de 0 ddf a 30 dde). Marcador de peso molecular 50 pb.

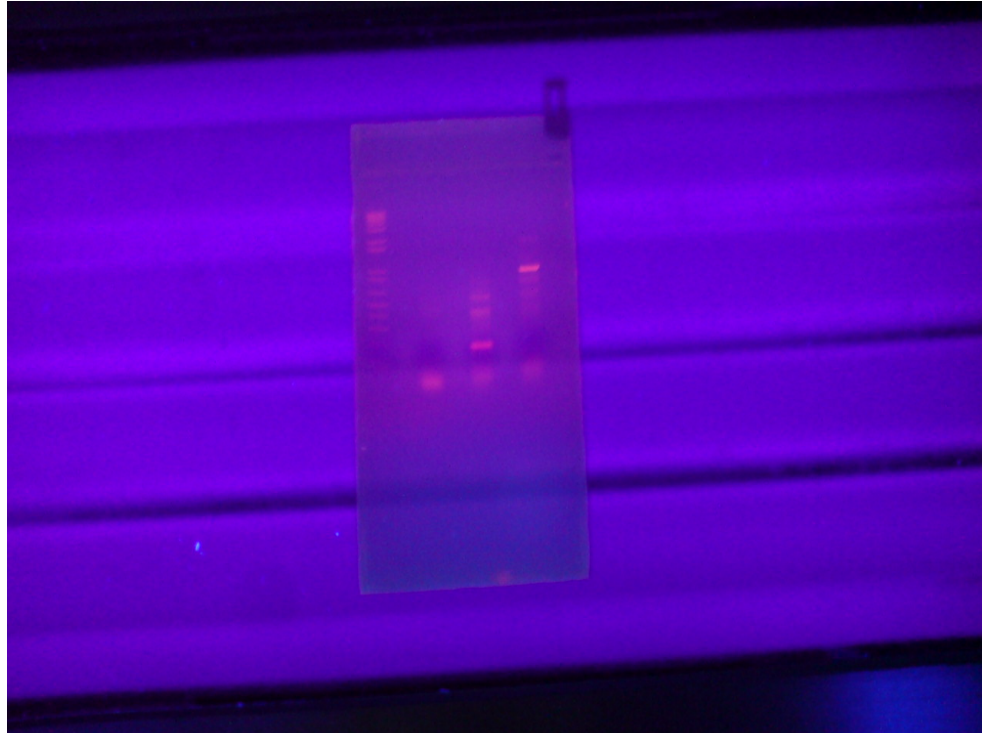


Figura 49. Gel de agarosa con las bandas correspondientes a los genes amplificados.

Los genes de las enzimas digestivas de *C. urophthalmus*, purificados en gel (como productos de PCR) resultaron ser amilasa (AMI), lipasa no dependiente de sales biliares (LIP), tripsina (TRIP), fosfatasa alcalina (FA), lipasa dependiente de sales biliares (BAL), citosólica intestinal (CNP) y el factor de elongación (EF-1 α). Posteriormente, las colonias bacterianas transformadas, que resultaron clonadas con inserto (color blanco, figura 50), por incorporación de los plásmidos asociados a las enzimas digestivas, fueron consideradas para resiembra en medio líquido LB. Las colonias en azul pálido fueron descartadas para resiembra, ya que no incorporaron el inserto, como en el caso del gen de la enzima citosólica CNP.

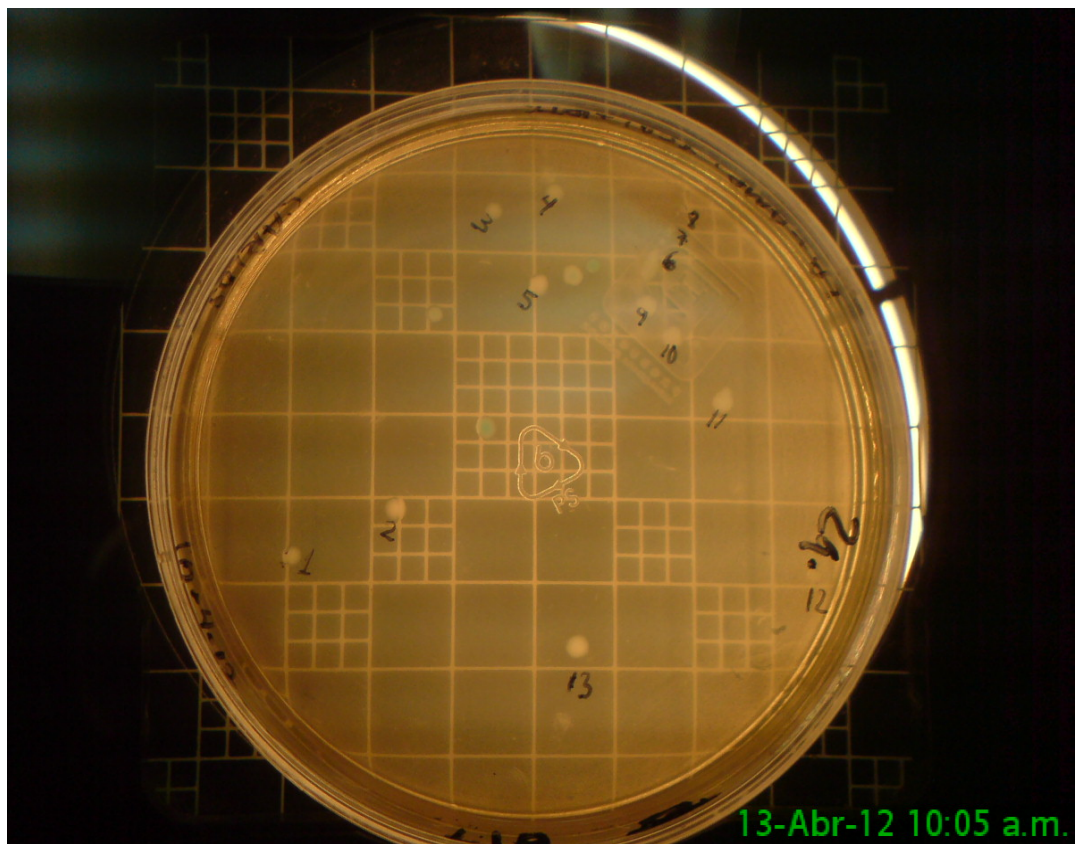


Figura 50. Colonias de células transformadas con (blanco) y sin (azul) insertos.

6.3.1. Amplificación de los genes clonados

Los resultados de los genes clonados (tras la desnaturalización de células bacterianas, durante la PCR), se pueden apreciar en la figura 51. Enzimas pancreáticas amilasa (AMI con tamaño esperado aproximado de 764 pb, carriles 2 y 3), lipasa no dependiente de sales biliares (LIP, que no observó el número de pares de bases esperado (488 pb, carriles 4 y 5), tripsina (TRIP, 735 pb, carriles 6 y 7), fosfatasa alcalina (APH, 1068 pb, ausente, carriles 8 y 9), enzima peptidasa citosólica no específica intestinal (CNP, 992 pb, ausente, carriles 10 y 11), lipasa dependiente de sales biliares (BAL, 386 pb, carriles 12 y 13), así como para el control interno EF-1 α (factor de elongación, 353 pb, carriles 14 y 15). El marcador de peso molecular empleado fue de 100 pb (carril 1).

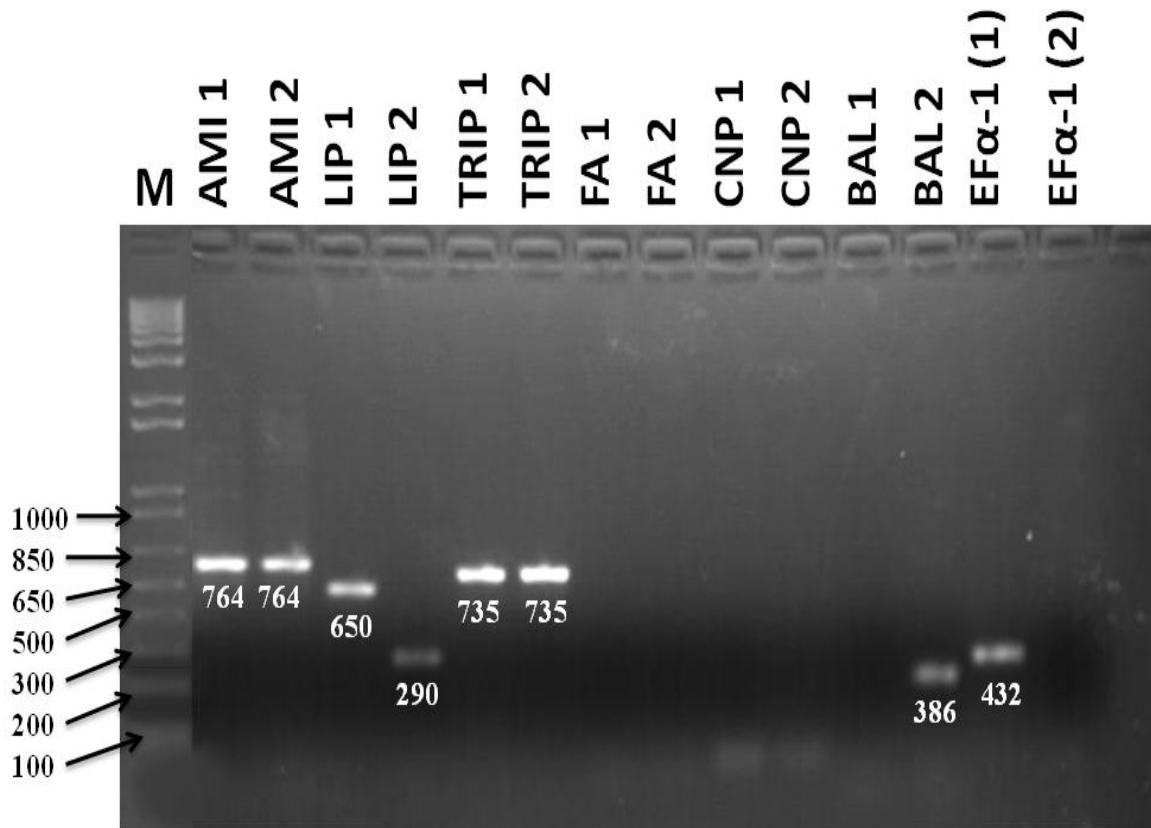


Figura 51. Gel de agarosa con bandas de genes por duplicado: amilasa (AMI), lipasa no dependiente de sales biliares (LIP), tripsina (TRIP), fosfatasa alcalina (FA), peptidasa citosólica intestinal (CNP), lipasa dependiente de sales biliares (BAL) y factor de elongación (EF-1 α). Marcador de peso molecular, 100 pb (M).

En la figura 52 es posible observar las bandas del inserto clonado perteneciente al gen (en duplicado), asociado de la enzima intestinal fosfatasa alcalina (FA, 1068 pb, carril 4), que resultó ausente en el gel de agarosa de la figura 55. Los carriles 2 y 3 corresponden de nueva cuenta a lipasa no dependiente de sales biliares, con una única banda presente (488 pb) y una segunda ausente o no con la cantidad de pares de bases esperada.

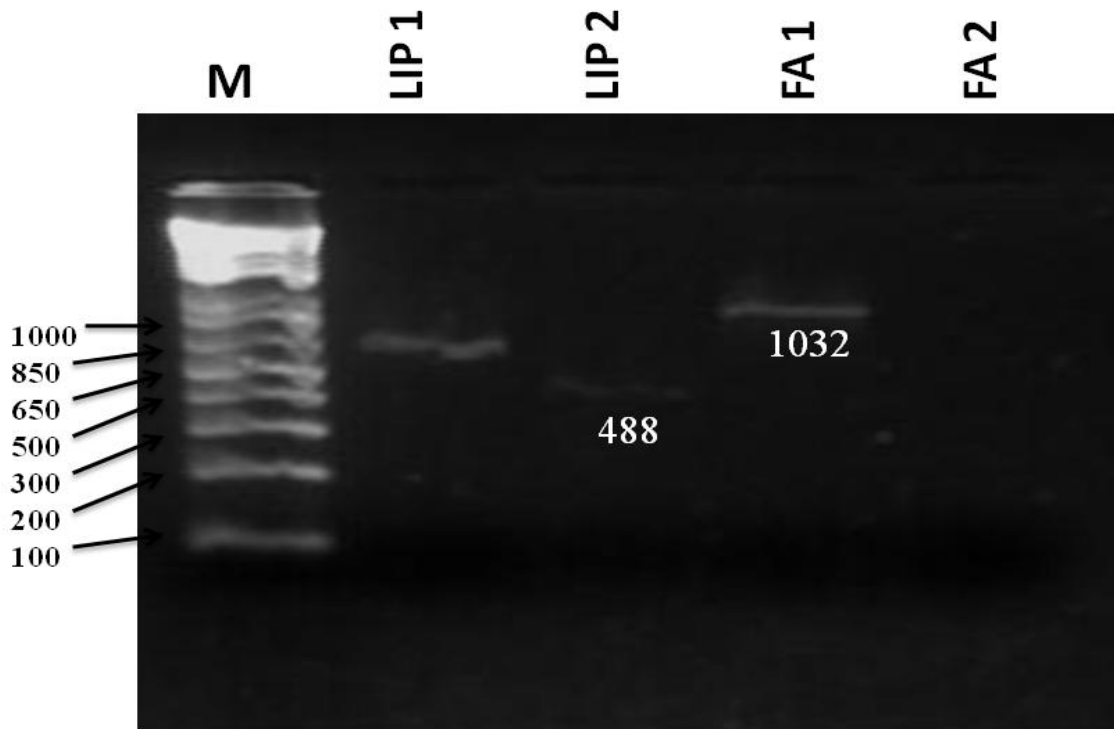


Figura 52. Gel de agarosa con bandas de genes por duplicado: lipasa no dependiente de sales biliares (LIP), fosfatasa alcalina (FA). Marcador de peso molecular, 100 pb (M).

Los resultados en duplicado, referentes a los genes de enzimas digestivas, dentro de sus plásmidos purificados (previos a su secuenciación) se pueden visualizar en la figura 53. Las bandas para amilasa (764 pb, carriles 4 y 5), tripsina (735 pb, carriles 6 y 7) y fosfatasa alcalina (1068 pb, carriles 8 y 9) son claramente visibles; mientras que el plásmido con los genes lipasa dependiente de sales biliares (386 pb) y el factor de elongación EF-1 α (353 pb), solo son visibles en una réplica (carriles 13 y 14, respectivamente). Por otro lado, el plásmido con el gen de la lipasa no dependiente de sales biliares y la enzima peptidasa citosólica intestinal (CNP), no mostraron ninguna banda con los tamaños esperados aproximados (488 pb, carriles 2 y 3 y 992 pb, carriles 10 y 11, respectivamente) y por lo tanto, ambas fueron descartadas para la secuenciación nucleotídica.

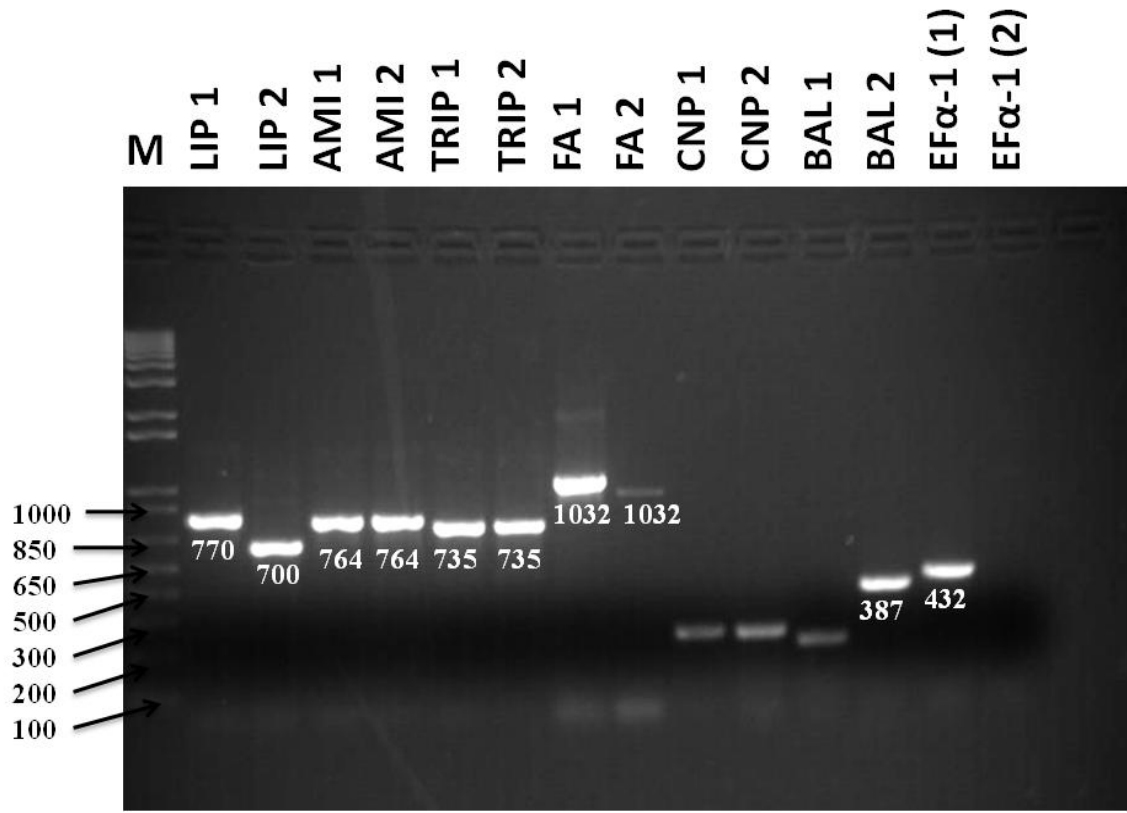




Figura 53. Gel de agarosa con bandas de genes de expresión por duplicado: amilasa (AMI), lipasa no dependiente de sales biliares (LIP), tripsina (TRIP), fosfatasa alcalina (FA), citosólica intestinal (CNP), lipasa dependiente de sales biliares (BAL) y factor de elongación (EF-1 α). Marcador de peso molecular, 100 pb (M).

6.3.2. Secuencias nucleotídicas de enzimas digestivas

La secuenciación nucleotídica, solo fue exitosa para las enzimas α -amilasa (clave HG764460, EMBL, Laboratorio de Biología Molecular Europeo, por sus siglas en inglés), lipasa dependiente de sales biliares, fosfatasa alcalina (clave HG764461, EMBL) y el factor de elongación EF-1 α , utilizado como gen de referencia para cuantificación de la expresión en *C. urophthalmus*. Los respectivos tamaños (en pares de bases), resultaron ser 565, 187, 832 y 232. Las secuencias nucleotídicas de los genes y sus correspondientes secuencias nucleotídicas y sus correspondientes secuencias aminoacídicas, resultaron ser como sigue.

Secuencia nucleotídica y aminoacídica de Amilasa (AMI)

 RT-AMI5'	
TTTGAGTGGCGCTGGGCTGACATTGCTCAAGAGTGTGAACGTTTCCTGGGTCCCAAAGGC	60
F E W R W A D I A Q E C E R F L G P K G	20
TTTGGTGGAGTTCAGATTTCTCTCCAAATGATCACATTCTGGTGAACAGTCCCTGGAGG	120
F G G V Q I S P P N D H I L V N S P W R	40
CCATGGTGGCAGAGATACCAGCCAATCAGCTACGACCTCTGTTGAGATCTGGCAGTGAG	180
P W W Q R Y Q P I S Y D L C S R S G S E	60
 RT-AMI3'	
GCAGAACTGAAGGACATGATCACACGATGCAACAACGTTGGGGTTAAAATCTATGTGGAT	240
A E L K D M I T R C N N V G V K I Y V D	80
GCTGTGATCAACCACATGTGTGGATCTGGTGGTGGATCAGGAACCCACTCTTCATGTGGA	300
A V I N H M C G S G G G S G T H S S C G	100
AACTGGTTTAAATGCTGGCAGTGAAGAGTTCOCAGTGTCCCTTATTCCAAATTGGACTTC	360
N W F N A G S E E F P S V P Y S K L D F	120
AATGACCAAAAATGCAAGACTGGCAGTGGCGAAATTGAGAACTATGGTGACATATATCAG	420
N D Q K C K T G S G E I E N Y G D I Y Q	140
GTAOCTGACTGCCGTCTGGTGGGTCTGCTGGATCTCGCCCTGGAGAAAGATTACGTTAGG	480
V R D C R L V G L L D L A L E K D Y V R	160
GGCAAAGTGAGCGACTACATGAACAAGCTGATTGGCATGGGTGTGGCTGGATTCCGAGTG	540
G K V S D Y M N K L I G M G V A G F R V	180
GATGCCTGCAAGCACATGTGGCCCA	565
D A C K H M W P W P	188

Secuencia nucleotídica y aminoacídica de fosfatasa alcalina (FA)

ACTGTGACGGCTGCTCGTATACTGAAGGGTCAGCTGAATGGACAGAGCGGAGAAGAAACA	60
T V T A A R I L K G Q L N G Q S G E E T	20
CAATTGGAAATGGACAAGTTCOCTTTTGTATCTTTATCCAAGACATAACAACACTAACGCA	120
Q L E M D K F P F V S L S K T Y N T N A	40
CAGGTGCCAGACAGTGCTGGCACAGCCACGGCTTACCTCTGTGGGGTTAAGGCCAACGAG	180
Q V P D S A G T A T A Y L C G V K A N E	60
GGCACAGTGGGCGTGAGTGCAGCTGCTGTCCGATCCCAGTGTAAACACCACACAGGGCAAT	240
G T V G V S A A A V R S Q C N T T Q G N	80
GAGGTCACTCCATCCTCAAATGGGCCAAGGATGCAGGCAAGTCAGTGGGAATAGTGACC	300
E V T S I L K W A K D A G K S V G I V T	100
ACAACGCGCGTCAACCATGCGACTCCAGTGCTGCTTACGCACACTGTGTGGACCGAGAC	360
T T R V N H A T P S A A Y A H C V D R D	120
TGGTACTCCGACAACGAGATGCCAGAAGAAGCGCTGAACGCTGGCTGCAAGGATATCGCC	420
W Y S D N E M P E E A L N A G C K D I A	140
AGGCAACTCTTTGAAACATTGCAACATTGATGTGATTATGGGCGGAGGAAGGAAGTAT	480
R Q L F E N I R N I D V I M G G G R K Y	160
ATGTTCCCCAAGAACCAGTCGGATGTAGAATACCOCTAATGTGCTGAAGCACAGCGGCACA	540
M F P K N Q S D V E Y P N V L K H S G T	180
CGGAAAGATGGAAGAAACCTGGTGCAGGAGTGGACTGAAAGAATGAAGGATAAAAAAGGA	600
R K D G R N L V Q E W T E R M K D K K G	200

→
RT-AM5'

CGTTATGTATGGAACAAGAAGCAGCTCTTATCCCTAAACCCCTAACAATGTGGATTACCTC 660
R Y V W N K K Q L L S L N P N N V D Y L 220

CTGGGTCTCTTTGAACCCGGAGATCTGCCATATGACTTGGAAAGGAACACTGACTCTGAT 720
L G L F E P G D L P Y D L E R N T D S D 240

CCATCACTGACAGAGATGGTGGATGTGGCTATCAAGATCCTGAAGAAGAACCCAAGTGG 780
P S L T E M V D V A I K I L K K N P S G 260

←
RT-AM3'

TTTTACCTGCTTGTAGAGGAAAGGACGAATTGAOCACGGACACCATGAGGGC 832
F Y L L V E E R T N * P R T P * G 277

Secuencia nucleotídica y aminoacídica de lipasa dependiente de sales biliares (BAL)

 <i>RT-AMI5'</i>	
GAC OCTGACAACATCACCATCTTTG GGGAGTCTGCAGGTGGAGTTAGTGTTAGCTTCCAG	60
D P D N I T I F G E S A G G V S V S F Q	20
ACTNTCACTCCACACAATAAAGGGCTCATCAGGAGAGCCATCCCCAGAGTGGGGTGGCA	120
T X T P H N K G L I R R A I P Q S G V A	40
CTTTGCCCTGGGGAATCAACAAAAACCCTCGCAAGTTTGCCGAG GAGATCGCTCTGAAG	180
L C P W G I N K N P R K F A E E I A L K	60
 <i>RT-AMI3'</i>	
GTCAACT	187
V N	62

Factor de elongación (EF α -1)

<p>→ RT-AMI5'</p>		
GCTTCGAGGAAATCACCAAGGA	AGTGAGCGCCTACATCAAGAAGATCGGCTACAACCCCG	60
A S R K S P R K *	A P T S R R S A T T P	20
CTGCCGTTGCCTTCGTCCCATCTCTGGATGGCACGGAGACAAC	ATGTTGGAGACCAGTG	120
L P L P S S P S L D G T E T T C W R P V		40
<p>← RT-AMI3'</p>		
ACAAGGTGAGGACTTAAACCATTTCAGTGATCCACTTGCTAATTTGACTGAACGTGGACT		180
T R * G L K P F S V S T C * F D * T W T		60
AAACTGTCACITTTGATTTCTGTAGATGAGCTGGTTCAAGGGATGGAAGGTTG		232
K L S L * F L * M S W F K G W K V		77

Las secuencias y parámetros de los cebadores diseñados, y correspondientes a las enzimas digestivas de *C. urophthalmus* secuenciadas, se pueden mostrar en la tabla 2. La posición de inicio en dirección 5'- 3', comprende el número de nucleótido a partir del cual, inicia el fragmento amplificado de nucleótidos del cebador, de longitud 22 pares de bases (pb), dentro de la secuencia del gen de la enzima digestiva, según sea el caso. Por ejemplo, para el gen que codifica para α -amilasa, la secuencia del cebador inicia a partir del nucleótido número 21, de la secuencia nucleotídica del gen.

