



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN
NICOLÁS DE HIDALGO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS Y FORESTALES

Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DIGESTIVA DURANTE EL
DESARROLLO LARVARIO Y JUVENIL DE DOS ESPECIES DE PEJERREY**

TESIS

Biol. Ma. Antonia Herrera Vargas

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. ELVA MAYRA TOLEDO CUEVAS

Morelia, Michoacán, Septiembre, 2011.



INSTITUTO DE
INVESTIGACIONES
AGROPECUARIAS
Y FORESTALES

CONTENIDO

I.	RESUMEN GENERAL	1
II.	GENERAL SUMMARY	2
III.	INTRODUCCIÓN GENERAL	3
	III. 1. Cultivo del pejerrey	6
	III. 2. Nutrición, alimentación y papel del sistema digestivo del pejerrey	8
	III. 3. Digestión, fluidos y enzimas digestivas	10
	III.3.1. Digestión de Proteínas	11
	III. 3.2. Digestión de Lípidos	15
	III. 3.3. Digestión de Esteres Fosfóricos	16
	III. 4. Digestión larvaria	19
	III.5. Características de maduración digestiva	21
IV.	HIPÓTESIS	24
V.	OBJETIVOS	25
	V. 1. Objetivo general	25
	V. 2. Objetivos particulares	25
VI.	RESULTADOS	26
	1) Resumen	26
	2) Abstract	26
	3) Introducción	27
	4) Materiales y métodos	30
	4.1. Obtención y mantenimiento de los organismos	30
	4.2. Muestreos y Disección	30
	4.3. Análisis enzimáticos	31
	4.4. Análisis estadísticos	32
	5) Resultados	33
	5.1. Crecimiento de los organismos	33

5.2. Actividades enzimáticas implicadas en la digestión de proteínas	33
5.3. Actividades enzimáticas implicadas en la digestión de lípidos	33
5.4. Actividades enzimáticas implicadas en la absorción de Nutrientes	34
5.5. Proporciones de las actividades de las enzimas de borde de cepillo con respecto de las enzimas citosólicas	35
6) Discusión	35
7) Agradecimientos	43
8) Literatura citada	44
VII. PERSPECTIVAS Y RECOMENDACIONES	54
VIII. BIBLIOGRAFÍA COMPLEMENTARIA	55
Anexo 1	60

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Crecimiento de *Odontesthes bonariensis* y *O. hatcheri* a lo largo del experimento (media \pm ES, n15). 50

Figura 2. Actividades específicas enzimáticas durante el desarrollo larval y juvenil de *Odontesthes bonariensis* y *O. hatcheri* (media \pm ES, n3). dpe; días de post-eclosión. Las letras distintas representan diferencias significativas; correspondiendo las letras oscuras las obtenidas al comparar la actividad a lo largo de la ontogenia de *O. hatcheri*. El recuadro interior en LAP representa la actividad durante el período de 7 a 56 dpe. 51

Figura 3. Porcentaje de actividad secretada de la enzima Lipasa dependiente de sales biliares (BAL) para *Odontesthes bonariensis* y *O. hatcheri* durante el período juvenil (media \pm ES, n3: α 0.05). dpe; días de post-eclosión. Distintas literales representan diferencias significativas, siendo las oscuras las obtenidas al comparar la actividad a lo largo del desarrollo de *O. hatcheri*, mientras que las claras las obtenidas para *O. bonariensis*. 52

Figura 4. Proporciones de las actividades de enzimas digestivas de membrana de borde de cepillo y citosólicas durante el desarrollo larvario y juvenil de dos especies de pejerreyes (media \pm ES, n3). Distintas literales representan diferencias significativas a lo largo del desarrollo. B) Las letras cursivas representan las diferencias a la proporción FA/FAc 53

Figura 5. Actividades totales enzimáticas durante el desarrollo larvario y juvenil de *Odontesthes bonariensis* y *O. hatcheri* a lo largo del experimento (media \pm ES, n3). dpe; días de post-eclosión. Distintas literales representan diferencias significativas; correspondiendo las letras oscuras las obtenidas al comparar la actividad a lo largo de la ontogenia de *O. hatcheri*. El recuadro interior en LAP representa la actividad durante el período de 7 a 56 dpe 61

ÍNDICE DE DIAGRAMAS

- Diagrama 1.** Hidrólisis por exopeptidasas y endopeptidasas de una proteína (De Silva 1995) 12
- Diagrama 2.** Hidrólisis de la proteína sintética, benzil-oxicarbonil-L-tirosilglicina amina. (De Silva 1995) 13
- Diagrama 3.** Hidrólisis de proteínas por Exopeptidasas. (De Silva 1995) 14
- Diagrama 4.** Modo de acción de la lipasa y colipasa. En A, la lipasa y la colipasa se encuentran libres y las sales biliares (b) cubriendo la superficie del glóbulo lipídico. (a) pero la lipasa no puede actuar. En B la colipasa adhiere el glóbulo. En C, la lipasa es anclada debido a la colipasa y puede hidrolizar los triacilgliceroles (Johnson 2001) 16
- Diagrama 5.** Reacción enzimática de la fosfatasa alcalina o ácida con el sustrato comúnmente usado para detectar su actividad. La actividad de una u otra se favorece con el pH de la reacción 17

INDICE DE CUADROS

- Cuadro 1.** Especies endémicas de agua dulce y fría, cultivadas o en experimentación para su cultivo en América Latina 3

Dedicatoria

*A mi pequeña **Estrella**, eres lo más bello que a mi vida ha llegado y la alegría de mi corazón, fruto de un amor inmenso, quiero ofrecerte este trabajo como un tributo por todas esas horas que tuve que quitarte para poder estudiar.*

*A mi **Mamá Chayo**, a mi mamá **Enriqueta** y a mi tía **Manue**, por estar siempre, de forma incondicional. Su fuerza y su amor han sido mi guía siempre.*

*A mi papá **Tomás**, por que todos mis éxitos en esta vida han sido posibles gracias a tus consejos y enseñanza moral, intelectual y física.*

*A mi papá **Tony**[†].*

*A mis amigas del alma **Dafne**, **Maru**, **Ana Carmen**, **Mari Carmen** y **Lidia**, por todos los momentos de convivencia y de compartir experiencias vividas.*

*Al final te dejo a ti mi amado compañero y amigo **Jesús**, porque te has convertido con el paso de los años en una extensión de mi espíritu y porque me has ayudado a lo largo de mi vida matrimonial y profesional a superarme en cada paso que damos juntos. Que Dios te premie por la paciencia que tuviste durante la maestría. En esperar siempre a que tuviese un hueco en el tiempo para estar juntos y compartir con nuestra hija toda clase de esperanzas. Y finalmente porque gozas conmigo como un solo ser, éste tan anhelado momento.*

Agradecimientos

A mi asesora, la Dra. **Mayra Toledo Cuevas** por ser una gran científica, una colosal guía para el asesorado, un gran apoyo en los momentos difíciles del proyecto, porque nunca escatimó esfuerzo y tiempo para corregir y mejorar este trabajo, por sus valiosos conocimientos siempre al servicio del tésista. Pero sobre todo porque me demostró en el trayecto de esta tarea que parecía no tener fin, que es una gran profesora y excelente ser humano.

Al Dr. **Dariel Tovar Ramírez**. Por sus acertados consejos al proyecto. Gracias también por toda su ayuda, dirección y amistad.

Al Dr. **Carlos Alfonso Álvarez González**. Por escucharme y retroalimentar con soluciones todo tipo de dudas. Pero sobre todo por concederme la dicha de su valiosa amistad.

Al Dr. **Carlos A. Strüssmann**. Por prestar sus instalaciones experimentales y los organismos para llevar a cabo este trabajo.

Al Dr. **Francisco Javier Moyano**. Por que sin el desarrollo y mejora de las metodologías sobre las enzimas digestivas de peces este trabajo no hubiera sido posible.

A los Dres. **Héctor Nolasco Soria, Carlos Martínez Palacios y Jorge Fonseca Madrigal**. Por aceptar ser parte de la comisión revisora y asesorado, por su valiosa guía para mejorar la redacción y presentación de este trabajo.

Dr. **Antonio Campos**. Por el apoyo económico otorgado a través del proyecto PIFI 2010, que me permitió asistir, presentar y concluir la escritura de este trabajo de tesis, en el XVII simposium internacional de nutrición y acuicultura.

Dra. **Gisela Ríos**. Por su ayuda en la revisión de los análisis estadísticos.

A todos mis familiares y amigos que me han echado porras.

A todos mis compañeros de cardumen del laboratorio de Nutrición.



Dirección de Investigación y Posgrado
Secretaría de Servicios Académicos

ciencia.dip@ujat.mx

Teléfono/fax 01.993.3127210

UNIVERSIDAD JUÁREZ AUTÓNOMA DE TABASCO
"ESTUDIO EN LA DUDA, ACCIÓN EN LA FE"



Villahermosa, Tabasco. 14 de junio de 2011.

Autor(es): MA Herrera-Vargas, CA Strüssmann, FJ Moyano-López, D Tovar-Ramírez, EM Toledo-Cuevas

Tengo el agrado de comunicar que recibimos copia electrónica del manuscrito:

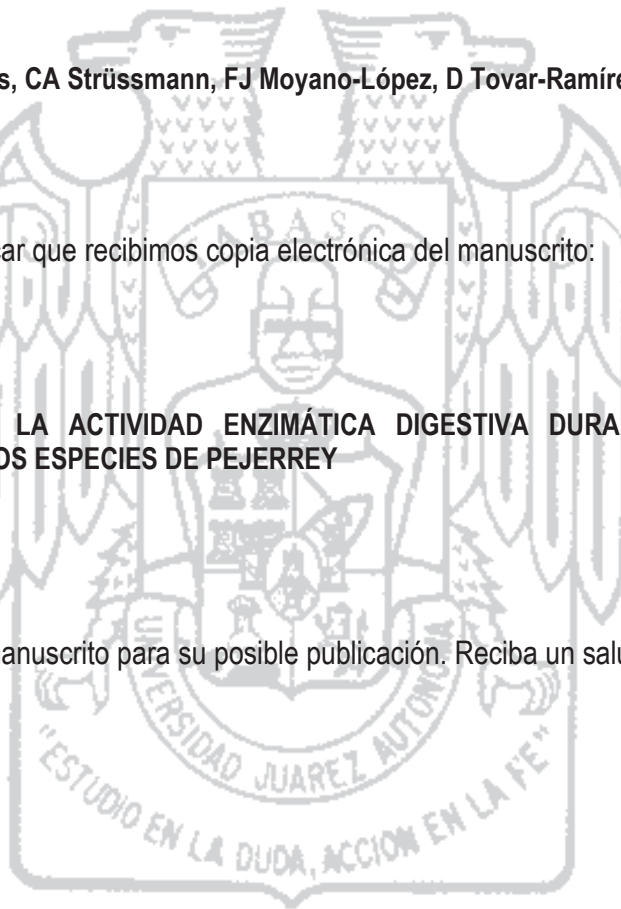
770UC EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DIGESTIVA DURANTE EL DESARROLLO LARVARIO Y JUVENIL DE DOS ESPECIES DE PEJERREY

Agradecemos el envío del manuscrito para su posible publicación. Reciba un saludo respetuoso.

Atentamente

Dr. Juan Barajas Fernández
Editor

c.p. archivo



I. RESUMEN GENERAL

Los pejerreyes son especies de peces agástricos, atherinopsidos endémicos de Sudamérica, en donde tienen gran importancia como pesca deportiva. Existe un gran interés en su cultivo, aunque éste solo se ha logrado en Japón, país en el cual se aprecia mucho la calidad de su carne. Sin embargo, hasta la fecha no existen alimentos balanceados adecuados para la especie y menos para cada uno de los estadios de vida. Así mismo se desconoce el momento apropiado para iniciar este tipo de alimentación. Reconociendo las importantes aportaciones que el estudio de la bioquímica digestiva de las especies tiene sobre dichos aspectos, el objetivo del presente trabajo fue caracterizar la actividad enzimática digestiva. Se analizaron las siguientes enzimas: 1) leucina alanina peptidasa, 2) leucina aminopeptidasa N, 3) lipasa dependiente de sales biliares, 4) fosfatasa alcalina y 5) fosfatasa ácida, durante el desarrollo larvario y juvenil de dos especies de pejerrey, *Odontesthes bonariensis* y *O. hatcheri*. Los resultados encontrados muestran niveles tempranos de actividad de todas las enzimas analizadas. Particularmente se encontraron niveles muy altos de la leucina alanina peptidasa, fosfatasa alcalina y leucina aminopeptidasa N, en comparación con los valores encontrados en otras especies gástricas y agástricas de peces, niveles constantes de secreción de la lipasa dependiente de sales biliares (BAL) a partir de los 2 meses de edad y hasta el final del estadio juvenil evaluado. Todos estos hallazgos son indicativos de un buen equipamiento digestivo y absorbivo de las especies. Adicionalmente sugieren un desarrollo normal del páncreas previo desde este momento. Posterior al “destete” completo (alimentación solo con dieta balanceada) se observó un marcado aumento de actividad de BAL en ambas especies. El incremento antes mencionado sugiere que el tipo de lípidos contenidos en la dieta balanceada promueve una mejor digestión y utilización de dichos nutrientes (Chakrabarti & Rathore 2010), aunque también podría representar el momento en el que la actividad de esta lipasa llega a ser más importante durante el desarrollo de estos organismos. La proporción entre los niveles de las enzimas de borde de cepillo y la citosólica (enzimas indicadoras de un modo adulto, o maduro de digestión, contra las indicadoras de pinocitosis e inmadurez digestiva) muestran que la maduración podría ocurrir de forma precoz para *O. hatcheri* y *O. bonariensis* a los 14 y 28 días de pos-eclosión respectivamente, siguiendo un modelo de maduración semejante a lo descrito para

peces marinos con estómago, a pesar de que las evidencias muestran que los pejerreyes son peces agástricos.

II. GENERAL SUMMARY

The pejerreyes are stomachless, native Atherinopsids of South America, where they have great importance as sport fishing species. There have been a great interest on its culture, but this has been achieved only in Japan, where its quality is highly appreciated. Nevertheless, until now there is't an ad hoc balanced diet for the species neither for each of their life stages. Additionally, it is not known the adequate moment when the fish are ready to initiate this type of feed. Knowing the important contributions the studies of the digestive biochemistry of the species have on the above mentioned aspects, the aim of the present work was the characterization of some of the main digestive enzyme activities: 1) The leucine alanine peptidase, 2) leucine aminopeptidase N, 3) bile-salt depend lipase 4) alkaline phosphatase and 5) acid phosphatase, were analyzed during the larval and juvenile development of two species of pejerrey, *Odontesthes bonariensis* and *O. hatcheri*. Early activity of all the analyzed enzymes were found; particularly, very high levels of leucine alanine peptidase, alkaline phosphatase and aminopeptidase N, in comparison with other gastric and agastric fish species. Additionally, the important levels of activity at all the enzymes studied suggest the species posses a good digestive and absorptive equipment. The steady levels of bile-salt depend lipase (BAL) secretion found since from 2 months of age to the end of the juvenile evaluated stage suggests a normal development of the pancreas before this moment. After total weaning (feeding only with balanced diets) a marked increase on BAL's activity was observed for both pejerrey species. This suggests that the type of lipids contained in the balanced diet promotes a better digestion and utilization of these nutrients (Chakrabarti & Rathore 2010), but could also represent the time when the activity of this lipase becomes more important during the development of organisms. The ratio of the levels of brush border and cytosolic enzymes (activities indicative of an adult way or mature digestion, against the pinocytic and immature proces) suggests that intestinal maturation is occurring early in *O. hatcheri* and *O. bonariensis*. This seems to take place at 14 and 28 days post-hatching respectively, following a similar model as the one described for gastric marine fish, even that pejerrey seems to be agastric fish.

III. INTRODUCCIÓN GENERAL

En los últimos 50 años ha habido una creciente tendencia a la diversificación del cultivo de organismos acuáticos en el mundo. En América Latina, particularmente en Sudamérica, se reporta que la producción pasó de 5 a 70 especies, esto principalmente debido a que la diversidad biológica es muy rica en esa región del continente, incluyendo una importante diversidad de peces de agua dulce. Lo anterior ha estimulado múltiples programas de investigación y desarrollo de tecnologías de cultivo de especies nativas. No obstante de la gran cantidad de especies nativas (Cuadro 1) de reciente incorporación a programas de cultivo, la mayoría aún se encuentran en etapas muy tempranas de desarrollo tecnológico, debido al acelerado ritmo de expansión del espectro de especies que se pretenden cultivar, por lo que no se ha logrado la consolidación de la tecnología de cultivo de la gran mayoría de éstas (FAO 2010).

Cuadro 1. Especies endémicas de agua dulce y fría, cultivadas o en experimentación para su cultivo en América Latina.

Especie	Nombre común
<i>Piaractus mesopotamicus</i>	Pacu
<i>Piaractus brachipomus</i>	Cachama
<i>Colossoma macropomum</i>	Tambaqui
<i>Pseudoplatystoma corruicans</i>	Pintado o Surubi
<i>Pseudoplatystoma fasciatum</i>	Doncella
<i>Pseudoplatystoma fasciatum</i>	Cachara
<i>Steindachneridion parahybae</i>	Surubim de Parahiba
<i>Surubim cuspicaudus</i>	Blanquillo
<i>Leiarius marmoratus</i>	Bagre
<i>Arapaima gigas</i>	Pirarucu o Paiche
<i>Salminus brasiliensis</i>	Dourado
<i>Rhamdia quelen</i>	Bagre negro o Jundiá
<i>Prochilodus spp</i>	Boca chico
<i>Chirostoma estor</i>	Pez blanco

<i>Chirostoma promelas</i>	Pico prieto
<i>Prochilodus lineatus</i>	Sábalo, Curimbatá
<i>Prochilodus mariae</i>	Coporo
<i>Brycon amazonicus</i>	Matrinxa
<i>Brycon insignis</i>	Piabanha
<i>Cichlasoma urophthalmus</i>	Mojarra Castarrica
<i>Petenia splendida</i>	Tenguayaca
<i>Brycon amazonicus</i>	Sardina colimorada
<i>Brycon lundii</i>	Matrinxa o Yamú
<i>Galaxias maculatus</i>	Puye
<i>Galaxias platei</i>	Puye
<i>Rhamdia quelen</i>	Bagre sapo o Randiá
<i>Surubim cuspidus</i>	Blanquillo
<i>Menticirrhus americanus</i>	Blanquito rey
<i>Pseudoancistrus sidereus</i>	Cucha Diamante
<i>Peckoltia vitatta</i>	Cucha cebra
<i>Hemiancistrus subviridis</i>	Cucha verde amarilla
<i>Peckoltia sp</i>	Cucha piña
<i>Ancistrus dolichopterus</i>	Xenocara
<i>Rhinelepis aspera</i>	Vieja de agua
<i>Atractocteus osseus</i>	Catán
<i>Lepisosteus tropicus</i>	Peje lagarto

Fuente: FAO 2010.

