



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS
Y FORESTALES**

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAESTRÍA EN
CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**DETERMINACIÓN DEL MODELO DE MADURACIÓN
DIGESTIVA DEL PEZ BLANCO DE PÁTZCUARO,
Chirostoma estor, BAJO UN REGIMEN DE ALIMENTO
VIVO**

TESIS QUE PRESENTA

**BIOL. MIGUEL ÁNGEL HERNÁNDEZ GONZÁLEZ
COMO REQUISITO PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

MAESTRO EN CIENCIAS

DIRECTOR DE TESIS

DRA. EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA BÁSICA

ELVA MAYRA TOLEDO CUEVAS

MORELIA, MICHOACÁN, MÉXICO, AGOSTO DE 2014



DEDICATORIA

Esta tesis se logro concluir con mucho esfuerzo, dedicación y trabajo constante. Ya que no hay secretos para el éxito, éste se alcanza preparándose, y trabajando arduamente y esforzándose por ser mejor cada día.

Primeramente quiero agradecer a la vida por darme la paciencia, sabiduría y optimismo, de salir en victorioso en esta pequeña aproximación al conocimiento científico, llamada tesis.

A mi pequeño Santiago Nahúm, que se ha convertido el amor y la alegría más importante que me ha dado la vida, gracias por ser mi motor y fuente de inspiración.

A mi pareja Isabel Alvarado, que siempre estuvo conmigo en las buenas y en las malas brindándome todo su amor, cariño y sobre todo comprensión y paciencia al tener que aguantar periodos fuera de casa.

A mis padres Salud y Gabriel, por ser un gran ejemplo de vida y estar siempre ahí motivándome y brindándome siempre su amor y apoyo incondicional, siendo parte fundamental para alcanzar este triunfo profesional.

A mis hermanos Yanet y Gabriel, por estar brindándome su cariño, apoyo, y compañía en esta aventura.

A toda mi familia, a mi cuñado Toño, tíos, primas, por brindarme siempre su apoyo, motivación y sabios consejos, especialmente a la familia Pérez González.

A todos mis amigos, tanto del laboratorio, universidad y del pueblo por su confianza, lealtad y compartir momentos de trabajo, diversión y experiencias de vida.

AGRADECIMIENTOS

A mi directora de tesis Dra. Mayra Toledo, por ser una gran investigadora pero aun más por ser una excelente persona, con mucha calidad humana, gracias por toda la paciencia, tiempo, dedicación y buena disposición durante todo este periodo, por sus siempre atinados comentarios, consejos, correcciones, en la elaboración de este trabajo, muchas gracias.

Al Dr. Dariel Tovar, por ser un excelente investigador y sobre todo un excelente ser humano, siempre resolviendo inmediatamente mis dudas, además de todas sus atenciones cuando realice las estancias de investigación en el CIB.

A los Doctores; Gisela Ríos, Carlos Martínez, Jorge Fonseca, por ser parte de mi comité tutorial y siempre realizando buenos comentarios y correcciones a lo largo de este proyecto, especialmente a la Dra. Gisela Ríos, por la ayuda otorgada en el análisis de la parte estadística.

Al Dr. Homero Reyes de la Cruz, por prestar sus instalaciones para la realización de una parte de este trabajo.

A todos mis compañeros del laboratorio; Carlos, Eva, Ale, Nancy, Chucho, Toño, Sibila, Cristian, Lalo, Karol, Lázaro, Memo, Eugenio, por el tiempo y apoyo compartido a lo largo de este tiempo.

A todas las personas en el CIB, con las que conviví durante las dos estancias que realice, por el préstamo de sus instalaciones, aparatos, equipos etc. Los técnicos Paty, Roberto, Ángel, compañeros Ivette, Magnolia, Rodolfo, sobre todo a Paty Hinojosa, y Dr Dariel, por ser unas excelentes personas en todos los sentidos siempre apoyando y dando ánimos a los estudiantes.

A CONACyT, por el apoyo económico con el otorgamiento de la beca para manutención, y beca mixta para la realización de la primera estancia de movilidad nacional.

A la SEP, por el otorgamiento de la beca CNBES (Consejo Nacional de Becas de Educación Superior) para movilidad nacional, para la culminación de los últimos análisis y escritura de la tesis

CONTENIDO

I. RESUMEN GENERAL	1
II. GENERAL SUMMARY	2
III. INTRODUCCIÓN GENERAL	3
IV. ANTECEDENTES	5
IV. 1 Desarrollo del sistema digestivo en larvas de peces	5
IV. 2 Desarrollo de los peces de ontogenia directa	5
IV. 3 Desarrollo de los peces de ontogenia indirecta	5
IV. 1.3.1 Periodo embrionario	6
IV. 1.3.2 Periodo larvario	6
IV. 1.3.3 Periodo juvenil	7
IV. 1.3.4 Periodo adulto	7
IV. 1.5 Enzimas digestivas	7
IV. 1.5.1 Proteasas	8
IV. 1.5.2 Lipasas	9
IV. 1.5.3 Esterasas	10
IV. 1.5.4 Fosfatasas acidas y alcalinas	10
IV. 1.5.5 Carbohidrasas.....	11
IV. 1.6 Desarrollo de la capacidad digestiva en peces	11
IV. 1.7 Proceso e indicadores de maduración digestiva	12
IV.1.8 Estudios de maduración digestiva en peces	14
IV.1.9 Generalidades de la especie	16

	IV. 1.9.1 Cultivo del pez blanco de Pátzcuaro	16
	IV. 1.9.2 Bioquímica y anatomía digestiva de <i>Chirostoma estor</i>	17
V.	HIPÓTESIS	19
VI.	OBJETIVOS	20
	V. 1. Objetivo general	20
	V. 1. Objetivos particulares	20
VII.	RESULTADOS	21
	VII. 1 Resumen	21
	VII. 2 Abstract	22
	VII. 3 Introducción	22
	VII. 4 MATERIALES Y MÉTODOS	24
	VII. 4.1 Obtención de huevos y mantenimiento de larvas	24
	VII. 4.2 Muestreos de los organismos	24
	VII. 4.3 Obtención de extractos y Análisis enzimáticos	25
	VII. 4.4 Cálculo de las actividades enzimáticas	26
	VII. 4.5 Análisis estadístico	27
	VII. 5.1 Crecimiento de los organismos	28
	VII. 5.2 Actividades digestivas citosólicas	29
	VII. 5.3 Actividad enzimática membranal	30
	VII. 5.4 Indicadores de maduración digestiva.....	31
VIII.	DISCUSIÓN	33
IX.	CONCLUSIONES	42
X.	PERSPECTIVAS Y RECOMENDACIONES	43
XI.	BIBLIOGRAFÍA	44

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig 1. Clasificación enzimática de acuerdo a los diferentes sitios de acción: luminal, membranal y citosólica.

Fig 2. Maduración digestiva de los enterocitos, cambios en la actividad digestiva citosólica (Leucin alanin peptidasa) y la de membrana de borde de cepillo (Fosfatasa alcalina), durante el desarrollo de larvas de lubina.

Fig 3. Crecimiento durante el desarrollo larvario y juvenil del pez blanco *Chirostoma estor* (media \pm , error estándar (ES), n= 10, en términos de longitud total (A), Peso húmedo (B); **dpe**, días post eclosión. Las letras representan las diferencias estadísticas a lo largo del desarrollo.

Fig 4. Actividad enzimática citosólica durante el desarrollo larvario y juvenil del pez blanco *Chirostoma estor* (media \pm , error estándar (ES), n= 2, en términos de Actividad total (A, C), y Actividad específica (B, D); **dpe**, días post eclosión. Las letras representan las diferencias estadísticas a lo largo del desarrollo.

Fig 5. Actividad enzimática membranal durante el desarrollo larvario y juvenil del pez blanco *Chirostoma estor* (media \pm , error estándar (ES), n= 2, en términos de Actividad total (A, C), y Actividad específica (B, D); **dpe**, días post eclosión. Las letras representan las diferencias estadísticas a lo largo del desarrollo.

Fig 6. Proporciones de la actividad enzimática digestiva, membranal/citosólica, durante el desarrollo larvario y juvenil del pez blanco *Chirostoma estor* (media \pm , error estándar (ES), n= 2, **dpe**, días post eclosión. Las letras representan las diferencias estadísticas a lo largo del desarrollo.

I. RESUMEN GENERAL

El pez blanco del Lago de Pátzcuaro, *Chirostoma estor*, es una especie de agua dulce perteneciente a la familia *Atherinopsidae* (Dyer y Chernoff, 1996). Es una especie nativa de gran importancia al ser un icono cultural y económico para las comunidades indígenas del lugar y para el comercio de la región. Actualmente el pez blanco se encuentran en peligro de extinción, como consecuencia de factores tales como el gran deterioro de su hábitat y la explotación poco selectiva de la especie (Martínez-Palacios *et al.*, 2002). Es por esto que la acuicultura es una alternativa para preservar y comercializar a la especie. El estudio de la bioquímica digestiva de las especies permite determinar la capacidad digestiva y el momento en el que los organismos alcanzan la madurez digestiva. El conocimiento generado contribuye al diseño de dietas adecuadas y a lograr el “destete” (deshabitación alimenticia o cambio de la alimentación con presas vivas por alimento formulado) en el momento más adecuado y temprano, basado en la adquisición de la madurez digestiva. Los objetivos del presente estudio fueron, por un lado caracterizar la actividad digestiva intestinal, tanto de enzimas de membrana de cepillo de los enterocitos (Aminopeptidasa N y Fosfatasa alcalina, en membranas purificadas), como citosólicas (Leucin alanin peptidasa (LAP) y Fosfatasa ácida (FAc)), desde el estadio larvario hasta el juvenil (1-150 dpe), en organismos alimentados solo con alimento vivo, para evitar posibles daños al proceso de maduración digestiva tanto por dietas inadecuadas o subóptimas, como por haber sido suministradas antes de la madurez digestiva. Así mismo, nos interesó determinar si los peces blancos, a pesar de ser agástricos, seguían el modelo de maduración descrito para especies gástricas. Para esto se determinaron proporciones de las actividades de las enzimas membranales con respecto de las citosólicas como indicadores de maduración. Los resultados obtenidos muestran actividad de todas las enzimas analizadas desde los primeros días. Sin embargo, la actividad más alta fue encontrada con las enzimas citosólicas LAP y FAc, las cuales permanecen altas hasta los 150 dpe, en contraste de lo que sucede en muchas especies de peces, principalmente gástricas. La actividad de las enzimas digestivas membranales fue bastante menor. Solo los indicadores FAlc/FAc y FAlc/LAP coincidieron en la edad donde el incremento significativo fue encontrado, el día 105. No obstante, el incremento fue significativo con respecto del día 75. Este resultado difiere de los indicadores descritos para las especies gástricas en las que el incremento es significativo con el día de muestreo inmediato anterior. Estos hallazgos sugieren que la maduración digestiva del pez blanco no encaja en el modelo de maduración descrito para peces con estómago, pero en caso de ocurrir ésta, sería mucho más tardía que en los peces gástricos. Otra posible interpretación de los resultados es que los indicadores no son suficientes para determinar el momento de la adquisición de la madurez digestiva en esta especie, que no solo es agástrica, sino con intestino corto y sin las estructuras compensatorias y de hábitos zooplanctófagos.

Palabras clave. Pez blanco, Agástrico, maduración digestiva, indicadores.

II. GENERAL SUMMARY

The pez blanco from Lake Patzcuaro, curtain *Chirostoma*, is a freshwater species belonging to the family Atherinopsidae (Dyer and Chernoff, 1996). It is a native species of great importance as a cultural and economic icon to the indigenous communities of place and trade in the region. Currently whitefish populations are endangered as a result of factors such as the severe deterioration of its habitat and unselective exploitation of the species (Martínez-Palacios et al., 2002). That is why aquaculture is an alternative to preserve the species and market. The study of the digestive biochemistry species to determine the digestive capacity of the latter and the time when they reach the digestive ripening organisms. The knowledge generated contributes to the design of appropriate diets and achieve the "weaning" (Food cessation or change of feeding live prey to formula feed) at the right time and later, based on the acquisition of digestive maturity. The objectives of this study were to characterize the one hand the intestinal digestive activity of both enzymes brush membrane of enterocytes (aminopeptidase N and alkaline phosphatase, in purified membranes), cytosolic (leucine alanine peptidase and acid phosphatase) from the larval stage to juvenile (1-150 dpe) in organisms fed live food only to prevent possible damage to the digestive ripening process by inadequate or suboptimal diets, as having been supplied before the digestive maturity. Furthermore, we were interested if the white fish, despite being agástricos, maturation were modeled for gastric species described. To do this proportions of the activities of enzymes with respect membrane cytosolic maturation indicators were determined. The results showed activity of all enzymes studied since the early days. However, the highest activity was found with the LAP and PAC cytosolic enzymes, which remain high until the 150 dpe, in contrast to what happens in many fish species, mainly gastric. The membrane activity of digestive enzymes was significantly lower. Only PALC / PAC and PALC / LAP indicators agreed age where significant increase was found, day 105. However, the increase was significant compared Day 75. This result differs from the indicators described for gastric species the increase is significant that the day immediately preceding sampling. These findings suggest that the maturation of white fish digestive does not fit the pattern described for maturing fish stomach, but if it happened it would be much later than in the gastric fish. Another possible interpretation of the results is that the indicators are not sufficient to determine the time of acquisition of gastrointestinal maturity in this species, which is not only agástrica but with short bowel without compensatory zooplancófagos structures and habits.

Keywords. Pez blanco, Agastric, digestive ripening, indicators.