Tabla 2. Secuencias y parámetros de los cebadores utilizados en los ensayos de PCR en tiempo real.

Cebador	Secuencia 5'>3'	Tm (°C)	Posición de inicio	Longitud del cebador (pb)
AMI F	CATTGCTCAAGAGTGTGAACGT	64.2	21	22
AMI R	GTGAGGCAGAACTGAAGGACAT	64.5	197	22
FA F	GGATTACCTCCTGGTCTCTTT	63.3	651	22
FA R	TAGAGGAAAGGACGAAATTGACC	63.1	815	22
BAL F	CCTGACAACATCACCATCTTTG	64.3	4	22
BAL R	AGTTGACCTTCAGAGCGATCTC	63.8	187	22
EF α -1 F	GCTTCGAGGAAATCACCAAGGA	68.4	1	22
EF α -1 R	ATGTTGGAGACCAGTGACAAGG	65.2	105	22

AMI F = Amilasa forward, AMI R = Amilasa reverse, FA F, Fosfatasa alcalina forward, FA R = Fosfatasa alcalina reverse, BAL F = Lipasa dependiente de sales biliares forward, BAL R = Lipasa dependiente de sales biliares reverse, EF-1 α F = Factor de elongación forward, EF-1 α R = Factor de elongación Reverse, Tm = Temperatura de fusión de fragmentos amplificadas.

6.3.4. Análisis de la distancia filogenética entre secuencias

En la figura 54, se puede observar el árbol filogenético de las secuencias nucleotídicas de la enzima digestiva α -amilasa de *C. urophthalmus* (presente en su ontogenia inicial); y sus análogas correspondientes a *O. niloticus*, *Centropomus undecimalis*, *D. labrax* y *Lates calcalifer*. El árbol filogenético se construyó con base al modelo del vecino más cercano. Es posible estimar la distancia filogenética, a través del segmento dado en la escala, lo que hace posible deducir que *L. calcalifer* es la especie más distanciada respecto a *C. urophthalmus*. Para el caso de la distancia comprendida entre *C. urophthalmus* y *O. niloticus*, el diagrama muestra que éste último es el vecino más cercano a *C. urophthalmus* lo cual, se confirma con el porcentaje de similitud entre secuencias nucleotídicas del 90.0% entre ambas. Este alto nivel de similitud, confirma la presencia de zonas altamente conservadas, en la zona del DNA que codifica para la α -amilasa.

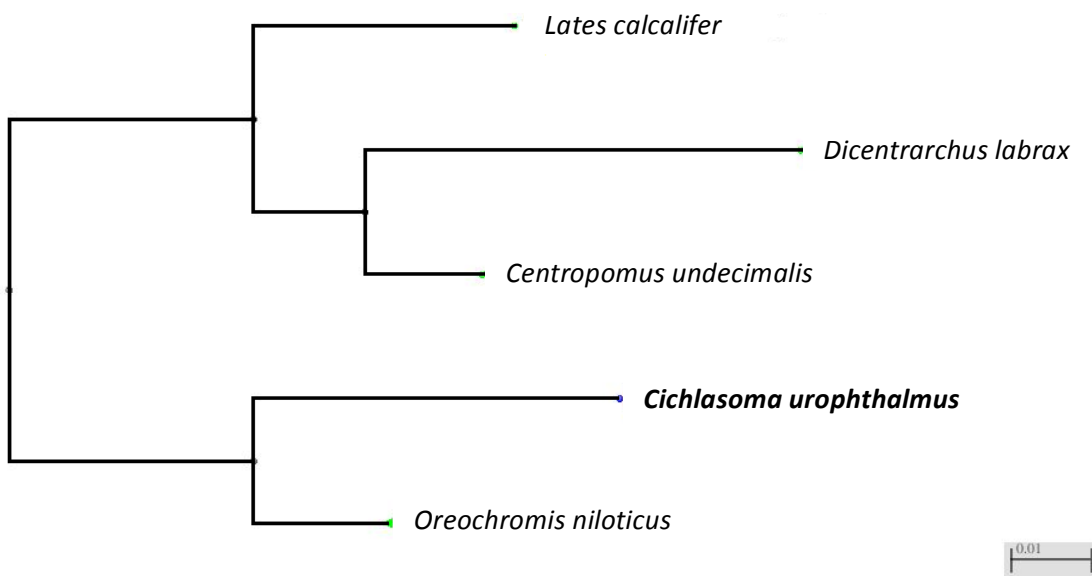


Figura 54. Árbol filogenético de las secuencias nucleotídicas de α -amilasa, presente en la ontogenia inicial de *Cichlasoma urophthalmus* y vecinos piscícolas más cercanos.

En la figura 55, se puede apreciar el árbol filogenético, con las secuencias nucleotídicas de la enzima digestiva fosfatasa alcalina de *C. urophthalmus* (presente en su ontogenia inicial); y sus análogos correspondientes a *O. niloticus*, *Mailandia zebra*, *D. labrax*, *L. calcalifer*, *S. aurata* y *Mycteroperca rosacea*. En este caso *M. rosacea* es la de mayor distancia con relación a *C. urophthalmus*; mientras que las más cercanas a ésta son *M. zebra* y *O. niloticus* (éste último con un índice de similitud de 90.0%), lo que confirma la presencia de zonas altamente conservadas en el ADN del gen que codifica para fosfatasa alcalina.

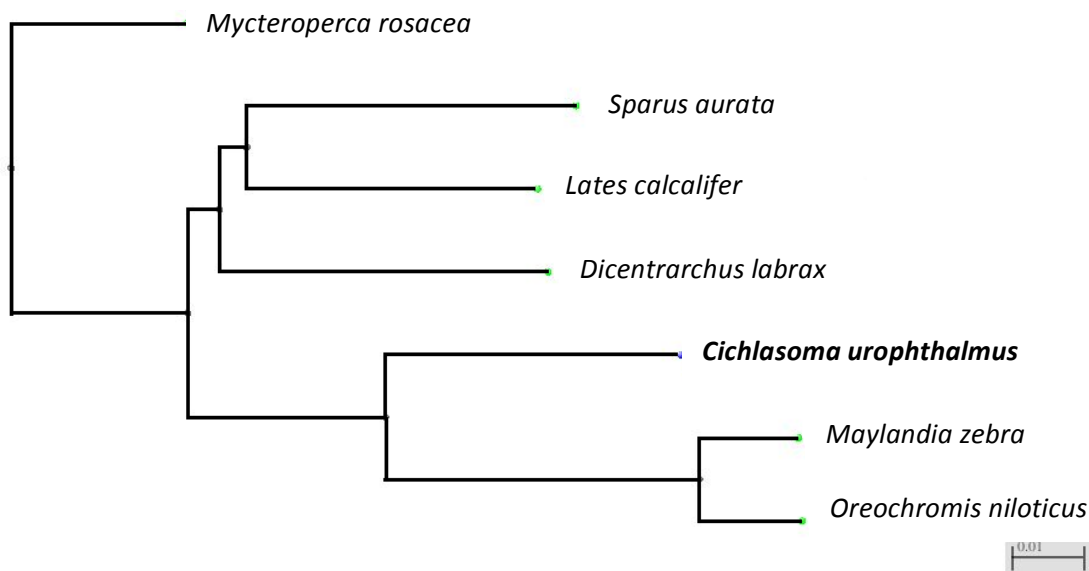


Figura 55. Árbol filogenético de las secuencias nucleotídicas de fosfatasa alcalina, presente en la ontogenia inicial de *Cichlasoma urophthalmus* y vecinos piscícolas más cercanos.

En la figura 56, se presenta el árbol filogenético con las secuencias nucleotídicas de la enzima digestiva lipasa dependiente de sales biliares, en *C. urophthalmus* (presente en su ontogenia inicial); y sus análogas correspondientes a *O. niloticus*, *M. zebra* y *Takifugu rubripes*. Éste último representa la especie de mayor distancia filogenética y *M. zebra* junto con *O. niloticus*, las más cercanas a *C. urophthalmus* (con un índice de similitud de 91.0% entre estas últimas), lo que confirma la presencia de zonas altamente conservadas en el ADN del gen que codifica para lipasa dependiente de sales biliares.

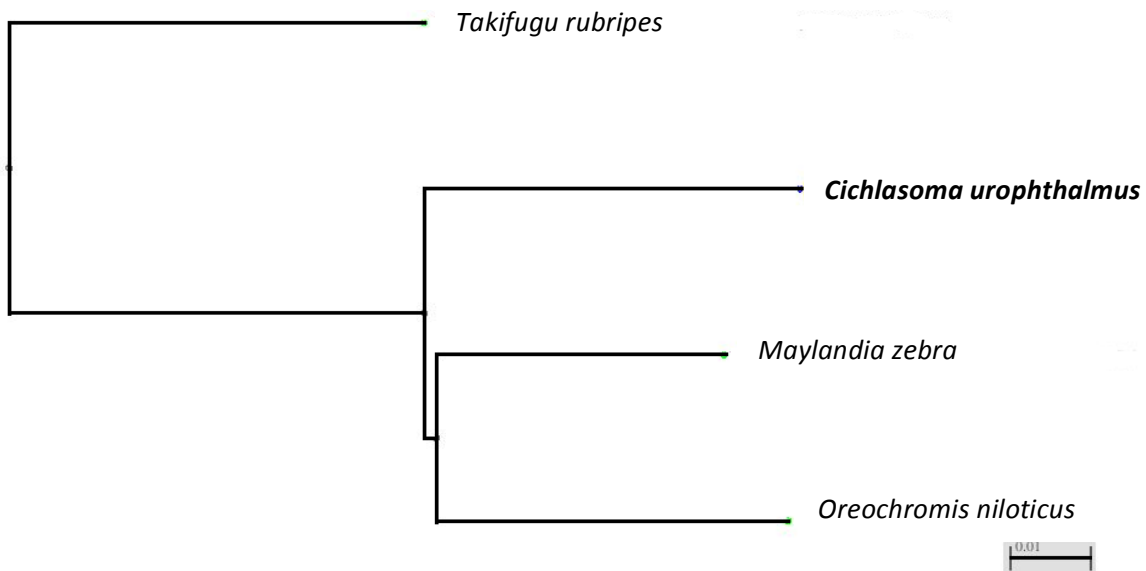


Figura 56. Árbol filogenético con las secuencias nucleotídicas de lipasa dependiente de sales biliares, presente en la ontogenia inicial de *Cichlasoma urophthalmus* y vecinos piscícolas más cercanos.

En la figura 57, se puede visualizar el árbol filogenético con las secuencias nucleotídicas del factor de elongación EF-1 α , de expresión permanente en *C. urophthalmus* y sus análogas correspondientes a *O. niloticus*, *S. ocellatus*, *S. aurata*, *L. calcalifer*, *Perca fluviatilis* y *D. labrax*. El diagrama muestra que ésta última es la especie mayor distanciada; mientras que *O. niloticus* resultó ser la más cercana a *C. urophthalmus*. Paralelamente, el índice de similitud entre las secuencias nucleotídicas entre estas últimas es de 93%, lo que confirma la presencia de zonas altamente conservadas en el DNA del gen que codifica para el factor de elongación EF-1 α .

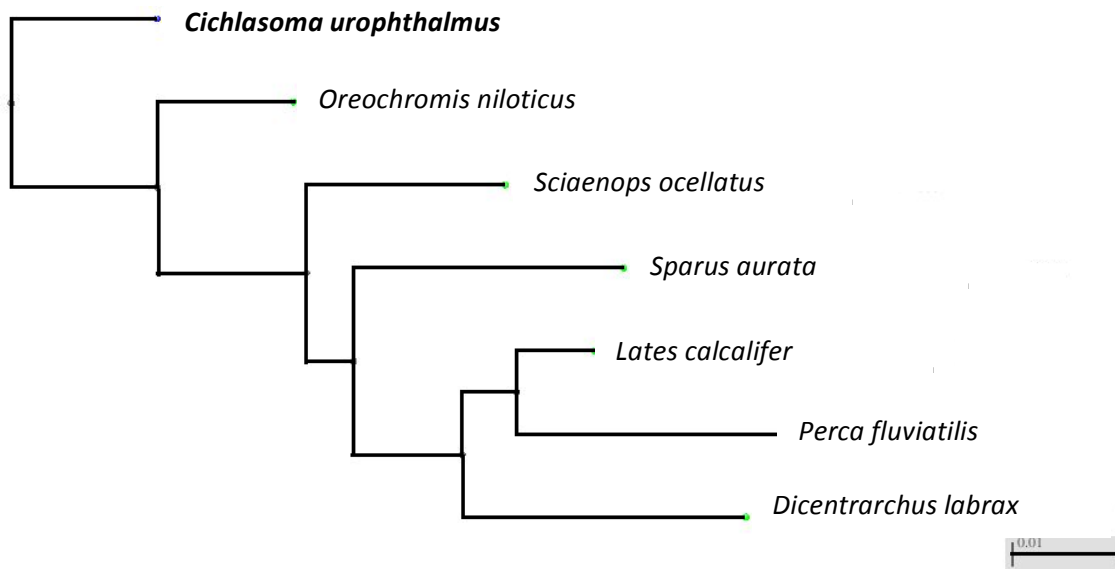


Figura 57. Árbol filogenético con las secuencias nucleotídicas del factor de elongación EF-1 α , presente en la ontogenia inicial de *Cichlasoma urophthalmus* y vecinos piscícolas más cercanos.

6.3.5. Curvas de calibración

En la figura 58, se puede observar la curva de calibración $Ct = -2,967 \text{ Log}[cDNA] + 13,6$ (1), referente al gen asociado al gen de referencia, factor de elongación EF-1 α . Una pendiente en torno a -3.32 o un incremento 10 veces el amplicón por cada 3.32 ciclos, equivale a un valor muy cercano a 100% de eficiencia de la reacción de PCR. La curva de calibración para el gen control interno EF-1 α arrojó una pendiente de -2.967, con su correspondiente valor de eficiencia de PCR de 117.3%. Es posible observar también un coeficiente de determinación R^2 de 0.979.

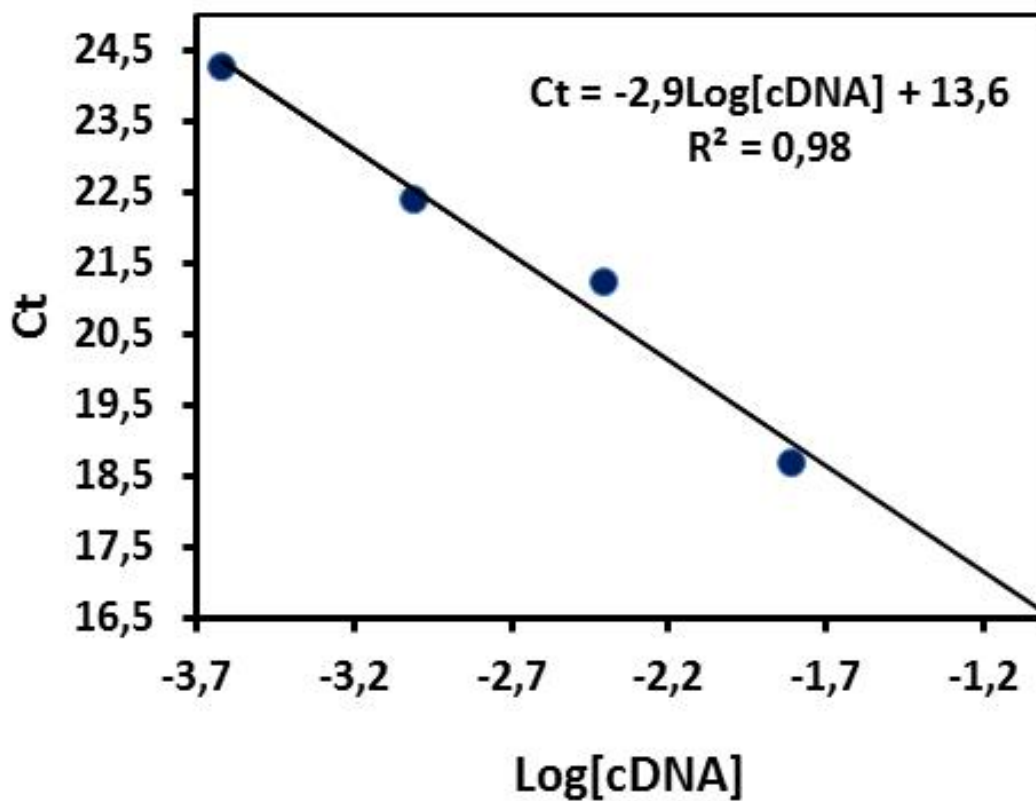


Figura 58. Curva de calibración Ct vs logaritmo (base 10) de la concentración de cDNA del gen de referencia EF-1 α .

En la figura 59, se puede apreciar la curva de calibración $Ct = -2.717 \text{ Log}[cDNA] + 18.95$ (2), referente al gen asociado a lipasa dependiente de sales biliares. Es posible visualizar una pendiente de -2.717, que corresponde a un 133.4% de eficiencia de la reacción PCR. Se puede apreciar también un coeficiente de determinación R^2 de 0.983.

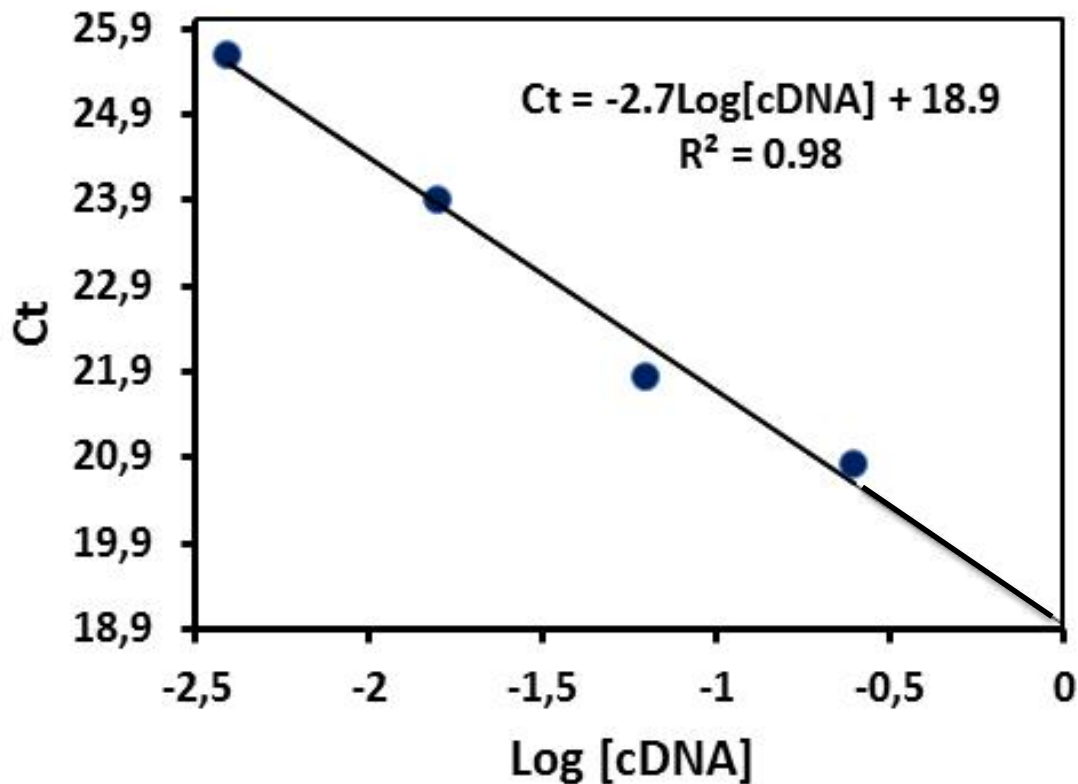


Figura 59. Curva de calibración Ct vs logaritmo (base 10) de la concentración de cDNA del gen asociado a lipasa dependiente de sales biliares.

En la figura 60 se puede apreciar la curva de calibración $Ct = -2.624 \text{ Log}[cDNA] + 21.08$ (3), referente al gen asociado a fosfatasa alcalina. Es posible visualizar una pendiente de -2.624, que corresponde a un 140.5% de eficiencia de la reacción PCR. Se puede apreciar también un coeficiente de determinación R^2 de 0.988.

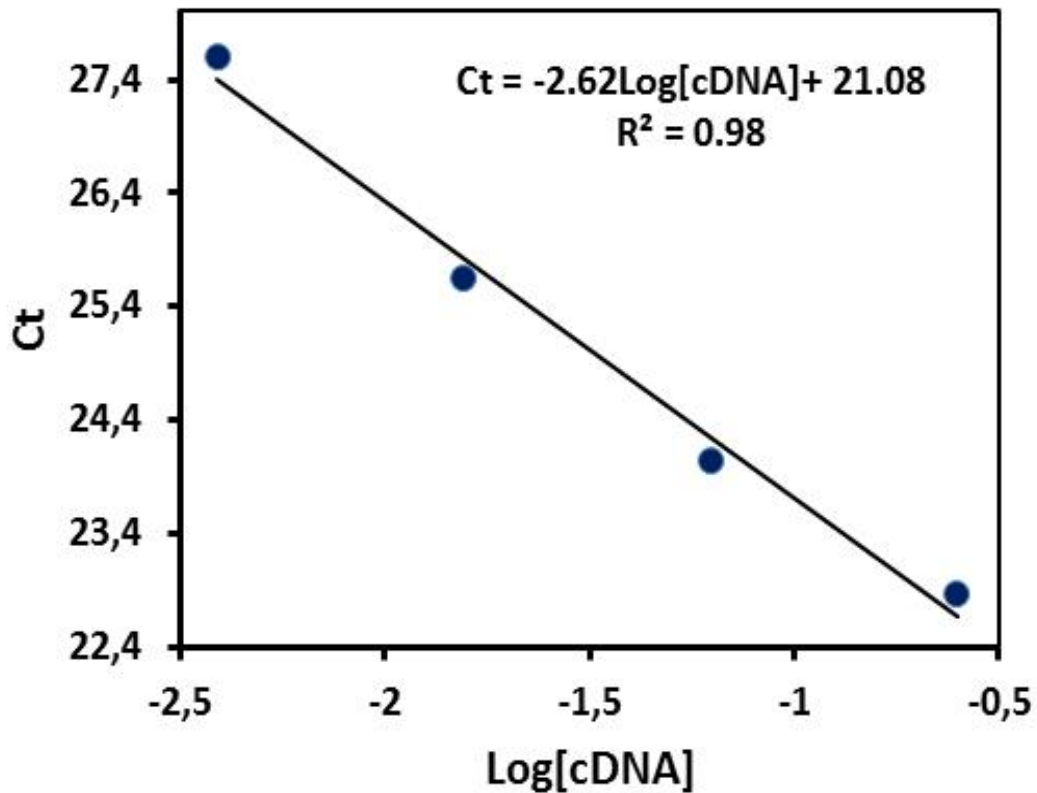


Figura 60. Curva de calibración Ct vs logaritmo (base 10) de la concentración de cDNA del gen asociado a fosfatasa alcalina.

En la figura 61, se puede observar la curva de calibración $Ct = -2.909 \text{ Log}[cDNA] + 19.51$ (4), referente al gen asociado a amilasa. Se puede visualizar una pendiente de -2.909, que corresponde a un 120.7% de eficiencia de la reacción PCR. Se puede visualizar también un coeficiente de determinación R^2 de 0.997.