Actualmente, las únicas especies endémicas de agua dulce ampliamente introducidas pertenecen a la familia Atherinopsidae. Estas son conocidas como pejerreyes (FAO 2009), particularmente *Odontesthes bonariensis* y *O. hatcheri*, especies que se distribuyen naturalmente en todo el Cono Sur de Brasil, Uruguay y Argentina, en donde tienen una gran importancia social (López *et al.* 2001, Baigún y Delfino 2003). Si bien parecen ser prometedoras las perspectivas de muchas otras especies, las atractivas características de los pejerreyes han motivado su introducción y

una exitosa adaptación a embalses, estanques y lagunas templadas de diversos lugares del mundo, como Europa y Asia. Por ejemplo, en 1968 fue introducida en Japón, con la intervención del Ministerio de Asuntos Agrarios y de la Liga Argentina Japonesa del Pejerrey. En la actualidad existen 21 provincias dedicadas a la cría del pejerrey en Japón y en las cuales este recurso no sólo ha solucionado un problema de alimentación, sino que evitó la migración de la población a las grandes urbes, dando la oportunidad para que los jóvenes se dedicaran a la cría del pejerrey en granjas piscícolas (Grosman 2002).

Los pejerreyes han tenido una gran aceptación en el mercado japonés y un excelente precio de venta. El costo de algunos platillos preparados con este recurso alcanzan los 100 dólares, y por kilo, en las granjas, su costo de venta es de 50 dólares (<http://www.lanacion.com.ar/197130-el-pejerrey-se-gana-un-lugar-en-japon>). Estos altos costos de venta se deben a la alta calidad de su carne (López *et al.* 2001), ya que a pesar de ser habitantes de aguas continentales, el sabor, olor, textura y características organolépticas de su carne es muy semejante a las exquisitas y de alto valor especies marinas (Somoza *et al.* 2008). Por esta razón, es apto para ser preparado en una gran variedad de formas: ahumado, cocinado, horneado, rostizado, frito al estilo de la cocina del Este, e incluso crudo como sashimi Japonés (Toda *et al.* 1995). Es por todo esto que la especie goza de un prestigio generalizado como exquisitez culinaria.

Los pejerreyes sustentan la pesquería deportiva más popular de Argentina (Toda *et al.* 1998). No obstante, la gran actividad económica generada por esta actividad ha provocado la sobreexplotación de la especie, debido a la pesca indiscriminada de larvas y juveniles (López y García 2001, Gómez *et al.* 2007). Otros factores que han afectado en gran medida a las poblaciones naturales, son la introducción de especies exóticas, como, las carpas. Estas han provocado grandes cambios ecológicos en los cuerpos de agua, tales como una importante disminución del zooplancton de las lagunas, lo cual torna vulnerables a los pejerreyes a las carnadas de las cañas de pesca al no tener alimento natural (Colautti *et al.* 2003, Toda *et al.* 1998). Adicionalmente, la contaminación debida a la urbanización y los largos períodos de sequía e inundaciones recurrentes, donde los cuerpos de agua aparecen y desaparecen y se vuelven inadecuados en forma cíclica (Somoza *et al.* 2008), han terminado por llevar a las

poblaciones a un punto crítico que requiere de atención desde el punto de vista biotecnológico para poder evitar el colapso de sus poblaciones. El cultivo es entonces una alternativa para aumentar su producción masiva.

Sin embargo, para lograr desarrollar la tecnología de cultivo del pejerrey de manera intensiva se requiere complementar el conocimiento tecno-científico sobre la biología del pejerrey y su cultivo (Somoza *et al.* 2008), para lo cual se requiere minimizar al máximo los costos de producción, desarrollando una dieta adecuada y específica para cada una de las etapas de crecimiento o desarrollo de las especies, en donde los estudios sobre la fisiología, requerimientos y comportamiento digestivo de dichas especies juegan un papel muy importante (Rathore *et al.* 2005, Debnath *et al.* 2007).

El objetivo del presente trabajo fue realizar la cuantificación de la actividad de las principales enzimas digestivas intestinales durante la ontogenia larvaria y juvenil de dos especies de pejerrey, *Odontesthes bonariensis* y *O. hatcheri*. Estos estudios contribuyen a la determinación de los requerimientos nutricionales de estas especies, necesarios para el desarrollo de dietas balanceadas *ad hoc* para cada estadio de vida de los organismos. Adicionalmente, se genera información útil para caracterizar la temporalidad y modelo de maduración digestiva de estos organismos, para los que existen evidencias anatómicas e histológicas que los definen como agástricos. La información obtenida contribuirá a determinar el momento óptimo para su destete, el que coincide con la adquisición de la maduración digestiva.

III.1. Cultivo del pejerrey

El cultivo de los pejerreyes se ha propuesto como una medida de conservación, propagación y comercialización. A través de un siglo se ha investigado sobre diversos aspectos, tales como los requerimientos ambientales para su cultivo, fisiología, reproducción y genética, lo que ha permitido completar el ciclo de vida en cautiverio y su producción intensiva a escala comercial en Japón. Entre los hallazgos más importantes se encuentra el conocimiento de que presentan un mejor desempeño en aguas salobres a pesar de ser especies que habitan aguas dulces, (Toresani *et al.*

1994). En aguas con niveles entre 3 a 5 g/L de sal (NaCl) presentan mejores crecimientos y supervivencias (Tsuzuki *et al.* 2001), probablemente debido a un efecto positivo en el balance iónico y osmorregulatorio producidos por su cultivo en aguas con cierto grado de salinidad, así como por la mitigación en las respuestas al estrés, ya que observaron que conforme aumentaban la salinidad disminuían los niveles de cortisol sanguíneo (Tsuzuki *et al.* 2000^{a,b}, Tsuzuki *et al.* 2008).

Por otro lado, se han logrado mejores tasas de reproducción en los pejerreyes mediante la manipulación de la temperatura y foto período, aumentando tanto el desove, la cantidad y calidad de huevos fertilizados y el período de reproducción. También se ha logrado disminuir la mortalidad en los estadios larvarios (con una tasa de supervivencia del 60%) y mejorar la salud de los juveniles, promoviendo que lleguen a la etapa adulta, con la finalidad de utilizarlos como reproductores. Adicionalmente se han implementado tratamientos hormonales en los huevos, con la finalidad de manipular el sexo de las larvas eclosionadas y obtener el mismo número de organismos femeninos y masculinos (Somoza *et al.* 2008).

Se han obtenido híbridos de *O. bonariensis* y *O. hatcheri*, que han mostrado un mejor rendimiento en el crecimiento. Sin embargo éstos son fértiles, por lo que están desarrollado métodos (inducción de la triploidia, inhibición del celo de los organismos, tratamientos hormonales, así como la manipulación de la temperatura durante la primera diferenciación sexual para producir organismos monosexo) que permitan suprimir la reproducción, asegurando así que no lleguen a ocasionar problemas ecológicos en el supuesto de que fueran liberados al ambiente (Strüssmann *et al.* 1993).

Koshimizu y colaboradores (2010) elaboraron un mapa genético mediante el desarrollo de marcadores de DNA ligados a la determinación gonadal del pejerrey patagónico *O. hatcheri*, confirmando que el sexo de los organismos es determinado genéticamente. De este modo han podido elucidar las bases moleculares de la diferenciación sexual y actualmente dicho mapa es utilizado como un excelente modelo para estudiar las bases genéticas y ambientales de la diferenciación sexual de otros

peces. Así mismo se ha logrado incrementar la cantidad de hembras en los cultivos, con lo cual a su vez se aumenta y mejora la producción de huevo.

III.2. Nutrición, alimentación y papel del sistema digestivo del pejerrey.

Se ha determinado, con base en el análisis de los contenidos intestinales, que *O. hatcheri* es una especie que posee hábitos alimenticios omnívoros, con predilección por zooplancton (Cladóceros y Copépodos), pero los adultos pueden ser piscívoros (Macchi *et al.* 1999) y *O. bonariensis* presenta un amplio espectro trófico (invertebrados bentónicos, crustáceos, insectos, moluscos y peces) (Colautti y Remes-Lenicov 2000, Piedras y Pouey 2005). Los pejerreyes en cultivo son alimentados desde los primeros días de post eclosión con nauplios de *Artemia* y su *destete* (definido como el cambio del alimento vivo al balanceado) se logra hasta la octava semana de post-eclosión (con talla aproximada de 2 cm). Debido al alto precio del alimento vivo, como el nauplio de *Artemia*, reducir el tiempo de esta alimentación, significa un ahorro económico relevante en su cultivo. En la actualidad el destete en las etapas larvarias provoca menores supervivencias y crecimientos cuando se compara con los resultados obtenidos al proporcionar alimento vivo (Somoza *et al.* 2008) y con las tallas registradas en las lagunas sudamericanas. Entre las posibles explicaciones al poco éxito del uso de dietas balanceadas se ha mencionado: a) que el sistema digestivo de las larvas no se encuentra completamente desarrollado y por lo tanto que no tengan la capacidad de digerir el alimento proporcionado; b) que las enzimas digestivas pueden no estar siendo producidas en cantidades suficientes para mantener una relación enzima/sustrato adecuada a la composición de dicho alimento; c) las enzimas pueden no estar actuando efectivamente en las condiciones ambientales mas adecuadas de pH y/o temperatura; y d) las enzimas pueden estar siendo afectadas por sustancias presentes en el alimento que las inhiben o las inactivan parcialmente (Moyano 2006, Charkrabati y Rathore 2010, Mitra *et al.* 2008). Adicionalmente Lemieux y colaboradores (2003) sugieren que la capacidad de crecimiento de los peces está restringida por la digestión y el transporte de nutrientes.

Así que el principal reto en la larvicultura de los pejerreyes es reducir al máximo las altas mortalidades que se presentan entre el período de absorción de saco vitelino y la primera alimentación por una inadecuada alimentación inicial.

En este contexto destaca de manera relevante la función del tracto digestivo. Su papel es el de actuar como interfase entre el alimento y el organismo, dado que en él se lleva a cabo la manipulación inicial, hidrólisis y transferencia de los nutrientes hacia el interior del cuerpo. En todas estas funciones cumplen un papel esencial diferentes enzimas digestivas, tanto las que inician la degradación de las macromoléculas en la primer parte del tracto digestivo así como las que complementan dicha transformación y colaboran en la absorción de los nutrientes que se encuentran inmediatos a nivel del epitelio intestinal. Por todo lo anterior se deduce la gran importancia de obtener un conocimiento detallado de tales enzimas, y de la influencia que numerosos factores puedan tener, tanto los ligados a la fisiología del animal como a las características del alimento o la forma en que éste es suministrado. Dicho conocimiento posee indudables repercusiones de índole práctica en la optimización de la alimentación de las diferentes especies (Moyano 2006). En especial, los perfiles de las actividades enzimáticas de las membranas de borde de cepillo, durante los estadios larvarios y juveniles, resultan muy buenos indicadores del momento en el que la madurez digestiva es alcanzada, y por consiguiente la adquisición de la capacidad para digerir alimento balanceado.

Por otro lado, los lípidos en la dieta juegan un papel muy importante como fuente de energía para los peces carnívoros y zooplanctófagos, como es el caso de los pejerreyes. Los peces marinos requieren de DHA (Ácido docohexaenoico, 22:6n-3) y EPA (Ácido eicosapentaenoico, 20:5n-3) como ácidos grasos esenciales para lograr un adecuado crecimiento (Mitra *et al.* 2008), y es la lipasa dependiente de sales biliares (BAL) la enzima que es esencial para la digestión eficiente de dichas grasas en la dieta (Ijima *et al.* 1997).

Existen pocos esfuerzos de investigación sobre temas referidos a la nutrición de pejerreyes. Entre los que existen se encuentra un estudio histológico y morfológico en organismos larvarios alimentados y no alimentados para calcular un criterio de valoración de la condición nutricional de pejerrey (Strüssman y Takashima 1989), y otro

más en donde analizaron las áreas nucleares de los hepatocitos como indicadores de condición nutricional en larvas de pejerreyes (Strüssman y Takashima 1990).

Gómez-Requeni y colaboradores (2011) se encuentran estableciendo los requerimientos nutricionales de los pejerreyes en términos de proteínas, lípidos y energía, concluyendo que un nivel de 10 a 15% de lípidos parece ser el óptimo para juveniles de pejerrey en condiciones de cultivo, quedando por esclarecer el porcentaje de proteína y energía.

Adicionalmente, dado que los pejerreyes tienen una gran similitud con los peces blancos, organismos de gran interés para nuestro país, se estableció un proyecto de colaboración, en el 2009, entre México y Japón, con lo cual se inició el primer estudio de la bioquímica digestiva de los pejerreyes (Toledo-Cuevas *et al.* 2011). El presente trabajo, dentro de esta colaboración internacional, tiene el objetivo de complementar la caracterización enzimática digestiva de las dos especies de pejerrey, en lo que respecta a la caracterización de la lipasa dependiente de sales biliares BAL y las enzimas digestivas intestinales.

III.3. Digestión, Fluidos y enzimas digestivas.

La mayor parte de los nutrientes de los alimentos ingeridos no pueden ser absorbidos por el sistema digestivo hasta que son reducidos a moléculas pequeñas, con lo cual logran ser utilizados por el organismo. Esta desintegración de los alimentos, que ocurre naturalmente hasta formas asimilables, constituye el proceso de digestión (Martín *et al.* 1982), tarea que es llevada a cabo principalmente por las enzimas digestivas que catalizan la hidrólisis de las proteínas nativas a aminoácidos, de los almidones a monosácaridos y de los triacilgliceroles a monoacilgliceroles, glicerol y ácidos grasos. En el curso de estas reacciones digestivas se vuelven también más asimilables los minerales y las vitaminas de los alimentos. En el caso de los peces las enzimas digestivas pueden ser sintetizadas en el estómago, ciegos pilóricos, páncreas y enterocitos. Las enzimas pancreáticas son secretadas hacia el lumen del canal intestinal, donde llevan a cabo su acción. Sin embargo, se piensa que los procesos digestivos en peces son muy similares a los de los mamíferos y otros grandes

vertebrados (Munilla-Moran y Samborido-Rey 1996), ya que la gran mayoría de los péptidos y hormonas que controlan las funciones del tracto digestivo en los grandes vertebrados se han encontrado también en peces, con características similares en general (Smith, 1989).

Las enzimas digestivas son hidrolasas, capaces de catalizar reacciones en donde el agua esta involucrada. Con base al sustrato, las enzimas se clasifican en proteasas, lipasas, esterasas y carbohidrasas.

La mayor digestión de los nutrientes es extracelular, tomando lugar en el lumen del canal alimentario. No obstante, también se encuentran enzimas digestivas inmersas en la superficie de la membrana celular de los enterocitos, conocidas como membranas de borde de cepillo. Estas son las responsables de la parte intermedia y final del proceso digestivo, a menudo ligado al mecanismo de absorción (Guillaume *et al.* 1999).

La presencia y actividad de las enzimas digestivas no es igual para todas las especies de peces. Por ejemplo, la pepsina está ausente en peces que no poseen estómago, por ejemplo, los ciprínidos y aterínidos (Horn *et al.* 2006) y la quitinasa ha sido detectada solo en ciertas especies, por ejemplo en el pez blanco (Pohls 2010). Además los órganos que secretan ciertas enzimas pueden variar de especie a especie; la lipasa incluso se ha encontrado, por ejemplo, en el estómago de *Pagrus mayor* (Izquierdo *et al.* 2000).

III.3.1. Digestión de proteínas

Las proteasas rompen los enlaces peptídico de las proteínas. Diferentes enzimas son capaces de actuar sobre los enlaces al final de la secuencia de aminoácidos de la proteína (exopeptidasas), o en un punto dentro de la proteína (endopeptidasas) (Diagrama 1).

Las endopeptidasas son muy específicas en su acción e hidrolizan solo en puntos particulares dentro de la molécula proteínica. La susceptibilidad de acción está básicamente determinada por la naturaleza del grupo químico al lado del enlace

concerniente. Por lo tanto, la vía por la cual una proteína es hidrolizada y la naturaleza química de los productos está determinada por el tipo de endopeptidasa presente. Esto se ilustra en el Diagrama 2, en donde se muestra el sitio de corte de la pepsina, que esta en el lado amino del radical aromático. En contraste, para la quimotripsina, hidroliza el lado carboxilo del mismo radical aromático.

La tripsina, por otro lado, actúa sobre el enlace peptídico entre arginina y lisina. Las tres endopeptidasas (pepsina, quimotripsina y tripsina) son probablemente las más importantes para la digestión de proteínas. Entre ellas pueden romper a la mayoría de polipéptidos presentes en la dieta.

Diagrama 1. Hidrólisis por exopeptidasas y endopeptidasas de una proteína (De Silva 1995).