III. INTRODUCCIÓN GENERAL

La acuicultura es una actividad económica de gran relevancia en el mundo (Balcázar *et al.*, 2006), puesto que la producción de organismos acuícolas constituye una de las principales fuentes de alimento y trabajo en los países que se dedican a ella (Gatesoupe, 1999). En México el cultivo de peces es una práctica que se ha extendido en los últimos años, pero aún se encuentra en plena fase de desarrollo (Lluch-Cota, 1995, Gómez-Gil *et al.*, 2000). El estudio del cultivo de los peces y crustáceos marinos reviste un gran interés económico, sobretodo en un país como el nuestro, en donde la mayor parte de los productos marinos que se consumen provienen de la pesca inmoderada en las áreas costeras.

La producción de larvas de peces de alta calidad y sobre todo la supervivencia, representa uno de los principales problemas en la producción masiva de estos organismos, debido a que en la mayoría de los casos se desconocen las condiciones ambientales óptimas de cultivo, sus hábitos alimenticios, sus requerimientos nutricionales y los cambios ontogénicos digestivos que presentan durante las primeras etapas de su desarrollo (Planas y Cunha, 1999). Todo esto dificulta la formulación y el suministro de un alimento adecuado a la capacidad digestiva de los organismos en cultivo. Otro de los principales problemas es la alta mortalidad (Álvarez-González *et al.*, 2001a), debida a factores como el desarrollo incompleto del tracto digestivo de la larva al eclosionar. Esto se traduce en una inadecuada asimilación de nutrientes de las dietas balanceadas, por lo que su cultivo depende exclusivamente del alimento vivo. Es por esto que las investigaciones se han orientado principalmente a entender el desarrollo larvario de las especies de interés y sus necesidades nutricionales, así como su capacidad digestiva, y en desarrollarlos mejores protocolos de “destete” (deshabitación alimenticia o cambio del alimento vivo por alimento balanceado).

Existe un gran interés en la formulación de microdietas que sustituyan a las presas vivas desde el inicio de la alimentación exógena. Idealmente estas dietas deben de ser de bajo costo, que estimulen su ingestión y digestión y que satisfagan las necesidades nutricionales de cada especie. Para ello es importante conocer el desarrollo de la capacidad digestiva larval durante su ontogenia, ya que de la madurez digestiva condiciona el aprovechamiento del alimento balanceado. Los factores nutricionales son particularmente determinantes durante el periodo larvario de los peces, no solo porque los requerimientos nutricionales de este estadio son específicos, sino porque el proceso de maduración digestiva es sensible a éstos. Dietas inadecuadas pueden detener el proceso de maduración, mientras que dietas con ciertas características nutricionales pueden estimularlo (Zambonino-Infante y Cahu, 2001).

Por todo esto, resulta primordial conocer la morfogénesis del sistema digestivo, relacionándola con su capacidad funcional, para así intentar dilucidar el tipo de alimento que debe ser ofrecido a la larva (Diniz *et al.*, 1997; Izquierdo *et al.*, 2000). Para esto es necesario realizar estudios histológicos, histoquímicos y de actividad enzimática digestiva. Estos

estudios permitirán evaluar la evolución bioquímica de la maquinaria enzimática, sus niveles de actividad, su ubicación y el tipo de enzimas digestivas presentes en el organismo, con lo que no solo se lograra integrar el conocimiento de su fisiología digestiva con sus requerimientos nutricionales, durante cada etapa del desarrollo, sino que determinará la capacidad digestiva de las especies, para generar las bases que permitan formular dietas adecuadas (Alliot *et al.*, 1977; Buddington, 1985; Moyano *et al.*, 1996).

Además, el conocimiento de la evolución de la actividad digestiva es útil también para entender el modelo y el momento en el desarrollo en el que el sistema digestivo alcanza su madurez, lo que permite determinar la edad adecuada para realizar el destete.

El presente trabajo pretende contribuir al entendimiento del modelo de maduración del pez blanco de Pátzcuaro *Chirostoma estor*. Para ello se llevó a cabo el estudio de los patrones de actividad de las principales enzimas digestivas intestinales, citosólicas y membranales, durante el desarrollo ontogénico, larvario a juvenil, hasta los 5 meses de edad en esta especie. La información derivada de esta investigación contribuirá a la formulación de una dieta adecuada para cada estadio de la especie, y permitirá dilucidar el momento idóneo para realizar el destete, con base en la maduración digestiva.

IV. ANTECEDENTES

IV.1 Desarrollo del sistema digestivo en larvas de peces

Existen diferencias notables entre los procesos digestivos de peces que cuentan con un estómago desarrollado y funcional, que es el caso de juveniles y adultos, y los que carecen de él, como es característico de la etapa larvaria y de aquellos peces denominados agastros. De manera general, el sistema digestivo de las larvas es menos complejo que el de juveniles y adultos, desde el punto de vista morfológico, histológico y fisiológico (Lauff y Hofer, 1984). Con la finalidad de permitir un mejor entendimiento a la fisiología de las distintas larvas de peces, Dabrowski (1984) implementó un sistema de clasificación basado en el grado de desarrollo del sistema digestivo, en el momento en el cual el saco vitelino se ha absorbido completamente y se inicia la alimentación exógena. Este sistema permite separar dos grandes grupos (Balon, 1984): Peces de ontogenia directa y peces de ontogenia indirecta.

IV.2 Desarrollo de los peces de ontogenia directa

Son aquellos peces que producen huevos demersales con grandes cantidades de vitelo, y que presentan un desarrollo embrionario relativamente largo. Al comienzo de su alimentación exógena poseen tractos digestivos relativamente completos y funcionales, incluyendo el estómago, por lo que estas especies pueden iniciar la alimentación directamente con alimento balanceado. Este tipo de desarrollo es típico de los salmónidos y de muchas especies de agua dulce, como los cíclidos (Kendall *et al.*, 1984).

IV.3 Desarrollo de los peces de ontogenia indirecta

Es el que se presenta en peces que producen huevos pelágicos de pequeño tamaño, los cuales contienen una cantidad limitada de material vitelino. En este caso, el desarrollo embrionario es rápido y la alimentación exógena se inicia cuando aún hay una capacidad digestiva mínima. El estómago aparece después de iniciar la alimentación exógena, existiendo algunas especies en las que se presenta un desfase entre su aparición y su funcionalidad (Lauff y Hoffer, 1984). Dependen del alimento vivo como su primera alimentación exógena, porque no pueden digerir dietas balanceadas sino hasta alcanzar la madurez funcional del estómago (Pedersen y Falk-Petersen, 1992). La gran mayoría de las larvas de especies de peces marinos se ubican dentro de esta categoría, como las familias *Serranidae*, *Lutjanidae*, *Sparidae*, entre muchas otras. Este tipo de desarrollo se caracteriza por presentar varios periodos, que se describen a continuación:

IV.3.1 Período embrionario

Inicia una vez que el ovocito ha sido fecundado y termina cuando la larva ha absorbido completamente el vitelo y el glóbulo de aceite. Este periodo se divide en tres fases: a) fase de segmentación, que inicia cuando se fecunda el óvulo y termina antes del cierre del blastoporo; b) fase de embrión, inicia con el cierre del blastoporo y termina con la eclosión del huevo y c) fase de eleuteroembrión (embrión libre), que inicia con la eclosión del huevo y termina cuando se da la completa absorción del vitelo y del glóbulo de aceite (Balon, 1984, Citado en Álvarez-González, 2003). El vitelo es una reserva de origen materno que es rico en glucógeno y aminoácidos libres, constituyendo la principal fuente de nutrientes en esta etapa (Ronnestad *et al.*, 1994; Balon, 1984). El glóbulo de aceite contiene triglicéridos, es utilizado como fuente de energía y ácidos grasos esenciales (Parra *et al.*, 1999).

IV.3.2 Período larvario

Esta etapa comienza a partir de la absorción del saco vitelino. En esta fase la larva está casi completamente formada, aunque todavía no presenta todas las características morfológicas de un juvenil. Al momento de la eclosión, el sistema digestivo de los embriones está compuesto por un tubo recto, histológicamente indiferenciado y cerrado en la boca y el ano (Engen, 1968; Vu, 1976). Cuando finaliza la absorción del vitelo (y el glóbulo de aceite), el tubo se segmenta, por válvulas musculares, en bucofaringe e intestino anterior, medio y posterior (Govoni, 1980). Aunque los tres segmentos del intestino se pueden distinguir histológicamente, todos poseen un epitelio sencillo. Sin embargo, el epitelio del intestino anterior posee enterocitos intercalados con células secretoras de moco. El epitelio del intestino medio se caracteriza por enterocitos con microvellosidades apicales y la presencia de vacuolas supranucleares, procedentes de procesos de pinocitosis de proteínas. Los enterocitos del intestino posterior se caracterizan por ser ricos en mitocondrias, ya que intervienen principalmente en procesos de recuperación de agua e iones (Govoni *et al.*, 1986).

Otros de los cambios importantes tras la absorción del vitelo son: el desarrollo y la funcionalidad de las estructuras de la cavidad bucofaríngea, la aparición de los dientes mandibulares, faríngeos, etc; la ornamentación de las espínulas branquiales en los peces planctófagos), y la formación y funcionalidad del hígado y páncreas (Govoni, 1980). No obstante, solo al final del periodo larvario se da el desarrollo del estómago y de los ciegos pilóricos (Stroband y Dabrowski, 1981; Govoni *et al.*, 1986), aunque esto puede tomar desde 15 hasta 60 días tras la eclosión, dependiendo de la especie (Cousin *et al.*, 1987). En aquellos organismos que permanecen sin estómago a lo largo de su vida, el intestino anterior y medio pueden expandirse y funcionar para almacenar alimento (Govoni 1980; Watanabe y Sawada, 1985). Todos estos cambios morfológicos, anatómicos, fisiológicos e histológicos del tracto digestivo están regulados por factores genéticos, ambientales y hormonales (Ronnestad *et al.*, 2001).

IV.3.3 Período Juvenil

En este período se presentan una serie de eventos que concluyen con todos los cambios morfofisiológicos que tendrá el organismo. Este se divide en; a) fase prejuvenil, que se inicia a partir de la formación completa de las aletas y hasta antes de que las escamas cubran completamente el cuerpo, y b) fase juvenil, que inicia una vez que el cuerpo está cubierto de escamas y hasta antes de la formación de gónadas (Hubbs, 1958). La mayoría de las larvas se transforman en juveniles entre los primeros 20 a 60 dpe, aunque algunas especies precoces pueden considerarse juveniles unos pocos días después de la eclosión. Se consideran juveniles cuando los elementos como huesos y radios de las aletas están completamente formados, se presenta el patrón de escamación, el sistema digestivo está completamente desarrollado y el organismo es capaz de alimentarse de forma óptima.

IV.3.4 Período adulto

Inicia al detectarse la aparición de las gónadas así como de los caracteres primarios y secundarios para la reproducción. Este período puede iniciar a los pocos meses de edad o hasta varios años después, y depende de la especie. En este periodo la tasa de crecimiento disminuye considerablemente debido a que gran parte de la energía que se utilizaba para el crecimiento se utiliza ahora para la formación de gónadas y de gametos (Kendall *et al.*, 1984).

En aquellos organismos que permanecen sin estómago toda su vida, como los ciprínidos, es común un incremento en la longitud del intestino. Como no hay producción de pepsina, el proceso digestivo es llevado a cabo en el intestino y toda la actividad proteolítica está basada en enzimas que actúan a un pH alcalino (Lauff y Hofer, 1984). En estos peces se han reportado altas actividades tipo tripsina y quimotripsina, además de una alta actividad citosólica intestinal, compensando la ausencia de estómago.

IV.4 Enzimas digestivas

Las enzimas digestivas llevan a cabo la degradación de los nutrientes del alimento para que sean asimilables para el organismo. Estas enzimas son producidas en diversos órganos como el estómago, páncreas, ciegos pilóricos y enterocitos, principales células del intestino. Sin embargo, las enzimas digestivas también pueden provenir del alimento vivo o de las bacterias que conforman la flora intestinal. El equipamiento de las enzimas digestivas no es igual en todas las especies de peces y el órgano de secreción de ciertas enzimas varía de una especie a otra.

Las enzimas digestivas pueden agruparse dependiendo de su sitio de acción, Fig 1: A) Las enzimas luminales son aquellas que son secretadas a la luz del tracto digestivo. Éstas son las secretadas por el estómago (pepsina) y el páncreas, que secreta enzimas que actúan en el intestino, como la tripsina y la quimotripsina; B). Las enzimas digestivas membranales, que actúan intercaladas en las membranas de las microvellosidades de los enterocitos, tales como

la aminopeptidasa N y la fosfatasa alcalina. Estas enzimas son de origen intestinal y tienen su marco de actuación cerca de los sistemas de transporte, lo que asegura la absorción de los nutrientes por parte del enterocito (Watanabe y Sawada, 1985), y C) enzimas digestivas intracelulares, localizadas en los lisosomas del enterocito, que compensan la baja digestión extracelular exhibida durante la etapa larvaria (Watanabe, 1985 y Sawada; Cahu *et al.*, 1995; Zambonino-Infante y Cahu, 2001).