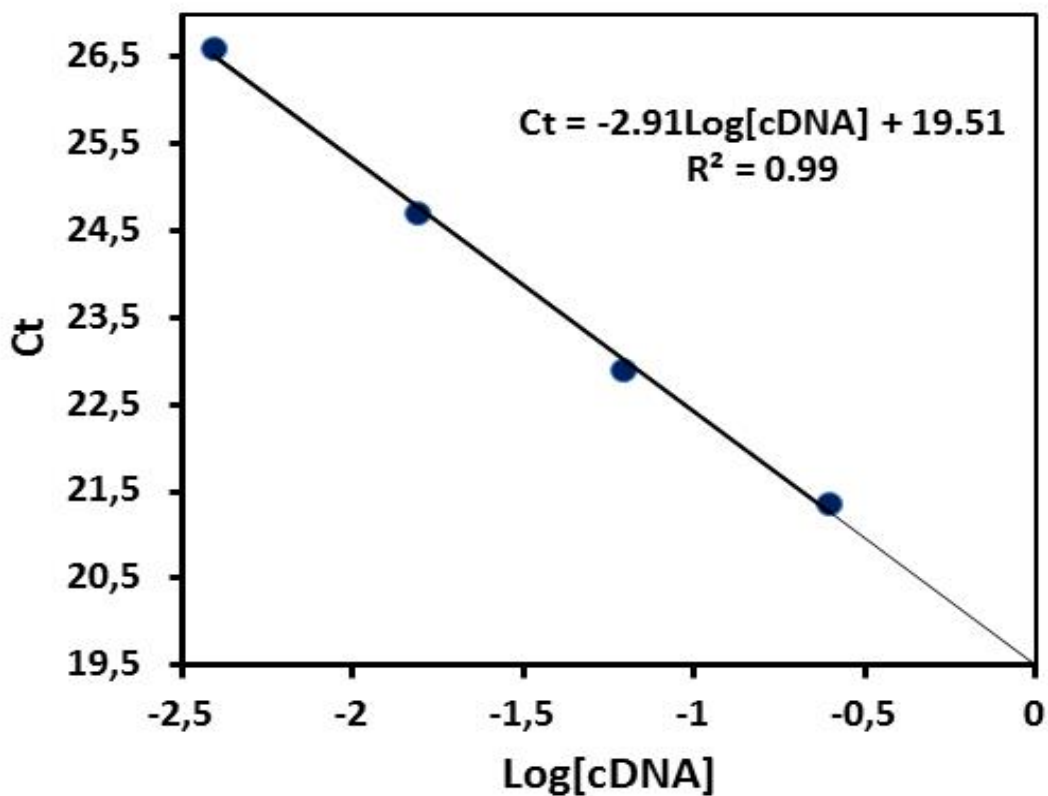


Figura 61. Curva de calibración Ct vs logaritmo (base 10) de la concentración de cDNA del gen asociado a amilasa.

6.3.6. Expresión relativa con PCR en tiempo real

Por otro lado, una vez obtenidos los cebadores propios de enzimas digestivas de *C. urophthalmus*, fue posible realizar ensayos de PCR en tiempo real, cuyos resultados muestran que la expresión génica relativa para las enzimas pancreáticas α -amilasa y lipasa dependiente de sales biliares, no observan una supresión génica respecto al tiempo, especialmente ésta última, donde se observa un incremento sostenido de expresión génica relativa, hasta el final de los 30 dde. No obstante, la enzima intestinal fosfatasa alcalina si observa una clara represión génica (figura 62).

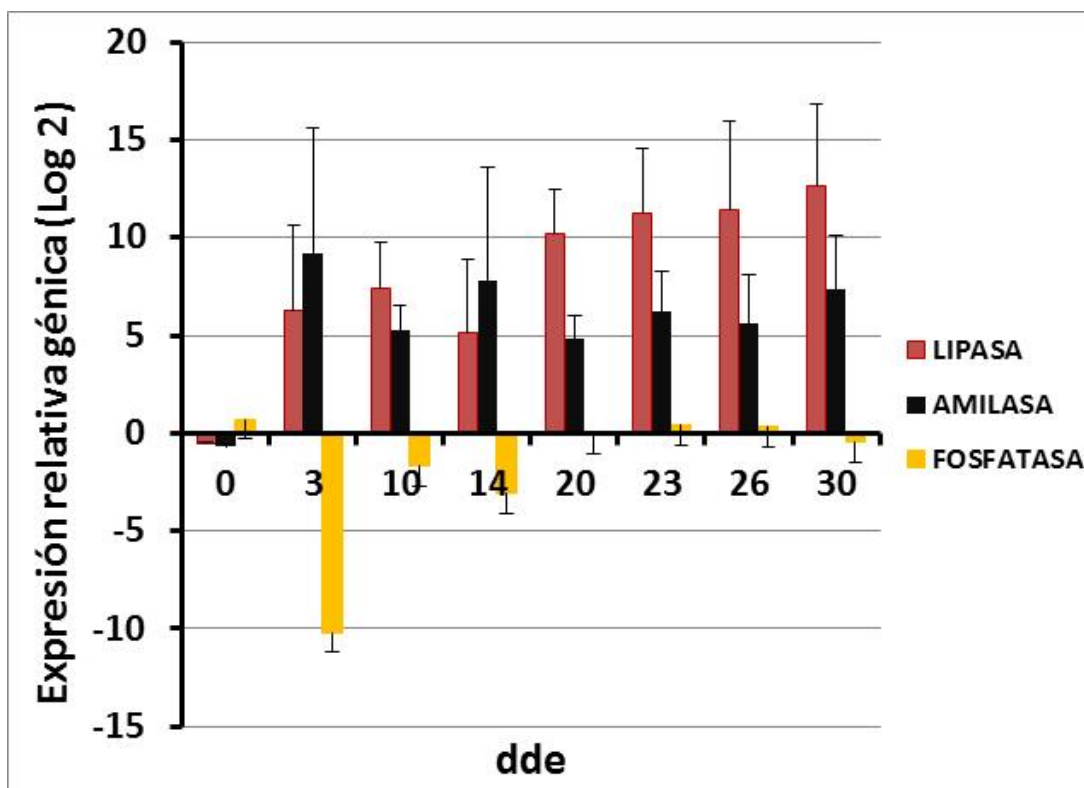


Figura 62. Expresión relativa génica de enzimas digestivas (LIPASA: lipasa dependiente de sales biliares, AMILASA: α -amilasa y FOSFATASA: fosfatasa alcalina), durante la ontogenia inicial de *Cichlasoma urophthalmus*.

Paralelamente, un análisis de correlación entre la expresión génica relativa de α -amilasa versus su actividad específica (reportada por López-Ramírez *et al.* 2010) a lo largo de 30 dde en *C. urophthalmus*, arrojó una asociación débilmente positiva ($r = 0.18$). El mismo caso ocurre entre la expresión génica relativa de fosfatasa alcalina y su actividad específica ($r = 0.26$). Por consiguiente, la correlación entre la actividad específica y la expresión génica relativa de ambas enzimas es casi nula ($p > 0.05$). Sin embargo, la actividad específica de α -amilasa experimenta incrementos importantes a partir del día 19 hasta los 30 dde; siendo el incremento de la expresión génica relativa de esta enzima más moderado (que su actividad) en el mismo período.

6.4. DISCUSIÓN

En los peces, la enzima α -amilasa se sintetiza en las células pancreáticas, y juega un rol de hidrólisis de enlaces glicosídicos, lo cual permite la formación de azúcares simples a partir de otros de estructura más compleja, como el almidón y el glucógeno (éste último, constituye un reservorio energético en los peces). Los estudios moleculares obtenidos en la presente investigación permitieron corroborar la expresión de α -amilasa en embriones libres de *C. urophthalmus* a los 3 dde, lo cual supone que los embriones libres son capaces de hidrolizar el glicógeno acumulado en el hígado, con la disponibilidad energética del eleuteroembrión, todavía a partir de fuentes alimentarias endógenas.

Algunos autores, sugieren la funcionalidad del páncreas después de la primera alimentación exógena en especies como *Diplodus sargus* (Ortíz-Delgado *et al.*, 2003), *S. aurata* (Sarasquete *et al.*, 1995); y pocas otras especies en la eclosión misma *Melanogrammus aeglefinus* (Hamlin *et al.*, 2000), lo que puede ser un indicador de que *C. urophthalmus* es una especie de rápido desarrollo digestivo. Según Darías *et al.* (2006), se desconoce la función del páncreas en los primeros días después de la eclosión. Sin embargo, Cahu & Zambonino-Infante (1994) la actividad de α -amilasa es un indicador de maduración pancreática. Lo anterior, fue confirmado por los estudios histológicos, que muestran un páncreas con un alto grado de diferenciación tras la eclosión de *C. urophthalmus*.

Los estudios moleculares permiten resaltar el hecho de que las lipasas dependientes de sales biliares (cuya función es degradar lípidos de estructura compleja), se pueda expresar muy al inicio de la ontogenia inicial de *C. urophthalmus* (3 dde). Es común que este papel sea llevado a cabo por lipasas que no dependen de sales biliares para activarse (como las estererasas) en la ontogenia muy incipiente de los peces. En las fases iniciales de la ontogenia de los peces, el catabolismo de los lípidos es mediado por las estererasas y más tarde por lipasas verdaderas, una vez que el tracto digestivo se ha desarrollado por completo (López-Ramírez *et al.*, 2010).

No obstante, estos autores revelaron que la actividad de lipasas dependientes de sales biliares experimentó un incremento abrupto hasta los 40 dde en esta especie. La aparición inicial de lipasas dependientes de sales biliares pudiera sugerir un desarrollo precoz del páncreas, lo cual se puede corroborar también con la expresión también inicial (3 dde) de amilasa en *C. urophthalmus*. La expresión génica de esta lipasa puede implicar que *C. urophthalmus* utilice sustratos lipídicos (incluso de estructura molecular compleja que, pudieran estar presentes en el saco vitelino) en sus fases iniciales de desarrollo y posteriormente haya hecho uso de sustratos proteínicos, sobre todo durante la transición de suministro de alimento vivo a alimento artificial. Semejante patrón también fue observado durante el desarrollo ontogénico de *Chirostoma estor* (Toledo-Cuevas *et al.*, 2011), un pez dulceacuícola del centro de México.

El desarrollo precoz del páncreas en esta especie, también se pudo demostrar con los estudios histológicos realizados en la presente investigación, ya que se mostró un páncreas endocrino y exocrino bien diferenciados, a los 4 dde. Adicionalmente, los estudios moleculares muestran en general una tendencia ascendente de la expresión de lipasa dependiente de sales biliares, en sincronía con un hígado desarrollado, con presencia de abundantes lípidos a nivel de los hepatocitos, principalmente hacia los 7 dde en adelante, lo que representa una disponibilidad importante de lípidos para las larvas en desarrollo.

Como se mencionaba líneas arriba, la enzima α -amilasa muestra una importante expresión génica a partir de los 3 dde, manteniéndose prácticamente en ascenso hasta los 30 dde. Paralelamente, dado que la dependencia de fuentes alimentarias endógenas concluye con la absorción del saco vitelino en *C. urophthalmus* (5-6 dde), entonces en la expresión inicial en esta especie pueden verse involucrados mecanismos programados, más que mecanismos de estímulo externo (de los 3 dde a la absorción del saco vitelino), como sugieren Darías *et al.* (2006) con el pez marino *P. pagrus*, donde los cambios en la actividad de esta enzima puedan deberse a factores transcripcionales dentro de una programación genética, durante los primeros pasos del período larvario.

Ma *et al.* (2001), reportaron expresión del gen amilasa a la eclosión de *L. calcarifer* con implicaciones de mecanismos que no son propios de estímulos externos como la dieta. Sin embargo, es meritorio también hacer notar un incremento sostenido de la expresión génica de α -amilasa a partir de los 20 dde, que se torna muy acentuado con relación a los días anteriores a partir de la eclosión de *C. urophthalmus*. Tal incremento de expresión amilásica, resultó acorde con la presencia de un estómago estructural y funcionalmente diferenciados (incluyendo la presencia de glándulas gástricas funcionales), lo cual fue sincrónico con un páncreas plenamente funcional.

Ambos eventos son indicadores de maduración del sistema digestivo (Darias *et al.*, 2006). No obstante, la mayor parte de los estudios que han abordado los patrones de la amilásica desde la eclosión a los 30 dde, reportan decrementos importantes de esta enzima pancreática en estados de desarrollo más tardíos, después de la eclosión. Ma *et al.* (2004) revelaron incrementos de la expresión de α -amilasa en *L. calcarifer* hasta los 5 dde y abatimientos considerables alrededor de los 30 dde. Douglas *et al.* (2000) detectaron decrementos de α -amilasa a partir de la metamorfosis de *P. americanus*. Peres *et al.* (1998) revelaron que un decremento de amilasa a partir de los 29 dde en *D. labrax*, responde a eventos genéticos programados, durante el desarrollo larvario.

No obstante, a pesar del rápido desarrollo morfofuncional de *C. urophthalmus*, en la presente investigación se determinó que no necesariamente tiene lugar un decremento de la expresión génica de α -amilasa hacia los 30 dde en esta especie. Por el contrario, los resultados muestran un leve incremento de esta expresión génica a esta edad, lo cual también se vio acompañado de una actividad específica de α -amilasa importante, desde los 20 dde en *C. urophthalmus* (López-Ramírez *et al.*, 2010). Lo anterior permite suponer que un incremento de α -amilasa en esta especie (con un sistema digestivo plenamente diferenciado), no resultaría ser un indicador molecular útil de maduración pancreática, hacia los 30 dde.

No existió correlación alguna entre los niveles de expresión génica relativa. No obstante, la actividad específica de α -amilasa experimenta incrementos importantes a partir del día 19 hasta los 30 dde; siendo el incremento de la expresión génica relativa de esta enzima más moderado (que su actividad) en el mismo período. Entonces, mientras los resultados moleculares muestran una tendencia creciente de la expresión génica de lipasa dependiente de sales biliares, hacia los 30 dde en *C. urophthalmus*, López-Ramírez *et al.* (2010) determinaron una actividad específica baja en esta enzima pancreática, desde la eclosión hasta aproximadamente los 45 dde (donde tiene lugar un repunte importante de actividad de esta enzima), y no a los 30 dde.

Lo anterior puede indicar que no necesariamente la expresión génica de una enzima en particular pudiera presentar una relación directamente proporcional a su actividad específica, lo que permite asumir el hecho de que puedan entrar en juego otro tipo de factores como la dieta y las condiciones de cultivo y que afecten su actividad específica.

En otro orden de ideas, el análisis del vecino más cercano, demuestra la presencia de zonas altamente conservadas en el DNA, especialmente las que contienen los genes que codifican para la síntesis de enzimas digestivas en *C. urophthalmus*. Lo anterior debido al alto grado de similitud, entre secuencias nucleotídicas de *C. urophthalmus* y especies como *O. niloticus* y *M. zebra*.

7. ESTUDIOS BIOQUÍMICOS EN JUVENILES

7.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar la actividad específica de enzimas digestivas de *C. urophthalmus* (proteasas ácidas, proteasas alcalinas y α -amilasa).

Determinar el efecto del pH, la temperatura e inhibidores (generales y específicos), sobre la actividad y estabilidad de proteasas.

Caracterizar las enzimas digestivas de *C. urophthalmus* mediante ensayos electroforéticos.

7.2. MATERIALES Y MÉTODOS

7.2.1. Reproducción, larvicultivo y obtención de juveniles

Para este estudio los juveniles (5.73 ± 1.43 g, peso húmedo, $n = 53$) fueron obtenidos a partir del lote de reproductores de las instalaciones de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Laboratorio de Acuicultura Tropical de la División Académica de Ciencias Biológicas (DACBIOL UJAT) Tabasco, México. En estas mismas condiciones, los juveniles fueron mantenidos en un sistema de recirculación de agua en tanques de 1.7 m^3 durante un periodo de dos semanas antes de su procesamiento. Los parámetros de la calidad del agua fueron medidos diariamente, se mantuvieron en $28.3 \pm 0.8^\circ\text{C}$ de temperatura, $5.89 \pm 0.48 \text{ mg l}^{-1}$ de oxígeno disuelto (YSI 55, California, USA) y 7.35 ± 0.11 de pH (Denver Instrument UB-10, Denver, Colorado, USA), durante el confinamiento de juveniles.

7.2.2. Obtención de extractos multienzimáticos

Los juveniles *C. urophthalmus* fueron disectados en frío, con el fin de aislar estómagos e intestinos de la masa visceral. Se obtuvo el peso húmedo por individuo, de los órganos con una balanza analítica (Denver Instrument APX-200, resolución 0.1 mg). Los tejidos fueron homogenizados en un macerador eléctrico (Ultra Turrax[®] Ika T18 Basic), a razón de 1:5 (tejido/agua destilada, p/v). Las mezclas fueron centrifugadas a 14,000 rpm, 4°C por 30 min, en una centrifuga (Eppendorf 5810-R). Se recuperaron los sobrenadantes y se almacenaron a -20°C , hasta su análisis.

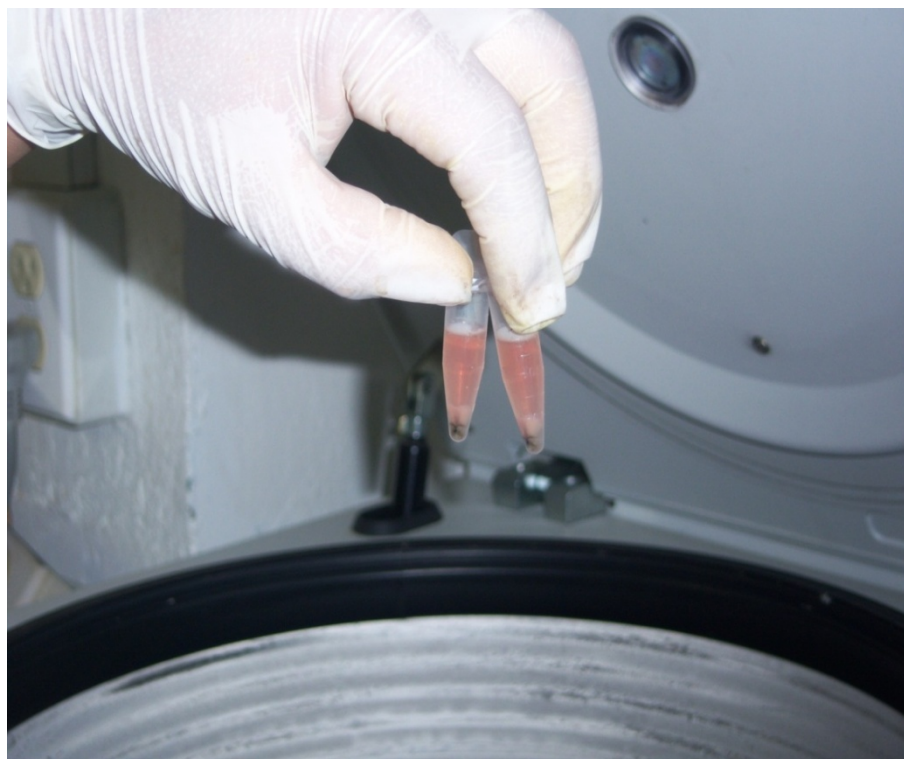


Figura 63. Extractos multienzimáticos de *Cichlasoma urophthalmus*.

7.2.3. Análisis bioquímicos

La concentración de proteína soluble en extractos de estómago e intestino de *C. urophthalmus*, fue realizada según Bradford (1976), empleando una solución madre de ovoalbúmina bovina de 1 mg ml^{-1} como estándar de referencia. Con el fin de conocer la cantidad de unidades de enzimas en el extracto multienzimático de estómago, se hizo uso del método de Anson (1938), con las modificaciones que siguen. Se formó un complejo a partir de 1 ml de hemoglobina (al 1% en tampón glicina-HCl 100 mM, pH 2) y 20 μl de extracto multienzimático de estómago de *C. urophthalmus*. La mezcla fue incubada a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ por 30 min. La reacción se detuvo con 500 μl de ácido tricloroacético (TCA) al 20% y reposadas a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ por 15 min. Las muestras por triplicado, fueron centrifugadas a 12,000 rpm, bajo las mismas condiciones de reposo.

Los sobrenadantes fueron recuperados y diluidos con agua destilada (1:10) para la lectura de la absorbancia a 280 nm en un espectrofotómetro (Jenway 6405 UV/Visible), utilizando celdas de cuarzo de 1 cm², definiéndose una unidad de actividad como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 µg de tirosina por minuto.

Para determinar la actividad del extracto multienzimático de intestino, se utilizó el método de Kunitz (1947), modificado por Walter (1984). Se utilizó 1 ml de caseína de Hammerstein al 1% en solución tampón tris-HCl 100 mM, como sustrato de 5 µl de extracto multienzimático de intestino de *C. urophthalmus*. La mezcla se incubó a 25 °C por 30 min. La reacción fue interrumpida con 500 µl de TCA al 20%. Para el centrifugado y lectura de absorbancias de muestras, se procedió de igual manera que las proteasas estomacales, para obtener la cantidad de tirosina liberada por reacción. Para la determinación de actividad proteolítica de mezclas control, tanto para proteasas ácidas y alcalinas, se añadió extracto multienzimático inmediatamente después de parar la reacción con TCA al 20%.

La actividad de la tripsina fue valorada mediante la técnica de Erlanger *et al.* (1961) con las siguientes modificaciones. El BAPNA (N- α -benzoyl-DL-arginina 4-nitroanilida) empleado como sustrato, se diluyó previamente en 200 µl de dimetil sulfóxido (DMSO) y se llevó al 3.5 mM en buffer en tris-HCl 50 mM CaCl₂ 20 mM, pH 8. La reacción tuvo lugar con la adición de 10 µl de extracto multienzimático de intestino a 990 µl de sustrato, incubada a 25 °C por 30 min. La reacción fue interrumpida con 250 µl de ácido acético al 30%. La absorbancia fue medida a 410 nm. Haciendo uso de un coeficiente de extinción molar de 8.8 ml µmol⁻¹ cm⁻¹, se definió la actividad enzimática como 1 µmol de *p*-nitroanilida liberada por minuto (Dimes *et al.*, 1994).

Con el fin de conocer la actividad de quimiotripsina, se determinó según Asgeirsson & Bjarnasson (1991) con las modificaciones que se mencionan. El BTEE (N-benzoyl-L-tirosina etil ester) al 5 mM en buffer tris-HCl 44.4 mM pH 7.8 (sin CaCl₂) se diluyó previamente en DMSO.

La reacción fue iniciada añadiendo 623 μl de buffer a la celda de cuarzo para llevar el espectrofotómetro a cero. Luego se agregaron 70 μl de sustrato y se leyó a 256 nm cada 20 s por 2 min. Posteriormente se adicionaron 10 μl de extracto multienzimático de intestino de y de nueva cuenta, se obtuvo la absorbancia cada 20 s por 2 min. El valor delta de absorbancia entre la reacción catalizada y la reacción sustrato se tomó para el cálculo de la actividad, considerando un coeficiente de extinción molar de $0.906 \text{ ml } \mu\text{mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. La actividad se definió como 1 μmol de tirosina liberada por min.

Para determinar de la actividad de leucina aminopeptidasa, se utilizó el método propuesto por Maraux *et al.* (1973). Se utilizó como sustrato leucina-*p*-nitroanilida al 1mM en buffer fosfato de sodio 50 mM pH 7.2. A 980 μl de sustrato se añadieron 20 μl de extracto multienzimático de intestino. La mezcla fue incubada a 25 °C por 30 min y la reacción se detuvo con ácido acético al 30%. La lectura de la absorbancia fue a 410 nm, definiéndose la actividad como la cantidad de enzima requerida para obtener 1 μmol de alanina *p*-nitroanilida por minuto. Se consideró un coeficiente de extinción molar de $8.2 \text{ ml } \mu\text{mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

La actividad de la carboxipeptidasa A, se obtuvo empleando el método de Folk & Schilmer (1963). Hypuryl-L-fenilalanina, al 1mM en tris-HCl 25 mM NaCl 500 mM pH 7.5 sustrato fue el utilizado para el ensayo. Se agregaron 600 μl de buffer directamente a la celda de cuarzo. El espectrofotómetro fue llevado a cero y se adicionaron de sustrato y se monitoreó la absorbancia a 254 nm por cada 20 seg durante 2 min. Seguidamente se incorporaron 5 μl de extracto multienzimático de intestino y se volvió a monitorear la absorbancia por 2 min, en lapsos de 2 seg. El cálculo fue computado de la misma manera que para la quimiotripsina. La actividad fue definida como la formación de 1 μmol de ácido hipúrico por minuto. Se empleó un coeficiente de extinción molar de $0.36 \text{ ml } \mu\text{mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Para evaluar fosfatasa ácida y alcalina, se procedió de acuerdo con Bergmeyer (1974). Se utilizaron 50 μl de extracto multienzimático de intestino, para degradación del sustrato 4-nitrofosfato al 2% en buffer citrato de sodio 41.6 mM pH 4.0 (fosfatasa ácida); o buffer glicina hidróxido de sodio al 100mM pH 10,1 (fosfatasa alcalina). La incubación a 37 °C fue durante 10 min. Se definió la actividad como la cantidad de enzima que produce un incremento de la absorbancia de 0.01 a 405 nm, considerando un coeficiente de extinción molar de 17.5 ml μmol^{-1} cm^{-1} .