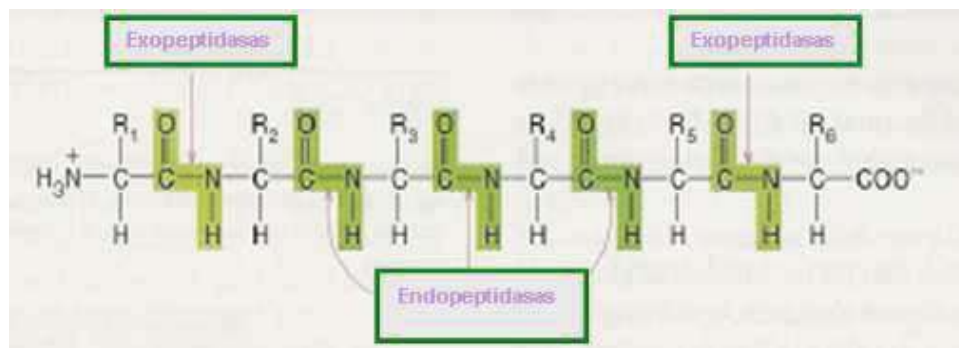
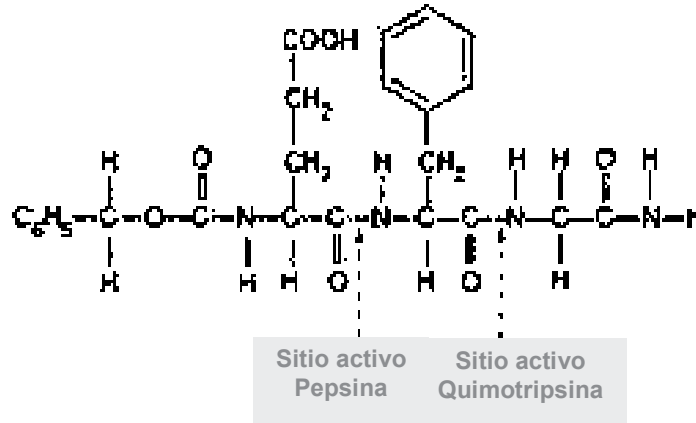
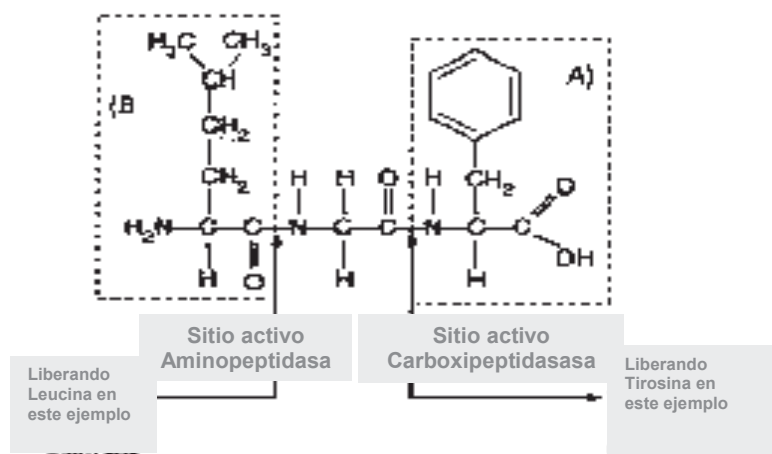


Diagrama 2. Hidrólisis del sustrato sintético, benzil-oxicarbonil-L-tirosilglicina amina.
(De Silva 1995)



Existen tres grupos de exopeptidasas: las carboxipeptidasas, las aminopeptidasas (APN) (EC 3.4.11.2) y las dipeptidasas. Cada una de éstas exhibe especificidad por un sustrato o grupo de sustratos, determinada por la naturaleza de los grupos sobre cada lado del enlace peptídico a ser hidrolizado. Mientras que las carboxipeptidasas remueven el aminoácido terminal en el cual el radical carboxilo está libre (Diagrama 3), las aminopeptidasas actúan en el otro extremo de la cadena polipeptídica, hidrolizando el enlace peptídico contiguo al aminoácido N-terminal de los polipéptidos. Las dipeptidasas por su parte actúan sobre los dipéptidos (Martín *et al.* 1982). Posterior a la digestión de las proteínas por estas proteasas, entran en juego la digestión de los péptidos y polipéptidos resultantes, lo que ocurre en el intestino. La leucina aminopeptidasa N (APN) es una enzima que es sintetizada por los enterocitos y es exportada y localizada en la membrana del borde de cepillo, en donde lleva a cabo su acción (Gal-Garber y Uni 2000). Esta enzima juega un papel central en la digestión de los péptidos, sobre todo al alcanzar la madurez en el proceso digestivo. Kvale y colaboradores (2006) detectaron que la actividad de APN incrementa abruptamente durante el transcurso del estadio larvario hacia el juvenil, en *Hippoglossus hippoglossus* y *Gadus morhua* indicando el tiempo cuando el intestino ha madurado y posee una mejor capacidad digestiva.

Diagrama 3. Hidrólisis de proteínas por exopeptidasas. (De Silva 1995).



La leucina-alanina peptidasa (Leu-Ala o LAP) es una enzima lisosomal (Nicholson *et al.* 1974) que juega un rol particular en la endocitosis. La actividad de esta enzima es mucho más alta durante las 3 primeras semanas de la vida larvaria y decrece progresivamente hacia el estadio juvenil (Guillaume *et al.* 1999). Actúa sobre di y tri péptidos, los cuales son transportados hacia el interior de la célula por transportadores presentes en la membrana (Generoso *et al.* 1980).

La disminución de la actividad de LAP es menos pronunciada en los organismos alimentados con dietas inadecuadas o dietas que contienen altos niveles de proteína hidrolizada (Zambonino 2001). Kvale y colaboradores (2006), emplean la actividad de LAP como indicadora de pinocitosis, fenómeno encontrado en estadios larvarios pre-gástricos y que se espera decrezca durante el crecimiento de *H. hippoglossus* y *G. morhua*. Sus resultados concuerdan en *H. hippoglossus*, en el cual los niveles enzimáticos disminuyen paralelamente con un marcado decremento en la pinocitosis. Sin embargo, en *G. morhua* la actividad específica de LAP presentó mucha variación durante el desarrollo, sugiriéndose que la dieta utilizada pudo haber alterado el proceso de maduración digestiva en el bacalao.

III.3.2. Digestión de lípidos

El hígado juega un papel fundamental en la digestión de lípidos; participando con la síntesis de bilis, la cual tras ser almacenada en la vesícula biliar, se libera al intestino cuando llega el alimento. También contiene ácido gálico, que participa en la emulsificación de los lípidos, incrementándose su área superficial para hacerlos más accesibles al rompimiento por las enzimas. Las enzimas digestivas de lípidos se clasifican como enzimas lipolíticas o lipasas, aunque también pueden participar las esterases, enzimas inespecíficas. Recientemente se ha detectado actividad lipasa a lo largo del tracto digestivo de algunas especies, tales como la anchoveta (*Engraulis engrausicolus*), el róbalo rayado (*Morone saxatilis*), salmón rosado (*Onchorhynchus gorbuscha*), tiburón leopardo (*Triakis semifasciata*), trucha arco iris (*Onchorhynchus mykiss*), bacalao (*Gadus morhua*) y el besugo (*Pagrus major*), tanto en peces juveniles como en adultos difiriendo los tipos de lipasas y actividades en las distintas especies (Izquierdo *et al.* 2000).

La mayor diferencia entre la hidrólisis de lípidos con respecto a la de las proteínas y carbohidratos es que las lipasas muestran una menor especificidad por un sustrato, catalizando la hidrólisis de cualquier éster orgánico (Bläckberg *et al.* 2006).

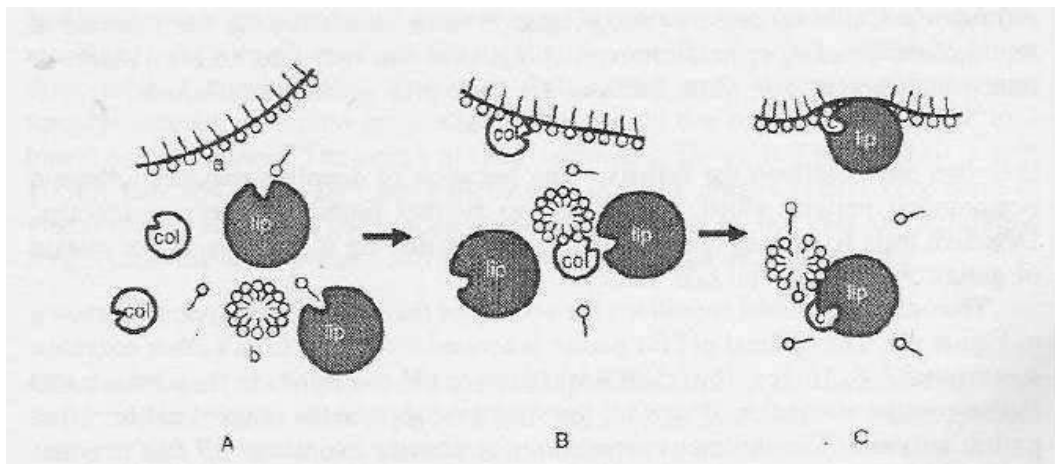
Los lípidos comúnmente utilizados por los vertebrados superiores son ésteres de ácidos orgánicos y alcoholes (usualmente glicerol y alcohol trihídrico). El resultado final de la lipólisis de la molécula de triglicérido son tres moléculas de ácidos grasos y una de glicerol (Kurtovic *et al.* 2009).

En los peces se han descrito dos tipos principales de lipasas: la lipasa pancreática y la lipasa dependiente de sales biliares. La lipasa pancreática (E.C.3.1.1.3), también denominada triacilglicerol acil lipasa, o lipasa colipasa, es secretada por el páncreas, presenta mayor actividad sobre triacilgliceridos y muy poca o nula actividad sobre esterios de ácidos grasos poliinsaturados. Requiere de agentes emulsificantes pero se activa únicamente en presencia de colipasa (cofactor proteínico necesario para la actividad óptima de la lipasa; Hernández y Sastre 1999), secretada

también por el páncreas permitiendo el anclaje de los lípidos una vez emulsificados, facilitando el posicionamiento en el sitio activo (Diagrama 4).

En contraste, la lipasa dependiente de sales biliares (BAL, neutra, carboxilesterasa o colesterol esterasa) requiere y es activada por sales biliares. Lleva a cabo la hidrólisis de los enlaces carboxil-ésteres de muchos lípidos de la dieta: acilgliceridos, ésteres solubles, triglicéridos ricos en ácidos grasos poliinsaturados, ésteres de colesterol y vitamínicos, por ello se considera que es la enzima de mayor importancia en los peces teleósteos (Iijima *et al.* 1997, Mitra *et al.* 2008). Esta enzima no requiere de colipasa.

Diagrama 4. Modo de acción de la lipasa y colipasa. En A, la lipasa y la colipasa se encuentran libres y las sales biliares (b) cubriendo la superficie del glóbulo lipídico. (a) pero la lipasa no puede actuar. En B la colipasa adhiere el glóbulo. En C, la lipasa es anclada debido a la colipasa y puede hidrolizar los triacilgliceroles (Johnson 2001).



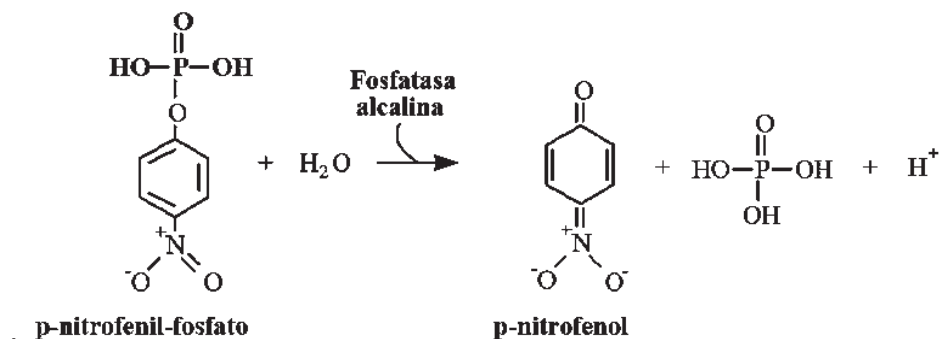
III.3.3. Digestión de ésteres fosfóricos

La enzima fosfatasa alcalina (FA) (E.C.3.1.3.1) hidroliza inespecíficamente enlaces ésteres fosfóricos entre un radical orgánico (por ejemplo, la glucosa-6 fosfato, glicerolfosfatos, nucleótidos derivados de la dieta y de la digestión de ácidos nucleicos por las nucleasas), a pH alcalino y en presencia de iones magnesio, calcio y vitamina D.

Liberando fosfato inorgánico y protones al medio (Diagrama 5). La FA es también llamada fosfohidrolasa de ésteres monofosfóricos. Ésta es una enzima fosfomonoesterasa presente en gran parte de las células y tejidos corporales. En humanos se encuentran varias isoenzimas, siendo las más importantes la fosfatasa alcalina ósea (FAo), hepática (FAh), intestinal (FAi), renal (FAr) y placentaria (FAp) (Guglielmi 2009). Peña-Martínez (2005) encuentra fosfatasa alcalina en el intestino, hígado y en la superficie apical de la mucosa pilórica de cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*). En el intestino se encuentra ligada a la membrana apical o borde de cepillo de los enterocitos. Todas las isoenzimas actúan a un pH próximo a 9.8, presentan afinidad por los sustratos y como ya se había mencionado, son metaloproteínas dependientes de zinc y magnesio (Romairone 2000).

El rol fisiológico de la fosfatasa alcalina intestinal es parcialmente conocido. Su localización sugiere un rol en el movimiento de moléculas a través de la membrana y parece estar relacionada con la absorción de ciertos nutrientes, como el calcio y los lípidos (Guglielmi 2009). La administración de vitamina D a pollos raquíticos produce un incremento de 2-3 veces en la actividad de la FAi y se presenta un incremento similar con la administración de calcio. Esta enzima es utilizada comúnmente como indicadora de absorción de aminoácidos y diferenciación de los enterocitos (Norman *et al.* 1970).

Diagrama 5. Reacción enzimática de la fosfatasa alcalina o ácida con el sustrato comúnmente usado para detectar su actividad. La actividad de una u otra se favorece con el pH de la reacción.



Por otro lado, las fosfatasa s ácidas (Fac) (E.C. 3.1.3.2) son enzimas que en pH ácido (aproximadamente 5) tienen la propiedad de catalizar la hidrólisis de fosfomonoésteres, liberando como producto de la reacción fosfato inorgánico y un alcohol, cuya naturaleza depende del sustrato utilizado (Guija *et al.* 2007). Son las enzimas más comúnmente presentes en los lisosomas (<http://webvision.umh.es/docencia/confsvivos/temas/TEMA14lisosomas.pdf>). Su papel biológico sigue siendo en gran parte desconocido, aunque su participación en el metabolismo de compuestos de fosfato y su naturaleza ubicua sugiere una gran importancia en la catálisis de diversas reacciones en las células vivas.

Hasta la fecha se han descrito dos clases principales de FAc en los tejidos de los vertebrados superiores: la de partículas lisosomales, en su mayoría de alto peso molecular (HMW-FAc, high molecular weight; PM alrededor de 80-120 kDa), y la citosólica, de bajo peso molecular (LMW-FAc, low molecular weight; PM alrededor de 14-20 kDa). Se diferencian en la estructura de sus proteínas y en sus propiedades enzimáticas. La enzima lisosomal (HMW-FAc) hidroliza una gran variedad de ésteres fosfóricos y parece estar implicada en los procesos catabólicos, mientras que la enzima citosólica (LMW-FAc) muestra una especificidad de sustrato más restringida.

Otra clase de FAc, es la llamada ZnFAc, que se ha aislado y caracterizado en el hígado de diferentes vertebrados (Panará *et al.* 1993). Esta enzima requiere iones Zn para su actividad, muestra una expresión tisular restringida al citosol y existe en dos formas principales, de diferente peso molecular: La LMW-ZnFAc (MW aproximado de 57-62 kDa), descrita como ZnFAc-myo-inositol 1-fosfatasa en el cerebro de bovino, y la HMW-ZnFAc (PM de alrededor de 100 kDa), la cual se ha purificado y caracterizado ampliamente en los tejidos de mamíferos. La LMW-ZnFAc actúa *in vivo* con la proteína fosfotirosil fosfatasa y parece estar implicada en una vía de transducción de señales y en el control de la proliferación celular. Las HMW-ZnFAc han sido descritas ya en los vertebrados inferiores, incluyendo anfibios y peces. Se ha reportado la existencia de tres isoenzimas en el hígado de la carpa *Cyprinus carpio* y se ha purificado y caracterizado una FAc de 82.5-kDa en el bagre *Ictalurus punctatus* (Kubicz *et al.* 1985). Hasta la fecha no ha sido claramente documentada la existencia de la LMW-FAc y ZnFAc en tejidos de peces, con excepción de la descrita en hígado de carpas (Panará y

Pascolini 1989; Panará 1997). Además, no hay información disponible sobre la especificidad de sus sustratos, la activación por iones metálicos, sus inhibidores, ni el pH y velocidad óptima de hidrólisis.

Panará (1997) investigó la presencia, distribución y caracterización parcial de estas diferentes actividades en diversos tejidos del lucio de agua dulce (*Esox lucius*), aislando las enzimas por cromatografía y las caracterizó bioquímicamente mediante el análisis de su comportamiento con respecto a algunas sustancias modificadoras, (conocidas como activadores específicos (iones metálicos) o inhibidores), su pH óptimo, tasa de hidrólisis (Km), sensibilidad a la temperatura y especificidad de su sustrato. Los resultados reportados informan la presencia de ambas FAc, HMW y LMW, así como de la HMWZn y LMW-Zn FAc. Los autores reportan un aparente alto grado de conservación estructural y bioquímica entre las enzimas, además de que su distribución en todos los tejidos parece ser muy similar a la de los mamíferos. Así que sugieren que la existencia de todas estas actividades puede tener relevancia en los peces y en la fisiología de su evolución biológica.

III.4. Digestión larvaria

Las larvas de los peces marinos son las formas funcionales e independientes más pequeñas de los vertebrados. A pesar de estas limitaciones poseen tasas de crecimiento muy elevadas (hasta mil veces partiendo de escasas decenas de microgramos en peso seco) y una progresiva diferenciación durante la etapa larvaria hasta completar el desarrollo de sus órganos y funciones en las fases juvenil y adulta (Blaxter 1988). Para llevar a cabo con eficiencia todos estos cambios, la larva debe estar capacitada para ingerir (acción que implica la búsqueda y captura del alimento) y procesar (digestión, absorción y metabolismo) el alimento. No obstante, hay que considerar que el sistema digestivo de las larvas de peces es morfológica, histológica y fisiológicamente menos desarrollado que el de los peces adultos (Govoni *et al.* 1980). Para efectos prácticos, Dabrowski (1982) estableció tres categorías de peces, considerando los principales eventos que tienen lugar durante la evolución y desarrollo de su sistema digestivo.

1. En un primer grupo, consideró a los salmónidos y algunos cíclidos, los que al inicio de la alimentación exógena presentan ya un estómago bien desarrollado y además funcional. Un desarrollo de este tipo determina que se puede iniciar la alimentación de estas especies directamente con dieta balanceada.

2. En el segundo grupo se engloban la mayoría de los peces marinos, en los que el estómago aparece después de iniciar la alimentación exógena, existiendo en algunas especies hasta cierto desfase entre su aparición y funcionalidad (Lauff y Hoffer, 1984).

3. En el tercer grupo se incluyen los peces que permanecen sin estómago a lo largo de toda su vida, como son los ciprínidos. En estos, el notable incremento de la longitud de su intestino es el evento más importante durante su desarrollo larvario. Actualmente se sugiere que todos los atherinópsidos, entre ellos los peces blancos, permanecen sin estómago a lo largo de su vida, pero contrario a los cíprinidos, presentan intestinos cortos (Ross *et al.* 2006). En esta misma categoría están los pejerreyes.

El desarrollo del proceso digestivo de las larvas de peces va de la mano con el incremento en la complejidad morfológica de su sistema digestivo. El hecho de que la mayoría de las células epiteliales del tracto digestivo son abortivas en las larvas indica que la secreción de las enzimas digestivas está limitada a estadios tempranos. Esto es reflejado por la baja actividad de algunas enzimas digestivas. Subsecuentemente el desarrollo de la complejidad gastrointestinal se encuentra correlacionado con los cambios en las actividades de ciertas enzimas digestivas.