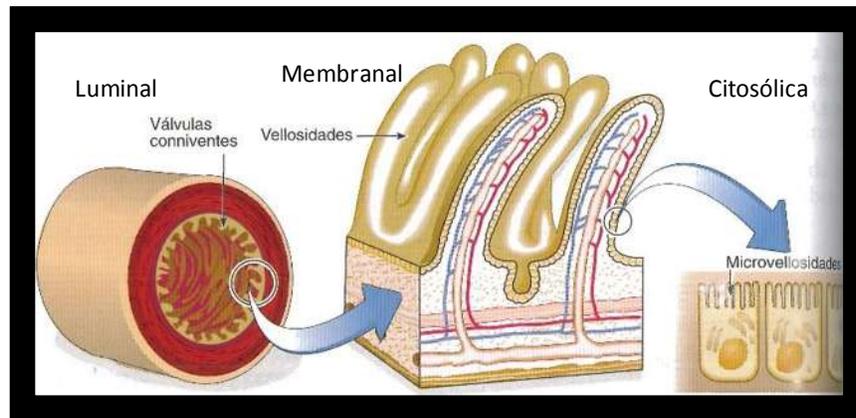


Fig 1. Clasificación enzimática de acuerdo a los diferentes sitios de acción, luminal, membranal y citosólica.

De acuerdo a su función fisiológica, entre las enzimas digestivas encontramos proteasas, lipasas, esterasas y carbohidrasas entre otras.

IV.4.1 Proteasas

Las proteasas son las enzimas digestivas más importantes, ya que permiten el aprovechamiento de la proteína dietaria para su uso como fuente de energía (la principal fuente para los peces) y para el crecimiento, como los principales constituyentes del músculo. Las proteasas son las responsables de llevar a cabo la primera parte de la hidrólisis de los enlaces peptídicos que forman la estructura primaria de las proteínas (Dixon y Webb, 1979; Essed *et al.*, 2002). Las proteasas más importantes son: la pepsina, la principal enzima gástrica (proteasa ácida), y cuatro enzimas pancreáticas (proteasas alcalinas): tripsina, quimotripsina, colagenasas y elastasas.

Las proteasas también se clasifican con base al sitio de rompimiento del enlace peptídico. Las exopeptidasas son aquellas que realizan el corte en los extremos de la cadena polipeptídica, por lo que sus productos son aminoácidos. Las endopeptidasas cortan el enlace dentro de la cadena, por lo que los productos de su actividad son polipéptidos (Alarcón, 1997). Dentro de este último grupo se encuentran la Pepsina, Tripsina y la Quimotripsina.

Dentro de las exopeptidasas tenemos a las Carboxipeptidasas, que cortan en el extremo carboxil de la cadena polipeptídica. También se encuentran las aminopeptidasas y las tri y di peptidasas, que remueven el primer aminoácido, es decir el amino terminal. Están involucradas en diversas funciones como en la maduración del sistema digestivo, degradación terminal de proteínas, regulación hormonal y control del ciclo celular. Entre éstas, la leucina aminopeptidasa N (APN) se encuentra en la membrana de borde de cepillo de los enterocitos, en donde lleva a cabo su acción (Gal-Gaber y Uni, 2000). Esta enzima juega un papel central en la digestión de los péptidos obtenidos tras la digestión llevada a cabo por la pepsina y la tripsina. Un aumento en la actividad de la leucina aminopeptidasa es indicador de la maduración de los enterocitos y del proceso digestivo. Su actividad está también relacionada con el estado nutricional de los organismos, en etapas iniciales.

La leucina-alanina peptidasa (Leu-Ala o LAP) es una enzima lisosomal (Nicholson *et al.* 1974) que juega un papel importante en la digestión de proteínas ingresadas por pinocitosis, por lo que su actividad es utilizada como indicadora de este fenómeno. Su actividad es mucho más alta durante las 3 primeras semanas de la vida larvaria y decrece progresivamente hacia el estadio juvenil (Guillaume *et al.*, 1999; Kvåle *et al.*, 2006). Sin embargo, 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-Infante y Cahu, 2001). La actividad de LAP también se ha reportado relacionada con un papel de defensa e inmunidad en el intestino (Kvåle *et al.*, 2007). LAP actúa sobre proteínas endocitadas o sobre di y tripéptidos, que son interiorizados a los enterocitos por transportadores presentes en la membrana.

IV.4.2 Lipasas

Los lípidos son el segundo grupo de nutrientes esenciales más importantes para la alimentación de peces, ya que son una fuente importante de energía y de ácidos grasos esenciales. Las lipasas son las enzimas que llevan a cabo la hidrólisis extracelular de lípidos (Higgs *et al.*, 2000). En el caso de los triglicéridos (TGA), los lípidos más abundantes en los alimentos, las lipasas actúan liberando ácidos grasos, los cuales son absorbidos por las células de la pared del intestino anterior, para posteriormente ser resintetizados a triglicéridos intracelularmente, antes de su subsiguiente transporte al hígado. Los lípidos requieren de ser emulsificados por las sales biliares para facilitar su digestión, puesto que esto aumenta la superficie disponible (interfase agua-lípido) para la acción de las enzimas. Las lipasas descritas en peces son: la lipasa neutra o no-específica, activada por sales biliares y lipasa pancreática, activada por co-lipasa y sales biliares (Izquierdo *et al.* 2000).

La lipasa pancreática actúa específicamente sobre los enlaces éster exteriores (α 1 y 3) de los triglicéridos, dando como resultado dos moléculas de ácido graso y una molécula de 2-monoglicérido. Esta lipasa se activa en presencia de colipasa y al parecer es la más importante

en la etapa larvaria de los peces, aunque es la más importante para la mayoría de los vertebrados (Izquierdo *et al.*, 2000).

La lipasa activada por sales biliares, también conocida como BAL (Bile Activated Lipase), es una lipasa inespecífica que lleva acabo la hidrólisis de ésteres solubles e insolubles, requiriendo de sales biliares para estos últimos, aunque su actividad no depende de la colipasa. BAL participa en la hidrólisis de TGA, sin ser inhibida por la presencia de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA; Polyunsaturated Fatty Acids), como sí sucede para la Lipasa pancreática (Izquierdo *et al.*, 2000). BAL también hidroliza a otros lípidos, tales como ésteres de colesterol y vitaminas. Las investigaciones sugieren que esta lipasa es la más importante para peces, por su capacidad para digerir los distintos lípidos presentes en los ambientes acuáticos (Izquierdo *et al.*, 2000). Pero también porque muchos de estos lípidos contienen ácidos grasos de cadena larga (14-22 átomos de carbono) y con un alto grado de insaturación, PUFAS y HUFAs (Highly Unsaturated Fatty Acids), los que no son buenos sustratos para la Lipasa Pancreática. En contraste, los lípidos que consumen los mamíferos terrestres raramente contienen ácidos grasos con más de dos dobles enlaces (Zambonino-Infante *et al.*, 2001).

IV.4.3 Esterasas

Éstas son enzimas sin especificidad que hidrolizan enlaces éster, tanto de lípidos como de otras moléculas.

Las lipasas se diferencian de las esterasas porque muestran especificidad por sustratos insolubles en agua (típicamente triglicéridos de cadenas largas), mientras que las esterasas tienen preferencia por sustratos solubles en agua, hidrolizando esterres simples, como acetato de etilo y triglicéridos con ácidos grasos de cadenas menores a 6 carbonos (Bornscheuer, 2002). Otra diferencia entre lipasas y esterasas radica en su intervalo óptimo de actividad a distintos pH. Las lipasas muestran su máxima actividad a pHs alrededor de 8, mientras que las esterasas tienen su patrón de máxima actividad a pH 6 (Fojan *et al.*, 2000).

IV.4.4 Fosfatasas ácidas y alcalinas

Las fosfatasas ácidas y alcalinas están involucradas en catalizar la hidrólisis de fosfomonoésteres, liberando fosfato inorgánico y un alcohol, cuya naturaleza depende del sustrato utilizado (Guija *et al.* 2007). Se encuentran en los tejidos intestinales y en el estómago, participando en funciones digestivas y absorptivas, aunque también se les ha relacionado con procesos de mineralización y formación ósea (Harris, 1989)

La fosfatasa alcalina (FAlc) intestinal se encuentra ligada a la membrana apical o borde de cepillo (BBM) de los enterocitos. Su papel fisiológico es parcialmente conocido, aunque su localización sugiere su participación en el movimiento de moléculas a través de la membrana y en la absorción de ciertos nutrientes, como el calcio, lípidos (Guglielmi, 2009) y amino ácidos. Esta enzima es utilizada como indicadora de la diferenciación de los enterocitos

(Norman *et al.*, 1970) y del comienzo de la función absorptiva del epitelio intestinal (Cousin *et al.*, 1987; Zambonino Infante y Cahu., 1994; Baglolle *et al.*, 1998).

Las fosfatasa ácidas (FAC) son las enzimas más comúnmente presentes en los lisosomas. 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. En el intestino se les ha asociado a cuerpos de inclusión y absorción pinocítica (Watanabe y Sawada, 1985), además de tener un importante papel en el proceso digestivo.

IV.4.5 Carbohidrasas

Son enzimas que llevan a cabo la hidrólisis de los carbohidratos (Divakaran *et al.*, 1999), produciendo oligosacáridos y monosacáridos.

La carbohidrasa principal es la amilasa, que hidroliza los enlaces α 1-4 del glucógeno. En peces se han detectado otras glucosidasas, como la celulasa, aunque parece provenir de las bacterias que colonizan el tracto digestivo. Además, en peces consumidores de algas, se ha podido constatar la presencia de laminarasa, una enzima que degrada a la laminarina un polisacárido estructural de las algas. En el tracto digestivo de algunos peces, sobre todo en peces que se alimentan con artrópodos, se ha detectado actividad de quitinasa (Furné *et al.*, 2005).

IV.5 Desarrollo de la capacidad digestiva en peces

Como ya se ha mencionado, el sistema digestivo de los peces presenta una gran cantidad de cambios fisiológicos, anatómicos y morfológicos durante su primer mes de vida, difiriendo los tiempos en los que dichos cambios se presentan en las distintas especies (Cahu, 1996). El conocerlos es de suma importancia para comprender que factores son los determinantes para el desarrollo, crecimiento y supervivencia de las larvas, en este período crítico.

El proceso de desarrollo de la capacidad digestiva en peces se lleva a cabo en tres etapas (Govoni *et al.*, 1986).

- a) **La Primera etapa**, corresponde a la nutrición endógena (absorción del saco vitelino), cuando la actividad enzimática digestiva es aún incipiente por poseer un tracto simple e indiferenciado, y un hígado y páncreas que se forman hacia el final del período, en algunas especies.
- b) **La Segunda etapa**, inicia con la alimentación exógena. En este momento casi todas las enzimas digestivas son detectadas, aunque en bajos niveles debidos a que

el tracto digestivo aún no está totalmente diferenciado ni funcional (Baragi y Lovel 1986, Zambonino y Cahu, 1994). Con excepción de algunas especies de ontogenia directa, la mayoría de las larvas aún no desarrollan el estómago. La consiguiente baja capacidad digestiva es compensada por la pinocitosis de macromoléculas (proteínas) en el intestino, como mecanismo principal para la adquisición de nutrientes. Las proteínas adquiridas por esta vía son subsecuentemente hidrolizadas intracelularmente por la enzima leucin alanin peptidasa (LAP), enzima citosólica cuya actividad es mucho más alta durante las primeras semanas de vida de la larva y que decrece progresivamente hacia el estado juvenil (Guillaume *et al.*, 1999). Durante este periodo se presentan una serie de cambios en las actividades digestivas, tanto en el tipo de enzimas producidas como en el nivel de actividad de las mismas, debido a los numerosos procesos que el tracto digestivo experimenta durante la maduración; el aumento en la longitud del intestino, la diferenciación de las regiones del intestino y la formación de vellosidades y microvellosidades en la mucosa intestinal. La secuencia del desarrollo del sistema digestivo está genéticamente programada en los peces (Zambonino y Cahu *et al.*, 2007).

- c) **La tercera etapa**, es considerada como el final del periodo larvario, con la transformación a juvenil para la mayoría de las especies (Govoni *et al.*, 1986). El tracto digestivo se encuentra ya totalmente diferenciado y funcional, con enterocitos que ya han establecido su membrana de borde de cepillo y que por tanto presentan grandes cantidades y actividades de las enzimas digestivas que se encuentran ubicadas y funcionales en ésta, facilitando la digestión (Zambonino-Infante y Cahu 2001). Los niveles de actividad enzimática digestiva son similares a los de organismos adultos (Buddington, 1985). La aparición de las glándulas gástricas y de los ciegos pilóricos constituyen los últimos principales cambios morfológicos y funcionales del canal alimentario.

IV.6 Proceso e Indicadores de maduración digestiva en peces

La maduración digestiva la podemos definir como el conjunto de cambios, tanto en la anatomía, y morfología, como en el funcionamiento del sistema digestivo necesarios para alcanzar los niveles óptimos de digestión adulta, decisiva para poder aprovechar los nutrientes de las dietas balanceadas (Díaz *et al.*, 1997). Dichos cambios pueden ser influenciados por factores genéticos, ambientales y nutricionales (Cousin *et al.*, 1987; Cahu y Zambonino Infante, 2001).