Con miras a evaluar α -amilasa, se prosiguió según Robyt & Whelan (1968). A 50 μl de extracto multienzimático (intestino y estómago, por separado) de *C. urophthalmus* se agregó solución tampón citrato-fosfato pH 7, solución de almidón 1% (después de llegar a máximo hervor). La mezcla se incubó a 37 °C y se leyó a 600 nm. Se definió una unidad como la cantidad de enzima que libera 1 mg de maltosa por minuto.

7.2.4. Efecto del pH y la temperatura sobre la actividad de proteasas

Para determinar el efecto de estos factores sobre la actividad de proteasas, se procedió del mismo modo antes descrito, solo que para el pH se utilizó un intervalo entre 2 y 7 (proteasas ácidas) y entre 8 y 12 (proteasas alcalinas), empleando solución de Stauffer (1989). El intervalo de temperatura empleado fue de 25 a 75 °C para ambos tipos de proteasas. Para los ensayos del efecto de estos factores sobre la estabilidad de proteasas, las muestras fueron por un lado, preincubadas a 25 °C durante 0, 30, 60 y 90 min, para valores de pH 2,4, 6, 8 y 10 (proteasas ácidas) y de 4, 6, 8, 10 y 12 (proteasas alcalinas). Por otro lado, las muestras fueron preincubadas a temperaturas crecientes ($25 < t$ (°C) < 75), durante 0, 30, 60 y 90 min (efecto de la temperatura).

7.2.5. Caracterización de proteasas mediante inhibición bioquímica

La caracterización enzimática de las distintas proteasas en juveniles de *C. urophthalmus*, se desarrolló según Dunn (1989). Para la caracterización de la actividad proteasa ácida se utilizó pepstatin A 1 mM. Con 20 µl de la solución concentrada de inhibidor se preincubaron con 20 µl de extracto multienzimático durante 1 h a 25°C. A continuación, se determinó la actividad residual del mismo modo antes descrito. Se preincubaron 5 µl de extracto multienzimático intestinal con 5 µl de los inhibidores utilizados en el ensayo, a 25°C por 1 h. La actividad residual se determinó como antes se mencionó con los extractos preincubados.

Los inhibidores usados fueron: fluoruro de fenilmetilsulfonilo 100 mM (PMSF), tosil-lisina-clorometil cetona 10 mM (TLCK), inhibidor trípico de soya 250 mM (SBTI), tosil-fenilalanina-clorometil cetona 10 mM (TPCK), fenantrolina 10 mM (Fen), ovoalbúmina 250 mM (Ovo) y ácido etilendiaminotetraacético 10 mM (EDTA). La actividad residual se expresó como el porcentaje de actividad respecto a un control sin inhibidores (100% de actividad) para ambos casos. Cada ensayo se realizó por triplicado.

7.2.6. Caracterización de proteasas mediante inhibición electroforética

La caracterización de proteasas se complementó mediante electroforesis y el uso de inhibidores. Se estudió la evolución de las proteasas ácidas y alcalinas con el objetivo de cuantificar el número de bandas de actividad enzimática, así como su masa molecular y los tipos de proteasas que componen los extractos multienzimáticos de *C. urophthalmus*. Para realizar este estudio, se preincubaron por 1 h los extractos multienzimáticos con los mismos inhibidores descritos anteriormente, para después tomar una muestra de 20 µl y realizar la electroforesis. En el caso de las proteasas ácidas se corrió la electroforesis en condiciones nativas (PAGE) y para las proteasas alcalinas la electroforesis se corrió en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) (Guerrero-Zárate, 2010).

7.3. RESULTADOS

7.3.1. Caracterización enzimática de juveniles

Los niveles de actividad enzimática (U ml^{-1}) de juveniles de *C. urophthalmus* se pueden visualizar en la tabla 3. Las proteasas ácidas mostraron 2.7 ± 0.7 y las proteasas alcalinas de 10.6 ± 1.9 . Las endopeptidasas tripsina y quimiotripsina observaron actividades de 1.9 ± 0.1 y 3.1 ± 1.4 , respectivamente; en tanto que las exopeptidasas aminopeptidasa y carboxipeptidasa A mostraron niveles de actividad de 0.014 ± 0.009 y 1.3 ± 0.4 , de manera respectiva. La actividad de fosfatasas ácidas fue de 0.0002 ± 0.0001 y la de las alcalinas fue de 0.0009 ± 0.0002 . Por último, las amilasas en condiciones ácidas y alcalinas mostraron 20.9 ± 4.9 y 12.3 ± 6.1 , respectivamente.

Tabla 3. Actividad de enzimas digestivas de juveniles de *Cichlasoma urophthalmus*.

ACTIVIDAD	U mL⁻¹	U g⁻¹ (tejido)	U mg⁻¹ (proteína)
Proteasas ácidas	2.7±0.7	13.6±3.6	1.8±0.5
Proteasas alcalinas	10.6±1.9	53.2±9.4	3.1±0.5
Tripsina	1.9±0.1	12.1±0.4	0.52±0.02
Quimiotripsina	3.1±1.4	14.5±6.6	0.8±0.3
Leucina aminopeptidasa	0.014±0.009	0.07±0.04	0.004±0.003
Carboxipeptidasa A	1.3±0.4	6.8±2.1	0.4±0.1
Fosfatasa ácida	0.0002±0.0001	0.001±0.0003	0.0001±0.00002
Fosfatasa alcalina	0.0009±0.0002	0.005±0.001	0.0003±0.00005
α-Amilasa	12.3±6.1	61.6±30.4	3.5±1.7

7.3.2. Efecto del pH y preincubación sobre la actividad y estabilidad de proteasas

La actividad de proteasas por efecto del pH; así como su estabilidad por efecto del pH y el tiempo de preincubación se muestra en la figura 64. La actividad de proteasas ácidas mostró diferencias significativas ($p < 0.05$), cuyo valor óptimo se observó a pH 3, disminuyendo drásticamente conforme aumenta el valor del pH (figura 64a). Para la estabilidad de proteasas ácidas se encontraron diferencias significativas, con los distintos valores de pH probados ($p < 0.05$), observándose un aumento de la actividad residual conforme aumenta el tiempo de preincubación conforme el valor de pH disminuye, mientras que conforme el valor de pH aumenta, la estabilidad de proteasas ácidas disminuye (figura 64b).

Por otra parte, la actividad de proteasas alcalinas se vio afectada por el valor del pH ($p < 0.05$) siendo esta actividad óptima a un pH de 9 (figura 64c). A distintos valores de pH, la actividad residual de proteasas alcalinas fue significativa ($p < 0.05$), mostrando una alta resistencia a los diferentes valores de pH, incrementándolos hasta por arriba del 650% en relación al 100 % de actividad inicial, especialmente para los valores de pH de 6 y 7 a partir de los 30 minutos de preincubación, aunque conforme el tiempo de preincubación aumenta, la actividad residual disminuye alrededor del 450% para los 60 y 90 minutos de preincubación (figura 64d).

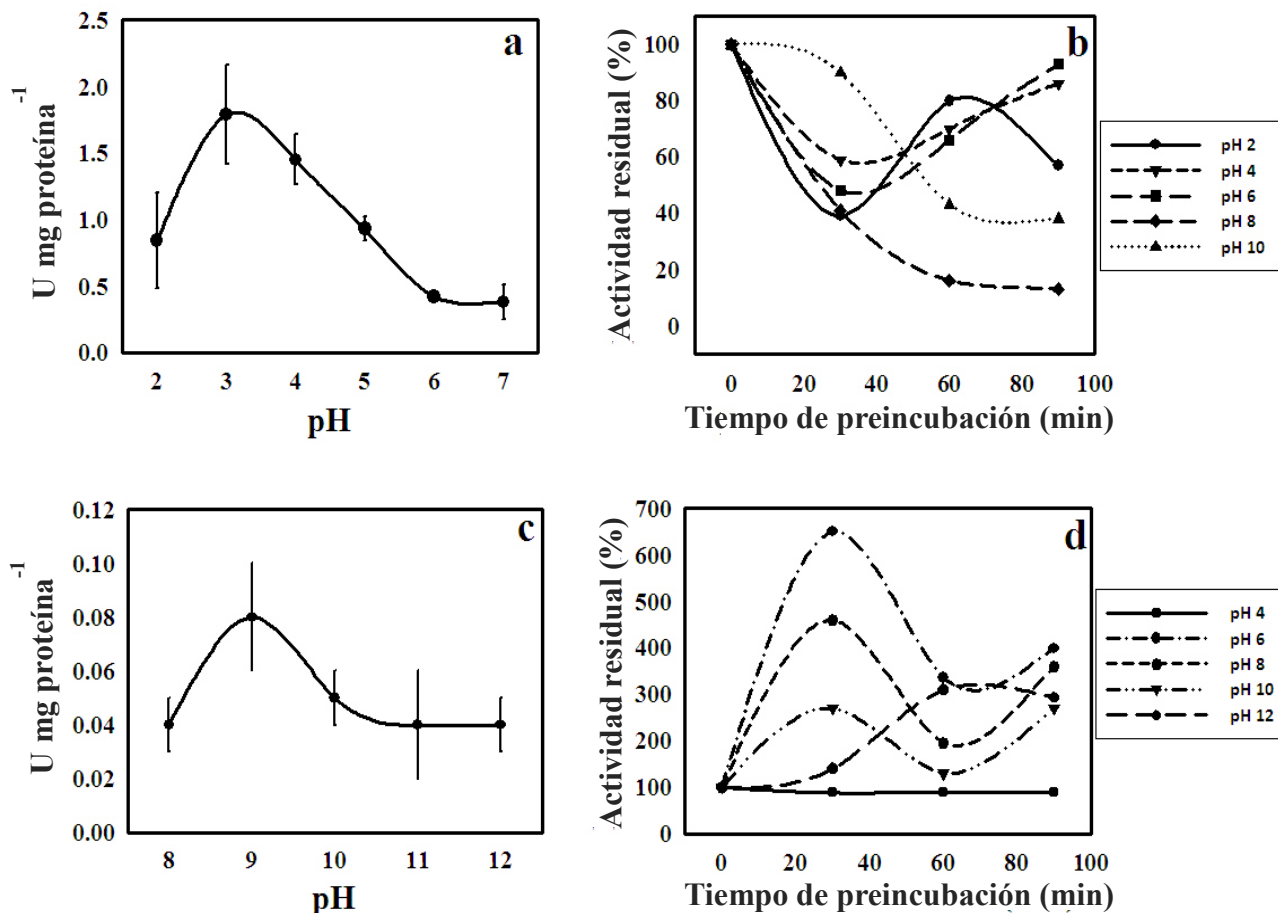


Figura 64. Caracterización de proteasas. a) pH óptimo de actividad de proteasas ácidas, b) Actividad residual, para evaluar estabilidad de proteasas ácidas, por efecto del pH y del tiempo de incubación, c) pH óptimo de actividad de proteasas alcalinas, d) Actividad residual, para evaluar estabilidad de proteasas alcalinas, por efecto del pH y del tiempo de incubación.

7.3.3. Efecto de la temperatura y preincubación sobre la actividad y estabilidad de proteasas

El papel de la temperatura sobre la actividad de proteasas, se puede observar en la figura 65. No existieron diferencias significativas en los valores de actividad de proteasas ácidas, por efecto de la temperatura ($p > 0.05$), sin embargo, se observa que la mayor actividad fue obtenida a 55 °C (figura 65a). La estabilidad de proteasas ácidas fue muy alta para todos los tiempos de preincubación para los 35 y 45 °C, mientras que para temperaturas mayores, la actividad residual disminuye rápidamente ($p < 0.05$), especialmente al preincubar los extractos a 65 °C (figura

65b). Para el caso de las proteasas alcalinas, la temperatura fue determinante, ya que se encontraron diferencias significativas entre los distintos valores de actividad enzimática ($p < 0.05$), siendo el valor más óptimo de actividad a 55 °C (figura 65c). La estabilidad de proteasas alcalinas a los cambios de temperatura muestran una alta resistencia a los cambios ($p < 0.05$), especialmente a los 45 °C, alcanzando su máximo valor después de 90 minutos, seguido de los 35 °C, después a los 55 °C; el valor más bajo se obtuvo al preincubar el extracto multienzimático a los 65 °C (figura 65d).

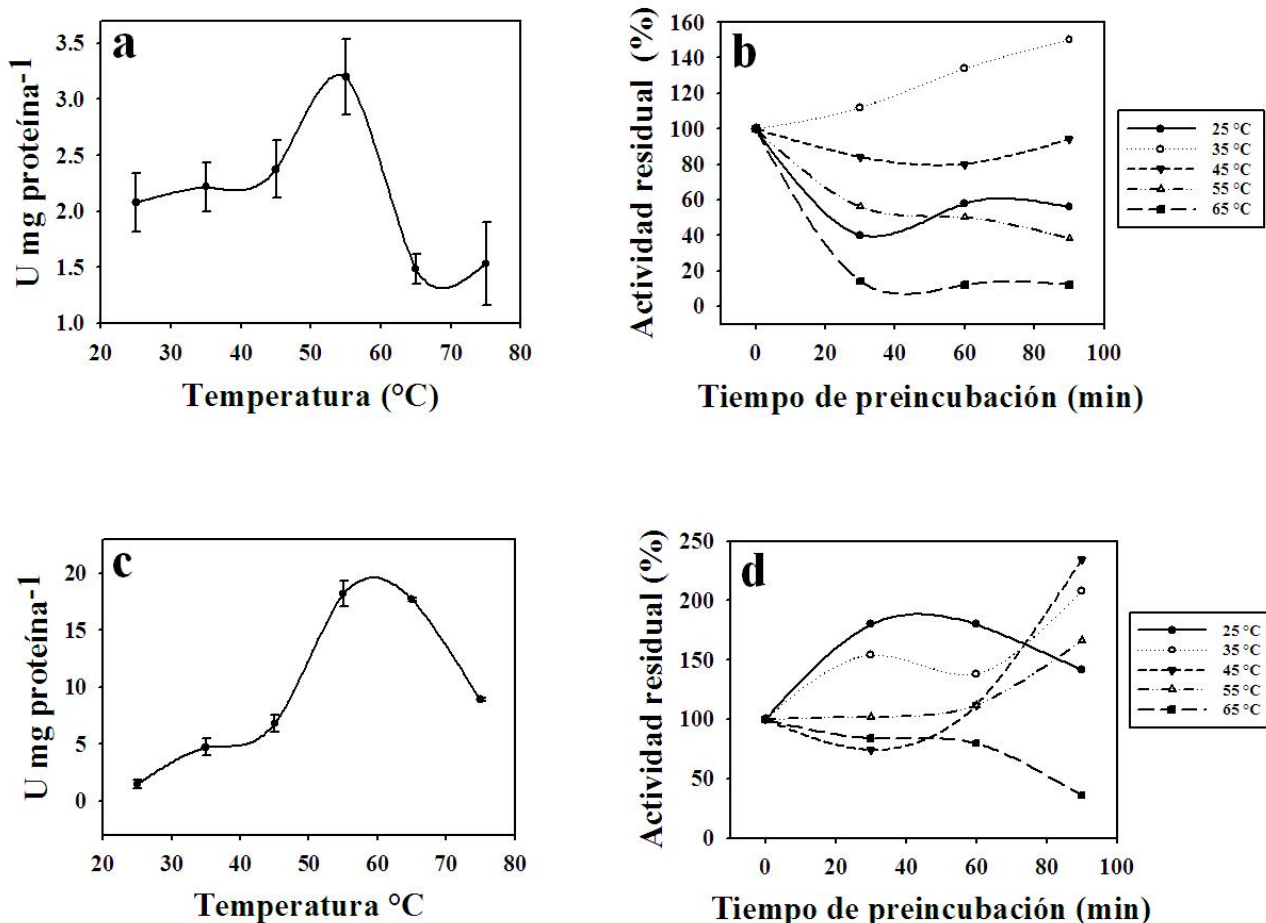


Figura 65. Caracterización de proteasas. a) Temperatura óptima de actividad de proteasas ácidas, b) Actividad residual, para evaluar estabilidad de proteasas ácidas, por efecto de la temperatura y del tiempo de incubación, c) Temperatura óptima de actividad de proteasas alcalinas, d) Actividad residual, para evaluar estabilidad de proteasas alcalinas, por efecto de la temperatura y del tiempo de incubación.

7.3.4. Caracterización de proteasas por inhibición bioquímica

En la tabla 4, se pueden apreciar los efectos de los distintos inhibidores, sobre la actividad de proteasas alcalinas y ácidas de *C. urophthalmus*, de modo respectivo. La inhibición de las proteasas alcalinas en *C. urophthalmus* mostró una alta inhibición al usar los inhibidores específicos como el TPCK, TLCK, EDTA y el inhibidor general ovoalbúmina (mayor al 80%); mientras que al usar los inhibidores generales como PMSF y SBTI fue posible visualizar un grado de inhibición de 58.6 y 43.8%, respectivamente. La inhibición con Pepstatin A (inhibidor de pepsina) en extracto multienzimático del estómago, la actividad disminuye en un 96%.

Tabla 4. Efecto de inhibidores sobre la actividad de proteasas.

Inhibidor	Concentración de inhibidor [mM]	Actividad residual (%)
PMSF	100	41.4 ± 8.3
SBTI	250	56.2 ± 6.4
Ovo	250	12.4 ± 1.6
TPCK	10	8.1 ± 1.5
TLCK	10	18.3 ± 2.0
Fen	10	44 ± 5.5
EDTA	10	14.1 ± 2.2
Pest A	1	4.0 ± 1.1

PMSF = fluoruro de fenilmetilsulfonilo, SBTI = Inhibidor tripsico de soya, Ovo = Ovoalbúmina, TPCK = Tosil-fenilalanina-metil cetona, TLCK = Tosil-lisina-metil cetona, Fen = Fenantrolina, EDTA = Ácido etilendiaminotetracético, Pest A = Pestatin A

7.3.5. Caracterización de proteasas por inhibición electroforética

En la figura 66a, en el extracto enzimático del estómago de *C. urophthalmus* (carril Control) se observó una sola isoforma la cual se inhibe completamente al usar pepstatin A (carril CI). Al contrastar con pepsina porcina (carril P) y la pepsina porcina inhibida con pepstatin A (carril PI) se observa la desaparición de la banda. En lo que concierne a la figura 66b, es posible visualizar las bandas de proteasas por efecto de inhibidores en extracto multienzimático de intestino de *C. urophthalmus*, la cual muestra la presencia de seis bandas, correspondientes a seis isoformas con actividad proteolítica alcalina (carril Control), de 16.1, 21.5, 43.1, 72.1, 82.2 y 92.9 KDa. En presencia de ovoalbúmina (carril Ovo) se inhiben las seis bandas. Al hacer uso de los inhibidores SBTI (carril SBTI) y PMSF (carril PMSF), se inhiben todas las bandas, salvo las de mayor peso molecular (82.2 y 92.9 KDa) y (92.9 KDa), respectivamente. Con la fenantrolina (carril Fen), no se inhibieron ninguna de las bandas, con excepción de la banda de menor peso molecular (16.1 KDa), mientras que con EDTA (carril EDTA), se inhibieron la mayoría de las bandas, con excepción de las bandas que corresponden a los pesos moleculares más extremos (16.1 y 92.9 KDa). Al utilizar los inhibidores específicos TPCK (carril TPCK) y TLCK (carril TLCK), no resultaron inhibidas la mayoría de las bandas, salvo la de menor peso molecular (16.1 KDa).

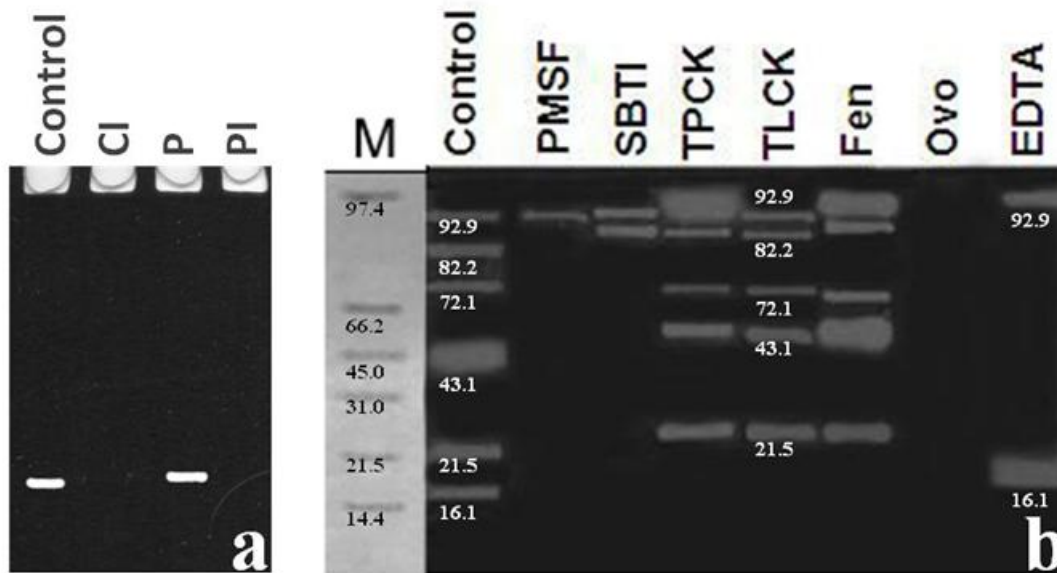


Figura 66. Zimograma de proteasas ácidas (a) y proteasas alcalinas (b) con acción de los inhibidores respectivos sobre las isoformas de los extractos multienzimáticos de *Cichlasoma urophthalmus*. CI: Control con inhibidor Pestatina A, P: Pepsina de cerdo, PI: Pepsina de cerdo con inhibidor Pestatina A, PMSF: Ioduro de fenilmetilsulfonilo, SBTI: Inhibidor tripsico de soya, TPCK: Tosil-fenilalanina-metil cetona, TLCK: Tosil-lisina-metil cetona, Fen = Fenantrolina, Ovo: Ovoalbúmina, EDTA: Ácido etilendiaminotetracético. M: Marcador de peso molecular (kDa): albúmina de suero bovino (66 kDa), albúmina de huevo (43 kDa), Anhidrasa carbónica (29 kDa), tripsinógeno (24 kDa), Inhibidor de soya tripsica (20 kDa).

7.4. DISCUSIÓN

La actividad enzimática de proteasas intestinales ($3.1 \pm 0.5 \text{ U mg proteína}^{-1}$) en *C. urophthalmus*, resultó ser mayor que la actividad derivada de proteasas estomacales ($1.8 \pm 0.5 \text{ U mg proteína}^{-1}$). En su trabajo para determinar la relación de la actividad de proteasas con la talla, Klahan *et al.* (2009) revelaron cierta preponderancia de proteasas intestinales (0.0204 , intestino bajo; 0.0242 , intestino superior, $\text{U mg proteína}^{-1}$), con respecto a las pseudoestomacales (0.0135 ; $\text{U mg proteína}^{-1}$), en tilapia *Oreochromis niloticus*, de hábitos omnívoros. Kumar *et al.* (2007) encontraron niveles de actividad de proteasas totales de $1.219 \pm 0.059 \text{ U mg proteína}^{-1}$, $1.084 \pm 0.061 \text{ U mg proteína}^{-1}$ y $0.193 \pm 0.006 \text{ U mg proteína}^{-1}$, para *Catla catla*, *L. rohita* e *Hypophthalmichthys molitrix*. Tales valores de actividad específica, (peces planctófagos), son visiblemente más semejantes para *C. urophthalmus*, que con relación a los obtenidos por Klahan *et al.* (2009).

Estos resultados permiten suponer que las proteasas intestinales en peces omnívoros y planctófagos, pueden jugar un rol más importante, que las proteasas estomacales; mientras que en peces carnívoros como el bagre *Pseudoplatystoma corrucans*, la actividad proteolítica alcalina en intestino, se encuentra más limitada que con relación a la actividad proteolítica del estómago (Lundstedt *et al.*, 2004), lo que ayuda a confirmar los hábitos alimentarios de *C. urophthalmus*.