La morfología del tracto digestivo es generalmente muy simple en las larvas. Los dientes están ausentes. El intestino es relativamente corto, alrededor de la mitad de la talla total del cuerpo y las células epiteliales que cubren el tracto digestivo no muestran regiones diferenciadas. La mayoría de estas células epiteliales son enterocitos absorbentes: células grandes con muchas microvellosidades en su superficie luminal. Las células secretoras están presentes solo en pequeños números.

En las larvas de peces marinos recién eclosionadas el tracto digestivo es un tubo recto y sin diferencias histológicas. Este descansa dorsalmente sobre la vesícula vitelina y está cerrado por ambos extremos (boca y ano). Tan sólo después de la absorción de las reservas vitelinas se pueden observar varias regiones con diferencias histológicas y funcionales (Govoni 1980). Existen curiosas excepciones como en los embriones del pez ovovivíparo *Sebastes melanopus*, que presentan un aparato digestivo abierto por ambos extremos y además reciben un aporte de alimento adicional a partir del fluido ovárico durante toda la gestación (Boehlert y Yoklavick 1984). La metamorfosis de larva a juvenil supone el desarrollo del estómago, así como de los ciegos pilóricos intestinales. Morfológicamente, en el digestivo diferenciado de la larva se distinguen tres segmentos: 1) el intestino anterior, que comprende el 60-75 % de la longitud e interviene en los procesos de degradación de lípidos, 2) el intestino medio, cuyas células absorptivas muestran vacuolas supranucleares electrodensas procedentes de procesos de pinocitosis de proteínas y, 3) el intestino posterior, que representa un 5 % de la longitud intestinal y dadas las características de sus enterocitos (menor cantidad de microvellosidades) parece intervenir principalmente en procesos de recuperación de iones y agua (Alarcón y Martínez 1998)

La importancia de los cambios antes mencionados se manifiesta en la frecuencia de alimentación y en la talla de la presa. En los primeros estadios el intestino relativamente corto limitará la cantidad de alimento que será tomado a la vez, además que el alimento no podrá ser retenido por un periodo largo de tiempo en el mismo. Como resultado de todo esto, el tiempo para la digestión será menor y por tanto la frecuencia de alimentación deberá ser mayor para asegurar una provisión suficiente de nutrientes.

III.5. Características de maduración digestiva en larvas

El mencionado proceso de adquisición de madurez digestiva en los peces ha sido caracterizado por múltiples eventos, que serán descritos a continuación:

Un aumento en la actividad de enzimas de borde de cepillo (fosfatasa alcalina, maltasa y aminopeptidasa) son características de madurez digestiva, principalmente por

que el aumento en las últimas marcan el paso de una digestión citosólica o intracelular a una extracelular. Así mismo, la disminución de la actividad enzimática citosólica de la leucina-alanina peptidasa (LAP) y el aumento en los cocientes de las actividades de membrana de borde de cepillo con respecto de las citosólicas (aminopeptidasa N / LAP y Fosfatasa alcalina / LAP), son indicativos de maduración de los enterocitos. Dichos cambios en las actividades digestivas tienen su origen en los numerosos cambios que el tracto digestivo experimenta durante la maduración. Los pliegues mucosos se desarrollan gradualmente y las regiones del intestino se van diferenciando. Inicialmente la absorción de los nutrientes se caracteriza por el proceso de pinocitosis de macromoléculas (p. ej proteínas y lípidos), en el cual la membrana de la célula “engulle” a las moléculas. El material absorbido por esta vía es subsecuentemente hidrolizado intracelularmente por la enzima LAP u otras enzimas citosólicas. Posteriormente, en el desarrollo de la larva, los dientes aparecen sobre las mandíbulas, y el estómago y los ciegos pilóricos se desarrollan en aquellas especies en las cuales se presentan. Con el desarrollo de la mucosa intestinal, grandes cantidades de enzimas digestivas de membrana de borde de cepillo (por ejemplo, la fosfatasa alcalina y aminopeptidasa N) se producen, las cuales facilitan la digestión en el tracto intestinal (Zambonino-Infante y Cahu 1996).

Otra característica de maduración digestiva es la aparición de la actividad de pepsina, indicativa del momento en el que el estómago de la larva es funcional. Se ha documentado que a partir de ese momento es posible reemplazar el alimento vivo por dietas balanceadas (Cahu y Zambonino-Infante 1995).

La presencia de la actividad de enzimas proteolíticas pone de manifiesto la existencia de un equipamiento digestivo muy completo de enzimas (Cara *et al.* 2002), lo cual es decisivo para establecer la adquisición de madurez digestiva y por lo tanto de tener la habilidad de utilizar dietas balanceadas por los organismos (Díaz *et al.*1997).

Un aumento significativo en el porcentaje de secreción de enzimas pancreáticas (por ejemplo, tripsina, amilasa, lipasa) es indicativo de la adquisición de un páncreas completamente desarrollado debido a que la cantidad de enzimas pancreáticas detectadas en el lumen intestinal incrementa con el desarrollo de la larva. Zambonino y

Cahu (2001) han observado que el desarrollo completo del proceso de secreción en diversas especies de peces marinos ocurre alrededor del primer mes de desarrollo.

La disminución de la relación lipasa: proteasa a lo largo de la ontogenia ha sido considerada como un indicador de madurez (Cara *et al.* 2002). Esto por que podría reflejar los cambios en el metabolismo que tienen lugar en el desarrollo de los peces, que inicialmente utilizan lípidos como la principal fuente de energía con lipasas capaces de hidrolizar lípidos existentes en el saco vitelino para progresivamente adaptarse a una dieta con un mayor contenido de proteína. Por cierto que, cambios en el índice C/N se consideran como indicadores de la relación lípido/proteína.

Por último, se ha observado un incremento en los niveles de RNA de amilasa y de tripsina, seguidos de una caída importante de la secreción de amilasa y de su respectivo mRNA durante el proceso de maduración. y que se ha encontrado está genéticamente programado. Se sabe que cuando la actividad y niveles de mRNA de amilasa permanecen altos en los organismos persiste un sistema digestivo poco desarrollado (Zambonino-Infante *et al.* 1996). Este patrón de actividad de la amilasa durante el desarrollo de las larvas es análogo a lo observado con los altos niveles de mRNA y actividad específica de lactasa en ratas destetadas y mal nutridas (Rossi *et al.* 1986, Duluc *et al.* 1992 en Tóvar *et al.* 2002).

IV. HIPÓTESIS

Los cocientes resultantes de la actividad de las enzimas de membrana de borde de cepillo y la enzima citosólica mostrarán resultados diferentes a los reportados para la mayoría de especies marinas con estómago, por ser los pejerreyes especies agástricas.

V. OBJETIVOS

V.1. Objetivo General

Evaluar la capacidad digestiva de las principales enzimas intestinales implicadas en la digestión y absorción de proteínas, lípidos y otros nutrientes, así como buscar indicadores del proceso de maduración digestiva durante el desarrollo larvario y juvenil de dos especies de pejerrey, (*Odontesthes bonariensis* y *Odontesthes hatcheri*).

V. 2. Objetivos Particulares

a) Cuantificar la actividad de las enzimas leucina alanina peptidasa, aminopeptidasa N, fosfatasa alcalina, fosfatasa ácida y lipasa dependiente de sales biliares, las cuales están implicadas en la digestión y absorción de proteínas, lípidos y otros nutrientes durante el desarrollo larvario y juvenil de los pejerreyes *Odontesthes bonariensis* y *O. hatcheri*.

c) Caracterizar el proceso de maduración digestiva en las dos especies de pejerrey, a través de las actividades de las enzimas de borde de cepillo (fosfatasa alcalina y aminopeptidasa N) y la citosólicas (leucina alanina peptidasa y fosfatasa ácida).

VI. RESULTADOS

Evaluación de la actividad enzimática digestiva de pejerreyes

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DIGESTIVA DURANTE EL DESARROLLO LARVARIO Y JUVENIL DE DOS ESPECIES DE PEJERREY

DIGESTIVE ENZYME ACTIVITY DURING THE LARVAL AND JUVENILE
DEVELOPMENT OF TWO PEJERREY SPECIES

M. A. Herrera-Vargas¹, C. A. Strüssmann², F. J. Moyano-López³, D. Tovar-Ramírez⁴. E.
M. Toledo-Cuevas^{1*}.

(MAHV). ¹Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, México. ²Graduate School of Marine Science and Technology, Tokyo University of Marine Science and Technology, Tokio, Japón.

³Escuela Politécnica Superior, Universidad de Almería, España. ⁴Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR), S.C., La Paz, B.C.S., México. *Av. San Juanito Itzicuaró s/n, Col. San Juanito Itzicuaró, Morelia, Michoacán, México.

58330. Fax 443-3340475. e-mail: mayra.toledo@gmail.com.

Fecha de recepción: Junio 2011

Fecha de aceptación:

RESUMEN. La actividad enzimática digestiva, durante el desarrollo larvario y juvenil de dos especies de pejerrey (*Odontesthes bonariensis* y *O. hatcheri*), fue analizada. Estos son peces endémicos de América del Sur, pertenecen a la familia Atherinopsidae y como varios miembros de ésta, son agástricos. La actividad y tiempo de aparición de las enzimas analizadas (leucina alanina peptidasa, aminopeptidasa N, lipasa dependiente de sales biliares (BAL), fosfatasa alcalina y ácida), en ambas especies, sugieren un muy buen desarrollo en los mecanismos digestivos y absortivos desde etapas tempranas. Niveles constantes de secreción pancreática de BAL, a partir de los 63 dpe, sugieren un páncreas funcionalmente maduro desde antes de los 2 meses de edad. Adicionalmente, la evaluación de indicadores de maduración digestiva, con base en las proporciones de las actividades de las enzimas de borde de cepillo y las citosólicas, sugirió que ésta se adquiere en forma temprana (en las primeras 3 semanas

de vida) en ambas especies de pejerrey, en concordancia al modelo descrito para peces marinos con estómago, a pesar de ser estos organismos agástricos. Muy altos niveles de LAP fueron detectados a lo largo del periodo evaluado, actividad que seguramente compensa la ausencia de estómago en estos organismos y cuyos altos niveles, al menos hasta el periodo juvenil, podrían ser una característica de peces sin estómago.

Palabras clave: *Odontesthes hatcheri*, *O. bonariensis*, enzimas digestivas, maduración intestinal, peces agástricos.

ABSTRACT. The digestive activity of two pejerrey species (*Odontesthes bonariensis* and *O. hatcheri*), during their larval and juvenile development was evaluated. These South America's endemic fish belong to the Atherinopsidae family, and as other members of it, they are stomachless species. The activity and time of appearance of the analyzed enzymes (leucine alanine peptidase, aminopeptidase N, bile salt-dependent lipase (BAL), alkaline and acid phosphatase) suggest an adequate and early development of the digestive and absorptive mechanisms in both species. The steady levels found of BAL secretion, since 63 days after hatching, suggest a functional mature pancreas before the second month of life. This was reinforced by brush border membrane vs cytosolic activities ratios. Based on them, early intestinal maturation during the first three weeks of development was suggested for both pejerrey species so. It seems that these species follow a similar model of digestive maturation described for marine gastric fish, even that pejerreyes seem to be agastric fish. Finally, very high levels of LAP were detected along the development of pejerreyes, activity that is surely compensating the absence of stomach in these organisms and which high levels, at least up to the juvenile stage, seems to be a characteristic of agastrics fish.

Keywords: *Odontesthes hatcheri*, *O. bonariensis*, digestive enzymes, intestinal maturation, stomachless fish.

INTRODUCCIÓN.

Odontesthes bonariensis y *O. hatcheri* son peces nativos que habitan las aguas continentales del cono Sur de Brasil, Uruguay y Argentina, países en donde son conocidos como pejerreyes y en donde tienen gran importancia social. Pertenecen a la familia Atherinopsidae, constituida por cerca de 170 especies, la mayoría habitantes de

aguas marinas. De hecho, tanto los pejerreyes, como el pez blanco de Pátzcuaro, miembros de la misma familia, son especies que descienden de ancestros marinos (Tejedor 2001, Martínez-Palacios *et al.* 2004, Dyer 2006), por lo que aún conservan varias características de organismos de este hábitat. Los pejerreyes son apreciados en la pesca deportiva, así como por la calidad de su carne, con atributos muy similares a los de especies marinas altamente cotizadas (Somoza *et al.* 2008). Como consecuencia de esto se ha generado una gran actividad económica producida alrededor de estas especies, lo que ha propiciado la introducción, y adaptación exitosa, a embalses, estanques y lagunas templadas de diversos lugares del mundo. No obstante, diversos factores, como: la pesca indiscriminada, la introducción de especies exóticas, la contaminación de los hábitats y los largos períodos de sequía e inundaciones recurrentes de los cuerpos de agua sudamericanos, han afectado considerablemente sus poblaciones naturales (Colautti *et al.* 2003, Toda *et al.* 1998). De aquí que se haya generado un gran interés por la domesticación y el cultivo del pejerrey. Sin embargo, factores tanto de naturaleza biológica como socio-económica han contribuido al estancamiento del desarrollo de su cultivo en los países sudamericanos. Caso contrario es el de Japón, país en el cual se ha desarrollado su cultivo a escala comercial, existiendo en la actualidad 21 provincias dedicadas a la cría de los pejerreyes. Este recurso no sólo ha solucionado un problema de alimentación, sino que ha evitado la migración a las grandes urbes al abrir una oportunidad para que los jóvenes se dediquen a la cría del pejerrey en granjas (Grossman 2002). Desafortunadamente, entre los obstáculos más importantes para el desarrollo de un cultivo exitoso se encuentran los dos periodos críticos que presentan estos organismos en cultivo, caracterizados por altas tasas de mortalidad. Dichos periodos involucran al proceso alimenticio y son: la primera alimentación exógena y la transición del alimento vivo al alimento artificial (Peña-Martínez 2005). Una elevada eficiencia alimenticia durante estos procesos permitiría incrementar las tasas de supervivencia y promover al máximo su crecimiento (Somoza *et al.* 2008). En este contexto cabe mencionar que la digestión, el proceso fisiológico fundamental que determina el aporte de los principales nutrientes, y por lo tanto los rendimientos finales a obtener, actúa como interfase entre el alimento y el organismo animal. Esto es, que tras la captura y la manipulación inicial del alimento ocurre la hidrólisis de los nutrientes, con la consiguiente transferencia de estos hacia el interior del cuerpo. En todas estas funciones cumplen un papel esencial diferentes

enzimas digestivas. Un conocimiento detallado de las enzimas digestivas, a lo largo del desarrollo larvario de las especies de peces cultivables, resulta fundamental, dado que esta información ayuda a entender los requerimientos nutricionales de los diferentes estadios de las especies. El conocimiento generado contribuye también al desarrollo de dietas artificiales adecuadas y a determinar el momento óptimo para el “destete”. El “destete” es definido como el momento en el que los organismos logran desempeños adecuados tras el cambio del alimento vivo al artificial, evento que es posible al ocurrir la maduración del sistema digestivo (Moyano *et al.* 1996). Pocos estudios de este tipo se han llevado a cabo en atherinópsidos, sobre todo en especies actualmente cultivadas. Investigaciones preliminares sugieren la ausencia de estómago en los pejerreyes, así como en el pez blanco (Ross *et al.* 2006), que junto con un tracto digestivo simple parecen ser características comunes de todos los miembros de dicha familia (Horn *et al.* 2006).

Los pejerreyes son considerados organismos omnívoros, con base en sus contenidos intestinales (Piedras & Pouey 2005, Ruiz 2005). De acuerdo a este hábito alimenticio se han descrito como principales enzimas a las proteasas y lipasas. Toledo-Cuevas *et al.* (2011) describen el desarrollo de las proteasas lumbales (tripsina), la lipasa pancreática y fosfatasa ácida y alcalina a lo largo del desarrollo larvario y juvenil de ambas especies de pejerrey. Entre los hallazgos más importantes sugieren la adquisición de la maduración digestiva alrededor de los 63 dpe para ambas especies de pejerrey, con un modelo semejante a los peces gástricos. Por el contrario, datos de maduración similar no se encontraron en el pez blanco de Pátzcuaro. Con base en estos resultados, los propósitos del presente trabajo fueron: 1) Completar la evaluación de la capacidad digestiva en estas especies de pejerrey, con respecto a las principales enzimas implicadas en la digestión y absorción de proteínas y lípidos; y 2) Contribuir al estudio de indicadores de maduración digestiva, para confirmar, o no, si este evento ocurre en los pejerreyes. Las enzimas digestivas analizadas fueron entonces: La lipasa dependiente de sales biliares, descrita como la principal lipasa para los peces, y varias enzimas intestinales; dos membranales (fosfatasa alcalina y aminopeptidasa-N), que han sido descritas como indicadoras de maduración digestiva, y dos citosólicas (leucina alanina peptidasa y fosfatasa ácida), sugeridas como indicadoras de pinocitosis e inmadurez digestiva.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención y mantenimiento de los organismos. Los huevos fertilizados de *O. bonariensis* y *O. hatcheri* se obtuvieron de reproductores provenientes de la Estación de Yoshida, del Centro de Investigación de Campo, y de las instalaciones de cría para los Animales Acuáticos en Shinagawa, Campus de la Universidad de Tokio de Ciencias Marinas y Tecnología de Japón. Los huevos fueron incubados entre 18-20 °C hasta su eclosión (10-13 días). El cultivo de las larvas y juveniles se realizó de acuerdo a lo descrito en Toledo-Cuevas *et al.* (2011). Las larvas fueron alimentadas, desde su eclosión, con nauplio de Artemia. A las dos semanas de edad se inició la administración del alimento balanceado, diseñado para trucha (MARUHA CORPORATION, Tokyo, Japón) y carpa (NOSAN CORPORATION, Yokohama, Japón). Las dietas contenían 46 % de proteína, 3 % de lípidos (con un diámetro de partícula entre 100-300 micras) y 40 % de proteínas y 3 % de lípidos (con un diámetro de partícula entre 300-800 micras), respectivamente. El destete completo se realizó a partir de los 56 días de post-eclosión (dpe).