Los indicadores enzimáticos de maduración digestiva se describen a continuación:

1. El inicio de la secreción pancreática es un evento clave en el proceso de maduración digestiva. La secreción inicia cuando el páncreas está totalmente desarrollado y funcional para el envío de sus enzimas digestivas al intestino, donde llevarán a cabo su acción (Moyano *et al.*, 1996; Zambonino Infante y Cahu, 2001).
2. La disminución en la actividad de la amilasa. La actividad de esta enzima es alta durante el estadio larval temprano de diversas especies pero su actividad disminuye a lo largo de la ontogenia, principalmente al alcanzar la madurez morfofuncional digestiva (Zambonino-Infante *et al.* 2001).
3. La disminución en la relación lipasa/proteasa a lo largo de la ontogenia. Esta ha sido considerada como un indicador de madurez que refleja los cambios en el metabolismo durante el desarrollo de los peces. Las larvas inicialmente utilizan lípidos como fuente principal de energía (con lipasas que hidrolizan los lípidos existentes en el saco vitelino), para progresivamente adaptarse a una dieta con un mayor contenido de proteína (Cara *et al.* 2002).
4. El incremento en las actividades de las enzimas digestivas membranales (Aminopeptidasa N, Fosfatasa Alcalina y Maltasa), coincidente con la disminución en la actividad de las enzimas citosólicas digestivas (como la leucin alanin peptidasa). Dichos patrones opuestos de actividad caracterizan la maduración normal de los enterocitos en los animales superiores (Henning, 1987) y en los peces (Cahu y Zambonino Infante, 1994; 2001). Estos cambios señalan la mayor importancia relativa de la digestión membranal, producto de la maduración de los enterocitos (digestión adulta), respecto de la digestión intracelular mediada por pinocitosis, característica de la digestión larvaria (Zambonino Infante *et al.*, 2001). Dichos patrones son indicativos de la maduración digestiva de peces marinos (Ribeiro *et al.*, 1999; Zambonino Infante y Cahu, 2001; Ma *et al.*, 2005; Hakim *et al.*, 2007) (Figura 2).

Las enzimas citosólicas, como la leucin-alanin peptidasa (LAP), exhiben una muy alta actividad desde estadios tempranos pero durante el desarrollo sufren una abrupta disminución de su actividad, que coincide con un incremento importante (alrededor de la tercera semana de vida de varias especies) de las enzimas de las de membrana de borde de cepillo (BBM) de los enterocitos, en particular la fosfatasa alcalina (Cousin *et al.*, 1987; Zambonino Infante y Cahu, 1994; Baglolle *et al.*, 1998) y la aminopeptidasa N (Ribeiro *et al.*, 1999).

5. El inicio del funcionamiento del estómago, con la consecuente secreción y actividad de la pepsina. Este es uno de los últimos y más importantes eventos en el proceso de

maduración digestiva (Alliot *et al.*, 1977; Lauff y Hauffer, 1984; Buddington, 1985; Dabrowski y Culver, 1991; Cahu y Zambonino-Infante, 1995). El funcionamiento del estómago se produce, en la mayoría de los peces marinos, en el primer mes de post-eclosión (mpe), cuando se completa la formación de las glándulas gástricas que secretan ácido clorhídrico y pepsinógeno (Zambonino-Infante y Cahu, 1994; Moyano *et al.*, 1996). Una vez que se inicia la actividad de la pepsina se produce la disminución de las actividades proteolíticas alcalinas (Zambonino-Infante y Cahu, 1994; Moyano *et al.*, 1996), ya que la digestión ácida (la desnaturalización de las proteínas por el ácido clorhídrico y la acción de pepsina) facilita la posterior hidrólisis completa de las proteínas por las enzimas pancreáticas e intestinales (Moyano *et al.*, 1996).

En los peces agástricos, se ha observado que la ausencia de digestión ácida se compensa por una elevada actividad proteolítica de enzimas pancreáticas e intestinales, como también ocurre en las primeras etapas de vida de los peces de ontogenia indirecta, antes del desarrollo del estómago (Walford y Lam, 1993; Moyano *et al.*, 1996). La compensación también se produce por elevados niveles de enzimas intestinales citosólicas (Lauff y Hofer, 1984), que se mantiene incluso hasta estadios juveniles y adultos.

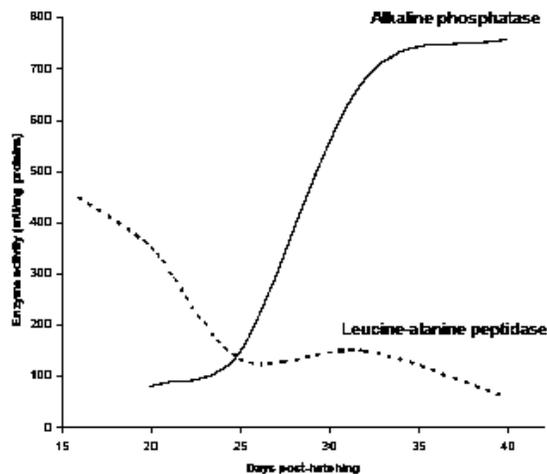


Fig 2. Maduración digestiva de los enterocitos, ilustrados por los cambios en la actividad digestiva citosólica (Leucina alanina peptidasa) y la de la membrana de borde de cepillo (Fosfatasa alcalina), durante el desarrollo de larvas de lubina (Zambonino-Infante y Cahu, 2001).

IV.7 Estudios de maduración digestiva en peces

A pesar de los recientes avances en la producción de dietas formuladas para larvas de peces, la alimentación de la mayoría de las especies de interés para la acuicultura aún se basa en alimento vivo durante las etapas tempranas de la vida (Kolkovski 2006; Rosenlund y Halldorsson 2007). Esto tanto por la muy buena composición nutricional del alimento vivo

como porque estimula el comportamiento predatorio de los organismos. El alimento vivo contiene la mayoría de los elementos nutritivos que garantizan la supervivencia y el óptimo desarrollo de las larvas; un muy buen contenido de: ácidos grasos esenciales (Coutteau *et al.*, 1997), de proteína de excelente calidad (Sipauba-Tavares *et al.*, 2003), de vitaminas y minerales (Kubitza *et al.*, 1998) y de enzimas digestivas, que pueden contribuir a la digestión larvaria (Kolkovski 2001; Portella *et al.*, 2002). No obstante, el contenido nutricional del alimento vivo no es constante y su producción es muy costosa, además de requerir infraestructura y personal especializados.

Por esto es que lograr el “destete” (cambio de alimento vivo a formulado) lo más temprano posible es relevante para el éxito y sustentabilidad de cualquier cultivo comercial. No obstante, el destete debe ser realizado solo cuando los organismos hayan alcanzado la madurez digestiva. La búsqueda de indicadores de maduración digestiva permite determinar el momento preciso en el que el destete puede realizarse, dado que es el momento en que la capacidad digestiva de las especies es óptima para aprovechar dietas balanceadas. Estos estudios son esenciales para evitar daños en el proceso de maduración digestiva, cuyo impacto en la supervivencia y el crecimiento es directo (Zambonino Infante y Cahu, 2001; Peña-Martínez, 2005).

Los estudios de búsqueda de indicadores de maduración digestiva han permitido determinar que ésta se presenta entre la tercera y cuarta semana de vida de diversas especies de peces, siguiendo el proceso y modelo de maduración digestiva ya descrito (Zambonino Infante y Cahu, 2001). Algunos ejemplos se encuentran en la perca *Perca fluviatilis* (Cuvier-Péres *et al.*, 2001), la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* (Álvarez-González *et al.*, 2008), lubina *Dicentrarchus labrax* (Zambonino-Infante y Cahu 1994), la dorada *Spaurus aurata* (Moyano *et al.*, 1996), lenguado *Solea senegalensis* (Ribeiro *et al.*, 2002), la Tenguayaca *Petenia splendida* (Uscaganda-Martínez *et al.*, 2011), larvas de rodaballo *Scophthalmus maximus* (Tong *et al.*, 2013).

La purificación de las membranas del borde de cepillo de los enterocitos (BBM) permite el incremento en la especificidad de detección de las actividades digestivas membranales, así como de su actividad, y por tanto incrementa la precisión para determinar el momento de la adquisición de la madurez digestiva (Cahu y Zambonino-Infante, 1994). La purificación se realiza en el segmento intestinal del cuerpo de los organismos, separándolo del segmento pancreático (Crane *et al.*, 1979).

Estudios de búsqueda de indicadores, purificando membranas, se han realizado en el sargo dorado, *Diplodus puntazzo*, (Suzer *et al.*, (2007), en el esturión *Acipenser persicus* (Babaei *et al.*, 2011), en el rodaballo *Scophthalmus maximus* (Tong *et al.*, 2013), en el bagre *Ompok bimaculatus* (Pradhan *et al.*, 2013), entre otros.

IV.8 Generalidades del pez blanco de Pátzcuaro

El pez blanco del Lago de Pátzcuaro, *Chirostoma estor*, es una especie de agua dulce perteneciente a la familia *Atherinopsidae* (Dyer y Chernoff, 1996), en la cual se encuentran representados entre 150 y 160 especies, en su mayoría de ambientes marinos y estuarinos. Todos los miembros del género *Chirostoma* son endémicos del altiplano mexicano, especies totalmente de agua dulce, pero con grandes similitudes con algunos atherinópsidos marinos ya que poseen ancestros comunes (Barbour, 1973). *Chirostoma estor* posee una gran importancia económica, social, cultural y ecológica, por ser una especie nativa y únicamente localizada en dos ambientes lacustres del estado de Michoacán; los Lagos de Pátzcuaro y Zirahúen. Los peces blancos están íntimamente ligados a la cultura indígena, la cual ha dependido de su pesca por generaciones, siendo una importante fuente de ingresos para quienes dependen en forma casi exclusiva de su pesquería. *C. estores* una especie muy preciada en el mercado local, llegando a alcanzar precios de hasta 60 dólares por kilo, en temporada alta. No obstante, las poblaciones del pez blanco se encuentran en peligro de extinción, como consecuencia de diversos factores, tales como el gran deterioro de su entorno (principalmente del Lago de Pátzcuaro), su muy limitado hábitat, el incumplimiento de los programas de veda, la gran demanda que tiene en el mercado local y regional (gracias a su excelente aspecto y sabor) y la explotación poco selectiva de la especie, por la captura de peces de todas las tallas, afectando todos los estadios del ciclo biológico.

IV.8.1 Cultivo del Pez Blanco de Pátzcuaro

El cultivo de estos organismos, a través de la acuicultura, es una alternativa viable para evitar la pérdida total de su genoma y para dar alternativas de subsistencia a las comunidades indígenas que dependen de su explotación. El cultivo de cualquier especie necesariamente requiere de su estudio, en diversas áreas. Aunque desde la década de los años 50 se realizaron algunas iniciativas para el cultivo del pez blanco y algunos estudios sobre su biología y desarrollo embrionario (Solórzano, 1963; Oseguera, 1990; Morelos-López *et al.*, 1994), no es sino hasta principios de este siglo que diversas investigaciones han permitido el cultivo de la especie (www.aquaculture.stir.ac.uk/GISAP/native-species), con la consecuente instalación y operatividad de la primera planta piloto de cultivo de esta especie.

Sin embargo, entre los problemas más grandes a resolver se encuentran el que no se cuenta aún con una dieta óptima para todos los estadios de vida de la especie, así como el prolongado periodo para lograr el destete, aproximadamente hasta los 5 meses post-eclosión. El conocimiento de la bioquímica digestiva de estos organismos puede contribuir al desarrollo de dietas *ad hoc*, mientras que el estudio del desarrollo de la capacidad digestiva durante la ontogenia permitiría determinar la madurez del tracto digestivo (Walford y Lam, 1993; Moyano *et al.*, 1996), con lo que se podría disminuir el periodo de alimentación con presas vivas.

IV.8.2 Bioquímica y anatomía digestiva de *Chirostoma estor*

Por varios años los peces blancos fueron considerados como organismos de hábitos ictiófagos, con base en estudios del contenido intestinal. No obstante, estudios sobre la anatomía de su cavidad orobranquial (dientes mandibulares, faríngeos y ornamentación de branquiespinas) permitió definir a la especie como un pez zooplanctófago y ocasionalmente ictiófago (Ross *et al.*, 2006).

Es un pez agástrico, con un intestino muy corto (0.9 la longitud del tubo digestivo con respecto de la longitud estándar corporal) y alcalino (pH entre 6.5 y 8) (Ross *et al.*, 2006), típico de un pez zooplanctófago y filtrador continuo (Martínez-Palacios *et al.*, 2006). No presenta válvula pilórica ni ciegos pilóricos ni ninguna estructura compensatoria, tales como dientes faríngeos, intestino grueso, estómago de molleja, etc (Ross *et al.*, 2006). Estas características anatómico-digestivas están relacionadas y parecen ser suficientes para el tipo de alimentación de la especie, pero seguramente le imponen serias limitaciones para su alimentación con dietas balanceadas.

Respecto de la caracterización de la bioquímica digestiva de la especie, los primeros estudios reportan una alta actividad proteolítica alcalina (tipo tripsina) desde estadios tempranos (Ríos-Duran, 2000). Posteriores estudios, durante la ontogenia larvaria de la especie, reportan alta y temprana actividad proteolítica de tipo Tripsina y Quimotripsina, confirmando que estas especies poseen un equipo enzimático capaz de digerir proteínas a temprana edad (Ríos-Durán, 2000; Martínez-Palacios *et al.*, 2008; Toledo-Cuevas *et al.*, 2011). También se ha detectado alta actividad lipolítica en adultos de pez blanco, en la parte anterior y media del tracto digestivo, con un pH óptimo de actividad de 9. Un estudio más detallado de la caracterización de las principales enzimas digestivas durante el desarrollo larvario del pez blanco evidenció que los organismos presentan una alta actividad proteolítica y lipolítica desde la apertura de la boca; siendo las enzimas digestivas de mayor relevancia la tripsina y la lipasa pancreática (Hernández-González, 2011). Estos hallazgos reflejan la capacidad de las larvas para digerir lípidos y proteínas existentes en el saco vitelino, los cuales son cruciales para la supervivencia y el crecimiento (Tocher *et al.*, 2003). La actividad de las enzimas digestivas varía en función de la condición nutricional, que identifican a la ingesta de alimento como el principal mecanismo regulador de la actividad enzimática. En este estudio se observó que la restricción de alimento influye sustancialmente en el crecimiento y supervivencia de la especie, sobre todo en los primeros días de posteclosión (dpe), aunque la inanición parece también retrasar el proceso de maduración digestiva (Hernández-González, 2011).