Paralelamente, las proteasas ácidas en extractos multienzimáticos de estómago de *C. urophthalmus*, presentaron un máximo de actividad a pH 3, en tanto que las proteasas alcalinas de extractos multienzimáticos intestinales, tuvieron un desenvolvimiento de actividad máxima a pH 9. Jun-Cheng *et al.*, (2006) encontraron que los pH óptimos para proteasas ácidas y alcalinas en juveniles del híbrido *Oreochromis niloticus* X *Oreochromis aureus*, fueron 2 y 10.5, de manera respectiva, lo cuales no distan demasiado a los encontrados en la presente investigación. Sin embargo, también es posible encontrar similitudes en peces de hábitos eurípagos carnívoros como en salmónidos, cuyas proteasas ácidas trabajan óptimamente a un intervalo de pH de entre 1 y 2, y en el pez eurífago carnívoro *Scleropages formosus* cuyas proteasas alcalinas trabajan a un intervalo de pH óptimo, de entre 9 y 10;

como señalan Munilla-Moran & Stark (1990) y Natalia *et al.* (2004) de modo respectivo. Lo anterior sugiere que la actividad óptima de proteasas a un pH determinado, no guarda relación con los hábitos alimentarios de la especie.

Por otro lado, las proteasas ácidas permanecen estables a pHs alcalinos, pues presentan actividad intermedia, a 30 minutos de preincubación, aunque baja considerablemente a temperaturas de preincubación de 60 y 90 °C, lo que sugiere que su capacidad proteolítica, aunque es óptima a pH ácido, son relativamente estables a pH alcalino, lo cual permite que las proteasas ácidas actúen como potenciales activadores de zimógenos de proteasas alcalinas, secretados por el páncreas al intestino (Nolasco-Soria, comunicación personal).

La digestión con proteasas alcalinas, toma lugar con la digestión de proteasas ácidas (Chakrabarti *et al.*, 1995). Esto ha sido observado también en el pejelagarto *Atractosteus tropicus* (Guerrero-Zarate, 2010) y en el atún *Tunnus thynnus* (Essed *et al.*, 2002), peces estrictamente carnívoros por lo que, los resultados demuestran que *C. urophthalmus* presenta cierta tendencia a la carnivoría, en tanto que las proteasas alcalinas mostraron amplia estabilidad a distintos valores de pH, en toda la escala de pHs probados, lo que permite suponer la amplia plasticidad de éstas proteasas, incluso todavía mayor a la de los peces eurípagos carnívoros.

La estabilidad de proteasas ácidas a pHs que salen de su óptimo intervalo, puede estar asociado a que *C. urophthalmus* es una especie, en la que no se tenga bien delimitada una zonación funcional digestiva. En los vertebrados superiores, la actividad de las enzimas digestivas, está restringida a distintas regiones del intestino, mostrando una clara zonación funcional, lo cual ocurre con la mayoría de los peces (Lundstedt *et al.*, 2004). Sin embargo, proteinasas con pHs óptimos de 5 y 8.5, han sido encontrados en jugo gástrico de peces (Kuz'mina, 1991). En especies como *Sparus aurata* se han encontrado proteasas alcalinas en estómago (Deguara, *et al.*, 2003).

Con lo que respecta al factor temperatura, Jun-Cheng *et al.* (2006) también determinaron la temperatura óptima para proteasas ácidas y alcalinas en el híbrido *Oreochromis niloticus* X *Oreochromis aureus*, encontrando condiciones óptimas a 55 °C para ambos tipos de proteasas; lo cual guarda cierta similitud a las observadas en proteasas ácidas (65 °C) y alcalinas (55 °C) para *C. urophthalmus*. Aunque de hábitos eurífago carnívoros, la actividad de proteasas ácidas y alcalinas en *Atractosteus tropicus* presentan una temperatura óptima de 65%, según reporta Guerrero-Zarate (2010), por lo que, las temperaturas óptimas para *C. urophthalmus*, la sitúan dentro de los intervalos encontrados para otras especies.

En lo que concierne a la estabilidad de proteasas alcalinas por efecto de la temperatura, la estabilidad de proteasas ácidas se ve reflejada por el poco efecto a temperatura de incubación a 45 °C, debido a que estas proteasas pierden poca actividad (incluso a los 90 minutos de preincubación), hecho que a partir de los 55 °C comienzan a experimentar pérdidas de 50% de actividad y más cuando actúan a 65 °C; mientras que la estabilidad de proteasas alcalinas poco o nada se ve afectada por la temperatura de preincubación, así como por la temperatura a la cual desarrollan actividad proteolítica, salvo también a los 65 °C. La plasticidad relativamente alta que observan las proteasas digestivas en *C. urophthalmus*, posiblemente vaya de la mano con su amplio espectro de hábitats.

El cíclido maya *C. urophthalmus* es una especie euriótica es decir, puede encontrarse en cuerpos de agua dulce, salobres, manifestaciones cársticas de la Península de Yucatán, en los cuales esta especie puede crecer y colonizar, por lo que la probable explicación de esta amplia tolerancia ecológica estaría ligada a una gran plasticidad de sus características fisiológicas (Chávez-Sánchez *et al.*, 2000).

De acuerdo con los resultados ($\text{U mg proteína}^{-1}$), la actividad de tripsina (0.52 ± 0.02), estuvo ligeramente por debajo de la actividad de la quimiotripsina (0.8 ± 0.3) en *C. urophthalmus*. Tales resultados también han sido observados en especies con hábitos alimentarios cercanos a *C. urophthalmus*, como *L. rohita*, *C. catla* y *H. molitrix*, en los que la actividad de quimiotripsina resultó ser más alta que la actividad de tripsina, en todos los casos Kumar *et al.* (2007). De acuerdo con Jonas *et al.* (1983), la actividad quimiotripsina suele predominar en peces omnívoros.

Los resultados de inhibición con pepstatin A por técnicas bioquímicas, confirman la ausencia de bandas correspondientes a pepsina en gel PAGE, como el inhibidor de pepsina, en estómago de *C. urophthalmus*, y por ende, observa cierta tendencia enzimática propia de peces carnívoros. Tales resultados han sido encontrados para peces omnívoros y carnívoros (Chiu & Pan, 2002). En lo que concierne a las proteasas alcalinas, la inhibición con ovoalbúmina, y el PMSF, observa una disminución de la actividad casi total (mayor a 80% y 60%, respectivamente), demostrando la importancia de la serín-proteasas en la digestión alcalina.

Jonas *et al.* (1983) destacaron una inhibición importante de actividad de serín-proteasas, en peces carnívoros y omnívoros, en presencia del PMSF; lo cual es confirmado por la ausencia casi total de bandas en los geles SDS PAGE, concretamente en el carril 1 (PMSF). A diferencia de la ovoalbúmina que inhibe todas las bandas, se logra apreciar una única banda no inhibida por el PMSF, que corresponde a una isoforma de 92.9 K, la cual probablemente corresponda a leucina-aminopeptidasa. Wu *et al.* (2008) reportaron leucina-aminopeptidasa con un peso molecular aproximado de 96 K para *Pagrus major*.

Las reacciones de inhibición también mostraron que del extracto multienzimático de intestino de *C. urophthalmus*, la quimiotripsina observó casi el doble de inhibición (con TPCK), que la observada por tripsina (con TLCK y SBTI), lo cual aporta un elemento adicional cuando se sugiere que en peces eurípagos omnívoros como *C. urophthalmus*, la quimiotripsina reviste mayor importancia que la tripsina.

Por otro lado, estudios recientes con juveniles (como los del presente estudio), indican un incremento en la importancia de la quimiotripsina, relativo a la tripsina en larvas muy avanzadas en desarrollo, al tiempo que esta enzima puede triplicar la actividad de la tripsina (Lazo *et al.*, 2007).

Paralelamente, la presencia de metal proteasas (que dependen de iones metálicos divalentes para su actividad) quedó evidenciado con la inhibición de su actividad, en al menos 50% (con fenantrolina) y en mayor medida con EDTA (10% de actividad enzimática inicial), lo que indica la importancia de este tipo de proteasas en la digestión alcalina de *C. urophthalmus*. El empleo de éstos dos últimos inhibidores en otras especies de agua dulce como *Atractosteus tropicus*, han demostrado la presencia de metalproteasas en su tracto digestivo, como concluyen Guerrero-Zarate (2010).

En lo que toca a las técnicas electroforéticas con el gel PAGE SDS probadas en el presente estudio, la presencia de bandas asociadas a casi todas las seis isoformas presentes en extracto multienzimático de intestino, (carriles 5 y 6), demostraron la especificidad de los inhibidores TPCK y TLCK. Sin embargo, estos inhibidores de quimiotripsina y tripsina, respectivamente, no resultaron del todo específicos ya que no fue posible discernir entre una y otra endoproteasa, debido a que el TPCK y TLCK inhibieron ambas la última banda correspondiente a la isoforma de menor peso molecular (16.1 K) aunque es posible establecer un intervalo de pesos moleculares de entre 16.1 y 21.5 K, para ambas endoproteasas.

De acuerdo con Castillo-Yañez *et al.* (2004) reportaron un peso molecular de 25 K para tripsina, en sardina Monterey *Sardinops sagax caerulea*, mientras que Heu *et al.* (1995) encontraron 25.6 y 26.1 K, para tripsina y quimiotripsina, a partir de anchoveta *Engraulis japonica*; y Chong *et al.* (2002) reportaron un intervalo de 19.2 a 21.8 K para quimiotripsina en pez disco *Symphysodon aequifasciata*.

La ausencia de varias bandas en el carril 9 (EDTA) salvo las correspondientes a valores extremos (92.9 y 16.1 K), confirman los resultados obtenidos por técnicas bioquímicas, que evidencian la presencia de metal proteasas en extracto multienzimático de intestino de *C. urophthalmus*. No obstante, la presencia de la banda asociada a la isoforma de 16.1 K en el carril 9 (EDTA), y su ausencia en los carriles TPCK y TLCK, pueden indicar que tanto tripsina como quimiotripsina, no requieran de iones metálicos para su activación. Sin embargo, la presencia de la mayor parte de las bandas de las seis isoformas encontradas en el carril 7 (Fen), demostró la alta especificidad del inhibidor 1, 10 fenantrolina, a la actividad de metal proteasas, concretamente tripsina y quimiotripsina.

Las divergencias en el grado de inhibición de estas endoproteasas, por la presencia del 1, 10 fenantrolina y EDTA, pudieran ser debido a diferencias en el grado de sensibilidad (de uno de los inhibidores), a la acción del SDS presente en el gel, por lo que se sugiere profundizar más a este respecto. Por otro lado, el grado de inhibición de tripsina y quimiotripsina con 1, 10 fenantrolina y EDTA, puede variar con la especie, como hacen suponer Heu, *et al.* (1995).

Los bajos niveles de exopeptidasas (carboxipeptidasa B y leucin aminopeptidasa) detectadas en *C. urophthalmus* puede ser un indicativo de que, gran parte de la digestión alcalina de proteínas, la realizan de manera conjunta las endopeptidasas y metaloproteasas, que mostraron también un papel importante en intestino del pez arowana *S. formosus* (Natalia *et al.*, 2004). El rol de las exopeptidasas de *C. urophthalmus* puede limitarse a degradar pequeñas cadenas peptídicas cortas, para liberación de aminoácidos terminales, como señalan López-Ramírez *et al.* (2010), una vez que pepsina, endoproteasas y metal proteasas, han efectuado gran parte de la actividad proteolítica en la digestión de *C. urophthalmus*. Los resultados de caracterización bioquímica y electroforética, confirmaron que *C. urophthalmus* es una especie de hábitos omnívoros, con potencial para degradar sustratos propios de una especie carnívora, ya que presenta actividad específica importante de proteasas alcalinas, pero también una alta actividad de proteasas ácidas.

8. DIGESTIBILIDAD *IN VITRO* DE INGREDIENTES PROTEÍNICOS

8.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar la digestibilidad *in vitro* en condiciones ácidas y alcalinas, de ingredientes proteínicos de origen animal y vegetal, en juveniles de *C. urophthalmus*.

Determinar la concentración de aminoácidos libres totales, en condiciones alcalinas, de ingredientes proteínicos de origen animal y vegetal, en juveniles de *C. urophthalmus*.

Seleccionar los ingredientes proteínicos con el mayor grado de hidrólisis y concentración de aminoácidos libres, susceptibles de utilizarse en el diseño de dietas inertes, para alimentación de larvas de *C. urophthalmus*, a futuro.

8.2. MATERIAL Y MÉTODOS

8.2.1. Obtención de extractos multienzimáticos

La totalidad de los juveniles de *C. urophthalmus* fueron disectados en frío, a fin de aislar estómagos e intestinos de la masa visceral, para lo cual se obtuvo el peso húmedo por individuo y de cada órgano con una balanza analítica (Denver Instrument APX-200, resolución 0.1 mg). Los tejidos fueron homogenizados en un macerador eléctrico (Ultra Turrax[®] Ika T18 Basic), a razón de 1:5 (tejido/agua destilada, p/v). Las mezclas fueron centrifugadas a 14,000 rpm, 4 °C por 30 min, en una centrifuga (Eppendorf 5810-R, con rotor F45-3011). Se recuperaron los sobrenadantes y se almacenaron a -20 °C, hasta su análisis posterior.

8.2.2. Materias primas

Las materias primas y sus respectivos contenidos de proteína y humedad, se muestran en la tabla 5. Las harinas de grano de maíz, maíz amarillo, trigo, sorgo, carne de pollo y pasta de soya fueron obtenidas de la empresa GALMEX S.A. en Villahermosa, Tabasco, México. Las harinas de carne de res, sangre porcina, carne de cerdo, soya, gluten de maíz, pulido de arroz, plasma porcino, salvado de trigo, sangre de res y pasta de canola fueron obtenidas de la planta de alimentos Consorcio Súper en Guadalajara, Jalisco, México. La harina de pescado y el hidrolizado de pescado fueron obtenidos de (Alimentos Pedregal S.A. de C.V. y CCP, Noruega, respectivamente), la harina de carne de cerdo y de pollo se obtuvieron de la empresa National Renderers Association, mientras que las harinas de harina de pescado marca Aqua, de jaiba, camarón, calamar, carne y sangre de res se obtuvieron de Proteínas Marinas y Agropecuarias S.A. de C.V., Guadalajara, Jalisco, México; el gluten de trigo de Glútenes de México S.A. de C.V. Edo. Mex., Mexico, la pasta de coco fue obtenida de la Unión de Copreros de Tabasco S.A. de C.V. en Villahermosa, Tabasco, México y la harina de canavalia, fue obtenida en Teapa, Tabasco, México. La sangre de res se obtuvo del rastro de Texcoco, Estado de México. México.

Con el fin de conocer la cantidad de unidades de enzimas en extracto de estómago, se hizo uso del método de Anson (1938), con las modificaciones que siguen. Se formó la mezcla de reacción con 1 ml de hemoglobina (al 1% en tampón glicina-HCl 100 mM, pH 2) y 20 µl de extracto multienzimático de estómago de *C. urophthalmus*. La mezcla fue incubada a 25 °C por 30 min. La reacción se detuvo con 500 µl de ácido tricloroacético (TCA) al 20% y se dejó en reposo a 4 °C por 15 min. Las muestras por triplicado, fueron centrifugadas a 12000 rpm, (Eppendorf 5810-R, con rotor F45-3011).

Tabla 5. Contenido de proteína y de humedad de los ingredientes proteínicos.*

Ingrediente	CP (%)	CH (%)	CL (%)
Harina de camarón	28.0	5.0	2.0
Harina de jaiba	30.0	4.9	1.0
Harina de carne de cerdo	15.5	6.9	13.5
Harina de pollo	58.4	6.1	13.5
Harina de sangre de res (Prieto)	72.0	4.4	<1.0
Harina de carne de res (rastro)	46.5	7.4	<1.0
Pasta de coco	18.0	0.8	ND
Harina de pescado (Acua)	56.0	3.4	12.0
Harina de carne y vísceras de pollo	60.0	5.12	13.0
Harina de sangre de res	64.0	4.8	<1.0
Harina de pescado	64.1	4.8	15.0
Harina de pollo	65.0	4.5	13.5
Harina de maíz amarillo	8.8	13.6	ND
Harina de grano de maíz	9.8	11.2	ND
Pasta de soya	49.2	6.0	ND
Harina de calamar	75.0	5.0	7.0
Harina de trigo	12.4	12.8	ND
Harina de canola	37.0	14.0	ND
Hidrolizado de pescado	72.0	8.0	8.0
Salvado de trigo	14.8	11.8	ND
Harina de sangre de cerdo	80.0	10.0	ND
Harina de sangre de res (Texcoco)	64.0	5.0	ND
Pulido de arroz	12.8	10.9	ND
Harina de soya	46.8	11.6	0.5
Harina de canavalia	30.0	8.5	ND
Harina de sorgo	8.9	14.0	ND
Gluten de trigo	75.0	10.0	1.0
Hemoglobina	90.0	2.0	<1.0
Caseína	90.0	2.0	1.2
Harina de plasma porcino	78.0	9.0	ND
Gluten de maíz	61.5	9.4	ND

*Frías-Quintana *et al.*, (2010)

Los sobrenadantes fueron recuperados y diluidos con agua destilada (1:10) para la lectura de la absorbancia a 280 nm en un espectrofotómetro (Jenway 6405 UV/Visible), utilizando celdas de cuarzo de 1 cm de paso de luz, definiéndose una unidad de actividad como la cantidad de enzima que cataliza la liberación de 1 µg de equivalentes de tirosina por minuto.

Para determinar la actividad de extracto multienzimático de intestino, se utilizó el método de Kunitz (1947), modificado por Walter (1984). Se utilizó 1 ml de caseína de Hammarstein (ICN Biomedicals No. 101289, Aurora OH USA) al 1% en solución tampón Tris-HCl (100 mM, pH 7.5) como sustrato de 5 µl de extracto multienzimático de intestino de *C. urophthalmus*. La mezcla se incubó a 25 °C por 30 min. La reacción fue terminada con 500 µl de TCA al 20%. Para el centrifugado (Eppendorf 5810-R, con rotor F45-3011, 25 °C por 10 min) y lectura de absorbancias de muestras a 280 nm, para de igual manera obtener la cantidad de equivalentes de tirosina liberada por reacción hidrolítica. Para los métodos de actividad proteolítica ácida y alcalina, se utilizó un ensayo testigo, donde se añadió el extracto multienzimático, hasta después de parar la reacción con TCA al 20%. Ambos valores de actividad específica, se tomaron como base para el cálculo del volumen de extractos multienzimáticos, tanto para la hidrólisis ácida como alcalina, de ingredientes proteínicos. Para el cálculo de concentración de proteína en extractos, se utilizó el método de Bradford (1976), con una curva estándar de albúmina bovina.

Digestibilidad *in vitro* en condiciones ácidas y alcalinas

Un total de 29 ingredientes proteínicos de origen animal y vegetal (tabla 5), fueron puestos a hidrolizar en un sistema pH Stat Titrino (Metrohm, 718, Suiza), de acuerdo con Saunders *et al.*, (1972), modificado por Dimes & Haard (1994), para evaluar su grado de hidrólisis (GH, %). Los ensayos de digestión ácida, se realizaron en un volumen final de 5 ml de la mezcla de reacción. Cada ingrediente de prueba se resuspendió en solución acuosa, razón de 8 mg de proteína mL⁻¹, en agua destilada, ajustando el pH a 2 con HCl 1 N. La digestión se inició con 10 µL de proteasa de extracto multienzimático de estómago de mojarra castarrica *C. urophthalmus* en fase juvenil (conteniendo 0.03 U de proteasa ácida). Se utilizó a la hemoglobina como ingrediente de referencia.

Para el caso de la digestión alcalina, los ensayos se realizaron en un volumen final de 5 ml de la mezcla de la reacción. Cada ingrediente de prueba se resuspendió a razón de 8 mg de proteína mL⁻¹ en agua destilada, ajustando el pH a 7.5 con NaOH 1 N. La reacción se inició con 110 µL de extracto multienzimático de intestino de *C. urophthalmus* en fase juvenil (conteniendo 1.2 U de proteasa alcalina), y caseína Hammerstein como ingrediente de referencia. Al inicio y término de 900 y 2700 s de digestión ácida y alcalina de ingredientes proteínicos, se tomaron muestras de mezcla hidrolizada respectivamente. La unidad de tiempo previa a la adición de extracto multienzimático, fue definida como el tiempo cero. Las muestras fueron conservadas a -20°C, para la determinación posterior de aminoácidos libres totales.

8.2.4. Determinación de aminoácidos libres totales (ALT) en condiciones ácidas y alcalinas

Las muestras parcial y totalmente hidrolizadas, fueron puestas a reaccionar con reactivo *o*-phtaldialdehido (OPA) de acuerdo con Church (1983), que consiste en la unión de los grupo amino de los aminoácidos, con el OPA. Para realizar lo anterior, 20 μl de mezcla hidrolizada fueron fijados con TCA al 12% para los ensayos con reacción química con OPA (80 mg de OPA en 1 ml de metanol, 0.2 ml de β -mercaptoetanol, 50 ml de tetraborato de sodio al 0.1 M y 5 ml de SDS al 20%, y disueltos en 100 ml de solución con agua destilada). Se obtuvo lectura de la absorbancia a 340 nm. La (ALT de la mezcla de reacción en $\mu\text{g ml}^{-1}$, se evaluó según una curva patrón con l-leucina (0.5 mg ml^{-1}) con concentraciones crecientes de 0 a $20 \mu\text{g ml}^{-1}$. Los ensayos fueron llevados a cabo por triplicado.

8.2.5. Análisis estadístico

Los datos que cumplieron los supuestos de normalidad y homocedasticidad (GH y ALT alcalinos), fueron analizados con pruebas ANOVA paramétricas de una vía y de Duncan, para establecer diferencias significativas entre grupos de prueba y de referencia. Por otro lado, con la finalidad de aproximar su distribución a la normalidad y reducir la heterogeneidad de varianzas entre grupos, los valores GH ácidos fueron sometidos a la transformación de la forma: $X' = [\sqrt{(X+1)+0.375}] / [\sqrt{(X)+15}]$, donde, X' es el valor GH-ésimo transformado y X es el valor GH-ésimo en crudo. Para los valores ALT ácidos, que no cumplieron los supuestos básicos (aún con transformaciones), las diferencias significativas se establecieron con una prueba de comparaciones múltiples no paramétrica de Kruskal-Wallis y las diferencias entre los tratamientos fueron detectadas con la prueba a posteriori de Nemenyi (Zar, 1998). Para el cómputo de todas las pruebas estadísticas se empleó el programa StatísticaTM v8 usando un valor de significancia de 0.05.

8.3. RESULTADOS

8.3.1. Grados de hidrólisis de ingredientes proteínicos (GH)

Los grados de hidrólisis ácida, de los 29 ingredientes proteínicos de prueba y de hemoglobina, ingrediente de referencia, se pueden apreciar en la tabla 6. La hemoglobina, mostró un GH de 2.2 ± 0.5 . El mayor GH encontrado fue el de la harina de camarón, con un valor de 30.9 ± 9.7 . Es posible visualizar que la mayoría de ingredientes proteínicos de prueba observan un GH mayor al de la hemoglobina, salvo las harinas de plasma porcino y gluten de maíz, cuyos GH son 2.1 ± 0.5 y 0.6 ± 0.3 , de manera respectiva, siendo éste último el menor GH encontrado, de todos los ingredientes de prueba. Se encontraron diferencias significativas entre casi todos los ingredientes de prueba, con relación al de referencia ($p < 0.05$), excepto con pulido de arroz, harina de soya, harina de canavalia, harina de sorgo, gluten de trigo, harina de plasma porcino y gluten de maíz, ($p > 0.05$). Todos GH de los ingredientes de prueba que resultaron ser significativos, se encontraron por arriba del GH del ingrediente de prueba.

En la tabla 7, se indican los valores GH para los 29 ingredientes proteínicos y el de referencia (caseína Hammerstein), en condiciones alcalinas. La caseína observó un GH de 6.9 ± 1.8 . El GH de la harina de carne de cerdo resultó ser el más alto, con 31.6 ± 2.2 , mientras que el GH de la harina de jaiba, fue la más baja, con 2.2 ± 0.7 . Por otro lado, se hallaron diferencias significativas entre la caseína y los ingredientes de prueba, harinas de carne de cerdo, de sangre de res (Texcoco), de carne y vísceras de pollo, de pollo Nacional, de pasta de coco, de pescado (Pedregal), de pescado (Acua), de sangre de res, de sangre de res (Prieto), de carne de res, de pescado, de soya y de canola ($p < 0.5$), cuyos valores GH se situaron por arriba del GH ingrediente de prueba.