Muestreos y disección. Todos los muestreos de los organismos fueron realizados antes de la primera alimentación diurna, tras un ayuno de 17 hrs, para la detección de las actividades digestivas basales. Cada día de muestreo, los días siete, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 77 y 91 de post-eclosión, 15 organismos fueron extraídos para evaluar el crecimiento de las especies de pejerrey en términos de peso húmedo. La determinación de la tasa específica de crecimiento se realizó de acuerdo a Brown en Harfus (1992). Posteriormente, tres pools de organismos con un peso húmedo mínimo de 65 mg fueron muestreados, cantidad que permite la detección de actividades enzimáticas por métodos espectrofotométricos. Los organismos muestreados fueron anestesiados en agua con hielo, enjuagados con agua destilada y secados, extrayendo la mayor cantidad de agua posible. Inmediatamente después las muestras fueron congeladas en nitrógeno líquido y mantenidas a -80 °C, hasta ser liofilizadas para su transporte hacia el laboratorio de Acuicultura y Nutrición (Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán, México), en donde se almacenaron a -80 °C hasta el momento de su análisis. La cabeza y cola de los organismos, de los 21 hasta los 56 dpe, fue retirada, mientras que

los intestinos y hepatopáncreas fueron obtenidos de los organismos desde los 63 hasta los 91 dpe.

Análisis enzimáticos. Los extractos enzimáticos fueron preparados a partir de cada uno de los 3 pools de organismos (réplicas). Estos fueron resuspendidos en 600 μ L de agua destilada y homogenizados con la ayuda de un sonicador (ultra sonic cell disruptor; Microson; Fisher Scientific Model 150E), con pulsos de 3 seg, a una amplitud 10, hasta su total homogenización. Las muestras se mantuvieron siempre en hielo para evitar la desnaturalización de las enzimas. Los homogenados obtenidos fueron centrifugados a 15,700 g, a 4 °C por 30 min, recuperando el sobrenadante, e n donde fueron realizadas las determinaciones enzimáticas a 37 °C. Los análisis se realizaron por duplicado a partir de cada uno de los extractos. La enzima citosólica leucina alanina peptidasa (LAP) fue analizada de acuerdo al método de Nicholson & Kim (1975), utilizando como sustrato 0.01M de Leu-ala (SIGMA L-9250). La enzima lipasa dependiente de sales biliares (BAL) fue determinada de acuerdo al método de Iijima & Ota *et al.* (1998), utilizando 0.53mM p-nitrofenil miristato (Sigma N2502) como sustrato, en tampón Tris-HCl 0.25mM pH 9.0 conteniendo 0.25mM metoxietanol (SIGMA-ALDRICH 360503) y 5mM de colato de sodio (SIGMA C1254). Las unidades/mL de las actividades enzimáticas corresponden a 1 nmol de sustrato hidrolizado por min. La enzima leucina aminopeptidasa N (APN) fue analizada utilizando tampón de potasio monobásico 50 mM a pH 7.2 y 0.98mM de L-Leucina p-nitroanilida (SIGMA L9125) como solución sustrato, de acuerdo al método descrito por Maroux *et al.* (1973). Las fosfatasa alcalinas (FA) y ácidas (FAc) fueron analizadas de acuerdo a Bergmeyer *et al.* (1974), utilizando como sustrato p-nitrofenil fosfato (FLUKA 71770), a una concentración final de 14.5 y 4.5 mM, respectivamente. Las Unidades /mL de las actividades enzimáticas fueron definidas como 1 μ mol de sustrato hidrolizado por min. Las actividades se reportaron en actividades específicas (U/mg de proteína), aunque la actividad digestiva total fue utilizada para el cálculo de las proporciones de actividades enzimáticas.

La concentración de proteína soluble en los extractos fue evaluada por el método de Bradford (1976), en micro placa, usando Albúmina Sérica Bovina (BSA) (SIGMA A-7906) como estándar.

El cálculo de las actividades se realizó de acuerdo a las siguientes ecuaciones:

Ecuación 1. Cálculo de la actividad de LAP, en unidades por ml.

$$U/ml = \frac{\Delta As * 1 * 1000}{m \quad t \quad Vol. (ml) \text{ de extracto usado en el ensayo}}$$

Ecuación 2. Cálculo de la actividad de BAL, en unidades por ml.

$$U/ml = \frac{(\Delta As) (Vol \text{ total (ml) del ensayo})}{(CEM) (t) (Vol. (ml) \text{ de extracto usado en el ensayo})}$$

Ecuación 3. Cálculo de la actividad de APN, FA y FAc, en unidades por ml.

$$U/ml = \frac{(\Delta As/min) (Vol \text{ total (ml) del ensayo})}{(CEM) (Vol (ml) \text{ del extracto usado en el ensayo})}$$

Ecuación 4. Cálculo de la actividad enzimática en unidades por mg de proteína soluble en el extracto (Actividad específica).

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

Ecuación 5. Cálculo de la actividad en unidades por larva (Actividad Total)

$$U/larva \text{ o segmento} = \frac{U / ml}{No \text{ de larvas} / ml}$$

Ecuación 6. Cálculo del porcentaje de actividad secretada de la lipasa dependiente de sales biliares

% de actividad secretada = $(U \text{ seg de BAL de intestino} / U \text{ seg de BAL páncreas} + U \text{ seg de BAL intestino}) \times 100$.

Análisis estadístico. Los datos obtenidos fueron analizados por la prueba de Shapiro-Wilk para verificar su normalidad y la homogeneidad de varianzas. Cuando fue requerido, los datos fueron transformados a \log^{-10} . Posteriormente, se compararon mediante un análisis de varianza ANOVA de una vía, con un nivel de significancia α de

0.05. Las diferencias entre medias se compararon mediante una prueba de Tukey en el programa JMP versión 6.

RESULTADOS

Crecimiento de los organismos. El crecimiento de las dos especies de pejerrey durante el experimento, en términos de peso húmedo (mg), se muestra en la Figura 1. Este describe una curva típica exponencial, con una tasa específica de crecimiento de 6.8 y 6.6 g/100 g día para *O. bonariensis* y *O. hatcheri*, respectivamente.

Actividades enzimáticas implicadas en la digestión de proteínas. En el presente trabajo se evaluó la actividad de dos enzimas digestivas intestinales involucradas en la digestión de péptidos: la enzima citosólica LAP y la membranal APN cuyos perfiles se presentan en la Figura 2.

En los que respecta a la actividad de LAP, puede observarse que sus niveles se mantienen constantes a lo largo del desarrollo, presentando un incremento significativo a partir del día 63 dpe, para ambas especies de pejerrey. No obstante, en *O. bonariensis* se presenta un nuevo y drástico aumento el día 91 dpe, alcanzando valores de $13,190.70 \pm 2,341$ U/mg de proteína. En contraste, los máximos niveles de esta actividad en *O. hatcheri* se presentan el día 63 dpe, con valores de 1,360.09 U/mg de proteína, niveles que se mantienen constantes hasta el final del período evaluado. Con respecto a la enzima APN, se detectaron altas actividades en ambas especies en los primeros días de desarrollo, presentando una drástica caída entre los 28 y 42 dpe. Posteriormente los niveles de actividad se mantienen constantes a lo largo de la etapa juvenil. Aunque el perfil obtenido y los niveles de actividad para las dos especies de pejerrey es muy semejante, la caída en la actividad de APN ocurre primero en el desarrollo de *O. hatcheri*.

Actividad enzimática implicada en la digestión de lípidos. La actividad evaluada en este estudio fue la de la lipasa dependiente de sales biliares (BAL). El perfil de su actividad fue muy semejante para ambas especies, iniciando con niveles bajos en los primeros estadios del desarrollo (Figura 2). Casi al final del período evaluado se detectó un aumento significativo en la actividad; el día 77 dpe para *O. bonariensis* y el 63 para

O. hatcheri, con respecto a la actividad de los primeros días de post-eclosión. Dado que la síntesis de BAL ocurre principalmente en el hepatopáncreas de los peces, y que la enzima es secretada hacia el intestino para llevar a cabo su actividad, el porcentaje de secreción de ésta (Figura 3) fue calculado a partir de la edad de 63 dpe, cuando el tamaño de los organismos permitió la disección del hepatopáncreas e intestinos. Los resultados encontrados muestran una tendencia de incremento de la secreción enzimática para ambas especies; sin embargo, dicho aumento no fue estadísticamente significativo.

Actividades enzimáticas implicadas en la absorción de nutrientes. De las enzimas digestivas ensayadas en este trabajo, son las fosfatasa ácida y alcalina las involucradas en la absorción de nutrientes; la primera intracelularmente y la segunda como una enzima del borde de cepillo de los enterocitos. La evolución de las actividades específicas de ambas enzimas, durante el desarrollo de *O. bonariensis* y *O. hatcheri*, se muestran en la Figura 2. A diferencia de las otras actividades, los perfiles de actividad de la FA son un tanto diferentes para las dos especies de pejerrey. Los niveles de actividad se mantienen constantes a lo largo del desarrollo en *O. bonariensis*, presentando un pico de actividad el día 63 dpe, para posteriormente permanecer constantes los valores hasta el final del período evaluado. Por el contrario, el perfil de actividad en *O. hatcheri* es más irregular. Comienza con un nivel constante hasta la primera caída en la actividad el día 35 (con respecto del 14 dpe), seguida por un abrupto incremento el día 63 dpe. Posteriormente decaen nuevamente, alcanzando los niveles iniciales el día 77 dpe. En relación a la FAc, ésta fue la enzima cuya actividad fue la menor en comparación al resto de las enzimas analizadas en el presente trabajo. De hecho, su actividad dejó de poder ser detectada en *O. bonariensis* a partir del día 49 dpe, momento en donde se presentó un aumento significativo, comparado con los niveles constantes de actividad detectados en todo el período de desarrollo anterior. En *O. hatcheri* la actividad de FAc sí logró ser detectada durante todo el período experimental. Se presentó con valores constantes a lo largo del desarrollo y con un marcado incremento a los 63 dpe, para después retornar a los niveles iniciales hasta el final del período experimental.

Proporciones de las actividades de las enzimas de borde de cepillo con respecto a las enzimas citosólicas. Con la intención de buscar indicadores de maduración digestiva, se usaron los criterios descritos para peces marinos con estómago, calculando las proporciones de las actividades enzimáticas digestivas intestinales. Aunque todas las proporciones fueron analizadas, solo se muestran aquellas en donde se encontraron cambios significativos (Fig. 4). Como ha sido ya documentado en varios trabajos previos, el aumento en la proporción de la actividad de las enzimas membranales, con respecto de las citosólicas, es considerado como un indicador de maduración digestiva. En concordancia, aumentos estadísticamente significativos fueron encontrados en *O. hatcheri*, el día 14 después de la eclosión. Esto para las proporciones de las dos enzimas de membrana de borde de cepillo analizadas (FA y APN) contra la citosólica LAP. En el caso de *O. bonariensis*, el incremento significativo fue encontrado en el día 28 dpe en la proporción de la enzima membranal FA con respecto de las dos enzimas citosólicas, LAP y FAc.

DISCUSIÓN.

A lo largo del experimento los parámetros de calidad del agua y el crecimiento observado corresponden a los reportados para estas especies en estudios anteriores (Strüssmann *et al.* 1989), por lo que se puede considerar que las larvas presentaron un desarrollo normal en este trabajo.

Se ha demostrado en muchas especies de peces los acontecimientos de numerosos cambios morfológicos y funcionales, principalmente durante las primeras semanas de vida. Dentro de estos cambios funcionales encontramos el proceso de maduración digestiva, que comprende, entre otros cambios, la secreción pancreática y el aumento en la producción de las enzimas de la membrana de borde de cepillo (BBM, en el intestino. Los momentos en los que ocurren dichos cambios influyen substancialmente en la supervivencia, la viabilidad, el crecimiento y los costos de producción larvaria, bajo condiciones de cultivo (Suzer *et al.* 2007). El lograr determinar el momento en el que los organismos adquieren la maduración digestiva permite la posibilidad de realizar el “destete”, en el momento más apropiado, ya que realizarlo antes de que este proceso ocurra perjudica a los organismos. Existen varios reportes que indican que la naturaleza de la dieta y el período de administración influyen determinantemente el proceso de

maduración digestiva en peces. Un ejemplo se encuentra en la lubina Europea (*Dicentrarchus labrax*), en la cual la maduración digestiva se retarda de los 14 a los 28 días al realizar un destete en una etapa inapropiada (Zambonino-Infante & Cahu 2001). En forma complementaria, la valoración bioquímica de la presencia y nivel de actividad de las enzimas digestivas tiene múltiples utilidades de índole práctica y potencial para la acuicultura. La información obtenida es utilizada como un indicador comparativo, tanto de la tasa de desarrollo de las larvas de peces, como de su capacidad digestiva. También ayuda a mejorar la selección de los ingredientes más adecuados a utilizar en los alimentos balanceados, considerando la susceptibilidad a ser hidrolizados por los organismos, influyendo esto en la elaboración de dietas balanceadas *ad hoc* para cada etapa del cultivo y para cada especie en particular (Moyano *et al.* 2006). Alarcón-López & Martínez-Díaz (1998) mencionan que la utilización de nuevos datos biológicos y bioquímicos obtenidos en los laboratorios de investigación han permitido un incremento considerable en la producción de larvas de dorada y lubina, en los criaderos de los países mediterráneos, debido a la mejora de la tecnología utilizada.

Las actividades de las enzimas digestivas suelen ser expresadas en relación a la proteína soluble de los extractos (actividad específica) y en relación al número de organismos y órganos utilizados (actividad total). La evolución de la actividad específica, a lo largo de la ontogenia de los organismos, es afectada tanto por la velocidad de desarrollo de los tejidos secretores, como por la naturaleza y disponibilidad del alimento. De esta manera, en forma habitual los perfiles incluyen fuertes incrementos o disminuciones. Esto último es más frecuente durante la etapa larvaria, debido a que su fracción tisular se vuelve en forma progresiva más importante y por lo tanto, el contenido en proteína soluble corporal va aumentando progresivamente. Los factores ambientales (temperatura del agua, foto periodo) también pueden influir en los perfiles de las enzimas digestivas. Cuando la actividad de las enzimas digestivas es expresada en actividad total, en general el perfil encontrado es de incremento relacionado con la edad, indicando que las larvas de los peces mejoran su capacidad digestiva durante el desarrollo. Tal es el caso del turbot (*Scophthalmus Maximus*, Hoehne-Reitan *et al.* 2001), el lenguado (*Solea senegalensis*, Cara *et al.* 2003), lenguado del pacífico (*Paralichthys californicus*, Álvarez-González *et al.* 2006), la cobia, (*Rachycentron canadum*, Faulk *et al.* 2007), blackspot seabream (*Pagellus bogaraveo*,

Ribeiro *et al.* 2008) y lisa gris (*Chelon labrosus*, Zouiten *et al.* 2008). No obstante, en algunas especies se presentan incrementos o disminuciones en el perfil de actividad total, semejante a lo ocurrido en la actividad específica. Por ejemplo, en el pejelagarto (*Atractosteus tropicus*, Márquez-Couturier *et al.* 2006), sharpsnout seabream (*Diplodus puntazzo*, Suzer *et al.* 2007), la mojarra tenguayaca (*Petenia splendida*, Álvarez-González *et al.* 2008) y en el presente trabajo (ver anexo 1). Los citados autores discuten que las fluctuaciones se pueden deber a cambios en el sistema digestivo, tales como la maduración de los enterocitos, el incremento en las vellosidades y microvellosidades, entre otros; pero, el factor principal es sin duda el régimen alimenticio, desde la composición de los alimentos ingeridos hasta las pautas de alimentación. En este trabajo no se encontró una correlación entre los cambios en la alimentación con las variaciones en la actividad de las enzimas ensayadas, por lo que los resultados de los estudios histológicos del sistema digestivo de estas especies (en progreso) permitirán en todo caso sustentar nuestros hallazgos.

La leucina alanina peptidasa (LAP) es una enzima característica del citosol, que digiere a di y tri péptidos absorbidos por pinocitosis. Por esta razón su actividad es utilizada como indicadora de pinocitosis (Nicholson *et al.* 1974) y de digestión endógena, catalogada como de inmadurez intestinal. Altos niveles de esta actividad han sido encontrados en el estadio larvario pre-gástrico de varios peces (Guillaume *et al.* 1999), lo que al parecer les proporciona una alta capacidad para la digestión de proteínas hidrolizadas (Cahu & Zambonino 2001). La actividad de LAP en ambas especies de pejerrey se muestra con niveles muy altos durante la etapa larvaria pero con un incremento mas importante en la fase juvenil, muy similar a lo reportado para el pez blanco del lago de Pátzcuaro, *Chirostoma estor* (Toledo- Cuevas *et al.* 2011). Los niveles de LAP son mas altos en el pez blanco (3125.658 U/mg de proteína) que en *O. hatcheri* (943.099 U/mg de proteína), pero no llegan al máximo valor alcanzando a los 91 dpe en *O. bonariensis* (13, 190.7 U/mg de proteína). Estas diferencias podrían estar relacionadas a los distintos hábitos alimenticios de las especies. Estudios sobre los contenidos intestinales sugieren que la alimentación de *O. bonariensis* se basa en invertebrados bentónicos, crustáceos, insectos, moluscos y peces (Piedras & Pouey 2005), mientras que *O. hatcheri* se describe como un pez omnívoro (Macchi *et al.* 1999). Por el contrario, el pez blanco es un organismo zooplanctófago, hábito definido con

base en sus estructuras bucofaríngeas (Ross *et al.* 2006). Éste tipo de estudios permiten obtener resultados más confiables en cuanto a la determinación del hábito alimenticio, por lo que estudios similares están también en progreso en los pejerreyes. Los altos niveles de LAP parecen ser un mecanismo compensatorio de la ausencia de estómago en estas especies, al igual que los altos niveles de proteasas alcalinas en peces en estadios pre-gástricos (Walford & Lam 1993, Moyano *et al.* 1996). Cara *et al.* (2002) mencionan que la ausencia de pepsina en los estados tempranos de vida de los sargo picudo (*Diplodus puntazzo*) y sargo común (*Diplodus sargus*) es compensada por procesos de micropinocitosis y digestión intracelular de proteínas, en el intestino posterior, en los cuales están implicadas la fosfatasa ácida, la catepsina y algunas aminopeptidasas.

APN es una enzima intestinal localizada en la membrana de borde de cepillo de los enterocitos, hidroliza péptidos a aminoácidos hacia el proceso final de la digestión de proteínas, iniciado por las proteasas lumbales, tripsina y quimotripsina. Su aumento en la membrana de borde de cepillo caracteriza la maduración normal de los enterocitos, en larvas de peces con estómago, indicando el momento cuando el intestino adquiere las características digestivas de un adulto. Los valores máximos de actividad de aminopeptidasa N detectados para *O. bonariensis* son de 146.287 ± 2 mU/mg de proteína a los 35 dpe, semejante al de *Pseudosciaena crocea* (Ma *et al.* 2005) y 4.6 veces mayores a los de *C. labrosus* (Zouiten *et al.* 2008). En cambio *O. hatcheri* presenta un máximo de actividad de 185.950 ± 25 mU/mg de proteína a los 21 dpe, mas alto que el reportado en el sargo (*D. sargus*, Cara *et al.* 2002) y un poco mayor al reportado en *C. estor* (129 mU/mg de proteína; Toledo-Cuevas *et al.* 2011). Altos niveles de actividad de proteasas indican una gran capacidad de digestión proteínica para los peces, capacidad que se sugiere por tanto para estas especies.