Por otro lado, estudios recientes reportan altos niveles de leucin aminopeptidasa N y leucin alanin peptidasa, enzimas digestivas membranales y citosólicas, durante el desarrollo larvario de *Chirostoma estor* (Toledo-Cuevas *et al.*, 2011). Los resultados sugieren que esas altas actividades compensan la ausencia de estómago y permiten una digestión eficiente de

proteínas. Además, los niveles de la leucin alanin peptidasa son incluso mayores en el estadio juvenil (90 dpe). Esta actividad es característica del periodo durante el cual los peces de ontogenia indirecta aún no desarrollan estómago (Kendall *et al.*, 1984; Moyano *et al.*, 1996), aunque también parece ser común en las especies agástricas (Horn *et al.*, 2006), manifestando que las enzimas citosólicas son importantes cuando el sistema digestivo no se ha desarrollado plenamente (Zambonino *et al.*, 1994) y que en la especie sin estómago juega un papel compensatorio importante. En los peces de ontogenia indirecta, el desarrollo y funcionalidad del estómago es un parte muy importante del proceso de maduración digestiva, así como la disminución en la actividad de las enzimas citosólicas y el aumento de las enzimas de la membrana del borde de cepillo de los enterocitos, lo que da lugar a una digestión más eficiente, un evento clave para la adquisición de un modo adulto de digestión.

El hallazgo de una alta actividad de LAP a los 90 dpe sugiere que el pez blanco presenta una madurez digestiva tardía o que no sigue el modelo de maduración descrito para peces con estómago. No obstante, este resultado requiere de ser confirmado tanto porque el estudio no se realizó en membranas purificadas de enterocitos, como porque los organismos habían sido alimentados con una dieta no óptima para la especie, desde los 30 dpe, factores que pudieron haber influido negativamente en los resultados obtenidos.

V. HIPÓTESIS

El pez blanco de Pátzcuaro *Chirostoma estor*, por ser un organismo agástrico, presenta un modelo de maduración digestiva diferente al descrito para peces con estómago.

VI. OBJETIVOS

VI.1 General

Caracterizar el modelo de maduración digestiva del pez blanco de Pátzcuaro, en organismos mantenidos exclusivamente con alimento vivo.

VI.2 Particulares

- Evaluar el comportamiento y nivel de actividad de las principales enzimas digestivas citosólicas intestinales, Leucin alanin peptidasa (LAP) y Fosfatasa ácida (PAc), durante el desarrollo larvario y juvenil (5 meses) de peces blancos de Pátzcuaro.
- Analizar el patrón y nivel de actividad de las principales enzimas digestivas membranales intestinales, Fosfatasa alcalina (PAIc) y Aminopeptidasa N (APN), en membranas purificadas de enterocitos, durante el desarrollo larvario y juvenil de peces blancos.
- Proponer el modelo de maduración digestiva de *Chirostoma estor*, con base en las proporciones de las actividades enzimáticas digestivas citosólicas y membranales.

VII. RESULTADOS

DETERMINACIÓN DEL MODELO DE MADURACIÓN DIGESTIVA DEL PEZ BLANCO DE PÁTZCUARO, *Chirostoma estor*, BAJO UN REGIMEN DE ALIMENTO VIVO

DETERMINATION OF THE DIGESTIVE MATURATION MODEL OF THE SILVERSIDE *Chirostoma estor*, FED ON LIVE FOOD

Miguel A. Hernández-González¹, Dariel Tovar-Ramírez², M. Gisela Ríos Durán¹, Carlos A. Martínez-Palacios¹, Jorge Fonseca Madrigal¹, *Elva Mayra Toledo-Cuevas¹.

¹Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales, UMSNH. Morelia, Michoacán, México;

²Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste CIBNOR, La Paz B.C.S, México.

* Email: mayra.toledo@gmail.com

VII.1 RESUMEN

Se analizó la actividad de las enzimas digestivas, descritas como indicadoras de la maduración digestiva, en larvas y juveniles (1-150 dpe) del pez blanco de Pátzcuaro, *Chirostoma estor*, especie nativa a la zona lacustres del estado de Michoacán México. *Chirostoma estor*, es un miembro de la familia Atherinópsidae, un grupo de peces con características anatómo-digestivas muy particulares, como el carecer de estómago y poseer un intestino corto. Las determinaciones enzimáticas se realizaron por técnicas espectrofotométricas, en extractos crudos y en purificados de membranas. Los resultados obtenidos nos indican que estos organismos presentan una alta actividad enzimática citosólica intestinal (Leucin-Alanin Peptidasa LAP y Fosfatasa ácida Fa), desde el momento de la eclosión hasta los 150 dpe. En comparación, la actividad de las enzimas intestinales membranales (aminopeptidasa N APN y fosfatasa alcalina FAlc) fue baja a lo largo del periodo de cultivo. Por tanto, se sugiere que la alta actividad citosólica intestinal está programada genéticamente, y hace suponer una respuesta compensatoria a la ausencia de estómago e intestino corto además de los hábitos zooplánctófagos que presenta la especie. Por otra parte al realizar proporciones de actividad membranal/citosólica, se observó una maduración digestiva tardía a los 105 dpe, siendo el mejor indicador de maduración digestiva APN/Fa. Presentando un modelo diferente a lo descrito para peces con estómago.

Palabras clave. Pez blanco, Agástrico, maduración digestiva, indicadores.

VII.2 ABSTRACT

The activity of digestive enzymes, described as indicators of digestive maturation, larvae and juveniles (1-150 dpe) freshwater *Chirostoma estor*, native species to the lake area in the state of Michoacan Mexico was analyzed, *C. estor*, is a member of the Atherinopsidae family, a group of fish with very specific anatomical characteristics digestive, as the lack of stomach and have a short intestine. Measurements were performed by spectrophotometric techniques, in crude extracts and in purified membrane. The results indicate that these organisms have high intestinal cytosolic enzyme activity (leucine - alanine peptidase LAP and acid phosphatase Fa) from the time of hatching to 150 dpe. In comparison, the activity of the membrane intestinal enzymes (aminopeptidase N APN and alkaline phosphatase Falc) was low throughout the culture period. Therefore, it is suggested that the high intestinal cytosolic activity is genetically programmed, and suggests a compensatory response to the absence of stomach and short bowel habits and zooplanktophagic response. In addition to performing proportions membrane/cytosolic activity, digestive ripening to late dpe 135 was observed, being the best indicator of digestive ripening APN/Fa. Presenting a different way as described for fish stomach model.

Key words. Pez blanco, Gastric, maturation digestive, indicator.

VII.3 INTRODUCCIÓN

El pez blanco de Pátzcuaro, *Chirostoma estor*, es una especie nativa del Altiplano Mexicano, localizada únicamente en dos cuerpos lacustres del estado de Michoacán. Pertenece a la familia Atherinópsidae y aunque los peces blancos son organismos totalmente de agua dulce, poseen grandes similitudes con algunos atherinópsidos marinos, por tener ancestros comunes (Barbour, 1973, Dyer y Chernoff, 1996). El pez blanco de Pátzcuaro posee una gran importancia económica, social, cultural y ecológica, pero sus poblaciones se encuentran en grave peligro de extinción por diversas causas, como la sobrepesca, la contaminación y principalmente por el gran deterioro de su medio ambiente. El cultivo de estos organismos, a través de la acuicultura, es una alternativa viable para evitar la pérdida total de su genoma y para dar alternativas de subsistencia a las comunidades indígenas que dependen de su explotación. Diversos estudios se han realizado para lograr este objetivo (www.aquaculture.stir.ac.uk/GISAP/native-species), logrando la instalación y operación de una planta piloto.

A pesar de los avances en el conocimiento de la especie, la obtención de una dieta adecuada y óptima ha sido difícil, seguramente por las restricciones que su sistema digestivo impone. Adicionalmente, el período para lograr el destete es bastante largo (aproximadamente 5 meses), aunque en realidad el destete total no permite el óptimo desarrollo de la especie en cualquier etapa de su desarrollo.

El conocimiento de la bioquímica y la fisiología digestiva de una especie contribuye al diseño de dietas balanceadas *ad hoc*, porque permite determinar la capacidad digestiva de los organismos en sus diferentes estadios. Por otro lado, permite conocer el momento en el que la madurez digestiva es alcanzada, para en esa edad suministrar dietas formuladas sin afectar el crecimiento y la supervivencia de los organismos (Peña-Martínez, 2005).

Los peces blancos son de hábitos zooplancófagos, no poseen estómago y presentan un intestino corto (Ross *et al.*, 2006). Además carece de órganos o estructuras compensatorias, tales como dientes faríngeos trituradores, ciegos pilóricos, intestinos largos o gruesos, etc. Varios estudios reportan alta y temprana actividad proteolítica y lipolítica en larvas de pez blanco, sugiriendo que estas especies poseen un equipo enzimático digestivo a temprana edad (Ríos-Durán, 2000; Toledo-Cuevas *et al.*, 2011; Hernández-González, 2011).

No obstante, existe un solo antecedente sobre estudios de maduración digestiva en pez blanco donde se reportan altos niveles de actividad de la enzima citosólica Leucin alanin peptidasa (LAP), sugiriendo una maduración digestiva tardía, al menos posterior a los 3 meses de post-eclosión (mpe), o distinta a la de peces con estómago (Toledo-Cuevas *et al.*, 2011). Así mismo se sugiere que la alta actividad de LAP estaría compensando la ausencia de estómago y contribuiría a la digestión de proteínas. No obstante, en este estudio los organismos fueron destetados al primer mpe y con una dieta que no permitía buenos crecimientos ni supervivencia, así que es posible que ésta haya alterado el posible modelo o tiempo de maduración digestiva.

Este trabajo pretende esclarecer el modelo de maduración del pez blanco de Pátzcuaro. El estudio se realiza en organismos alimentados únicamente con alimento vivo, para evitar impactar negativamente el proceso de maduración digestiva, tanto por dietas balanceadas aún no óptimas para la especie como por el suministro de éstas antes de la adquisición de la maduración. Se realiza desde la etapa larvaria, el 1er día de eclosión, hasta la juvenil, a los 150 dpe, cuando se ha visto que el destete resulta en un mejor desempeño en los organismos, por lo que es posible que en esta fecha hayan ocurrido mejorías en su capacidad digestiva. Se realiza en las condiciones ambientales no controladas de la planta de producción, para conocer si en dichas condiciones se produce una maduración digestiva en los organismos. El estudio comprende el análisis de la actividad de las enzimas digestivas intestinales membranales (Amino peptidasa N y Fosfatasa alcalina) y citosólicas (Leucin alanin peptidasa y Fosfatasa ácida), que han sido descritas como indicadoras de la maduración digestiva.

VII. 4 MATERIALES Y MÉTODOS

VII. 4.1 Obtención de huevos y mantenimiento de las larvas

Los huevos de pez blanco fueron obtenidos de la Planta Piloto de Producción, del Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales, de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (IIAF-UMSNH). Los huevos fueron incubados de 6 a 7 días a 25°C y tras la eclosión, los organismos fueron cultivados durante 150 días en la planta de Producción, bajo las condiciones de cultivo empleadas en ésta. Esto es, el cultivo se realizó en sistemas con recirculación de agua, de tamaños adecuados para el crecimiento. Inicialmente y hasta los 45 dpe en canaletas de 90 L de capacidad, y posteriormente (101 dpe) en tanques de 1000 L de capacidad. El cultivo se llevó a cabo de abril a septiembre del 2011, con un fotoperiodo natural y una temperatura promedio de 23.31 ± 0.3476 °C, cercana a la temperatura óptima para el cultivo del pez blanco (Martínez-Palacios *et al.*, 2004). La temperatura del agua se midió diariamente, con sensores que registraban la temperatura cada hora, durante las 24 horas.

Los parámetros fisicoquímicos del agua de los sistemas de cultivo se mantuvieron dentro de los límites adecuados para la especie (Martínez-Palacios *et al.*, 2004).

Los organismos fueron alimentados, desde la eclosión, solo con alimento vivo: rotífero *Brachionus plicatilis* del día 1 al 25 dpe, nauplios y metanauplios de *Artemia franciscana* del día 15 al 60 y 60 al 150 dpe, respectivamente, siguiendo el esquema de alimentación establecido para el pez blanco (Martínez-Palacios *et al.*, 2004).

VII. 4.2 Muestreos de los organismos

Los organismos fueron muestreados inicialmente cada 3^{er} día (1, 3,5 dpe), posteriormente cada 5 días (5-25dpe) y finalmente cada 15 días (60-150 dpe). Para cada día de muestreo se colectaron cuatro pools de organismos, con un peso húmedo mínimo de 65 mg (1-30 dpe), pero a partir del 60 dpe se colectaron 6 organismos individuales, para cada día de muestreo. Todos los muestreos se realizaron antes de la primera alimentación (10 am), por lo que los organismos tenían aproximadamente 19 horas de inanición. Los organismos se muestrearon completos del 1er al 45 dpe, pero a partir del día 60 se disecaron para obtener el hepatopáncreas y el intestino.

Los individuos fueron medidos. Estos y los órganos fueron también pesados en una balanza analítica (Mettler Toledo AB204-S) y microbalanza (Mettler Toledo 1122451222), respectivamente. Posteriormente fueron inmediatamente congelados en nitrógeno líquido, para ser luego transferidos a una ultracongeladora a -80 °C, a donde fueron mantenidos hasta su posterior análisis.

VII. 4.3

Obtención de extractos y Análisis enzimáticos

Las muestras biológicas (pooles, individuos u órganos) fueron divididas de la siguiente manera: dos réplicas de cada día de muestreo para determinar la actividad de las enzimas digestivas citosólicas, y las otras dos para la determinación de las actividades digestivas membranales.