Tabla 6. Grados de hidrólisis (GH) ácida, de los ingredientes proteínicos de prueba e ingrediente de referencia (hemoglobina), concluida su digestibilidad *in vitro*.

Ingrediente	GH (%)	Digestibilidad relativa (%)
Harina de camarón*	30.9 ± 9.7	1404.5
Harina de jaiba*	23.1 ± 15.8	1050.0
Harina de carne de cerdo (NRA)*	22.0 ± 5.2	1000.0
Harina de pollo (Nacional)*	14.9 ± 5.7	677.3
Harina de sangre de res (Prieto)*	11.6 ± 1.1	527.3
Harina de carne de res (rastros)*	10.8 ± 4.6	490.9
Pasta de coco*	10.4 ± 1.5	472.7
Harina de pescado (Acua) *	10.4 ± 4.7	472.7
Harina de carne y vísceras de pollo*	9.6 ± 1.8	436.4
Harina de sangre de res*	8.8 ± 4.7	400.0
Harina de pescado (El Pedregal) *	8.3 ± 0.6	377.3
Harina de pollo*	8.2 ± 1.2	372.7
Harina de maíz amarillo*	7.7 ± 1.8	355.0
Harina de maíz grano*	7.3 ± 5.3	331.8
Pasta de soya*	6.9 ± 4.1	313.6
Harina de calamar*	6.9 ± 2.4	313.9
Harina de trigo*	6.4 ± 2.7	290.9
Harina de canola*	6.2 ± 4.1	281.8
Hidrolizado de pescado*	6.1 ± 1.8	277.3
Salvado de trigo*	5.0 ± 0.9	227.3
Harina de sangre porcina*	4.9 ± 0.8	222.7
Harina de sangre de res (Texcoco)*	4.3 ± 0.2	195.5
Pulido de arroz	4.0 ± 1.8	181.2
Harina de soya	3.9 ± 1.9	177.3
Harina de canavalia	3.4 ± 1.6	154.5
Harina de sorgo	2.7 ± 2.3	122.7
Gluten de trigo	2.3 ± 0.2	104.5
Hemoglobina	2.2 ± 0.5	100.0
Harina de plasma porcino	2.1 ± 0.5	95.5
Gluten de maíz	0.6 ± 0.3	27.3

*Ingredientes proteínicos, cuyos GH ácidos presentan diferencias significativas ($p > 0.05$), con respecto al ingrediente de referencia (hemoglobina).

Tabla 7. Grados de hidrólisis (GH) alcalina, de ingredientes los proteínicos de prueba e ingrediente de referencia (caseína), concluida su digestibilidad *in vitro*.

Ingrediente	GH (%)	Digestibilidad relativa (%)
Harina de carne de cerdo (NRA)*	31.6 ± 2.2	458.0
Harina de sangre de res (Texcoco)*	26.7 ± 2.2	386.9
Harina de carne y vísceras de pollo*	22.7 ± 4.3	329.0
Harina de pollo (Nacional)*	21.9 ± 1.6	317.4
Pasta de coco*	21.6 ± 5.2	313.0
Harina de pescado*	21.2 ± 3.6	307.2
Harina de pescado (Acua) *	21.1 ± 4.5	305.8
Harina de sangre de res (rastró)*	16.1 ± 0.4	233.3
Harina de sangre de res (Prieto)*	14.7 ± 2.4	213.0
Harina de carne de res*	14.6 ± 0.5	211.6
Harina de pollo*	14.0 ± 4.6	202.9
Hidrolizado de pescado*	12.8 ± 2.4	185.5
Harina de soya*	11.9 ± 1.1	172.5
Harina de canola*	10.9 ± 7.7	158.0
Harina de maíz grano	10.6 ± 4.1	153.6
Harina de calamar	10.4 ± 2.8	150.7
Pulido de arroz	8.9 ± 4.8	129.0
Gluten de trigo	8.3 ± 6.3	120.3
Gluten de maíz	8.3 ± 1.7	120.3
Harina de sangre porcina	8.2 ± 1.7	118.8
Harina de maíz amarillo	8.2 ± 2.4	118.8
Caseína	6.9 ± 1.8	100.0
Harina de sorgo	6.2 ± 3.3	89.9
Harina de camarón	5.9 ± 1.8	85.5
Harina de plasma porcino	5.5 ± 1.0	79.7
Pasta de soya	5.4 ± 2.8	78.3
Harina de canavalia	5.3 ± 2.0	76.8
Harina de trigo	4.8 ± 3.3	69.6
Salvado de trigo	3.5 ± 2.0	50.7
Harina de jaiba*	2.2 ± 0.7	31.9

*Ingredientes proteínicos, cuyos GH alcalinos presentan diferencias significativas ($p > 0.05$), con respecto al ingrediente de referencia (caseína).

8.3.2. Concentración de aminoácidos libres totales (ALT)

La tabla 8, muestra los valores ALT ácidos, de los 29 ingredientes de prueba y su referente, la hemoglobina. De ésta última se obtuvo un valor ALT de $1293.1 \pm 24.1 \mu\text{g ml}^{-1}$, valor que se situó por encima de todos los ingredientes de prueba. El valor ALT que le siguió fue el correspondiente a harina de sangre de cerdo, con $1018 \pm 53.5 \mu\text{g ml}^{-1}$. El valor ALT menor obtenido fue para la harina de sangre de res (Prieto), con $204.4 \pm 2.7 \mu\text{g ml}^{-1}$. Los valores ALT que fueron significativos, con relación al ingrediente de prueba figuraron el gluten de trigo y la harina de sangre de res (Prieto) ($p > 0.05$). En la tabla 9 es posible observar los valores ALT alcalinas, de los 29 ingredientes de prueba y la caseína Hammerstein, empleada como referente, la cual mostró un valor ALT de $943.3 \pm 14.7 \mu\text{g ml}^{-1}$. El valor ALT mayor observado, fue el de la harina de carne y vísceras de pollo, con $1587.8 \pm 13.0 \mu\text{g ml}^{-1}$, mientras que el ALT menor, correspondió al gluten de trigo, con $449.6 \pm 8.3 \mu\text{g ml}^{-1}$. Las diferencias significativas fueron evidentes entre el ingrediente de referencia con respecto a los de prueba: harina de carne y vísceras de pollo, de trigo, de camarón, de jaiba, de pescado (Pedregal), pulido de arroz, hidrolizado de pescado, de sangre porcina, de carne de cerdo, de pollo, de canola y de sorgo ($p > 0.05$). Tales ingredientes observaron valores ALT por encima del de referencia.

Tabla 8. Concentración de aminoácidos libres (ALT), de los ingredientes proteínicos de prueba e ingrediente de referencia (hemoglobina), concluida su digestibilidad *in vitro* ácida.

Ingrediente	ALT ($\mu\text{g ml}^{-1}$)
Hemoglobina	1293.1 \pm 24.1
Harina de sangre porcina	1018.7 \pm 53.6
Harina de plasma porcino	814.4 \pm 13.8
Harina de carne y vísceras de pollo	793.9 \pm 21.1
Harina de sorgo	759.3 \pm 7.1
Harina de canavalia	613.9 \pm 10.6
Harina de maíz grano	600.5 \pm 8.3
Pasta coco	591.9 \pm 4.1
Harina de calamar	569.9 \pm 31.1
Harina de canola	545.5 \pm 30.0
Pasta soya	456.7 \pm 32.0
Salvado de trigo	441.8 \pm 13.0
Harina de maíz amarillo	435.5 \pm 8.3
Pulido de arroz	430.0 \pm 16.1
Harina de pescado (Acua)	428.4 \pm 8.3
Harina de trigo	414.3 \pm 7.6
Harina de pollo	411.9 \pm 2.7
Harina de jaiba	404.8 \pm 19.2
Hidrolizado de pescado	391.5 \pm 12.5
Gluten de maíz	341.9 \pm 8.5
Harina de carne res	322.3 \pm 6.8
Harina de camarón	319.9 \pm 13.6
Harina de carne de cerdo (NRA)	310.5 \pm 33.0
Harina de pescado (Pedregal)	293.2 \pm 7.2
Harina de soya	292.4 \pm 6.2
Harina de sangre de res (rastró)	287.7 \pm 2.4
Harina de sangre de res (Texcoco)	273.5 \pm 2.4
Harina de pollo (Nacional)	263.3 \pm 7.2
Gluten de trigo*	241.3 \pm 5.9
Harina de sangre de res (Prieto)*	204.4 \pm 2.7

*Ingredientes proteínicos, cuyos ALT ácidos presentan diferencias significativas ($p > 0.05$), con respecto al ingrediente de referencia (hemoglobina).

Tabla 9. Concentración de aminoácidos libres (ALT), de los ingredientes proteínicos de prueba e ingrediente de referencia (caseína), concluida su digestibilidad *in vitro* alcalina.

Ingrediente	ALT ($\mu\text{g ml}^{-1}$)
Harina de carne y vísceras de pollo*	1587.8 \pm 13.0
Harina de trigo*	1442.4 \pm 12.1
Harina de camarón*	1237.3 \pm 13.6
Harina de jaiba*	1142.2 \pm 19.2
Harina de pescado (Pedregal) *	1105.2 \pm 14.2
Pulido de arroz*	1101.3 \pm 10.8
Hidrolizado de pescado*	1098.1 \pm 19.6
Harina de sangre porcina*	1070.6 \pm 17.8
Harina de carne de cerdo (NRA)*	1013.2 \pm 20.3
Harina de pollo*	1007.0 \pm 14.7
Harina de canola*	992.8 \pm 7.1
Harina de sorgo*	976.3 \pm 6.2
Caseína	943.3 \pm 14.7
Harina de pollo (Nacional)	940.1 \pm 21.4
Harina de sangre de res (Texcoco)*	878.8 \pm 14.2
Harina de pescado (Acua) *	819.9 \pm 1.4
Harina de sangre de res (rastró)*	793.9 \pm 13.4
Salvado de trigo*	782.9 \pm 12.5
Harina de canavalia*	774.3 \pm 16.6
Glúten de maíz*	742.8 \pm 18.9
Harina de calamar*	719.6 \pm 11.8
Harina de sangre de res (Prieto)*	662.7 \pm 17.8
Pasta soya*	641.4 \pm 4.7
Harina de soya	589.6 \pm 11.8
Pasta coco*	574.6 \pm 11.9
Harina de plasma porcino*	573.8 \pm 7.6
Harina de carne res*	572.3 \pm 9.5
Harina de maíz amarillo*	542.4 \pm 13.1
Harina de maíz grano*	527.4 \pm 11.9
Gluten de trigo*	449.6 \pm 8.3

*Ingredientes proteínicos, cuyos ALT alcalinos presentan diferencias significativas ($p > 0.05$), con respecto al ingrediente de referencia (caseína).

8.4. DISCUSIÓN

Los métodos de digestibilidad *in vitro* para evaluar GH en peces marinos y más recientemente en peces dulceacuícolas, permiten complementar técnicas convencionales de digestibilidad *in vivo*, por lo que cobran importancia capital cada vez mayor, en el estudio de la capacidad digestiva de los peces cultivados. Los métodos *in vitro* para evaluar digestibilidad de proteínas son necesarios, debido a que suelen ser más rápidos y baratos que los métodos *in vivo*, y permiten una evaluación más precisa del porcentaje de enlaces peptídicos totales hidrolizados de fuentes de proteína, utilizando cantidades mínimas de materiales crudos (Grabner, 1985).

En condiciones ácidas, los ingredientes proteínicos de prueba de origen animal, como la harina de camarón, de jaiba, de carne de cerdo, de carne de res, de sangre de res, de carne y vísceras de pollo y de pescado (Acua), observaron valores GH muy por arriba del ingrediente de referencia (hemoglobina), en presencia de extracto multienzimático de estómago de *C. urophthalmus*. No obstante que la especie objeto de estudio es un pez omnívoro, en otros trabajos se ha observado que estos ingredientes resultaron tener valores GH significativamente mayores que la hemoglobina, en presencia de extractos estomacales de pejelagarto *Atractosteus tropicus* (Frías-Quintana *et al.*, 2010), un pez de agua dulce del Sureste de México.

Sobresale el hecho de que entre estos ingredientes de prueba, figuren subproductos de la industria avícola y ganadera del Sureste de México (sangre de res y vísceras de pollo), que frecuentemente son eliminados en cuerpos de agua de la región, lo que los hace meritorios de más estudios.

Son notorios también los valores GH, de ingredientes proteínicos de origen vegetal, como la harina de maíz amarillo y la pasta de coco, obtenidos en condiciones ácidas. Está documentado el empleo de harina de maíz, en el diseño de dietas artificiales de otras especies omnívoras como el pacú *Piaractus mesopotamicus*, el pejerrey *Odontesthes bonaeriensis* y el pez rohu *L. rohita*, aunque su inclusión a altos niveles en la dieta, puede llevar a una sobreacumulación de glicógeno en hígado (Pérez *et al.*, 2003; Debnath *et al.*, 2007), por lo que es necesario elaborar más estudios, acerca de la harina de maíz, y más tratándose de un insumo abundante y de menor costo, con respecto de las fuentes de proteína animal.

En lo que concierne a los GH de ingredientes proteínicos de prueba en condiciones alcalinas, sobresalieron la harina de carne de cerdo, de sangre de res (Texcoco), de carne y vísceras de pollo, de sangre de res (Prieto), de pollo (Nacional), de pescado (Purina), de pescado (Acua), de carne de res, e hidrolizado de pescado para el caso de los ingredientes de origen animal, que fueron significativamente mayores al ingrediente de referencia (caseína). Sin embargo, Frías-Quintana *et al.* (2010) obtuvieron valores GH más ínfimos en estos ingredientes, salvo para la harina de carne y vísceras de pollo, en presencia de extractos de estómago e intestino de *A. tropicus*.

Es posible que lo anterior pueda ser explicado por las divergencias de hábitos alimentarios en una y otra especie, y por consiguiente su maquinaria enzimática, durante la hidrólisis alcalina. A este respecto, precisamente Frías-Quintana *et al.* (2010) revelaron que gran parte de la digestión de ingredientes proteínicos en *A. tropicus*, se lleva a cabo en el estómago (y no en intestino).

En cuanto a los ingredientes proteínicos de origen vegetal, la harina de soya, de canola y pasta de coco, observaron los GH más acentuados. La harina de soya, junto con la harina de carne y vísceras de pollo y las harinas e hidrolizados de pescado, han mostrado aceptables valores GH en condiciones alcalinas en la dorada *S. aurata*, el pez disco *Symphysodum aequifasciata*, la cabrilla arenera *P. maculatofasciatus*, y el róbalo blanco *C. undecimalis* (Alarcón *et al.*, 2002; Chong *et*

al., 2002; Álvarez-González, 2003; Concha-Frías, 2007), aunque habría que tomar en consideración que se trata de especies marinas y más de hábitos carnívoros, lo que puede implicar ciertas diferencias en la composición enzimática de los extractos crudos intestinales, respecto de la de *C. urophthalmus*.

La harina de soya es un ingrediente ampliamente utilizado en dietas artificiales para peces tanto marinos como dulceacuícolas, en tanto que la harina de canola posee aproximadamente un 36% de proteína cruda (Naczki *et al.*, 1998), es rica en lisina y aminoácidos sulfurados (Uppström, 1995). Sin embargo, es necesario considerar su inclusión en dietas artificiales en acuicultura, ya que la canola contiene taninos, glucosinolatos, ácido fítico y elevados niveles de fibra, que actúan como factores antinutrientes (Bell, 1993). En cuanto a la harina de coco, puede ser una fuente de proteína y ácidos grasos insaturados a considerar, al menos para *C. urophthalmus*. Más aún, mostró altos niveles GH en ambas fases de la hidrólisis, además de que es un insumo de mucho menor costo que las fuentes de proteína de origen animal, siendo además muy abundante en el Sureste de México.

Por otro lado las técnicas que se basan en la reacción del o-ftaldialdehído con los aminoácidos, en presencia de mercaptoetanol (Nielsen *et al.*, 2001), son otra herramienta útil que permiten complementar los estudios de digestibilidad *in vitro*. Con lo que respecta a los valores ALT que resultaron de la hidrólisis ácida de ingredientes proteínicos, destacan la harina de sangre porcina, de plasma porcino, de carne y vísceras de pollo como ingredientes de origen animal, seguidos de la harina de sorgo, de canavalia, maíz de grano, de canola y de pasta de coco.

No obstante que los valores ALT de estos ingredientes, no revelaron diferencias significativas respecto del ingrediente de referencia, es necesario poner énfasis que las harinas de carne y vísceras de pollo, de sangre porcina, maíz grano, de canola y de pasta de coco, observaron valores GH intermedios durante la fase ácida, lo que le puede hacer un objeto de más estudios, como fuentes potenciales de proteína para *C. urophthalmus*.

No así con las harinas de plasma porcino, de sorgo y de canavalia que obtuvieron GH ácidos bajos. En condiciones alcalinas, los ALT más relevantes y que a su vez observaron valores GH alcalinos significativamente por arriba del ingrediente de referencia, correspondieron a la harina de carne de cerdo, de carne y vísceras de pollo, de canola e hidrolizado de pescado, que por consiguiente es posible considerarlos como fuentes potenciales de proteína para *C. urophthalmus*. Son menos meritorias de considerarse las harinas de trigo, de camarón, de jaiba, de sorgo y pulido de arroz, puesto que presentaron valores GH alcalinos bajos.

Son escasos los estudios en lo que se refiere a la evaluación de ALT, de ingredientes proteínicos que se probaron en el presente estudio. Es posible comparar el valor ALT de la harina de carne y vísceras de pollo (631.2 ± 3.6 y $1830.8 \pm 9.5 \mu\text{g ml}^{-1}$, condiciones ácida y alcalina respectivamente), que encontraron Frías-Quintana *et al.* (2010) en *A. tropicus*, mientras que los ALT de *C. urophthalmus* que se obtuvieron en la presente investigación fueron 793.9 ± 21.1 y $1587.8 \pm 13.0 \mu\text{g ml}^{-1}$, respectivamente; lo que refleja cierta similitud en los ALT de ambas especies.

Aunque *A. tropicus* es de hábitos carnívoros, *C. urophthalmus* es una especie omnívora, con cierta tendencia a la carnivoría (Chávez-Lomelí *et al.*, 1989). Por otro lado, cabe hacer hincapié el hecho de que en condiciones alcalinas, se observaron varios valores ALT por encima del referente (caseína), en contraste con el referente (hemoglobina) que obtuvo el mayor valor ALT, en condiciones ácidas. Es posible notar también que, fueron más valores ALT alcalinos que resultaron estar por encima de los $1000 \mu\text{g ml}^{-1}$. Lo anterior puede ser un indicador de que, gran parte del proceso digestivo de ingredientes proteínicos, se efectúa en intestino de *C. urophthalmus*, lo cual también pudiera ser confirmado por la mayor concentración de proteasas alcalinas, con relación a la concentración de proteasas ácidas encontradas en este estudio.

No obstante los valores GH y ALT, de ingredientes de prueba harina de sangre porcina, de calamar, de maíz amarillo, de maíz de grano no presentaron diferencias significativas, con lo que respecta a la caseína, utilizada como referente en la hidrólisis alcalina, si resultaron ser significativos, y estar por encima de la hemoglobina, referente de la hidrólisis ácida. Resulta relevante observar en condiciones ácidas, el hecho que la hemoglobina haya mostrado uno de los valores GH más moderados de los 29 ingredientes probados, en contraste con su valor ALT. Ello puede implicar la realización de más estudios para corroborar estos resultados.

En general, de los 29 ingredientes de prueba que presentaron valores GH y ALT significativamente mayores a los ingredientes referentes (hemoglobina/caseína), al término de la hidrólisis ácida y alcalina, fueron la harina de carne y vísceras de pollo, de carne de cerdo, de canola, pasta de coco e hidrolizado de pescado. De entre éstos, vale la pena mencionar a la pasta de coco, por ser un ingrediente abundante la mayor parte del año en el Sureste de México, además de ser menos costoso, que las harinas de pescado y otras fuentes de proteína de origen animal, probadas en los ensayos. Cabe mencionar también que, muchos de los ingredientes probados en el presente estudio, obtuvieron valores GH (ácidos y alcalinos) aún por encima de los valores GH de las harinas de pescado (Pedregal) y de pescado (Acua).

Es menester no pasar por alto que, insumos como las vísceras de pollo (junto con su carne), la sangre porcina y de res (subproductos de deshecho de la industria ganadera y avícola), cuyas harinas observaron valores, ya sea GH o ALT, incluso algunos por arriba de los ingredientes referentes, puedan ser objeto de más estudios, con el fin de considerárseles, como fuentes potenciales de proteína para el cultivo de *C. urophthalmus*, aunque cuando solo hayan observado altos valores GH (ácidos o alcalinos) y no en sus respectivos valores ALT, o viceversa. En la presente investigación se encontraron valores GH y ALT de gran parte de ingredientes probados, que pueden suponer la realización de estudios posteriores de sustitución parcial de harina de pescado en dietas experimentales, como fuentes potenciales de proteína alternativas, hacia el diseño de dietas inertes para *C. urophthalmus*.

9. DISCUSIÓN GENERAL

9.1. Cambios morfofuncionales durante la ontogenia inicial

Los resultados histológicos y moleculares de la presente investigación, confirman en lo general que *C. urophthalmus* es una especie de rápido desarrollo morfológico, estructural y funcional, durante su ontogenia inicial. Los mecanismos básicos de desarrollo son similares en todos los peces teleósteos, aunque existe cierto grado de diversidad en los embriones libres recién eclosionados en cuanto a los tiempos de desarrollo y crecimiento y funcionalidad de las células especializadas, tejidos y órganos (Kjørsvik *et al.*, 2004). Aunque en la eclosión de *C. urophthalmus*, el tracto digestivo consistió de un tubo recto indiferenciado, como ocurre en la gran mayoría de los peces de ontogenia indirecta hasta ahora estudiados, es altamente relevante el hecho de que esta especie presente apertura bucal a los 2 dde. No menos relevante es la presencia de células mucosas en bucofaringe, esófago e intestino, que a los 3 dde ya pueden desempeñar su función lubricante y de protección antibacteriana (Gisbert *et al.*, 2004).

Es trascendente la aparición de gránulos de zimógeno en embriones libres recién eclosionados de *C. urophthalmus*, como precursores de actividad de quimiotripsina y tripsina, aunque los primeros picos de actividad se detectaron a los 3 y 13 dde, respectivamente, según López-Ramírez *et al.* (2013). Esta aparición precoz de gránulos de zimógeno ha sido observada también en *Melanogrammus aeglefinus* (Hamlin *et al.*, 2000). Algunos autores consideran el páncreas funcional cuando aparecen los gránulos de zimógeno en las células acinares (Darias *et al.*, 2006). Aunado a esto, a los 3 dde se detectó notoria expresión génica de α -amilasa, lipasa dependiente de sales biliares (como indicadores de un páncreas en proceso de desarrollo), y en grado menor de expresión, fosfatasa alcalina, como indicador de cierta funcionalidad de enterocitos, en un intestino en formación, como así lo constatan los estudios histológicos a esta edad.

Cabe puntualizar también que la visible expresión de enzimas digestivas como lipasa dependiente de sales biliares y α -amilasa; y el pico de quimiotripsina a los 3 dde (López-Ramírez *et al.*, 2010), resultaron sincrónicos con la apertura de la boca en *C. urophthalmus*, a los 2 dde. Tal sincronía de eventos fueron encontrados también en *Pseudopleuronectes americanus* (Murray *et al.*, 2003).

En general, al inicio de la alimentación exógena (entre los 5-6 dde), el tracto digestivo (bucofaringe, esófago e intestino) y glándulas accesorias se apreciaron completamente diferenciadas en *C. urophthalmus*, con excepción del estómago, el cual complementa su diferenciación entre los 11 y 14 dde, como ocurre con otros peces cíclidos: *Oreochromis niloticus* y *Petenia splendida* (Morrison *et al.*, 2001; Treviño *et al.*, 2011), respectivamente. Tal grado de desarrollo se vio acompañada por los picos de actividad de enzimas digestivas encontradas en *C. urophthalmus*, por López-Ramírez *et al.*, (2010), a los 13 dde.

También sobresale la disposición de remanencias energéticas de origen endógeno hasta los 16 dde (a la par de un estómago muy desarrollado), ya que de acuerdo con los resultados histológicos, se apreciaron indicios microscópicos de saco vitelino a esa edad, a pesar de que la alimentación exógena comenzó a partir de los 6 dde. Lo anterior pudiera facilitar la transición de régimen alimenticio (el cambio de alimento vivo a artificial) y puede disponer a *C. urophthalmus* de más tiempo para aceptar alimentos inertes a temprana edad.