La lipasa que parece jugar el papel más importante en los peces marinos es la conocida como lipasa dependiente o activada por sales biliares (BAL). Esta enzima cataliza la hidrólisis de los enlaces ester carboxílicos, no solo de los triacilglicéridos, sino también de esteres de colesterol o esteres de vitaminas liposolubles. Su actividad ha sido detectada desde la apertura de la boca en larvas de *D. labrax* (Zambonino-Infante & Cahu 2007). BAL muestra un perfil con niveles bajos al inicio de la etapa larvaria de

ambas especies de pejerrey, con un posterior aumento al final del periodo experimental. Esto a pesar de que el contenido de lípidos en las presas vivas, de 9.6 ± 0.2 % (Ma *et al.* 2005), es mayor al del alimento balanceado proporcionado en el presente trabajo. No obstante, no cuantificamos la cantidad de alimento proporcionado (vivo o balanceado), por lo que no podemos determinar si el estímulo para el aumento en la actividad de BAL haya sido un mayor contenido total de lípidos en el alimento balanceado o el tipo de éstos. Ribeiro *et al.* (2008), en *Pagellus bogaraveo*, reportan un incremento de tres veces en los niveles de actividad de lipasa cuando se alimentaron exclusivamente con alimento balanceado, sugiriendo que es el tipo de lípidos el que influencia las variaciones en la actividad de la lipasa y no el contenido. Estudios sobre esta lipasa, en otras especies de peces carentes de estómago (como las carpas indias, *Catla catla*, *Labeo rohita*, y *Cirrhinus mrigala*), han permitido sugerir que el aumento en su actividad coincide con el momento en el que se dan los posibles cambios fisiológicos para el metabolismo de los lípidos y la preparación del intestino a un tipo adulto de digestión, lo que se traduce en una mejor digestión y utilización de los lípidos de la dieta (Rathore *et al.* 2005, Chakrabarti *et al.* 2006, Chakrabarti & Rathore 2010). Así que podría ser la adquisición de la maduración digestiva intestinal el origen del incremento en esta actividad en los pejerreyes. Por otro lado, los niveles de BAL encontrados en estos organismos son bajos en comparación con otras especies (Cara *et al.* 2002), lo que podría sugerir una baja capacidad lipolítica para estas especies. Esto pareciera ser el mismo caso de *C. estor*, que presenta valores muy semejantes a los de los pejerreyes. No obstante, al parecer la actividad lipolítica de las especies es complementada por la lipasa pancreática, ya que niveles crecientes de ésta fueron detectados (Toledo-Cuevas *et al.* 2011) en pejerreyes muestreados al mismo tiempo que los de este trabajo.

Como se ha mencionado anteriormente, el incremento en la secreción enzimática digestiva pancreática ha sido definido como un indicador de madurez digestiva. En este trabajo se encontró un aumento en el porcentaje de secreción de BAL durante el período evaluado (63 a 91 dpe); sin embargo éste no fue significativo. Zambonino & Cahu (2001) mencionan que el proceso de maduración pancreática ocurre durante el primer mes de vida en el desarrollo de algunos peces marinos. Con base en las proporciones de enzimas intestinales membranales y citosólicas, los pejerreyes parecen alcanzar la maduración digestiva durante las primeras tres semanas de desarrollo,

periodo en el cual la disección de órganos es muy difícil en estos organismos, por su pequeño tamaño. Así que es probable que ésta sea la causa de no haber detectado un aumento significativo en la secreción pancreática de BAL en el periodo evaluado, ya que éste fue bastante posterior a cuando parece ocurrir la maduración en estos organismos.

La fosfatasa alcalina (FA) es una enzima que se produce en el aparato de golgi de los enterocitos, lugar de donde posteriormente se transloca a la membrana intestinal de borde de cepillo. Aquí, en su sitio activo, participa de forma importantemente en la absorción de nutrientes en los peces. El incremento en su actividad, en larvas de peces, es indicador de enterocitos funcionalmente desarrollados, por ello es usada como un marcador en la diferenciación de éstos (Zambonino-Infante & Cahu 2001). Altos valores de esta actividad se encontraron en ambas especies de pejerrey, mayores que los reportados en la carpa *Hypophthalmichthys molitrix*, en híbridos de *Morone saxatilis* x *Morone chrysops* y en híbridos de tilapia (Harpaz & Uni 1999), en *D. sargus* (Cara *et al.* 02), en *P. crocea*, (Ma *et al.* 2005) y *P. californicus* (Álvarez-González *et al.* 2006). También se observó un abrupto incremento en la actividad específica a partir de los 63 dpe en ambas especies, posterior al “destete”, mientras que en *P. californicus* y *P. crocea* se reporta a los cinco y 8 dpe, respectivamente; y desde la eclosión en *D. sargus*. Los autores interpretan este resultado como producto de una alta capacidad de digestión y absorción de nutrientes a través de la membrana de los enterocitos, además de enterocitos muy desarrollados desde el período larvario. En el caso de los pejerreyes, según el resultado obtenido, los enterocitos se encontrarían mas desarrollados hacia el final del periodo juvenil.

La fosfatasa ácida participa en el metabolismo de compuestos de fosfato y su naturaleza ubicua sugiere una gran importancia para las células; por ejemplo parece estar implicada en la transducción de señales y en el control de la proliferación celular. No obstante, su papel biológico es aún desconocido en gran parte, aunque algunos autores la asocian con actividad lisosomal y en procesos de pinocitosis (Baglolle *et al.* 1998, Ribeiro *et al.* 1999). En *Cyprinus carpio* se han reportado varias isoenzimas en el hígado (Kubicz *et al.* 1981, Janska & Kubicz 1985), y en otros órganos, siendo la FAc intestinal la más abundante. Panará (1997) describe la presencia de diferentes FAc en

diversos órganos y tejidos de *Esox lucius*. Kozaric *et al.* (2004) mencionan que la FAc es un marcador de lisosomas, pero su actividad también es detectada fuera de éstos, en diferentes regiones del intestino de *Merluccius merluccius*. En este trabajo, fue detectada en células epiteliales, en la lámina propia, en donde se encontraron macrófagos, y en la zona supranuclear de los enterocitos. Su actividad también se encontró en las glándulas gástricas, probablemente relacionada con procesos de secreción. Siakpere *et al.* (2010) la encuentran asociada al daño del hígado por permanganato de potasio (un quimo terapéutico utilizado comúnmente en la acuicultura para el manejo de enfermedades infecciosas y parásitos) en el bagre africano (*Clarias gariepinus*). Por su parte Álvarez-González *et al.* (2006) mencionan que la actividad de esta enzima está involucrada en la digestión ácida, además de considerar altos niveles indicativos de una alta capacidad digestiva. Bajos niveles de esta actividad fueron encontrados en los pejerreyes, principalmente en *O. bonariensis*, especie en donde la actividad solo pudo ser determinada hasta los 49 dpe. Para *O. hatcheri* la actividad exhibe un perfil similar al obtenido para la FA, similar a lo reportado en *Paralabrax maculatofasciatus* (Peña-Martínez 2005). Los valores de actividad de FAc detectados en los pejerreyes son similares a los reportados en *P. californicus* (Álvarez-González *et al.* 2006) pero son menores a los reportados por Cara *et al.* (2002) en *D. sargus*.

La proporción de la actividad total de las enzimas de BBM con respecto de la actividad de la enzima citosólica LAP ha sido considerada como un indicador de la madurez en la digestión intestinal (Zambonino Infante & Cahu 2001). Lo anterior debido a que la digestión llevada a cabo por enzimas citosólicas, como la LAP, disminuye en importancia durante el desarrollo para dar lugar a un proceso de digestión exógeno, más eficaz y esencial, llevado a cabo por las enzimas de la membrana de borde de cepillo (Ma *et al.* 2005, Zambonino-Infante & Cahu 2007). Un aumento en dichas proporciones fue observado de manera precoz para las dos especies de pejerrey; a los 14 dpe en *O. hatcheri*, en las proporciones de FA y APN con respecto a LAP, y a los 28 dpe en *O. bonariensis*, en las proporciones de FA con respecto de las dos enzimas citosólicas, LAP y FAc. En este estudio, se consideraron los altos niveles de FAc como un indicador de inmadurez digestiva, por estar asociada a los procesos de pinocitosis (Ribeiro *et al.* 1999), pero debido a su ubicuidad cabe la posibilidad de que no sea un buen indicador. Las tempranas fechas de maduración encontradas para los pejerreyes

coinciden con una gran diversidad de peces, tales como: *D. labrax* (Zambonino Infante & Cahu 1996), *Cyprinus caprio* (Escaffre *et al.* 1997), *P. olivaceus* (Kurokawa & Suzuki 1998), *Sparus aurata* (Calzada *et al.* 1998), *S. senegalensis* (Ribeiro *et al.* 1999), *Sciaenops ocellatus* (Buchet *et al.* 2000) *P. crocea*, (Ma *et al.* 2005, Mai *et al.* 2005), *P. californicus* (Álvarez-González *et al.* 2006), *D. punctazzo* (Suzer *et al.* 2007) y *Amphiprion percula* (Onal *et al.* 2008). Resulta relevante señalar que el modelo de maduración digestiva fue descrito para peces marinos que desarrollan estómago durante la ontogenia (Zambonino-Infante & Cahu 2001). Toledo-Cuevas y colaboradores (2011) describen la ausencia de tales indicadores en el pez blanco de Pátzcuaro, un organismo agástrico y sugieren que los peces sin estómago no siguen el modelo de maduración descrito para peces con estómago. No obstante, describen datos de maduración en los pejerreyes, tal como ocurre en el presente trabajo. Aunque los tiempos en los que se encuentran estos indicadores de maduración difieren en ambos trabajos (a pesar de que las muestras fueron tomadas al mismo tiempo del mismo cultivo), la coincidencia de resultados sugieren fuertemente que sí ocurre una maduración intestinal en los pejerreyes, tal como ocurre en los peces gástricos. Sin embargo, el momento en el que ocurre la maduración requiere de ser confirmado, por estudios histológicos (en progreso) y por análisis de las actividades de las enzimas digestivas en membranas aisladas, de ser posible, tal como lo sugiere el grupo de Zambonino-Infante.

Posterior al mencionado incremento en las proporciones de las actividades digestivas intestinales, se observó un decremento significativo en éstas en ambas especies de pejerrey. Este fenómeno no ha sido mostrado en la mayoría de los trabajos con otras especies, aunque podría atribuirse a que los tiempos de desarrollo reportados son menores a los de este trabajo. Sin embargo, Zouiten *et al.* (2008) si reportan una disminución similar, que la relacionan a una temprana maduración digestiva, adquirida con el régimen alimenticio proporcionado. Así que podría ser que éste fuera también el caso de los pejerreyes. Por otro lado, Hakim *et al.* (2006) describen que la composición del alimento y el origen genético (filogenia) de las especies influyen los niveles de algunas enzimas de membrana de borde de cepillo, como es el caso de la fosfatasa alcalina, y no así los de enzimas citosólicas, como la LAP. Así que dicha disminución en la proporción podría ser simplemente el reflejo del aumento en los niveles de LAP

durante el desarrollo de estas especies agástricas, determinado por su genética. Pero, adicionalmente, podría reflejar que el alimento balanceado proporcionado esté afectando los niveles de enzimas digestivas, como las de membrana; quizás no permitiendo que éstas adquieran los niveles usuales para los organismos. Finalmente, esta disminución en las proporciones pudo tener también su origen en la probable subestimación de la actividad de las enzimas de membrana, al no haberse podido determinar en fracciones purificadas de membrana, por el pequeño tamaño de los organismos. Como lo mencionan Zambonino-Infante & Cahu (2001), este procedimiento permite incrementar los niveles de actividad detectados de estas enzimas.

Como conclusiones podemos mencionar que, los altos niveles de actividad de la enzima citosólica LAP, a lo largo del desarrollo, parecen ser una característica de especies agástricas, seguramente compensando la ausencia de digestión ácida. Tal es el caso de las especies de atherinópsidos aquí estudiadas, los pejerreyes *O. bonariensis* y *O. hatcheri*. Aún así, se sugiere una buena capacidad digestiva para estas especies, basada en los mecanismos digestivos y de absorciones detectadas, así como por el alto nivel de actividad de enzimas digestivas de membrana asociadas al modo adulto de digestión, la de la FA y APN. El hallazgo de maduración digestiva en los pejerreyes apoya la posibilidad de llevar a cabo un “destete” más temprano, pero con una dieta más adecuada, quizás con una naturaleza proteínica diferente acorde a sus altas actividades de peptidasa citosólica.

Los resultados aquí obtenidos no solo permiten colaboraciones internacionales entre grupos que realizan investigación con Atherinópsidos, complementando conocimientos tecno-científicos de estas especies, si no que su gran similitud permite que los conocimientos generados para unas especies puedan ser de utilidad para otras. Por ejemplo, el coadyuvar al desarrollo de una tecnología alimentaria apropiada para los pejerreyes se apoya el desarrollo de la relacionada a los peces blancos, organismos de gran importancia para nuestro país.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Gisela Ríos-Durán por su valiosa ayuda para realizar los análisis estadísticos. Al Dr. Carlos A. Álvarez González por sus enriquecedoras asesorías. A CONACYT y

COECYT por las becas otorgadas mediante sus programas de Formación de Científicos y Tecnólogos y de Superación Académica, que me permitieron continuar con mi formación profesional. A los apoyos otorgados por CONACyT CB-2006-01-61167, CONACyT CB-2007-01-83920, 104194, 94136, Cooperación bilateral México-Japón (JSPS), COECYT 2008 Y PIFI 2010.

LITERATURA CITADA

- Alarcón López FJ, Martínez Díaz MI (1998) Fisiología de la Digestión en Larvas de Peces Marinos y sus Aplicaciones al Cultivo Larvario en Masa. AquaTIC 5, (Disponible el 28/03/2011 en: <http://www.revistaaquatic.com/aquatic/art.asp?t=h&c=53>)
- Álvarez-González CA, Cervantes-Trujado M, Tovar-Ramírez D, Conklin DE, Nolasco H, Gisber, Piedrahita R (2006) Development of digestive enzymes in California halibut *Paralichthys californicus* larvae. Fish Physiology and Biochemistry 32:83-93.
- Álvarez-González CA, Márquez-Couturier G, Arias-Rodríguez I, Contreras-Sánchez WM, Uscanga-Martínez A, Perales-García N, Moyano-López FJ, Hernández-Jiménez R, Civera-Ceresedo R, Goytortua-Bores E, Isidro-Olán L, Almeida-Madrigal JA, Ramírez-Tovar D, Gutiérrez-Rivera J. N, Arevalo-Galán LM, Enrric G, Treviño L, Morales-Sánchez B (2008) Avances en la fisiología digestiva y nutrición de la mojarra tenguayaca *Petenia splendida*. Memorias del IX Simposium internacional de nutrición acuícola. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, México. pp. 135-235.
- Baglolle CJ, Goff GP, Wright GM (1998) Distribution and ontogeny of digestive enzymes in larval yellowtail and winter flounder. J. Fish Biol (53) 767-784.
- Bergmeyer HU, Gawehn K, Grassl, M (1974) in Methods of Enzymatic Analysis (Bergmeyer HU) Volumen I, 2nd ed. 495-496, Academic Press, Inc, New York, NY. Biochemistry of vertebrate acid phosphatases. Trends in Comparative Biochemistry and Physiology 1:675–692.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem (72): 248-254.
- Buchet V, Zambonino-Infante JL, Cahu CL (2000) Effect of lipid level in a compound diet on the development of red drum (*Sciaenops ocellatus*) larvae. Aquaculture 184 (3-

4): 339-347.

- Cahu C, Zambonino-Infante J (2001) Substitution of live food by formulated diets in marine fish larvae. *Aquaculture* 200(1-2): 161-180
- Calzada A, Medina A, Gonzáles de Canales ML (1998) Fine structure of the intestine development in cultured sea bream larvae. *J. Fish Biol* 53: 340-365.
- Cara TJB, Moyano JF, Fernández DC, Yúfera M (2002) Actividad de enzimas digestivas durante el desarrollo larvario del Sargo (*Diplodus sargus*). Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura 110-121.
- Cara JB, Moyano FJ, Cárdenas S, Fernández-Díaz C, Yúfera M (2003) Assessment of digestive enzyme activities during larval development of white bream. *J. Fish Biol* 63: 48-58.
- Chakrabarti R, Rathore RM, Kumar S (2006) Study of digestive enzyme activities and partial characterization of digestive proteases in a freshwater teleost, *Labeo rohita*, during early ontogeny. *Aquaculture Nutrition* 12: 35–43.
- Chakrabarti R, Rathore RM (2010) Ontogenic changes in the digestive enzymes patterns and characterization of proteases in indian major carp *Cirrhinus mrigala*. *Aquaculture Nutrition* 16:569-581.
- Colautti D, Remes-Lenicov M, Berasain G (2003) Vulnerabilidad Del Pejerrey *Odontesthes bonariensis* A La Pesca Deportiva, En Función De Su Condición. *Biología Acuática* 20: 326-1638.
- Dyer BS (2006) Systematic revision of the South American silversides (Teleostei, Atheriniformes). *Biocell* 30:69–88.
- Escaffre AM, Zambonino-Infante JL, Cahu CL, Mambrini M, Bergot P, Kaushik S (1997) Nutritional value of soy protein concentrate for larvae of common carp (*Cyprinus carpio*) based on growth performance and digestive enzyme activities. *Aquaculture* 153: 63-80.
- Faulk CK, Benninghoff AD, Holt GJ (2007) Ontogeny of the gastrointestinal tract and selected digestive enzymes in cobia *Rachycentron canadum* (L.). *Journal of Fish Biology* 70:567–583.
- Grossman F (2002) Fundamentos Biológicos, Económicos y Sociales Para Una Correcta Gestión Del Recurso Pejerrey. Editorial Astyanax. Argentina. pp 246.
- Guillaume J, Kaushik S, Bergot P, Métailler R (1999) Nutrition and Feeding of fish and crustaceans. INRA. UK. pp. 35-45 y 247-249.