Para la preparación del extracto enzimático, utilizado para la determinación de las actividades citosólicas, las muestras se homogenizaron en agua destilada fría, con un disruptor de tejidos (Fisher Scientific Model 150E), con pulsos de 10 segundos, a una amplitud de 10, hasta su total homogenización. Estos fueron mantenidos todo el tiempo en hielo, para evitar la desnaturalización de las enzimas. Los extractos fueron centrifugados a 15,700 g, por 30 minutos, a 4°C, en una microcentrífuga (Eppendorf 5415 R). El sobrenadante fue almacenado en alícuotas de 0.1 ml, a -20°C, hasta su utilización.

Para el análisis de las enzimas digestivas de membrana se realizó la purificación de las mismas, por la metodología descrita por Crane *et al.* (1979), modificada por Cahu y Zambonino-Infante (1994). Los intestinos de los organismos fueron homogenizados en 30 volúmenes de buffer 50 mM manitol, 2 Mm Tris, pH 7, a 4°C; tomando una alícuota de 1 ml para evaluar la actividad inicial de fosfatasa alcalina. Posteriormente se agregó CaCl₂ 0.1 M, hasta una concentración final de 10 mM, para después centrifugar a 9,000 g, durante 10 min, a 4°C. Tras eliminar el sedimento, el sobrenadante fue centrifugado a 34,000 g, durante 20 min, a 4°C. Finalmente, el sedimento se homogenizó durante 10-15 segundos, por sonicación, en 1 mL de 0.1 M KCl, 1 mM Dithiotreitol 5 mM Tris-HEPES, pH 7.5, a 4°C.

En las membranas de borde de cepillo (BBM) se ensayaron las enzimas Fosfatasa alcalina (FAlc), descrita por Bergmeyer *et al.*, (1974) y la Aminopeptidasa N Maroux (1973). Para el ensayo de FAlc se utilizó buffer 1M dietanolamina, 1mM MgCl₂, pH 9.8, y 4 nitrofenilfosfato (Sigma N4645) como sustrato. La actividad se midió por cinética, a 37°C, registrando la Absorbancia a una longitud de onda de 410 nm, en un espectrofotómetro UV-Vis (Cary 50 Varian). Para la Aminopeptidasa N (APN) se utilizó como sustrato 0.5 M de Leucin p-nitroanilida (Sigma L9125), en buffer fosfato de sodio 50 mM, pH 7.2. La cinética se midió a 37°C, a una longitud de 410 nm.

De las enzimas digestivas citosólicas se ensayaron la leucin-alanin-peptidasa (LAP ó Leu-Ala) (Nicholson y Kim, 1975) y la fosfatasa ácida (Bergmeyer *et al.* (1974). Para la LAP se utilizó 0.01M de Leu-Ala (Sigma L-9250), en reactivo LAOR: L-aminooxidasa (Sigma A5147), peroxidasa de rábano (Sigma P6782) y O-dianisidina (Sigma D9143), disueltos en Tris-HCl 50 mM, pH 8. La reacción fue incubada durante 20 minutos, a 37°C, tras lo cual fue detenida con H₂SO₄ al 50%, registrando la absorbancia en el espectrofotómetro (Cary 50 Varian), a 530 nm. Para la determinación de la fosfatasa ácida (FAC) se utilizó 4-nitrofenilfosfato (Sigma N4645) como sustrato, en buffer 41.6 mM Citrato de sodio, pH 4.8.

Después de 30 minutos de incubación, a 37°C, la reacción se detuvo con la adición de NaOH 0.05 N; registrando la absorbancia a 405 nm.

La concentración de proteína soluble de los extractos se realizó por la técnica de Bradford (Bradford, 1976), adaptada a microplaca. La absorbancia se midió a 595 nm en un lector de microplacas.

Todas las determinaciones se realizaron por triplicado. Para todas las enzimas analizadas, una Unidad de actividad se define como 1 µmol de sustrato hidrolizado por minuto, a 37°C.

VII. 4.4 Cálculo de las actividades enzimáticas

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

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

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

Ecuación 2. Cálculo de la actividad total en unidades por individuo.

$$Unidades/individuo = \frac{Unidades/ml}{larvas/ml}$$

Ecuación 3. Cálculo de la actividad en unidades por mg de proteína soluble en el extracto.

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

Ecuación 4. Cálculo de las proporciones.

$$Proporciones = \frac{Unidades \text{ por individuo (enzima membranal)}}{Unidades \text{ por individuo (enzima citosolica)}}$$

ΔAbs, el incremento de absorbancia, con respecto a un blanco, a la longitud de onda específica de cada actividad enzimática.

CEM, el coeficiente de extinción molar del producto

t tiempo (min), de la reacción

Volumen extracto adicionado en la reacción.

VII. 4.5

Análisis estadístico

Se utilizó el paquete estadístico Sigma Plot Versión Total 11.0. Se aplicó un análisis de varianza (ANOVA on Ranks) a una vía, a las actividades digestivas obtenidas a lo largo del desarrollo ontogénico. Cabe señalar que los datos no tuvieron una distribución normal, ni homogeneidad de varianza, por lo cual se realizó una prueba no paramétrica llamada Dunn's, con un nivel de significancia $\alpha= 0.05$.

VII. 5 RESULTADOS

VII. 5.1 Crecimiento de los organismos

El crecimiento de la especie, durante todo el periodo de cultivo, describe un comportamiento lineal cuando se expresa en longitud total (Fig. 3A) pero un comportamiento exponencial cuando se expresa en términos de peso húmedo (Fig. 3B).

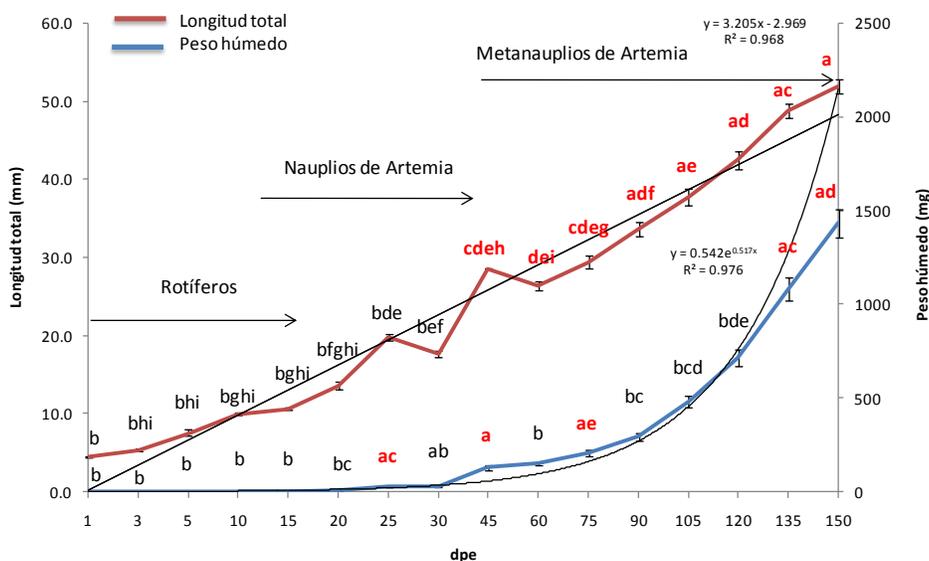


Fig. 3. Crecimiento durante el desarrollo larvario y juvenil del pez blanco de Pátzcuaro, *Chirostoma estor* (promedio \pm , error estándar (ES), n= 10). (A) En términos de longitud total y (B) en Peso húmedo. Las letras representan las diferencias estadísticas a lo largo del desarrollo.

La longitud total comienza a incrementarse gradualmente durante los primeros días, pero solo es estadísticamente diferente a partir del día 45, mientras que el incremento del peso húmedo es significativamente distinto a partir del 25 dpe. Este mayor crecimiento puede estar relacionado al cambio de alimento, de Rotíferos a Nauplios de *Artemia*.

VII. 5.2

Actividades digestivas Citosólicas

En la Figura 4 se muestran la actividad total y específica de la Leucin Alanin Peptidasa (LAP) y de la Fosfatasa ácida (FAC). Resulta evidente que la actividad de LAP es mucho más alta que la de la FAC, aproximadamente 20 a 45 veces más. No obstante, la actividad de ambas enzimas se detecta desde el primer dpe, con incrementos paulatinos a lo largo del desarrollo, tanto cuando la actividad se expresa en Actividad Total como en Actividad específica. La actividad específica de ambas enzimas muestra un incremento significativo en el 105 dpe, que se mantiene constante hasta el día 150 para FAC pero no para la LAP, que tiene una caída en ese día de desarrollo (Fig. 4B y D).

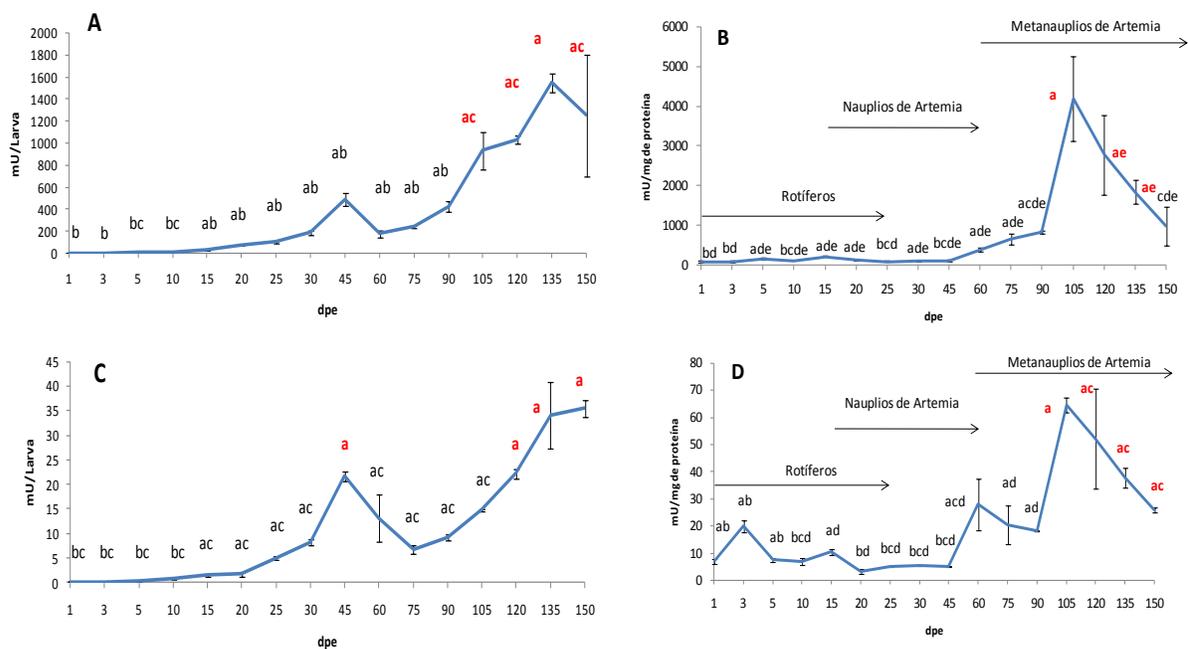


Fig. 4. Actividades digestivas citosólicas durante el desarrollo larvario y juvenil del pez blanco de Pátzcuaro *Chirostoma estor* (promedio \pm , (ES), n= 2), en términos de Actividad total (A, C), y Actividad específica (B, D); **dpe**, días post eclosión. Las letras representan las diferencias estadísticas a lo largo del desarrollo.

No se encontró relación alguna entre el incremento de la actividad de ninguna de estas enzimas con el cambio de alimento.

VII. 5.3 Actividad enzimática membranal

En la Figura 5 se muestran las Actividades Totales y Específicas de la Aminopeptidasa N (APN) y de la Fosfatasa alcalina (FAlc). Es relevante mencionar que dichas actividades se midieron en extractos purificados de membranas, obteniéndose un muy alto grado de purificación, con un promedio de 294.61 veces.

Como puede observarse, la actividad de APN es aproximadamente 10 veces mayor a la FAlc, pero ambas bastante menores a la de las enzimas citosólicas.

Las actividades Totales de APN y FAlc presentan un incremento que correlaciona con el crecimiento de los organismos. En cuanto a la actividad Específica, ésta también aumenta paulatinamente para ambas enzimas, aunque para APN se presenta una ligera fluctuación antes del día 60. En ambas actividades se presenta un incremento significativo en el día 60, a partir del cual se mantiene constante.