A este respecto, en su estudio de actividad de enzimas digestivas, durante la ontogenia inicial de *C. urophthalmus*, López-Ramírez *et al.*, (2010) determinaron que esta especie tiene la capacidad digestiva de aceptar alimentos inertes a los 13 dde; lo cual concuerda con la presencia de un estómago provisto de glándulas gástricas posiblemente ya funcionales a los 14 dde (de acuerdo a los resultados histológicos de la presente investigación), lo cual se puede sustentar por el hecho de que a partir de los 9 dde, se comenzaron a distinguir mucopolisacáridos neutros (con funciones protectoras de la autólisis estomacal, por la actividad de jugos gástricos y de

pepsina, secretadas por las glándulas gástricas) en la mucosa interna del estómago en diferenciación. Adicionalmente, López-Ramírez *et al.* (2010) encontraron un pico de proteasas ácidas a los 13 dde, lo que refuerza la idea de la funcionalidad de las glándulas gástricas a esta edad.

Paralelamente, entre los 6 y 8 dde, *C. urophthalmus* muestra deposición de lípidos en intestino anterior y posterior y su baja disposición en hígado durante el período de consumo de *Artemia*, sugieren un correcto balance entre el consumo de lípidos dietarios, requerimientos nutricionales larvarios y capacidades digestivas (Bogolino *et al.*, 2012). Sin embargo, tras el cambio de alimento vivo a inerte los depósitos lipídicos se incrementan considerablemente en los hepatocitos, no así en intestino, lo que sugiere que la absorción de lípidos por los enterocitos intestinales no excede su tasa de síntesis de lipoproteínas y el transporte de lípidos al hígado (Olsen *et al.*, 1999), resultando en un hígado graso (Gisbert *et al.*, 2008). Concurrentemente, los análisis moleculares mostraron una expresión génica progresiva de lipasa dependiente de sales biliares, hasta los 30 dde, aunque esta tendencia pudiera verse influenciada en parte, por eventos transcripcionalmente programados, o bien como una posible respuesta a la alta cantidad de lípidos de reserva.

Otro aspecto que reviste importancia en la ontogenia inicial de *C. urophthalmus*, es la clara sincronía encontrada entre un estómago diferenciado por completo hacia los 19 dde (regionalizado en estómago cardiaco, fúndico y pilórico), un considerable aumento de la expresión génica de lipasas dependientes de sales biliares (según los estudios moleculares) a partir de los 20 dde; así como delos mayores pico de actividad de tripsina y proteasas ácidas, encontrados alrededor de los 20 dde en *C. urophthalmus*, de acuerdo con López-Ramírez *et al.* (2010). Tales indicios morfofuncionales, marcan el fin del período larvario y consecuente inicio del período juvenil en *C. urophthalmus*, sobre todo los evidentes signos de maduración de las glándulas gástricas, a partir de los 14 dde.

Es de hacer notar también la presencia un páncreas ya casi diferenciado a la eclosión, lo cual se reflejó en una prominente expresión génica tanto de α -amilasa como de lipasa dependiente de sales biliares a los 3 dde. Sin embargo, es meritorio también hacer notar un incremento sostenido de la expresión génica de α -amilasa, de los 20 a los 30 dde, Tal incremento de expresión amilásica, resultó acorde con la presencia de un estómago estructural y funcionalmente diferenciados (incluyendo la presencia de glándulas gástricas funcionales), lo cual fue sincrónico con un páncreas plenamente funcional. Ambos eventos son indicadores de maduración del sistema digestivo (Darias *et al.*, 2006).

No obstante, *C. urophthalmus* no muestra un decremento de la expresión de α -amilasa, como ocurre con peces como *Paralichthys olivaceus* (Tanaka *et al.*, 1996); *Dicentrarchus labrax* (Zambonino-Infante y Cahu, 2001); *Pagrus pagrus* (Darias *et al.*, 2006) hacia los 30 dde, edad a la cual ya existe un páncreas plenamente desarrollado y funcional. Lo anterior puede indicar que no necesariamente pueda existir una correlación entre decrementos de la expresión génica de α -amilasa, con un sistema digestivo maduro, ya que *C. urophthalmus* siempre experimentó un aumento progresivo en la expresión de esta enzima pancreática.

Por otro lado, los resultados de similitud de secuencias nucleotídicas y aminoacídicas con otras especies como *O. niloticus* y *Maylandia zebra*, demuestran que los genes que codifican para la expresión de enzimas digestivas de *C. urophthalmus*, son altamente conservadas.

9.2. Bioquímica y digestibilidad *in vitro* en juveniles

Los resultados de caracterización bioquímica y electroforética, muestran que *C. urophthalmus* dispone de un amplio espectro dentro de su maquinaria enzimática, que la hace una especie de hábitos omnívoros, con potencial para degradar sustratos propios de una especie carnívora, ya que presenta actividad específica importante de proteasas alcalinas, pero también una alta actividad de proteasas ácidas, lo que la hace ser una especie carnívora oportunista, como puntualizaron López-Ramírez *et al.* (2010).

De acuerdo con los resultados de la presente investigación, la amplia diversidad en el acervo enzimático de *C. urophthalmus*, pudieran permitirle degradar una amplia gama de ingredientes proteínicos; lo cual, aunado a sus altas tasas de crecimiento y sobrevivencia, resistencia al manejo en cautiverio, alta fertilidad y resistencia a enfermedades (Álvarez-González, comunicación personal), hacen de *C. urophthalmus*, una especie con alto potencial de cultivo, como también señalan Chávez-Lomelí *et al.* (1989) y Martínez-Palacios & Ross (1994).

Así lo confirman también los estudios de digestibilidad *in vitro*, ya que las harinas de carne y vísceras de pollo, de cerdo y pasta de coco, sobresalen como las fuentes potenciales de proteína, que puedan figurar como componentes no convencionales de alimentos inertes para *C. urophthalmus*, a nivel juvenil. Cabe mencionar que la pasta de coco es una materia prima que se encuentra disponible la mayor parte del año en el Sureste de México, además de ser un insumo barato, con relación a muchas otras fuentes proteínicas de origen animal, como la misma harina de pescado.

Es necesario hacer notar que otros ingredientes proteínicos de prueba, como las harinas de sangre de res, que observaron GHs aceptables, puedan ser considerados, juntos a las fuentes proteínicas arriba mencionadas, como meritorias de llevar a cabo un mayor número de estudios (con miras de diseño de alimentos inertes), debido a la problemática que representan en estas regiones del país, pues subproductos de deshecho de la industria ganadera (como la sangre de res), son vertidos directamente a los cuerpos de agua, convirtiéndose en agentes eutroficadores en estos ecosistemas.

De modo más general, el conocimiento de la dinámica ontogénica en peces teleósteos es fundamental para entender los cada vez más indicadores de los eventos cruciales del proceso de maduración digestiva, que a su vez propicie el diseño de alimentos inertes, principalmente en los períodos iniciales de vida de especies de valor comercial y la de aquellas especies con potencial de cultivo. Es menester comprender por tanto, los cambios a nivel embrionario, y larvario (o alevín) de manera integral ya que muy pocos estudios hasta ahora han hecho uso de indicadores varios (histológicos, moleculares, bioquímicos, histoquímicos, entre otros), hacia un entendimiento más integral de los cambios relevantes durante la ontogenia inicial en peces teleósteos.

10. CONCLUSIONES

10.1. Cambios morfofuncionales durante la ontogenia inicial

1. El lapso de transición del período larvario a juvenil en *C. urophthalmus*, tiene lugar entre los 14 y 19 dde, donde en el primer caso, el estómago muestra glándulas gástricas posiblemente funcionales y en el segundo caso, el estómago experimenta la regionalización en estómago cardiaco, estómago fúndico y estómago pilórico.
2. Por consiguiente, muy posiblemente *C. urophthalmus* está en condiciones digestivas para aceptar un alimento inerte desde los 14 dde, cuando las glándulas gástricas no solo están presentes en el estómago, sino que ya puedan estar plenamente diferenciadas y funcionales.

10.2. Bioquímica y digestibilidad *in vitro* en juveniles

1. Los resultados bioquímicos confirman que el acervo enzimático de *C. urophthalmus*, es propio de una especie eurífaga omnívora con tendencia carnívora, esto es, con tendencia a la carnivoría oportunista.
2. Con base a lo anterior, *C. urophthalmus* puede disponer de la capacidad digestiva para aceptar alimentos inertes, en cuya formulación puedan incluirse fuentes proteínicas como la carne y vísceras de pollo, carne de cerdo, sangre de res, pasta de coco y sorgo; materias primas que resultan ser abundantes todo el año y por su costo relativamente barato, en el Sureste de México.

11. RECOMENDACIONES

11.1. Cambios morfofuncionales durante la ontogenia inicial

Es necesario continuar los estudios de expresión génica de otras enzimas digestivas (que no fue posible secuenciar en los ensayos de expresión génica), durante la ontogenia inicial de *C. urophthalmus*. La enzima pancreática tripsina reviste importancia capital, debido a que este tipo de estudios pueden coadyuvar a esclarecer más aún su dinámica en los primeros días de la eclosión de *C. urophthalmus*, y permitiría corroborar los hallazgos de López-Ramírez *et al.* (2010) y los resultados histológicos, en la presente investigación.

Estos estudios no solo son trascendentes en los primeros días tras la eclosión, sino también en la transición entre el período larvario y juvenil, aportando un elemento importante a lo que acontece con la expresión génica de tripsina, en este lapso de tiempo ontogénico. Es posible encontrar posibles sincronías que en otros estudios se han encontrado en lo que concierne a cambios morfofuncionales, de expresión y actividad enzimática de tripsina, utilizados a menudo como indicadores de desarrollo morfofuncional. No menos importante, es la expresión génica de las enzimas intestinales leucín-aminopeptidasa y peptidasa citosólica, que puedan brindar mayor información acerca de los cambios morfofuncionales en intestino, durante la ontogenia inicial de *C. urophthalmus*.

Es altamente meritorio abordar de manera íntegra, la exploración de los cambios morfofuncionales durante la ontogenia inicial de los peces, utilizando al menos dos tipos de herramientas (v.g. histología y bioquímica) y cotejar a su vez con otras más (v.g. la expresión génica de enzimas). Más importante aún, explorar primordialmente la morfología y estructura (histología); y de manera posterior, la función (bioquímica, técnicas moleculares, endocrinología, y más).

11.2. Bioquímica y digestibilidad *in vitro* en juveniles

Para probar ingredientes proteínicos, es recomendable llevar a cabo los ensayos de digestibilidad *in vitro* en condiciones alcalinas, inmediatamente después de los realizados en condiciones ácidas, de manera que la simulación del proceso digestivo, resulte ser lo más fidedigno e íntegramente posible a las condiciones naturales en los peces. La digestión ácida y alcalina, no son del todo excluyentes.

Para determinar actividad específica enzimática, se recomienda verificar que las unidades de los coeficientes de extinción utilizados en las ecuaciones, sean compatibles con las unidades de las demás variables y de este modo, el cálculo de la actividad específica no resulte sesgado.

Finalmente, con los resultados obtenidos sobre el perfil de enzimas digestivas, caracterización bioquímica y de digestibilidad *in vitro* en juveniles *C. urophthalmus*, es posible disponer de varios elementos para el diseño de alimentos inertes, que contribuyan a potenciar el cultivo de esta especie neotropical. Por consiguiente, otro paso crucial consistiría en realizar un diseño experimental, que permita desarrollar ensayos de carácter biotécnico, donde el papel de la cantidad y composición de ingredientes proteínicos de origen animal y vegetal (principalmente aquellos que observaron altos valores GH y ALT), resulten en la obtención de un alimento inerte, que atienda la capacidad y fisiología digestiva de larvas y juveniles de *C. urophthalmus*. No pasar por alto que las condiciones de cultivo juegan un rol no menos preponderante.

12. LITERATURA CITADA

- Alarcón, F.J., J.F. Moyano & M. Díaz. 2002. Evaluation of different protein sources for aqua feeds by an optimized pH-stat system. *Journal Science Food Agriculture*, 82: 697-704.
- Alliot, E., Pastoureaud, A. & Trellur, J. 1977. Evolution des activités enzymatiques dans le tube digestif au cours de la vie larvaire du bar (*Dicentrarchus labrax*). Variations des proteinogrammes et des zymogrammes. *Colloq. Int. Cent. Nat. Rech. Sci.*, 4: 85-91.
- Álvarez-González, C.A. 2003. Ontogenia enzimática y nutrición larvaria de la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus*. Tesis Doctoral. CICIMAR-IPN, La Paz, B.C.S. México, 164 p.
- Álvarez-González, C.A., M. Cervantes-Trujano, D. Tovar-Ramírez, D.E. Conklin, H. Nolasco, E. Gisbert & R. Piedrahita. 2006. Development of digestive enzymes in California halibut *Paralichthys californicus* larvae. *Fish Physiol Biochem*, 31: 83-93.
- Álvarez-González, C.A., F.J. Moyano-López, R. Civera-Cercedo, V. Carrasco-Chávez, J.L. Ortiz-Galindo & S. Dumas. 2008. Development of digestive enzyme activity in larvae of spotted sand bass (*Palabrax maculatofasciatus*) I. Biochemistry analysis. *Fish Physiol. Biochem.*, 34: 373-384.
- Anson M.L. 1938. The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin. *Journal Gen. Physiol.*, 22:79-89.
- Asgeirsson, B. & J.B. Bjarnason. 1991. Structural and kinetic properties of chymotrypsin from Atlantic cod (*Gadus morhua*). Comparison with bovine chymotrypsin. *Comp. Biochem. Physiol.*, 99B(2): 327-335.
- Baglole, C.J., H.M. Murray & G.P. Goff. 1997. Ontogeny of the digestive tract during larval development of yellowtail flounder: a light microscopic and mucous histochemical study. *J. Fish Biol.*, 51 (1): 120-134.
- Balon, E.K. 1990. Epigenesis of an epigeneticist: the development of some alternative concepts on the early ontogeny and evolution of fishes. *Guelph ichthyol. Rev.*, 1: 1-48.

- Balon, E.K. 2002. Epigenetic processes, when *natura non facit saltum* becomes a myth, and alternative ontogenies a mechanism of evolution. *Environmental Biology of Fishes*, 65: 1-35.
- Bergmeyer, H.V. 1974. *Phosphatases methods of enzymatic analysis*, vol 2. Academic Press, New York.
- Boglino, A.E. Gisbert, M.J. Darias, A. Estévez, K.B. Andree, C. Sarasquete & J.B. Ortiz-Delgado. 2012. Isolipidic diets differing in their essential fatty acid profiles affect the deposition of unsaturated neutral lipids in the intestine, liver and vascular system of Senegalese sole larvae and early juveniles. *Comp. Biochem. Physiol.* 162A: 59-70.
- Boulhic, M. & J. Gabaudan. 1992. Histological study of the organogenesis of the digestive system and swim bladder of Dover sole, *Solea solea* L. *Aquaculture*, 102: 373-396.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochemistry*, 72: 248-25.
- Bryant, P.L. & A.J. Matty. 1980. Optimisation of Artemia feeding rate for carp larvae (*Cyprinus carpio* L.). *Aquaculture*, 2: 203-212.
- Buchet, V., J.L. Zambonino-Infante & C.L. Cahu. 2000. Effect of lipid level in a compound diet on the development of red drum *Sciaenops ocellatus* larvae. *Aquaculture*, 184: 339-347.
- Cahu, C. & J.L. Zambonino-Infante. 1995. Maturation of the pancreatic and intestinal digestive functions in sea bass (*Dicentrarchus labrax*): effect of weaning with different protein sources. *Fish Physiol. Biochem.*, 14: 431-437.
- Cahu, C.L. & J.L. Zambonino-Infante. 2001. Substitution of live food by formulated diets in marine fish larvae. *Aquaculture*, 200: 161-180.
- Canino, M.F. & K.M. Bailey. 1995. Gut evacuation of walleye pollock larvae in response 519 to feeding conditions. *J. Fish Biol.*, 46: 389-403.
- Cara, J.B., F.J. Moyano, S. Cardenas, C. Fernandez-Díaz & M. Yufera. 2003. Assessment of digestive enzyme activities during larval development of white bream. *J. Fish Biol.*, 63: 48-58.

- Castillo-Yáñez, F.J., R. Pacheco-Aguilar, F.L. García-Carreño & M.A. Navarrete-Del Toro. 2004. Isolation and characterization of trypsin from pyloric caeca of Monterey sardine *Sardinops sagax caerulea*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 140(B): 91-98.
- Concha-Frías, B. 2007. Evaluación de la capacidad digestiva de juveniles de *Centropomus undecimalis* (Bloch, 1792) sobre diferentes ingredientes proteínicos. Tesis de maestría, Facultad de Ciencias del Mar, UCN, Coquimbo, Chile. 130 pp.
- Chakrabarti, I., M.A. Gani, K.K. Chaki, R. Sur & K. K. Misra. 1995. Digestive enzymes in freshwater teleost fish species in relation to food habit and niche segregation. *Comp. Biochem. Physiol.*, 112A: 167-177.
- Chavez-Lomelí, M.O., M.H. Mattheeuws & P. Vega. 1989. *Biología de los peces del Río San Pedro en vista de determinar su potencial para la piscicultura*. Xalapa Veracruz, México. 222 pp.
- Chávez-Sánchez, C., C.A. Martínez-Palacios, G. Martínez-Pérez & Ross. 2000. Phosphorus and calcium requirements in the diet of the American cichlid *Cichlasoma urophthalmus*. *Aquaculture Nutrition*, 6:1-9.
- Chiu, S .T. & Pan, B. S. 2002. Digestive protease activities of juvenile and adult eel (*Anguilla japonica*). *Aquaculture*, 205: 141-156.
- Chong, A. R. Hashim & A. Bin-Ali. 2002. Inhibition of protease activities in *Discus symphysodon* spp. by three plant meals. *Aquaculture International*, 10: 433-441.
- Church, F.C., H.E. Swaisgood, D.H. Porter & G. Catignani. 1983. Spectrophotometric assay using o-phthaldehyde for determination of proteolysis in milk proteins. *Journal of Dairy Science*, 66: 1219-1227.
- Dabrowski, K. 1982. Proteolytic enzyme activity decline in starving fish alevins and larvae. *Env. Biol. Fish.* 7: 73-76.
- Dabrowski, K. 1984. The feeding of fish larvae: "present state of the art" and perspectives. *Reprod. Nutr. Dev.*, 24: 807-833.

- Dahl, J., E. Pettersson, J. Dannewitz, T. Jarvi & A. C. Lof. 2006. No difference in survival, growth and morphology between offspring of wild-born, hatchery and hybrid brown trout *Salmo trutta*. *Ecology of Freshwater Fish*, 15: 388-397.
- Darias M. J., H. M. Murray, J. W. Gallant, A. Astola, S. E. Douglas, M. Yúfera & G. Martínez-Rodríguez. 2006. Characterization of a partial α -amylase clone from red porgy (*Pagrus pagrus*): Expression during larval development. *Comp. Biochem. Physiol.*, 143(B): 209-218.
- Das, K. M. & S. D. Tripathi. 1991. Studies on the digestive enzymes of grass carp *Ctenopharyngodon idella* (VAL). *Aquaculture*, 92: 21-32.
- Debnath, D., A. K. Pal, N. P. Sahu, S. Yengkokpam, K. Baruah, D. Choudhury & G. Venkateshwarlu. 2007. Digestive enzymes and metabolic profile of *Labeo rohita* fingerlings fed diets with different crude protein levels. *Comp. Biochem. Physiol.*, Part B 146: 107-114.
- Deguara, S., K. Jauncey & C. Agius. 2003. Enzyme activities and pH variations in the digestive tract of gilthead sea bream. *J. Fish. Biol.*, 62: 1033-1043.
- del Río, V., J. Rosas, A. Velásquez & T. Cabrera. 2005. Desarrollo embrionario-larval y tiempo de metamorfosis del pez tropical *Xenomelaniris brasiliensis* (Pisces: Atherinidae). *Rev. Biol. Trop.*, 53(3-4): 503-513.
- Dimes, L. E. & N. F. Haard. 1994. Estimation of protein digestibility- I. Development of an *in vitro* method for estimating protein digestibility in salmonids. *Comp. Biochem. Physiol.*, 108(A): 349-362.
- Douglas, S. E., S. Mandla & J. W. Gallant. 2000. Molecular analysis of the amylase gene and its expression during development in the winter flounder, *Pleuronectes americanus*. *Aquaculture*, 190: 247-260.
- Dunn, B.M. 1989. Determination of protease mechanism. En: Beynon R.J. & J.S. Bond (Edits.). *Proteolytic Enzymes: A practical approach*. I.R.L. Press. Oxford, Inglaterra. 57-81.
- Engen, P.C. 1968. Organogenesis in the walleye surfperch, *Hyperprosopon argenteum* (Gibbons). *Calif. Fish Game*, 54: 156-169.

- Erlanger, B., N. Kokowsky & W. Cohen. 1961. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 95:271-278.
- 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 del Instituto Español de Oceanografía*, 18(1-4): 99-107.
- Falk-Petersen, I.B. 2005. Comparative organ differentiation during early life stages of marine fish. *Fish Shellfish Immunology*, 19: 397-412.
- Faulk, C.K., Benninghoff, A.D. & G.J. Holt. 2003. Ontogeny of the gastrointestinal tract and selected digestive enzymes in cobia *Rachycentron canadum* (L.). *J. Fish Biol.*, 70: 567-583.
- Fenerci S. & E. Sener. 2005. *In vivo* and *in vitro* protein digestibility of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1972) fed steam pressured or extruded feeds. *Turkish J. Fish. Aquat. Sci.*, 5: 17-22.
- Fishelson, L. 1995. Ontogenesis of cytological structures around the yolk sac during embryologic and early larval development of some cichlid fishes. *J. Fish Biol.*, 47(3): 479-491.
- Folk J. & E. Schirmer. 1963. The porcine pancreatic Carboxypeptidase A System: Three forms of the active enzyme. *The Journal of Biological Chemistry*. 238: 38-84.
- Frías-Quintana, C.A., C.A. Álvarez-González & G. Márquez-Coutoriel. 2010. Diseño de microdietas para el larvicultivo de pejelagarto *Atractosteus tropicus* (Gill 1863). *Universidad y Ciencia*, 26(2): 265-282.
- Fukusho, K. 1972. Organogenesis of digestive system in the mullet, *Liza haematocheila*, with special reference to gizzard. *Jpn. J. Ichthyol.*, 19: 283-294 (In Japanese).
- Furné, M., M.C. Hidalgo, A. López, M. García-Gallego, A.E. Morales, A. Domezain, J. Domezainé & A. Sanz. 2005. Digestive enzyme activities in Adriatic sturgeon *Acipenser naccarii* and rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: A comparative study. *Aquaculture*, 250: 391-398.

- García-Gasca, A., M.A. Galaviz, J.N. Gutiérrez & A. García-Ortega. 2006. Development of the digestive tract, trypsin activity and gene expression in eggs and larvae of the bullseye puffer fish *Sphoeroides annulatus*. *Aquaculture*, 251: 366-376.
- Gawlicka, A., S.J. The, S.S.O. Hung, D.E. Hinton & J. De La Noue. 1995. Histological and histochemical changes in the digestive tract of white sturgeon larvae during ontogeny. *Fish Physiol. Biochem*, 14: 357-371.
- Gisbert, E., R.H. Piedrahita & D.E. Conklinm. 2004. Ontogenetic development of the digestive system in California halibut (*Paralichthys californicus*) with notes on feeding practices. *Aquaculture*, 232: 455-470.
- Gisbert, E., J.B. Ortiz-Delgado & C. Sarasquete. 2008. Nutritional cellular biomarkers in early life stages of fish. *Histol. Histopathol.*, 23: 1525-1539.
- Gisbert, E., G. Giménez, I. Fernández, Y. Kotzamanis & A. Estévez. 2009. Development of digestive enzymes in common dentex *Dentex dentex* during early ontogeny. *Aquaculture*, 287: 381-387.
- Glass, H.J., N.L. Mc. Donald, R.M. Moran & J.R. Stark. 1989. Digestion of protein in different marine species. *Comp. Biochem. Physiol.*, 94(B): 607-611.
- Gorodilov, Y.N. 1996. Description of the early ontogeny of the Atlantic salmon, *Salmo salar*, with a novel system of interval (state) identification. *Environ. Biol. Fish.*, 47(2): 109-127.
- Govoni, J.J. 1980. Morphological histological and functional aspects of alimentary canal and associated organ development in larval *Leiostomus xanthurus*. *Rev. Can. Biol.*, 39: 69-80.
- Govoni, J.J., G.W. Boehlert & Y. Watanabe. 1986. The physiology of digestion in fish larvae. *Environ. Biol. Fish.*, 16: 59-77.
- Grabner, M. 1985. An in vitro method for measuring protein digestibility of fish feed components. *Aquaculture*, 48: 97-110.
- Guan, H-h, Q-y Xu, B-j Zhi, Y-y Kuang, W. Xu & J-s Yin. 2010. The post-embryonic development of digestive system and the demand of energy of *Hucho taimen*. *Agr. Sci. China*, 9(2): 286-293.