- Hakim Y, Uni Z, Hulata G, Harpaz S (2006) Relationship between intestinal brush border enzymatic activity and growth rate in tilapias fed diets containing 30% or 48% protein. *Aquaculture* 257:420–428.
- Harfush MMR (1992) Determinación de los requerimientos de proteína dietaria en crías de *Cichlasoma urophthalmus* (Gunter 1862) alimentadas *ad libitum*. Tesis de Maestría CINVESTAV – IPN, Unidad Mérida 67 pp.
- Harpaz S, Uni Z. (1999) Activity of intestinal mucosal brush border membrane enzymes in relation to the feeding habits of three aquaculture fish species. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* (124):155–160.
- Hoehne-Reitan K, K Gjellesvick (2001) Development of bile salt dependent lipase in larval turbot. *Journal of Fish Biology* 58:737–745
- Horn MH, Gawlicka AK, German DP, Logothetis EA., Cavanagh JW, Boyle KS (2006) Structure and function of the stomachless digestive system in three related species of New World silverside fishes (Atherinopsidae) representing herbivory, omnivory, and carnivory. *Marine Biology* 149: 1237–1245
- Iijima N, Tanaka S, Ota Y (1998) Purification and characterization of bile salt activated lipase from the hepatopancreas of red sea bream, *Pagrus major*. *Fish Physiol. Bioch* 18: 59-69.
- Janska H, Kubicz A (1985) Studies on the heterogeneity of carp liver acid phosphatases: acid phosphatase-I. Subunit structure and carbohydrate composition. *Comparative Biochemistry and Physiology* (82B) 563–567.
- Kozaric Z, Kužir S, Nejedli S, Petrinc Z, Srebočan E (2004) Histochemical distribution of digestive enzymes in hake, *Merluccius merluccius* L. 1758. *Veterinarski Arhiv* 74 (4):299-308.
- Kubicz A, Dratewka-Kos E, Zygmuntowicz R (1981) Multiple molecular forms of the acid phosphatase from *Cyprinus carpio* liver: isolation and comparison with those of *Rana esculenta*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 68B: 437–443.
- Kurokawa T, Suzuki T (1998) Development of intestinal brush border aminopeptidase in the larval Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture* 162:113–124.
- Ma H, Cahu C, Zambonino J, Yu H, Duan Q, Le-Gall M, Mai K (2005) Activities of selected digestive enzymes during larval development of large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) *Aquaculture* 245:239– 248
- Macchi PJ, Cussac VE, Alonso MF, Denegri MA (1999) Presentation relationships between

- introduced salmonids and the native fish in lakes and reservoirs in northern Patagonia. *Ecology of Freshwater Fish* 8:227-236.
- Mai K, Yu H, Ma H, Duan Q, Gisbert E, Zambonino-Infante JL, Cahu CL (2005) A histological study on the development of the digestive system of *Pseudosciaena crocea* larvae and juveniles. *Journal of Fish Biology* 67(4):1094-1106.
- Maroux S, Louvard D, Baratti J (1973) The aminopeptidases from hog-intestinal brush border. *Biochem Biophys* 321: 282-295.
- Márquez-Couturier G, Álvarez-González, Contreras-Sánchez WM, Hernández-Franyutti AA, Mendoza-Alfaro RE, Aguilera-González C, García-Galano T, Civera-Cerecedo R, Goytortua-Bores E (2006) Avances en la alimentación y nutrición de peje lagarto *Atractosteus Tropicus*. En editores Cruz-Suárez LE, Ricque MD, Tapia SM, Nieto-López MG, David A, Villareal CN, Puello CAC y Ortega AG, Avances en Nutrición acuícola VIII. VIII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 15-17 de Noviembre. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey. Nuevo León México.
- Martínez-Palacios, CA, Comas-Morte J, Tello-Ballinas J.A, Toledo-Cuevas M, Ross LG (2004) The effects of saline environments on survival and growth of eggs and larvae of *Chirostoma estor estor* Jordan 1880. (Pisces: Atherinidae). *Aquaculture* 238: 509-522.
- Moyano LFJ, Díaz M, Alarcón FJ, Sarasquete MC (1996) Characterization of digestive enzymes activity during larval development of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Fish Physiol Biochem* 15: 121-130.
- Moyano LFJ (2006) Bioquímica Digestiva en especies acuicultivadas: Aplicaciones en nutrición. VIII Simposium internacional de nutrición acuícola. 15-17 de Noviembre. Universidad Autónoma de Nuevo León, Nuevo León, México.
- Nicholson JA, McCarthy DM, Kim YS (1974) The Responses of Rat Intestinal Brush Border And Cytosol Peptide Hydrolase Activities to Variation In Dietary Protein Content Dietary Regulation of Intestinal Peptide Hydrolases. *J. Clin Invest* 54(4):890-8.
- Nicholson JA, Kim YS (1975) A one-step L-amino acid oxidase assay for intestinal peptide hydrolase activity. *Anal. Biochem* 63:110-117.
- Onal U, Langdon C, Celick I (2008) Ontogeny of the digestive tract of larval percula clownfish, *Amphiprion percula* (Lacepède 1802): a histological perspective.

- Aquaculture Research 39:1077-1086
- Panará F (1997) Acid phosphatases of *Esox lucius*: tissue distribution and partial characterization. Journal of Fish Biology 51:275–283.
- Peña-Martínez R (2005) Estudios de la función digestiva en larvas de la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus*. Tesis de doctorado. Instituto Politécnico Nacional. La Paz Baja California. 141 pp.
- Piedras SRN, Pouey JLOF (2005) Alimentação do peixe-rei (*Odontesthes bonariensis*, Atherinopsidae) nas lagoas Mirim e Mangueira, Rio Grande do Sul, Brasil. Iheringia Sér Zool Porto Alegre 95(2):117-120.
- Rathore RM, Kumar S, Chakrabarti R (2005) Digestive enzyme patterns and evaluation of protease classes in *Catla catla* (Family: Cyprinidae) during early developmental stages. Comparative Biochemistry and Physiology Part B 142:98–106
- Ribeiro L, Zambonino-Infante JL, Cahu C, Dinis MT (1999) Development of digestive enzymes in larvae of *Solea senegalensis*, Kaup 1858. Aquaculture 179:465–473
- Ribeiro L, Couto A, Olmedo M, Álvarez-Blázquez B, Linares F, Valente LMP (2008) Digestive enzyme activity at different developmental stages of blackspot seabream, *Pagellus bogaraveo* (Brunnich 1768). Aquaculture Research 39:339-346.
- Ross LG, Martínez-Palacios CA, Aguilar-Valdez MC, Beveridge MCM, Chávez-Sánchez MC (2006) Determination of feeding mode in fish: the importance of using structural and functional feeding studies in conjunction with gut analysis in a selective zooplanktivore *Menidia estor* Jordan 1880. J Fish Biol (68): 1-13.
- Ruiz EA (2005). Biología del pejerrey patagónico, *Odontesthes hatcheri* (Eigenman, 1909) Dyer, 1993, En El Embalse Florentino Ameghino, Chubut, Argentina. Naturalia patagónica 2(1): 118-121.
- Siakpere K, Ikomi RB, Ogbe MG (2010) Variations in Acid Phosphatase and Alkaline Phosphatase Activities in the Plasma of the African Catfish: *Clarias Gariepinus* Exposed To Sublethal Concentrations of Potassium Permanganate. Asian J. Exp. Biol Sci 1 (1): 170-174.
- Somoza G, Miranda M, Berasain LA, Colautti GE, Lenicov DMR, Strüßmann CA (2008) Historical aspects, current status, and prospects of pejerrey aquaculture in South America. Aquaculture Research 39: 784-793.
- Strüßmann CA (1989) Basic studies on seed production of pejerrey *Odontesthes bonariensis*. Doctoral Dissertation Thesis. Tokyo University of Fisheries, Tokyo,

Japan, 351 pp.

- Suzer C, Aktülün S, Çoban D, Okan-Kamacı H, Saka S, Fırat K, Albaz A (2007) Digestive enzyme activities in larvae of sharpsnout seabream (*Diplodus puntazzo*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* 148: 470–477.
- Tejedor D (2001) El pejerrey como recurso genético. En: *Fundamentos biológicos, económicos y sociales para una correcta gestión del recurso pejerrey* (ed. by F. Grosman) Editorial Astyanax, Buenos Aires, Argentina. pp. 25–30
- Toda K, Tonami M, Yasuda N, Suzuki S (1998) Cultivo del pejerrey en Japón. Edit. Asociación Argentino Japonesa del Pejerrey. Argentina. 69 pp.
- Toledo-Cuevas M, Moyano LFJ, Tovar-Ramírez D, Álvarez-González CA, Strüssmann C, Martínez-Chávez CC, Martínez-Palacios CA (2011) Findings on the digestive physiology of three cultured Atherinopsids. *Aquaculture* 42 (6): 776-786
- Walford J, Lam TJ (1993) Development of digestive tract and proteolytic enzyme activity in seabass (*Lates calcarifer*) larvae and juveniles. *Aquaculture* 109: 187-205.
- Zambonino-Infante J. L, A. Péres, C. L. Cahu, P. Quazuguel y M. M. Le Gall. 1996. Sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae fed different Artemia rations: growth, pancreas enzymatic response and development of digestive functions. *Aquaculture* 139: 129–138.
- Zambonino-Infante JL, Cahu CL (2001) Ontogeny of the gastrointestinal tract of marine fish larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 130(4): 477-487
- Zambonino-Infante JL, Cahu CL (2007) Dietary modulation of some digestive enzymes and metabolic processes in developing marine fish: Applications to diet formulation. *Aquaculture* 268 (1-4) 22:98-105.
- Zouiten D, Khemis IB, Besbes R, Cahu C (2008) Ontogeny of the digestive tract of thick lipped grey mullet (*Chelon labrosus*) larvae reared in “mesocosms”. *Aquaculture* 279(1-4):166-172.

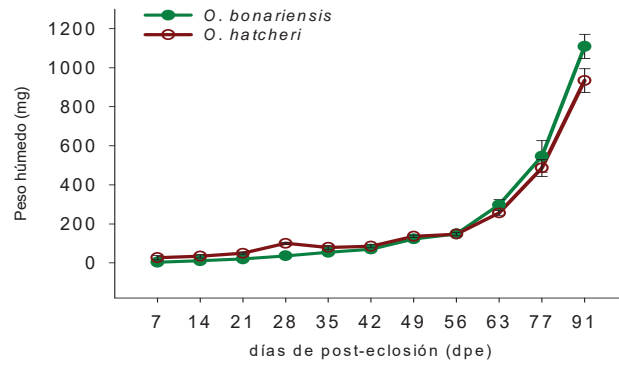


Figura 1. Crecimiento de *Odontesthes bonariensis* y *O. hatcheri* a lo largo del experimento (media \pm ES, n15).

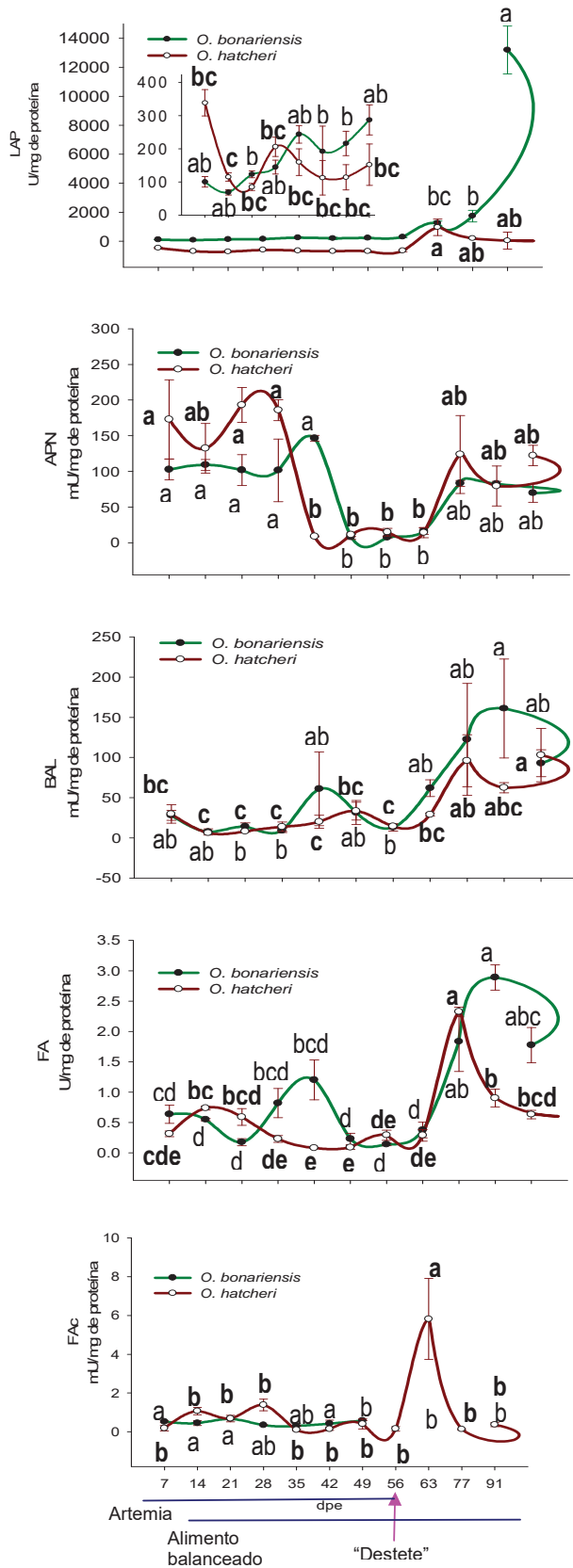


Figura 2. Actividades específicas enzimáticas durante el desarrollo larvario y juvenil de *Odontesthes bonariensis* y *O. hatcheri* (media \pm ES, n3: α 0.05). dpe; días de post-eclosión. Las letras distintas representan diferencias significativas a lo largo de la ontogenia; siendo las letras oscuras las que corresponden a *O. hatcheri*. El recuadro interior en LAP representa la actividad durante el período de 7 a 56 dpe.

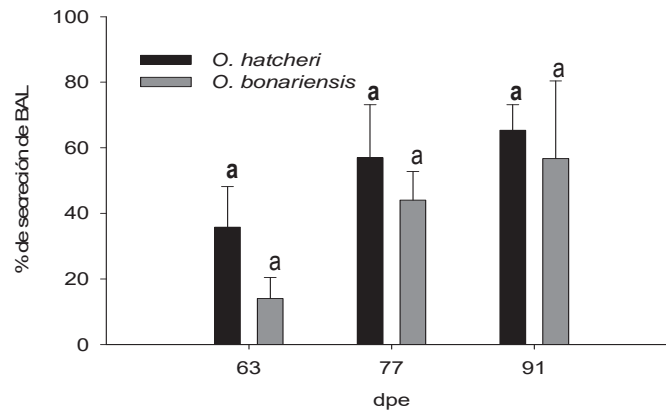
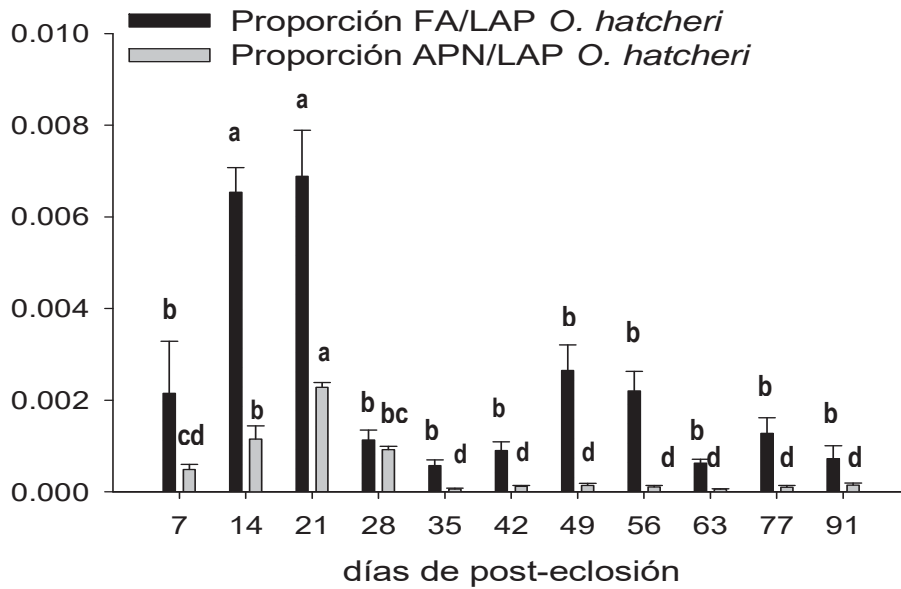


Figura 3. Porcentaje de actividad secretada de la enzima lipasa dependiente de sales biliares (BAL) para *Odontesthes bonariensis* y *O. hatcheri* durante el período juvenil (media \pm ES, n3: α 0.05). dpe; días de post-eclosión. Distintas literales representan diferencias significativas a lo largo del desarrollo de las especies, siendo las oscuras las correspondientes a *O. hatcheri*.

A)



B)

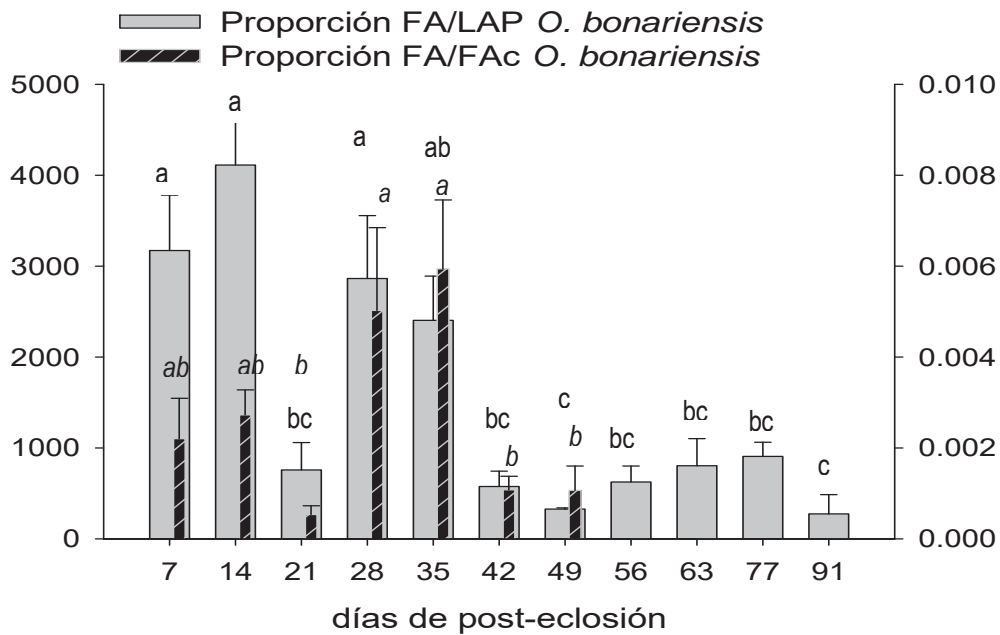


Figura 4. Proporciones de la actividad de enzimas digestivas de membrana de borde de cepillo y citosólicas durante el desarrollo larvario y juvenil de dos especies de pejerreyes (media \pm ES, n3: α 0.05). Distintas literales representan diferencias significativas a lo largo del desarrollo de las especies. En B), las letras cursivas representan las diferencias a la proporción FA/FAc.