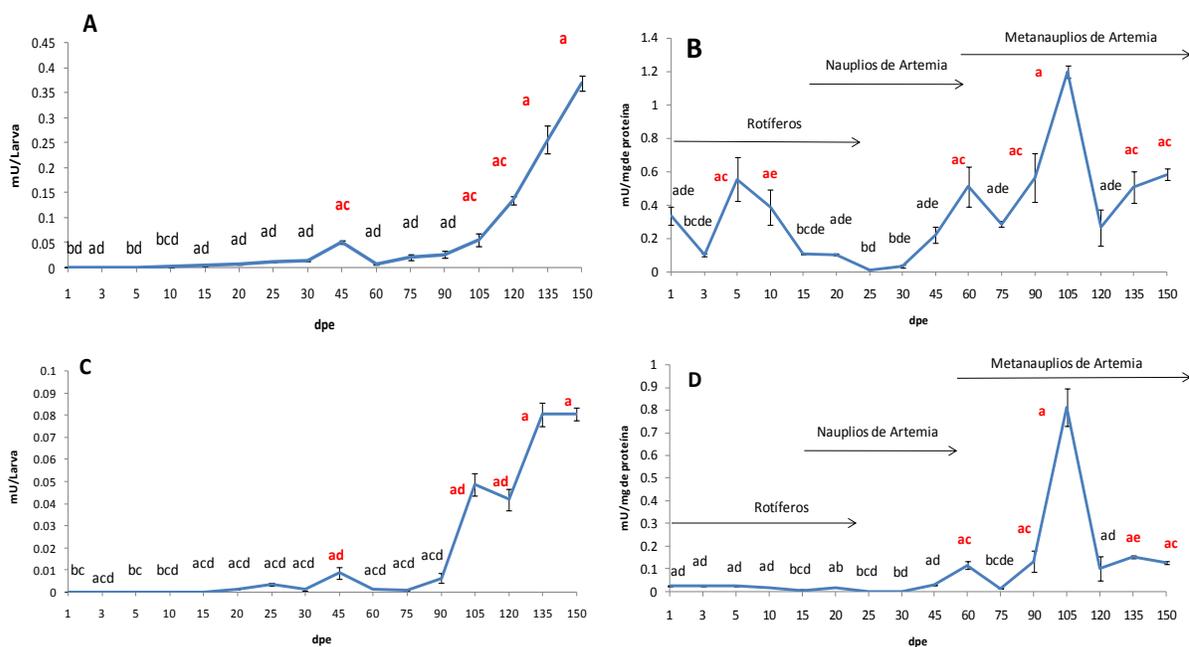


Fig. 5. Actividades digestivas membranales durante el desarrollo larvario y juvenil del pez blanco de Pátzcuaro *Chirostoma estor* (promedio \pm , (ES), n= 2, en términos de Actividad total (A, C), y Actividad específica (B, D); **dpe**, días post eclosión. Las letras representan las diferencias estadísticas a lo largo del desarrollo (1-150 dpe).

La actividad específica de APN y FAlc tuvieron un incremento significativo en el cambio de alimento, de rotífero a Artemia.

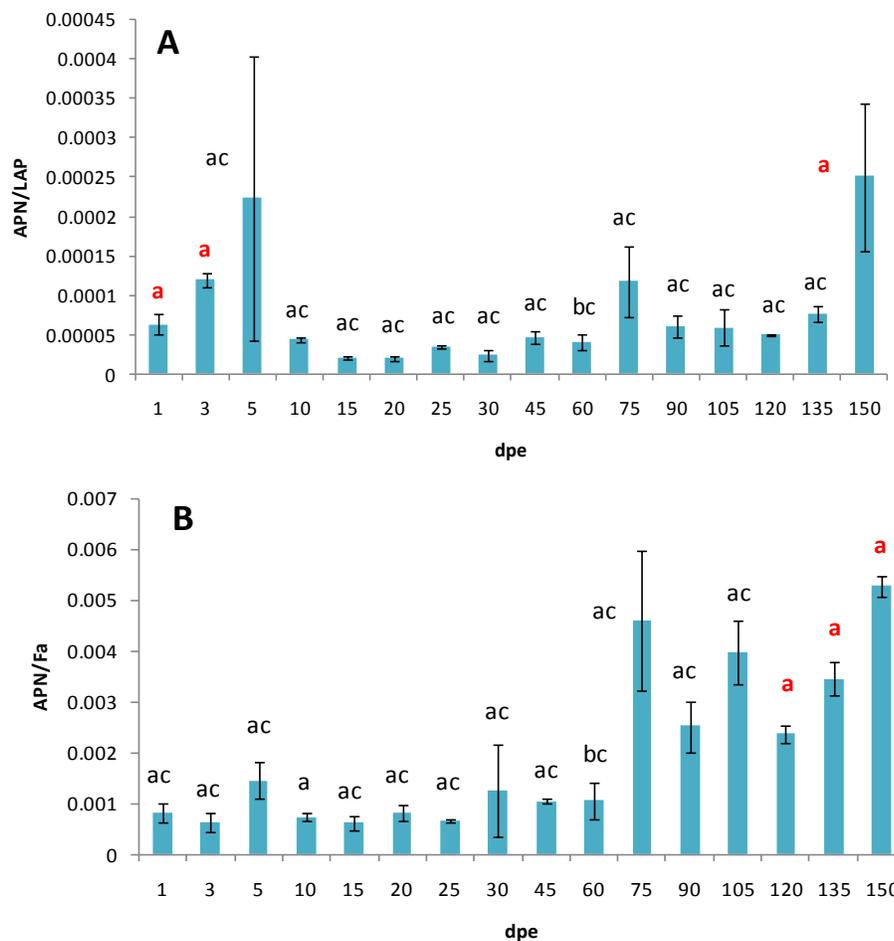
VII. 5.4

Indicadores de Maduración Digestiva

Con la intención de determinar si el pez blanco seguía el modelo de maduración digestiva descrito para peces con estómago, se calculó la relación entre las actividades de las enzimas digestivas citosólicas y las membranales analizadas a lo largo del desarrollo (Figura 6).

En la relación APN/LAP (Fig 6A) se pueden observar valores estadísticamente altos en los primeros días de muestreo, 1 y 3 dpe. Sin embargo el incremento mayor se presenta hasta el día 150, con respecto al 60 dpe. En el caso de la relación APN/FAc (Fig 6B), se puede observar que el incremento significativo se presenta en el día 120, con respecto al 60 dpe.

Las proporciones FAlc/LAP (Fig 6C) y FAlc/FAc (Fig 6D) coinciden en un incremento significativo en el día 105, con respecto del 75 dpe. No obstante, en la proporción de FAlc/LAP se presenta un pequeño incremento estadístico en el día 20, con respecto del 15 dpe.



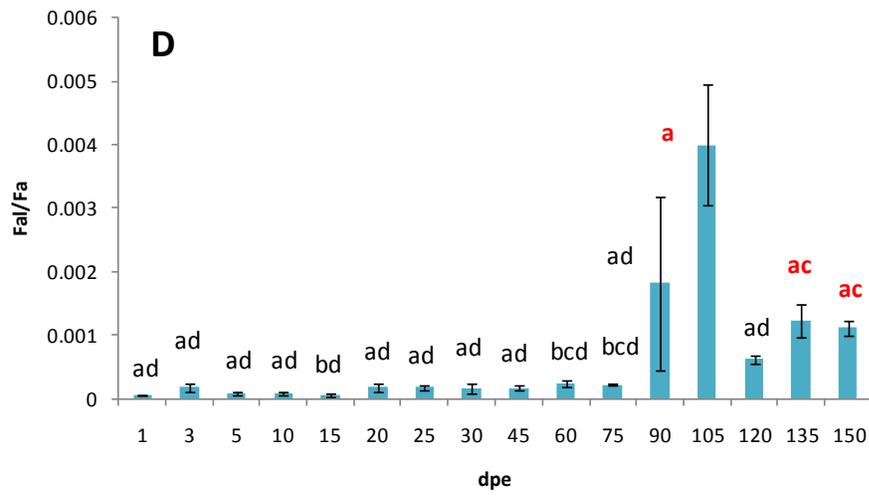
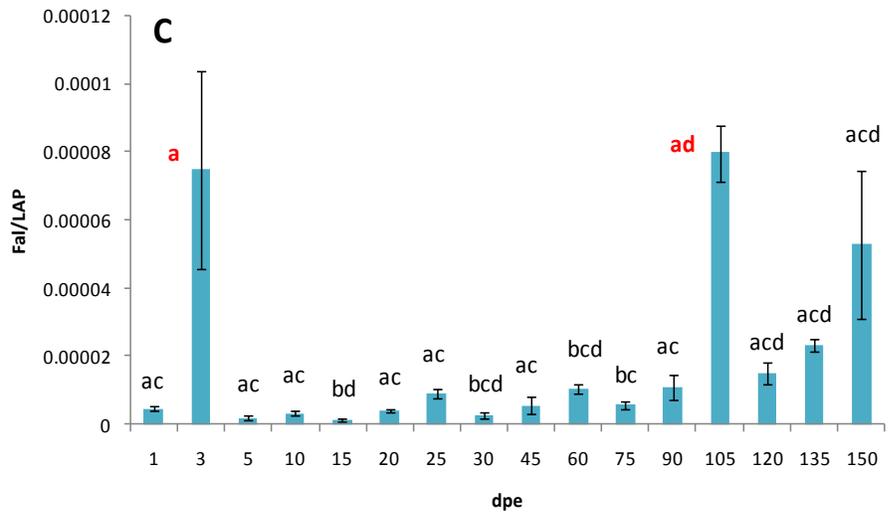


Fig. 6. Proporciones de la actividad enzimática digestiva, membranal/citosólica, durante el desarrollo larvario y juvenil del pez blanco *Chirostoma estor*, A, B,C, D (media \pm , error estándar (ES), n= 2), **dpe**, días post eclosión. Las letras representan las diferencias estadísticas a lo largo del desarrollo.

VIII. DISCUSIÓN

El estudio de la bioquímica digestiva durante la ontogenia de las especies acuáticas en cultivo permite determinar su capacidad digestiva particular. Esta información da la pauta para la selección de ingredientes y para la formulación de dietas adecuadas, para cada estadio de desarrollo puesto que no sólo basta saber si las larvas consumen o no el alimento, sino es crucial conocer si su sistema digestivo está preparado para una adecuada digestión de los alimentos y una adecuada absorción de los nutrientes (Valverde-Chavarría, 2002; Moyano *et al.*, 2006). El desconocimiento de esto podría llevar a elaborar dietas nutricionalmente balanceadas, pero inadecuadas desde el punto de vista de la digestión (Hamlin *et al.*, 2000), además de interrumpir el proceso normal de maduración. El sistema digestivo de la mayoría de las larvas de peces, al menos de los marinos, presentan una gran cantidad de cambios fisiológicos, anatómicos y morfológicos durante su primer mes de vida (Cahu y Zambonino, 1996). Estos cambios involucran la maduración y el funcionamiento del páncreas y el inicio de su actividad secretora. Posterior a este evento se presenta el desarrollo de las membranas de borde de cepillo de los enterocitos y finalmente el desarrollo y funcionamiento del estómago, con lo que inicia la digestión ácida de proteínas (Lazo *et al.*, 2000; Zambonino-Infante y Cahu, 2001, Zambonino-Infante *et al.*, 2007). Dichos cambios se ven reflejados en el comportamiento y actividad de las enzimas digestivas sintetizadas por dichos órganos, por lo que a partir de éstas se han identificado diversos indicadores de maduración digestiva. Así pues, los estudios de bioquímica digestiva también permiten determinar el momento en el que los organismos han adquirido la madurez digestiva.

Aunque los cambios en el sistema digestivo están regulados principalmente por cuestiones genéticas, también pueden ser modulados por factores hormonales, ambientales y nutricionales (Le Hüerou-Luron, 2000; Zambonino-Infante y Cahu, 2001). La composición de la dieta influye de manera crucial en la maduración del sistema digestivo, ya sea acelerando el proceso, retrasándolo o anulándolo (Zambonino-Infante y Cahu 2001).

La adquisición de la madurez digestiva capacita a los organismos a digerir y aprovechar los alimentos balanceados. Por tanto, es un evento esencial que influye substancialmente en la supervivencia, el crecimiento y los costos de producción larvaria, bajo condiciones de cultivo (Suzer *et al.* 2007). De aquí la importancia del conocimiento de la fisiología y bioquímica digestiva de cada especie, para reducir el uso de alimentos vivos en la crianza de larvas, realizando el destete en el momento en el que los organismos adquieren la madurez digestiva, el más apropiado para lograr buenos desempeños.

Crecimiento.

El crecimiento de *Chirostoma estor* presentó una tasa específica de 13.89 g/100 g, durante el periodo larvario, similar al reportado anteriormente (Toledo-Cuevas *et al.*, 2011). Esto sugiere que aunque las variables ambientales no son controladas en la Planta de Cultivo, de donde provienen los ejemplares aquí utilizados, las condiciones se mantienen bastante similares en el tiempo. Por tanto, los resultados de este trabajo podrían reflejar el proceso de desarrollo del sistema digestivo que se da en estos peces blancos en cultivo.

El crecimiento en peso húmedo se incrementa a partir del 25 dpe, describiendo un comportamiento exponencial, mientras que en términos de longitud total el incremento ocurre el día 45, con un comportamiento lineal. Este comportamiento también fue observado en otras especies de peces como la corvina *Pseudosciaena crocea* (Ma *et al.*, 2005), el bagre amarillo *Pelteobagrus fulvidraco* (Yang *et al.*, 2010), el pargo *Lutjanus guttatus* (Galaviz *et al.*, 2012), el bagre *Mystus nemurus* (Srichanun *et al.*, 2012), *Diplodus puntazo* (Suzer *et al.*, 2007) y la mojarra tenguayaca *Petenia splendida* (Uscanga-Martínez *et al.*, 2011). En estos se presentan un menor crecimiento en una primera fase (en *C. estor* desde el 1er dpe hasta el día 25), seguido de un crecimiento exponencial (a partir del día 45 dpe para el pez blanco).

Este cambio en el comportamiento del crecimiento puede explicarse por diferentes causas. La primera, la diferente composición alimento vivo; rotífero y *Artemia* (Moyano *et al.*, 1996; Morais *et al.*, 2004). Por otro lado el crecimiento también está relacionado a los distintos cambios morfo-fisiológicos que experimentan los peces durante su desarrollo. Adicionalmente se ha propuesto que las enzimas exógenas presentes en el alimento vivo podrían ayudar directamente en la digestión larvaria o activar los zimógenos presente en el intestino de las larvas, aumentando así la digestión y las tasas de crecimiento (Dabrowski 1979; Lauf y Hoffer 1984). Aunque varios autores han reportado que la aportación de estas enzimas no es significativa en el contexto de la actividad de enzimas endógenas o no estimula la producción de enzimas digestivas o su secreción al lumen del intestino (Kurokawa *et al.*, 1998; Baragi y Lovell 1986; Cahu y Zambonino-Infante 1997; Lazo *et al.*, 2000), es posible que la aportación de enzimas del alimento vivo sea relevante (Moyano, comm. Personal) para el pez blanco por sus hábitos alimenticios zooplanctófagos.