- Guerreiro, I., M. de Vareilles, P. Pousão-Ferreira, M.T.D. & L. Vera-Rodrigues Ribeiro. 2010. Effect of age-at-weaning on digestive capacity of white seabream (*Diplodus sargus*). *Aquaculture*, 300: 194-205.
- Guerrero-Zárate, R. 2010. Evaluación de la capacidad digestiva del pejelagarto (*Atractosteus tropicus*). Tesis de maestría, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, División Académica de Ciencias Biológicas. Tabasco. México. 100 p.
- Guo-Liang, R.L. Yang, G. Ze-Xia, W. Huan-Ling & Wei-Min. 2010. Molecular characterization of trypsinogens and development of trypsinogen gene expression and tryptic activities in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) and topmouth culter (*Culter alburnus*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 155(1): 77-85.
- Hachero-Cruzado, I., J.B. Ortiz-Delgado, B. Borrega, M. Herrera, J.I. Navas & C. Sarasquete. 2009. Larval organogenesis of flatfish brill *Scophthalmus rhombus* L. Histological and histochemical aspects. *Aquaculture*, 286: 138-149.
- Hamlin, H.J., I. Herbing & L.J. Kling. 2000. Histological and morphological evaluations of the digestive tract and associated organs of haddock throughout post-hatching ontogeny. *J. Fish Biol.*, 57: 716-732.
- Heming, T.A. & R.K. Buddington. 1988. Yolk sac absorption in embryonic and larval fishes, 407-446. En: Hoar W. A. & D. J. Randall (Eds.), *Fish physiology*, Vol. 11A. Academic Press, London, UK.
- Heu, M.S., H.R. Kim & J.H. Pyeun. 1995. Comparison of trypsin and chymotrypsin from the viscera of anchovy, *Engraulis japonica*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 112B(3): 557-567.
- Hoehne-Reitan, K. & E. Kjoersvik. 2004. Functional development of the liver and exocrine pancreas in teleost fish. *Am. Fish. Soc. Symp.*, 40: 47-83.
- Hofer, R. 1991. Digestion. 413-421. En: Winfield, I. J. & J. S. Nelson (Eds.). *Cyprinid fishes systematics biology and exploration (Fish and fisheries series)*, Chapman and Hall, London. 667 p.
- Hofer, R. & A. Nasir-Uddin. 1985. Digestive processes during the development of the roach (*Rutilus rutilus* L.). *J. Fish. Biol.*, 26: 53-59.
- Hofer, R., D. Via, J. Troppmair & G. Giussani. 1982. Differences in digestive enzymes between cyprinid and non-cyprinid fish. *Mem.Ist. Ital. Idrobiol*, 40: 201-208.

- Holcík, J. 1986. *The freshwater fishes of Europe*. Vol. 1. Part 1: Petromizontiformes. AULA-Verlag, Wiesbaden. 313 p.
- Houde, E. 1974. Effects of temperature and delayed feeding on growth and survival of larvae of three species of subtropical marine fishes. *Mar. Biol.*, 26: 271-285.
- Iijima, N., S. Tanaka & Y. Ota. 1998. Purification and characterization of bile salt-activated lipase from the hepatopancreas of red sea bream, *Pagrus major*. *Fish Physiol. Biochem.*, 18: 59-69.
- Jonas, E., M. Ragyanszki, J. Olah & L. Boross. 1983. Proteolytic digestive enzymes of carnivorous (*Silurus glanis* L.), herbivorous (*Hypophthalmichthys molitrix* Val.) and omnivorous (*Cyprinus carpio*) fishes. *Aquaculture*, 30: 145-154.
- Jun-Sheng L., Jian-lin L. & Ting-ting W. 2006. Ontogeny of protease, amylase and lipase in the alimentary tract of hybrid juvenile tilapia (*Oreochromis niloticus* X *Oreochromis aureus*). *Fish. Physiol. Biochem.*, 32: 295-303.
- Kawai, S. & S. Ikeda. 1973. Studies on digestive enzymes of fishes. Development of the digestive enzymes of rainbow trout after hatching and the effect of dietary change on the activities of digestive enzymes in the juvenile stage. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, 39: 819-823.
- Kjørsvik, E.K. Pittman & D. Pavlov. 2004. From fertilization to the end of metamorphosis-functional development, 204-278. En: Moksness, E., E. Kjørsvik & Y. Olsen (Eds.). *Culture of cold-water marine fish*. Blackwell Publishing Ltd, Oxford, UK.
- Klahan R, N. Areechon, R. Yoonpundh & A. Engkagul. 2009. Characterization and activity of digestive enzymes in different sizes of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) Kasetsart. *J. Nat. Sci.*, 43: 143-153.
- Kolkovski, S. 2001. Digestive enzymes in fish larvae and juveniles implications and applications to formulated diets. *Aquaculture*, 200: 181-201.
- Kumar S., F.L. García-Carreño, R. Chakrabarti, M.A.N. Toro & J.H Córdoba-Murueta. 2007. Digestive proteases of three carps *Catla catla*, *Labeo rohita* and *Hypophthalmichthys molitrix*: partial characterization and protein hydrolysis efficiency. *Aquaculture Nutrition*, 13: 381-388.

- Kunitz, M. 1947. Crystalline soybean trypsin inhibitor II. General properties. *J. Gen. Physiol.*, 30: 291-310.
- Kurokawa, T. & T. Suzuki. 1996. Formation of the diffuse pancreas and the development of digestive enzyme synthesis in larvae of the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture*, 141: 267-276.
- Kuz'mina, V.V. 1991. *Evolutionary Features of the Digestive-Transport Function in Fish*, Vol. 27. Plenum Publishing Corporation, pp. 167-175. Translated from Zhurnal Evolyut-sionnoi Biokhimii i Fiziologii.
- Lazo, J., 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.
- Lazo, J.P., M.J. Darias & E. Gisbert. 2011. Ontogeny of the digestive tract, 5-46. En: G. J. Holt (Ed.). *Larval Fish Nutrition*. First Edition. Wiley & Sons, Inc.
- Lindner, P., A. Eshell, S. Kolkovski, A. Tandler & S. Harpaz. 1995. Proteolysis by juvenile sea bass (*Dicentrarchus labrax*) gastrointestinal enzymes as a method for the evaluation of feed proteins. *Fish Physiol. Biochem.*, 14(5): 399-407.
- Liu, Z.Y., Z. Wang & J. Zhang. 2008. An acidic protease from the grass carp intestine *Ctenopharyngodon idellus*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 149(B): 83-90.
- López-Ramírez G., C.A. Cuenca-Soria, C.A. Álvarez-González, D. Tovar-Ramírez, J. L. Ortiz-Galindo, N. Perales-García, G. Márquez-Couturier, L. Arias-Rodríguez, J.R. Indy, W.M. Contreras-Sánchez, E. Gisbert & F.J. Moyano. 2010. Development of digestive enzymes in larvae of Mayan cichlid *Cichlasoma urophthalmus*. *Fish Physiol. Biochem.*, 37: 197-208.
- Lundstedt, L.M., J.F.B. Melo & G. Moraes. 2004. Digestive enzymes and metabolic profile of *Pseudoplatystoma corruscans* (Teleostei: Siluriformes) in response to diet composition. *Comp. Biochem. Physiol.*, 137(B): 331-339.
- Ma, P., B. Sivaloganathan & K.P. Reddy. 2001. Ontogeny of alpha amylase gene expression in sea bass larvae (*Lates calcarifer*). *Marine Biotechnology*, 3: 463-469.

- Ma, P., Y. Liu & K.P. Reddy. 2004. Characterization of the seabass pancreatic α -amylase gene and promoter. *Genetic and Comparative Endocrinology*, 137: 78-88.
- Maraux, S., D. Louvard & J. Baratti. 1973. The aminopeptidase from hog-intestinal brush border. *Biochimica et Biophysica Acta*, 32: 282-295.
- March, B.E., C. Macmillan & F.W. Ming. 1985. Techniques for evaluation of dietary protein quality for the rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Aquaculture*, 47: 275-292.
- Mark, W., R. Hofer & W. Wieser. 1987. Diet spectra and resource partitioning in the larvae and juveniles of three species and six cohorts of cyprinids from a subalpine lake. *Oecologia*, 71: 388-396.
- Martínez, I., F.J. Moyano, C. Fernandez-Díaz & M. Yufera. 1999. Digestive enzyme activity during larval development of the Senegal sole (*Solea senegalensis*). *Fish Physiol. Biochem.*, 21: 317-323.
- Martínez-Palacios C.A. & L.G. Ross. 1994. *Biología y cultivo de la mojarra latinoamericana Cichlasoma urophthalmus*. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México.
- Matus de la Parra, A., A. Rosas, J.P. Lazo & M.T. Viana. 2007. Partial characterization of the digestive enzymes of Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis* under culture conditions. *Fish Physiol Biochem.*, 33: 223-231.
- Micale, V., M. Garaffo, L. Genovese, M.T. Spedicato & U. Muglia. 2006. The ontogeny of the alimentary tract during larval development in common Pandora *Pagellus erythrinus* L. *Aquaculture*, 251: 354-365.
- Mitra, G., P.K. Mukhopadhyay & S. Ayyappan. 2008. Modulation of digestive enzyme activities during ontogeny of *Labeo rohita* larvae fed ascorbic acid enriched zooplankton. *Comp. Biochem. Physiol.*, 149(A): 341-350.
- Morrison, C.M., T. Miyake & J.R. Wright. 2001. Histological study of the development of the embryo and early larva of *Oreochromis niloticus* (Pisces: Cichlidae). *J. Morphol.*, 247: 172-195.

- Moyano, F.J., M. Diaz, F.J. Alarcon & M.C. Sarasquete. 1996. Characterization of digestive enzyme activity during larval development of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Fish. Physiol. Biochem.*, 15: 121-130.
- Munilla-Moran, R. & J.R. Stark. 1990. Metabolism in marine flatfish VI. Effect of nutritional state of digestion in turbot, *Scophthalmus maximus* (L.). *Comp. Biochem. Physiol.*, 95B: 625-634.
- Murray, H.M., J.W. Gallant, J.C. Pérez-Casanova, S.C. Johnson & S.E. Douglas. 2003. Ontogeny of lipase expression in Winter flounder. *J. Fish Biol.*, 62: 816-833.
- Nackz, M., A. Amarowicz, A. Sullivan & F. Shahidi. 1998. Current research developments on polyphenolics of rapeseed / canola: A review. *Food Chemistry*, 62:489-502.
- 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.
- Nielsen, P.M., D. Petersen & C. Dambmann. 2001. Improved method for determining food protein degree of hydrolysis. *J. Food Sci.*, 66(5): 642-646.
- Nolasco, H., A. Martínez, P. Hinojosa, R. Civera-Cerecedo & F. Vega-Villasante. 2006. 18 pp, En: Memorias del VIII Simposio Internacional de Nutrición Acuicola. *Digestibilidad in vitro de lípidos alimentarios para el camarón*, Noviembre. Universidad Autónoma de Nuevo León, México.
- Olsen, R.E., R. Myklebust, T. Kaino & E. Ringø. 1999. Lipid digestibility and ultrastructural changes in the enterocytes of Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.) fed linseed oil and soybean lecithin. *Fish Physiol. Biochem.*, 21: 35-44.
- Ortiz-Delgado, J.B., M.J. Darias, J.P. Cañavate, M. Yúfera & C. Sarasquete. 2003. Organogenesis of the digestive tract in the white seabream *Diplodus sargus*. Histological and histochemical approaches. *Histol. Histopathol.*, 18: 1155-1168.
- Ostaszewska, T. 2005. Developmental changes of digestive system structures in pike-perch (*Sander lucioperca* L.). *Elect. J. Ichth.*, 2: 65-78.

- Pavlov, D.A. 1993. Fertilization in wolffish, *Anarhichas lupus*: external or internal? *Vopro. Ikhtiol.*, 33(5): 664-670.
- Pavlov, D.A. 1994. Maturation and artificial fertilization of the eggs of captive common wolffish (*Anarhichas lupus* L.) from the White Sea. *Aquac. Fish. Manag.*, 25: 891-902.
- Pavlov, D.A. & E. Moksness. 1994. Reproductive biology, early ontogeny, and effect of temperature on development in wolffish: comparison with salmon. *Aquaculture International*. 2: 133-153.
- Pearse, A.G. 1985. *Histochemistry theoretical and applied*, Vol. 2. Analytic Technology, Churchill Livingstone, New York. U.S.A.
- Peres, A., J.L. Zambonino-Infante & C. Cahu. 1998. Dietary regulation of activities and mRNA levels of trypsin and amylase in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Fish Physiol. Biochem.*, 19: 145-152.
- Peres, J., J.F. Moyano & J.F. Alarcón. 2003. Evaluación del efecto de inhibidores de proteasas presentes en ingredientes vegetales utilizables en piensos para dos especies piscícolas cultivadas en Argentina; Pacú (*Piaractus mesopotamicus*) y Pejerrey (*Odontesthes bonaerensis*), En: Memorias del Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura. 442:454. CIVA 2003 (<http://www.civa2003.org>).
- Person, L. & J. Ruyet. 1989. Early weaning of marine fish larvae onto microdiets: constraints and perspectives. *Advances in Tropical Aquaculture, Tahiti. Actes de Colloque*, 9: 625-642.
- Ribeiro, L., J.L. Zambonino-Infante, C. Cahu & M. T. Dinis. 1999. Development of digestive enzymes in larvae of *Solea senegalensis*, Kaup 1858. *Aquaculture*, 179: 465-473.
- Robyt, J.F. & W.J. Whelan. 1968. *Starch and its Derivates*. Radley, J. A. (Ed.). Chapman and Hall, London.
- Rosenlund, G., J. Stoss & C. Talbot. 1997. Co-feeding marine fish larvae with inert and live diet. *Aquaculture*, 155: 183-191.

- Rungruangsak-Torrissen, K., 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 Physiol. Biochem.*, 32: 7-23.
- Sarasquete, M.C., A. Polo & M. Yufera. 1995. Histology and histochemistry of the development of the digestive system of larval gilthead seabream, *Sparus aurata* L. *Aquaculture*, 130: 79-92.
- Saunders, R.M., M.A. Conner, A.N. Booth, E.M. Bickoff & G.O. Kohler. 1972. Measurement of digestibility of alfalfa concentrates by in vivo and in vitro methods. *J. Nutr.*, 103: 530-535.
- Segner, H., V. Storch, M. Reinecke, W. Kloas & W. Hanke. 1994. The development of functional digestive and metabolic organs in turbot *Scophthalmus maximus*. *Mar. Biol.* 119: 471-486.
- Shiau, S. & H. Liang. 1995. Carbohydrate utilization and digestibility by tilapia, *Oreochromis niloticus* x *O. aureus*, are affected by chromic oxide inclusion in the diet. *J. Nutr.*, 125: 976-982.
- Smith, L.S. 1980. 3-18, En: T.V.R. Pillay (Ed.). *Fish Food Technology* UNDP-FAO, Rome.
- Sorgeloos, P. 1980. The use of the brine shrimp *Artemia* in aquaculture. 25-46, En: Persoone, G., Sorgeloos, P., Ž. Roels, O., Jaspers, E. (Eds.). *The brine shrimp Artemia. ecology, culturing and use in aquaculture*, vol. 3. Universal Press, Wetteren.
- Stauffer, C. 1989. *Enzyme Assays for Food Scientists*. Van Nostand Reinhold/AVI. Nueva York.
- Stroband, H.W.J. & K.R. Dabrowski. 1979. Morphological and physiological aspects of the digestive system and feeding in freshwater fish larvae, 355-376. En: Fontaine M. (Ed.) *La Nutrition dt:s Poisons*, CNERNA, Paris.
- Stroband, H.W.J. & A.G. Kroon. 1981. The development of the stomach in *Clarias lazera* and the intestinal absorption of protein macromolecules. *Cell Tissue Res.*, 215: 397-415.

- Tanaka, M. 1969. Studies on the structure and function of the digestive system of teleost larvae development of the digestive system during prelarval stage. *Jap. J. Ichthyol.*, 16: 1-9.
- Tanaka, M., S. Kawai, T. Seikai & J.S. Burke. 1996. Development of the digestive organ system in Japanese flounder in relation to metamorphosis and settlement. *Mar. Freshw. Behav. Physiol.*, 28: 1-33.
- Tengjaroenkul, B., B.J. Smith, T. Caceci & S.A. Smith. 2000. Distribution of intestinal enzyme activities along the intestinal tract of cultured Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L. *Aquaculture*, 182: 317-327.
- Tengjaroenkul, B., B.J. Smith, S.A. Smith & U. Chatreewongsin. 2002. Ontogenic development of the intestinal enzymes of cultured Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L). *Aquaculture*, 211: 241-251.
- Toledo-Cuevas, E.M., F.J. Moyano-López, D. Tovar-Ramírez, C.A. Strüssmman, C.A. Álvarez-González, C.C. Martínez-Chávez & C.A. Martínez-Palacios. 2011. Development of digestive biochemistry in the initial stages of three cultured Atherinopsids. *Aquaculture Research*, 42: 776-786.
- Treviño, L., C.A. Alvarez-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. *J. Appl. Ichthyol.*, 27: 73-82.
- Uppström, B. 1995. Seed chemistry. 217-243, En: Kimber D. & D.I. McGregor (Eds.), *Brassica Oilseeds: Production and Utilization*. Cab International. Wallingford, Oxford, UK.
- Walford, J. & T.J. Lam. 1993. Development of the digestive tract and proteolytic enzyme activity in sea bass (*Lates calcarifer*) larvae and juveniles. *Aquaculture*, 109: 187-205.
- Walter, H.E. 1984. Proteinases: methods with hemoglobin, casein and azocoll assubstrates. En: Bergmeyern H.J. (Ed.) *Methods of enzymatic analysis*. Verlag Chemie, Weinha, 5: 270-277.

- Watanabe, T., C. Kitajima & S. Fujita. 1983. Nutritional value of live organism used in Japan for mass propagation to fish: A review. *Aquaculture*, 34: 115-143.
- Watanabe, Y. 1984. An ultrastructural study of intracellular digestion of horseradish peroxidase by the rectal epithelium cells in larvae of a freshwater cottid fish *Cortus nozawae*. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, 50: 409-416.
- Wu, T.T. & X.M. Zhu. 1994. Study on the activity of digestive enzymes in mandarin fish, black carp, grass carp, common carp, crucian carp and silver carp. *J. Fish. Sci. China*, 12:10-17.
- Wu, G.P., M.J. Cao, Y. Chen, B.X. Liu & W.J. Su. 2008. Leucine aminopeptidase from red sea bream (*Pagrus major*) skeletal muscle: purification, characterization, cellular location, and tissue distribution. *J. Agric. Food Chem.*, 56(20): 9653-60.
- Zambonino-Infante, J.L. & C.L. Cahu. 1994. Development and response to a diet change of some digestive enzymes in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Fish Physiol. Biochem.*, 12: 399-408.
- Zambonino-Infante, J.L. & C.L. Cahu. 2001. Ontogeny of the gastrointestinal tract of marine fish larvae. *Comp. Biochem. Physiol.*, 130C: 477-487.
- Zar, J.H. 1998. *Biostatistical Analysis*. (4th Edition). Prentice Hall, Englewood Clifs, New Jersey.
- Zhong-Yi,L., W. Zhang & Z. Jian. 2008. An acidic protease from the grass carp intestine (*Ctenopharyngodon idellus*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 149(B): 83-90.

12. ANEXO

Productos

Hasta ahora, la presente tesis ha generado los productos que siguen:

1) Artículos científicos

Cuenca-Soria, C. A., Álvarez-González, C. A., Ortiz-Galindo, J. L., Tovar Ramírez, D., Guerrero-Zárate, R., Aguilar-Hernández, S., Perera-García, M. A., Hernández-Gómez, R. and E. Gisbert. 2013. **Histological development of the digestive system in the Neotropical Mayan cichlid *Cichlasoma urophthalmus***. Journal Applied of Ichthyology. (PUBLICADO ON LINE, doi: 10.1111/jai.12307).

Cuenca-Soria, C. A., Álvarez-González, C. A., Ortiz-Galindo, J.L., Nolasco-Soria, H., Tovar-Ramírez, D., Guerrero-Zárate, R., Castillo-Domínguez, A., Perera-García, M. A. and Gisbert, E. 2013. **Partial characterization of digestive proteases of the Mayan cichlid *Cichlasoma urophthalmus***. Fish Physiology and Biochemistry. (ACEPTADO).

Cuenca-Soria, C. A., Álvarez González, C. A., Arias-Rodríguez, L. Ortiz-Galindo, J. L., Perera-García, M. A. y Nolasco-Soria H. **Digestibilidad *in vitro* de ingredientes alimenticios, en el cíclido Maya *Cichlasoma urophthalmus***. Universidad y Ciencia. (SOMETIDO).

Cuenca-Soria C. A., Ortiz-Galindo, J. L., Tovar-Ramírez, D., Álvarez-González, C. A., Ochoa-Báez, R. I. y Murillo-Álvarez, J. I. **Indicators of morphofunctional development, during the early ontogeny of teleost fish: A review**. Aquaculture. (POR SOMETER).

Cuenca-Soria, C. A., Tovar-Ramírez, D., Álvarez-González, C. A. and Ortiz-Galindo, J. L. **Gene expression of digestive enzymes during early ontogeny of the Mayan cichlid *Cichlasoma urophthalmus***. (elaboración de manuscrito EN PROCESO, PARA SOMETER).

2) Eventos científicos presentados

Cuenca-Soria, C .A., Álvarez-González, C. A., Ortiz-Galindo, J. L., Pérez-Palafox X. A. 2010. **Digestibilidad *In vitro* de ingredientes proteínicos, con fines de uso potencial para nutrición de *Cichlasoma urophthalmus*.** In: XII Congreso Nacional de Ictiología, Nuevo Vallarta, Nayarit, México. Octubre 26-29. Espinoza-Pérez, H., Ortiz-Galindo, J. L., Valdez-Moreno, M. E., Vega-Cendejas, M. E., González-Acosta, A. F. (Edits.). SIMAC.

Cuenca-Soria, C .A., Álvarez-González, C. A., Ortiz-Galindo, J. L. 2011. **Nuevas fuentes de proteína animal y vegetal para el diseño de alimentos balanceados del pez maya *Cichlasoma urophthalmus*.** XI Semana de Posgrado. La Paz, B. C. S. México. CICIMAR-UABCS-CIBNOR.

Cuenca-Soria, C .A., Álvarez-González, C. A., Ortiz-Galindo, J. L. 2011. **Avances en la caracterización de proteasas digestivas, en juveniles de mojarra castarrica *Cichlasoma urophthalmus*.** In: II Encuentro de Investigación Científica y I Simposio Internacional de Investigación Multidisciplinaria. Tenosique, Tabasco, México. Perera-García, M. A., de la Cruz Leyva, M. C., Hernández-Gómez, R. E., Mendoza-Vázquez, E., Flores-Córdova, F. Flores-Vidal, M. (Edits.). UJAT-DAMR.

Cuenca-Soria, C .A., Álvarez-González, C. A., Ortiz-Galindo, J. L., Pérez-Palafox X. A., Gisbert-Casas, E. 2012. **Cambios morfofuncionales en estómago durante la ontogenia inicial de la mojarra castarrica *Cichlasoma urophthalmus*.** In: XIII Congreso Nacional de Ictiología, San Cristobal de Las Casas, Chiapas, México. Octubre 29-Noviembre 2. Ortiz-Galindo, J. L., Velázquez-Velázquez, E. (Edits.). SIMAC-UNICACH.

Cuenca-Soria, C. A., Tovar-Ramírez, D. Ortiz-Galindo, J. L., Gisbert, E., Álvarez-González, C. A., 2013. **Studies of digestive physiology during early ontogeny of the mayan cichlid *Cichlasoma urophthalmus*.** En: Larvi 2013 6th Fish and Selfish Larviculture Symposium. Ghent, Bélgica. 2-5 de septiembre.

Cuenca-Soria C. A., Álvarez-González, C. A., Tovar-Ramírez, D., Ortiz-Galindo, J. L., Aguilar-Hernández, S., Perera García, M. A., Hernández Gómez, R., Castillo-Domínguez, A., Gisbert-Casas, E. **Avances en la fisiología digestiva de la mojarra castarrica *Cichlasoma urophthalmus*.** En: Simposio Internacional de Nutrición Acuícola. Villahermosa, Tabasco. México.