VII. PERSPECTIVAS Y RECOMENDACIONES

A pesar del avance logrado durante los últimos años en el cultivo de larvas y juveniles de pejerrey, aún existen aspectos relacionados con la alimentación y nutrición que deben estudiarse de tal forma que se genere una visión que integre la fisiología y bioquímica digestiva. Adicionalmente, es necesario realizar una caracterización completa, que incluya estudios histológicos (en proceso) e histoquímicos para localizar los sitios de actividad de las enzimas digestivas.

Igual de relevante es realizar investigaciones para desarrollar dietas balanceadas óptimas para cada estadio de las especies, en conjunto con la implementación de un esquema de evaluación del desempeño de la dieta sobre la condición nutricional de las larvas. Con esto será posible proponer estrategias de cultivo integrales que permitirán incrementar la supervivencia y mejorar el crecimiento.

Así mismo, valdría la pena intentar purificar las membranas de borde de cepillo, para verificar los resultados referentes a la adquisición de la maduración digestiva, además de la búsqueda de otros indicadores de dicho proceso, que robustecieran los hallazgos en estas especies agástricas.

Con base en los resultados obtenidos a partir de este trabajo, se recomienda realizar un destete a partir de los 14 y 28 días de pos-eclosión en *O. hatcheri* y *O. bonariensis* respectivamente, sin dejar de proporcionar alimento vivo, dado lo inadecuado del alimento balanceado proporcionado en la actualidad. Es importante establecer un periodo de co-alimentación no menor de 7 días, de tal forma que las larvas tengan un tiempo adecuado para adaptarse al nuevo alimento

VIII. BIBLIOGRAFÍA COMPLEMENTARIA

- Baigún C. R. y R. Delfino. 2003. Assessment of social and economic issues as management tools for summer pejerrey recreational fisheries in pampean lakes (Argentina). *Lakes Res. Manage.* Texas, USA, 19: 242-250.
- Bläckberg L., M. Edlund, L. Hansson, O. Hernell, L. Lundberg, M. Strömquist, y J. Törnell. 2006. Variantes de la lipasa estimulada por las sales biliares, moléculas de ADN que las codifican, y mamíferos transgénicos no humanos. Boletín europeo de patentes. Número de publicación: 2 258 262. España.
- Blaxter J. H. S. 1988. Pattern and variety in development. In: *Fish Physiology (XIA)* (Hoar, W.S. & Randall, D.J., eds.). Academic Press, San Diego, pp 1-58.
- Boehlert G. W. y M. M. Yoklavich. 1984. Reproduction, embryonic energetic and the maternal-fetal relationship in the viviparous genus *sebastes*. *Biol. Bull* 167: 354-370.
- Cahu C. L. y 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(6): 431-437.
- Colautti D. y M. Remes-Lenicov. 2000. Primeros resultados sobre cría de pejerreyes (*Odontesthes bonariensis*) en jaulas, crecimiento, supervivencia, producción y alimentación. En: Fundamentos Biológicos, Económicos y Sociales para una correcta gestión del recurso pejerrey. Ed. Fabián Grosman. 212 pp.
- Dabrowski K. 1982. Proteolytic enzyme activity decline in starving fish alevins and larvae. *Env. Biol. Fish* 7: 73-76.
- De Silva S. Sena y T. A. Anderson. 1995. Fish Nutrition in aquaculture. Editorial *Chapman and hall*. Australia. pp. 112-119. 143-148.
- Debnath D., A. K. Pal, N. P. Sahu, S. Yengkokpam, K. Baruah, D. Choudhury y G. Venkateshwarlu. 2007. Digestive enzymes and metabolic profile of *Labeo rohita* fingerlings fed diets with different crude protein levels. *Comparative Biochemistry and Physiology (Part B)* 146:107–114.
- Díaz, M., F. J. Moyano, F. L. García-Carreño, F. J. Alarcón, M. C Sarasquete. 1997. Substrate-SDS-PAGE determination of protease activity through larval development in sea bream. *Aqu. Inter.* 5 (5):461-471.
- FAO. 2009. Las pesquerías de aguas continentales frías en América Latina. Consultado en agosto de 2011 en URL: <http://www.fao.org/docrep/008/t4675s/T4675S01.htm>.

- FAO. 2010. Peces nativos de agua dulce de América del Sur de interés para la acuicultura: Una síntesis del estado de desarrollo tecnológico de su cultivo. Serie Acuicultura en Latinoamérica. Número 1.
- Gal-Garber O. y Z. Uni. 2000. Chicken Intestinal Aminopeptidase: Partial Sequence of the Gene, Expression and Activity. *Poultry Science* 79:41–45.
- Generoso A., C. Salvatore, B. De Vizia, G. De Rits, G. Mazzacca y A. Salvatore. 1980. Brush border and cytosol peptidase activity of human small intestine in normal subjects and celiac patients. *Pediatr. Res* 14: 812-818.
- Gómez S. E., R. C. Menni, N. J. González y L. Ramírez. 2007. The physical–chemical habitat of the Buenos Aires pejerrey, *Odontesthes bonariensis* (Teleostei, Atherinopsidae), with a proposal of a water quality index. *Environ Biol Fish*. DOI 10.1007/s10641-006-9086-4.
- Gómez-Requeni P., C. Montecchia, J. Zorrilla, M. Villian, F. Canosa. 2011. Efectos del contenido lipídico de la dieta sobre el crecimiento y la composición corporal del pejerrey bonaerense (*Odontesthes bonariensis*). Memorias de la III Conferencia Latinoamericana sobre el Cultivo de Peces Nativos celebrada del 13 al 15 de Julio en Lavras MG Brasil.
- Govoni J. J. 1980. Morphological, histological and functional aspects of alimentary canal and associated organ development in larvario *Leiostomus xanthurus*. *Rev. Can. Biol* 39: 69-80.
- Guglielmi C. 2009. Caracterización electroforética y cinética de las isoenzimas óseas, hepática e intestinal de fosfatasa alcalina de rata. Laboratorio de Biología Ósea y Metabolismo Mineral Facultad Cs. Médicas UNR Rosario Argentina. Consultado en abril de 2010. URL.: www.biologiaosea.com.ar
- Guija E., M. Soberón y H. Haak-Mares. 2007. Mecanismo de acción de las fosfatasas ácidas de bajo peso molecular. *An Fac Med* 68(4) Lima.
- Hernández R. M. y A. Sastre Gallego. 1999. Tratado de nutrición. Ediciones Díaz de Santos S.A. Madrid España. Pp. 209.
- Iijima N., S. Chosa, K. Uematsu, T. Goto, T. Toshita, y M. Kayama. 1997. Purification and characterization of phospholipase A2 from a piloric caeca of red sea bream, *Pagrus major*. *Fish Physiol. Biochem* 16:487-498.
- Izquierdo M. S., J. Socorro, L. Arantzamendi y C. M. Hernández-Cruz. 2000. Recent advances in lipid nutrition in fish larvae. *Fish Physiology and Biochemistry* 22: 97–107.
- Johnson R. L. 2001. Gastrointestinal physiology. 6ª Edition. Ed. Mosby. St Louis Missouri. United States of America. 206 pp.

- Kubicz A., A. Waheed, R. L. Van. 1985. Isolation and characterization of a homogeneous acid phosphatase from catfish liver. *Comparative Biochemistry and Physiology* 81B, 177–183.
- Koshimizu E., C. A. Strüssmann, N. Okamoto, H. Fukuda, T. Sakamoto. 2010. Construction of a Genetic Map and Development of DNA Markers Linked to the Sex-Determining Locus in the Patagonian Pejerrey (*Odontesthes hatcheri*). *Mar Biotechnol* 12:8–13.
- Kurtovic, I., Marshall S. N., Z. Xin and Simpson B. K. 2009. Lipases from Mammals and Fishes Reviews in Fisheries Science, 17: 1, 18 — 40.
- Kvåle A. 2006. Weaning of Atlantic cod (*Gadus morhua*) and Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) Studying effects of dietary hydrolysed protein and intestinal maturation as a marker for readiness for weaning. Dissertation for the degree of doctor scientiarum at the University of Bergen National Institute of Nutrition and Seafood Research (NIFES, Bergen). Bergen Pp. 82.
- Lauff M. y R. Hofer. 1984. Proteolytic enzymes in fish development and the importance of dietary enzymes. *Aquaculture* 37: 335-346.
- Lemieux H., N. R. Le Franc y P. U. Blier. 2003. The Early Ontogeny of Digestive and Metabolic Enzyme Activities in Two Commercial Strains of Arctic Charr (*Salvelinus alpinus* L.) *Journal of Experimental Zoology* 299a:151–160.
- López H. L. y M. L. García. 2001. Aspectos históricos e importancia regional del pejerrey bonaerense: 15-20. En: Fundamentos biológicos, económicos y sociales para una correcta gestión del recurso pejerrey. F. Grosman (ed.), Editorial Astyanax, Azul, Argentina, 212 pp.
- López H. L., C. R. M. Baigún, J. M. Iwaskiw, R. L. Delfino y O. H. Padín. 2001. La cuenca del Salado: uso y posibilidades de sus recursos pesqueros, Editorial de la Universidad de La Plata, Serie Ambiente y Desarrollo 1. La Plata, Argentina. 75 pp.
- Martín D. W., V. W. Rodwell, P. A. Mayes. 1982. Bioquímica de Harper. 8ª Ed. México: El manual moderno S. A. México. 750 pp.
- Mitra G., P. K. Mukhopadhyay y S. Ayyappan. 2008. Modulation of digestive enzyme activities during ontogeny of *Labeo rohita* larvae fed ascorbic acid enriched zooplankton. *Comparative Biochemistry and Physiology (Part A)* 149; 341–350.
- Munilla-Morán, R. y F. Saborido-Rey, 1996. Digestive enzymes in marine species. II Amylase activities in gut from seabream (*Sparus aurata*), turbot, (*Scophthalmus maximus*) and redfish (*Sebastes mentella*). *Comp. Biochem. Physiol.* 113B (4): 827–834.

- Nicholson J. A., D. M. McCarthy y Y. S. Kim. 1974. The Responses of Rat Intestinal Brush Border And Cytosol Peptide Hydrolase Activities to Variation In Dietary Protein Content: Dietary Regulation of Intestinal Peptide Hydrolases. *The Journal of Clinical Investigation* (54): 890-898.
- Norman A. W., A. K., Mircheff, T. H. Adams y A. Spielvogel. 1970. Studies on the mechanism of action of calciferol 3 Vitamin D-mediated increase of intestinal brush border alkaline phosphatase activity. *Biochim Biophys* 215(2): 348-59.
- Panará F. y R. Pascolini. 1989. Acid phosphatases from liver of *Cyprinus carpio*. *Comparative Biochemistry and Physiology* (92B) 751–754.
- Piedras R. N. y L. O. F. Pouey. 2005. Alimentação do peixe-rei (*Odontesthes bonariensis*, *Atherinopsidae*) nas lagoas Mirim e Mangueira, Rio Grande do Sul, Brasil. *Iheringia Sér. Zool.* 95(2):117-120.
- Pöhls Ramírez Patricia. 2010. Determinación de la Expresión Génica y Actividad enzimática digestiva de la quitinasa en el Pez Blanco del Lago de Pátzcuaro (*Menidia estor* Jordan, 1880). Tesis de Maestría. Fac de Estudios Superiores-Cuautitlán-UNAM. México.
- Romairone A. 2000. Cinética Enzimática: Determinación de Km y Vmax de la fosfatasa alcalina. En URL: <http://www.doschivos.com/display.asp?ID=520&f=13547>. consultada en febrero de 2011.
- Smith G. N., A. M. Elizabeth, A. H. Karen, D. B. Kenneth. 1989. Specificity of inhibition of matrix metalloproteinase activity by doxycycline: Relationship to structure of the enzyme. *Ar & Rh* 42 (6): 1140–1146.
- Strüssmann C. A. y F. Takashima. 1989. Effect of temperature upon Survival and Histological Changes of Starved Pejerrey *Odontesthes bonariensis* Larvae. *Nippon Suisan Gakkaishi*. 55(2): 247-254.
- Strüssmann C. A. y F. Takashima. 1990. Hepatocyte nuclear size and nutritional condition of larval pejerrey, *Odontesthes bonariensis* (Cuvier et Valenciennes). *J. Fish Biol* 36:59-65.
- Strüssmann C. A., B. C. Ng, F. Takashima y T. Oshiro. 1993. Triploidy induction in an atherinid fish, the pejerrey (*Odontesthes bonariensis*). *The Progressive Fish-Culturist* 55: 83-89.
- Strüssmann C. A. y R. Patiño. 1995. Temperature manipulation of sex differentiation in fish. En: Goetz, F. & P. Thomas. (Eds.) *Reproductive* pp. 153-157.
- Toda K., T. Noriyuki, Y. Naohiro y S. Sakae. 1995. Cultivo de Pejerrey en Japón. *Asociación Argentino Japonesa del Pejerrey*. Buenos Aires. Pp. 69.

- Toresani H., H. López y S. E. Gómez. 1994. Lagunas de la Provincia de Buenos Aires. *Ministerio de la Producción de la Provincia de Buenos Aires*, 108pp.
- Tsuzuki M. Y., H. Aikawa, C. A. Strüssmann y F. Takashima. 2000_a. Comparative survival and growth of embryos, larvae, and juveniles of pejerrey *Odontesthes bonariensis* and *O. hatcheri* at different salinities. *Journal of Applied Ichthyology* 16:126-130.
- Tsuzuki M. Y., H. Aikawa, C. A. Strüssmann y F. Takashima. 2000_b. Physiological responses to salinity increases in the freshwater silversides *Odontesthes bonariensis* and *O. hatcheri* (Pisces, Atherinidae). *Brazilian Journal of Oceanography* 48: 81-85.
- Tsuzuki M. Y., M. K. Ogawa, C. A. Strüssmann, M. Maita y F. Takashima. 2001. Physiological responses during stress and subsequent recovery at different salinities in adult pejerrey *Odontesthes bonariensis*. *Aquaculture* 200:349–362.
- Tsuzuki M. Y., C. A. Strüssmann y F. Takashima. 2008. Effect of Salinity on the Oxygen Consumption of Larvae of the Silversides *Odontesthes hatcheri* and *O. bonariensis* (Osteichthyes, Atherinopsidae) *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 3 (51):563-567.
- Tovar D., J. Zambonino, C. Cahu, F. J. Gatesoupe, R. Vázquez-Juárez y R. Lésel. 2002. Effect of live yeast incorporation in compound diet on digestive enzyme activity in sea bass. *Dicentrarchus labrax*/larvae. *Aquaculture* 204:113–123.
- Zambonino-Infante J. L. y C. L. Cahu. 1995. Maturation of the pancreatic and intestinal digestive functions in sea bass (*Dicentrarchus labrax*): effect of weaning with different protein sources. *Fish Physiology and Biochemistry* 6 (14): 431-437.
- Zambonino-Infante J. L. y C. Cahu. 2001. Ontogeny of the gastrointestinal tract of marine fish larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology C* 130, 477-487.

ANEXO 1

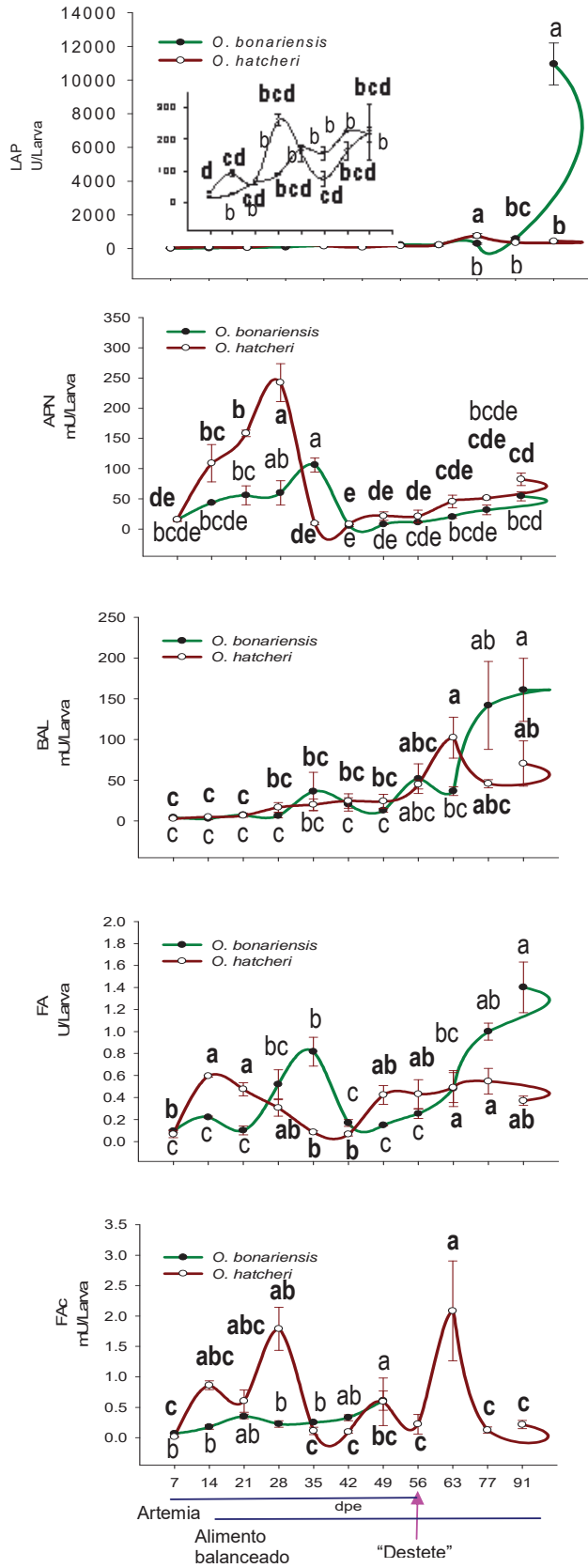


Figura 5. Actividades totales enzimáticas durante el desarrollo larvario y juvenil de *Odontesthes bonariensis* y *O. hatcheri* a lo largo del experimento (media \pm ES, n3: α 0.05). dpe; días de post-eclosión. Distintas literales representan diferencias significativas durante el desarrollo de las especies; correspondiendo las letras oscuras las obtenidas al comparar la actividad a lo largo de la ontogenia de *O. hatcheri*. El recuadro interior en LAP representa la actividad durante el período de 7 a 56 dpe.