Actividad enzimática digestiva citosólica.

Es la primera vez que se realiza un estudio tan detallado de caracterización de la capacidad digestiva para *C. estor*, ya que los muestreos fueron muy cercanos y se realizó desde el desarrollo larvario hasta el juvenil, a los 150 dpe.

A menudo la actividad enzimática digestiva es expresada en actividad específica (U/mg de proteína soluble) y actividad total (Unidades por larva). La actividad específica refleja

cambios en la función metabólica en la cual está implicada tal enzima, cambios debidos a la velocidad de desarrollo de los tejidos secretores, además de reflejar la influencia de la disponibilidad y cambio del alimento (Moyano *et al.*, 1996; Morais *et al.*, 2004). No obstante, dado que la actividad se relaciona con el contenido de proteína soluble del organismo y la fracción tisular se vuelve paulatinamente más importante durante el crecimiento (Cara *et al.*, 2003), la actividad tiende a disminuir a lo largo del desarrollo de los organismos. No obstante, el perfil encontrado en actividad total es de incremento relacionado con la edad, indicando que las larvas de los peces incrementan su capacidad digestiva durante el desarrollo, a medida que aumenta el tamaño y función de los tejidos secretores, tales como el incremento en las vellosidades y microvellosidades intestinales y la maduración de los enterocitos (Munilla-Moran *et al.*, 1990).

Diversos estudios han demostrado que la actividad digestiva citosólica es relevante en los primeros estadios de vida, cuando el sistema digestivo aún no está completamente desarrollado, pero que su actividad disminuye al alcanzar la madurez. Entre este grupo de enzimas se encuentran la leucin alanin peptidasa (LAP) y la Fosfatasa ácida (FAC). Ambas han sido descritas en el proceso de digestión de nutrientes adquiridos por pinocitosis (Henning 1987; Zambonino Infante y Cahu 2001). Otra más es la catepsina D, reportada en *Ctenopharyngodo idellus* (Liu *et al.*, 2008)

En *Chirostoma estor*, la actividad total de las enzimas digestivas citosólicas analizadas, LAP y FAC, se detectó desde el primer dpe y su actividad fue incrementándose con el crecimiento. Los niveles de actividad de las enzimas digestivas pueden ser considerados como indicadores fisiológicos del crecimiento, durante el período larvario y juvenil (Liu *et al.*, 2010).

La actividad total y específica de las enzimas digestivas citosólicas aumentó considerablemente alrededor del día 105, permaneciendo constante hasta el final del periodo evaluado. No obstante, análisis recientes muestran que la actividad de LAP continua incrementándose hasta los 1.5 años de vida, en organismos alimentados con dieta balanceada, mientras que la FAC permanece con niveles constantes (Hernández-González, 2014, comunicación personal).

Los niveles de LAP no solo se mantienen constantes en el estadio juvenil de *C. estor*, sino que son considerablemente mayores que los reportados para otras especies como; *Dentex dentex* (Gisbert *et al.*, 2009) y *Mycteroperca rosácea* (Martínez-Lagos *et al.*, 2013). Estos hallazgos sugieren que *C. estor* mantiene sus actividades digestivas citosólicas para compensar las restricciones digestivas que su sistema presenta: un intestino corto, ausencia de estómago y de estructuras compensatorias, i.e. trituración con dientes faríngeos, intestino grueso, entre otros. Resultados similares se reportan para otras dos especies de atherinópsidos, los

pejerreyes *Odontesthes bonariensis* y *O. hatcheri*, los cuales presentan una alta semejanza con el pez blanco; también son agástricos y con intestino corto (Toledo-Cuevas *et al.*, 2014).

LAP está presente principalmente en los enterocitos, pero se cree que una menor proporción se encuentra anclada en el BBM (Nicholson y Kim, 1975). Por lo tanto, LAP podría también participar en la digestión intracelular y membranal en etapa adulta, además de su papel fundamental en etapa larvaria (Kvåle *et al.*, 2007).

En otras especies de peces se ha reportado que la actividad de LAP permanece constante durante un mayor periodo de la vida del organismo tales como *Scophthalmus maximus* L (hasta 60 dpe) (Tong *et al.*, 2013), *Hippoglossus hippoglossus* y *Gadus morhua* (Kvåle *et al.*, 2007), se ha sugerido que esto pueda ser debido al efecto de otros tejidos presentes en el intestino, que enmascara los cambios ontogenéticos de los niveles de actividad de LAP, aunque también puede ser debido a las estrategias digestivas específicas de las especies (Kvåle *et al.*, 2007).

Aparentemente esta enzima está programada genéticamente para llevar a cabo la digestión intracelular de las proteínas absorbidas por pinocitosis, en los primeros estadios del desarrollo. No obstante, después del comienzo de la alimentación exógena, la actividad de LAP es modulada por la dieta (Zambonino-Infante y Cahu, 1994).

Como se ha mencionado, la FAc de *Chirostoma estor* fue detectada desde los primeros días de post-eclosión, al igual que en otras especies como en *Pleuronectes ferruginea* y *Pleuronectes americanus* (Baglolle *et al.*, 1998), *Pagrus pagrus* (Cara *et al.*, 2002) y *Diplodus sargo* (Guerreiro *et al.*, 2010). En estas especies el patrón de actividad específica fue de un incremento durante las primeras semanas del desarrollo larvario, con una disminución posterior, que se sugiere es el resultado del comienzo de la maduración de los enterocitos (Guerreiro *et al.*, 2010). No obstante, en *C. estor* la actividad tuvo un incremento significativo en el día 105 y permaneció constante hasta el final del periodo evaluado.

Actividad enzimática digestiva membranal

La actividad total de las enzimas membranales, aminopeptidasa N (APN) y fosfatasa alcalina (FAlc) se detectó desde los primeros días de desarrollo y, al igual que para las enzimas digestivas citosólicas, la actividad fue incrementándose con el crecimiento. No obstante, es relevante mencionar que la actividad de ambas enzimas fue mucho menor que la detectada en un estudio anterior, en donde se usaron extractos totales (Toledo *et al.*, 2011). También fue menor que la detectada en extractos totales de dos especies de pejerrey, *Odontesthes bonariensis* y *O. hatcheri* (Toledo *et al.*, 2014, en preparación), atherinópsidos con una anatomía externa y digestiva muy semejante a la de los peces blancos. En ninguno de dichos estudios se purificaron las membranas de borde de cepillo, lo que sí se realizó en el

presente trabajo. Así que los resultados sugieren que el proceso de purificación afectó negativamente la actividad de las enzimas digestivas de *C. estor*, por lo que los niveles de actividad detectados muy seguramente no son los reales. No obstante, la purificación de las BBM seguramente incrementó la especificidad de detección de las actividades digestivas membranales, lo que sin duda debió incrementar la precisión para determinar el momento de la adquisición de la madurez digestiva en *C. estor*.

La fosfatasa alcalina (FAlc) ha sido reportada como un marcador general en el transporte de nutrientes a través de la membrana de los enterocitos (citado en Zambonino y Cahu, 1994) y el incremento de su actividad está relacionada con la maduración de los enterocitos (Zambonino-Infante y Cahu, 2001; Kvåle *et al.*, 2007), por lo que es considerado como un indicador de maduración digestiva. Incrementos significativos, desde los primeros días de post-eclosión, han sido reportados en varias especies, como en la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* (Álvarez-González *et al.*, 2008) y en el bagre mantequilla *Ompok bimaculatus* (Kumar *et al.*, 2012). Resultados similares se han encontrado en larvas de peces marinos y de agua dulce, aunque alrededor de la tercera y cuarta semana de vida (Babaei *et al.*, 2011; López-Ramírez *et al.*, 2010; Uscanga-Martínez *et al.*, 2011). En contraste con estos resultados, en *Chirostoma estor* la actividad total de FAlc tuvo un incremento significativo hasta los 45 dpe, mientras que el incremento en la actividad específica se presentó en el día 90.

APN es otra de las enzimas localizada en el borde de cepillo intestinal. Hidroliza péptidos a amino ácidos en el proceso final de la digestión de las proteínas, tras el proceso digestivo iniciado por proteasas lumbales (Kurokawa y Suzuki, 1998). El incremento en la actividad total de APN en *C. estor* se presentó en el 105 dpe, mientras que para la actividad específica se observó en el día 60, aunque hay una tendencia de mayor incremento para el 105 dpe. No obstante, el aumento en la actividad de APN se observa mucho más temprano en el desarrollo larvario de varias especies de agua dulce y marinas, alrededor del día 3 de post-eclosión, como por ejemplo; en *Solea senegalensis* (Ribeiro *et al.*, 1999), *Pseudosciaena crocea* (Ma *et al.*, 2005), cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* (Álvarez-González *et al.*, 2008), en el cíclido *Cichlasoma urophthalmus* (López-Ramírez *et al.*, 2010) y el robalo *Centropomus undecimalis* (Jiménez-Martínez *et al.*, 2011).

Las aminopeptidasas se distribuyen en diversos tejidos, incluyendo la sangre, el hígado y el riñón, por tanto es difícil determinar la etapa en la que el intestino comienza a sintetizar aminopeptidasa, cuando los ensayos de actividad se realizan en extractos de organismos completos (Kurokawa y Suzuki, 1998). En el pez blanco, el incremento en el día 60 de la actividad específica de APN, podría ser debida a que a partir de esa fecha el análisis se realizó en extractos intestinales y por tanto la enzima podría estar más concentrada. Sin embargo, en las etapas tempranas del desarrollo larvario, de prácticamente todas las especies estudiadas, los análisis se han realizado en extractos totales y los incrementos de actividad son tempranos, por

lo que es improbable que la detección en extractos intestinales sean la razón del incremento tardío de la actividad de APN, en *C. estor*.

El desarrollo y función del intestino implica diferentes eventos morfológicos y de maduración que están muy bien conservados entre los vertebrados (Henning, 1987). La aparición de una membrana funcional en las microvellosidades de los enterocitos constituye un paso crucial durante el desarrollo de las larvas de los peces, porque el incremento en la actividad de las enzimas digestivas de esta membrana, con su alta eficiencia catalítica y función absorbente, permiten la adquisición de un modo adulto de digestión (Zambonino-Infante *et al.*, 2009). De acuerdo a diversos autores, estos cambios se producen entre la tercera y cuarta semana después de la eclosión, en especies de peces teleosteos marinos de aguas templadas. No obstante, el incremento de estas actividades digestivas en *C. estor* se presentó después de los 2 meses de vida, sugiriendo un retraso en el proceso de maduración. Sin embargo, el constante incremento en estas actividades sugiere una mejoría considerable en la capacidad digestiva intestinal, a lo largo del desarrollo de estos organismos. Este mismo comportamiento se observó en *Diplodus puntazzo* (Suzer *et al.*, 2007), que exhibió un aumento constante hasta los 50 dpe.

Maduración digestiva.

Como ya se ha mencionado anteriormente, el proceso típico de maduración del intestino se caracteriza por un aumento progresivo en las actividades específicas de las enzimas digestivas de la membrana borde de cepillo (fosfatasa alcalina, aminopeptidasa, que coincide con una disminución en las actividades de las enzimas digestivas citosólicas (leucina alanina peptidasa) (Cahu y Zambonino-Infante, 2001). Por esta razón, diversos autores utilizan el punto de cruce de estas actividades como un indicador de maduración digestiva. Este patrón se ha observado en diferentes especies, como es el caso de larvas de cíclidos *Cichlasoma urophthalmus* (López-Ramírez *et al.*, 2010); en el robalo *Centropomus undecimalis* (Jiménez-Martínez *et al.*, 2011) y en varias larvas de peces marinos (Zambonino-Infante *et al.*, 2007; Pittman *et al.*, 2013). En todos estos organismos, la maduración ocurre entre la tercera y cuarta semana de post-eclosión, aunque en especies de aguas frías, como el bacalao *Gadus morhua* y el lenguado *Hippoglossus hippoglossus*, la maduración se produce más tardíamente, aproximadamente 40 a 50 días después de la primera alimentación (Kvåle *et al.*, 2007). No obstante, en el caso del pez blanco no es posible observar el punto de cruce, porque las actividades citosólicas no decaen.

Otra forma de utilizar estas actividades como indicadores de maduración es en forma de relaciones; las actividades totales membranales sobre las totales citosólicas (Zambonino-Infante y Cahu 1994), siendo el incremento en la relación el indicio de madurez digestiva. Las proporciones han sido usadas para definir el proceso de maduración de los enterocitos en varias especies de peces, tales como la carpa común *Cyprinus carpio* (Escaffre *et al.*, 1997), el tambor rojo *Sciaenops ocellatus* (Buchet *et al.*, 2000) y la corvina *Pseudosciaea crocea* (Ma *et*

al., 2005), y al igual que con el otro indicador, la maduración ha sido encontrada entre la tercera y la cuarta semana de post-eclosión. Aunque, hay especies en las que se presenta una maduración precoz del tracto intestinal, como en el *Chelon labrosus*, con un aumento en el 8 dpe en las proporciones FAlc/LAP y APN/LAP (Zouiten *et al.*, 2008).

En el presente estudio se utilizaron las dos actividades membranales más comúnmente utilizadas, APN y FAlc; y dos actividades digestivas citosólicas, LAP y FAc. Sin embargo, dos cosas en los resultados llaman la atención: no fue constante la edad en la que se observó el incremento en las distintas relaciones y, el incremento no fue significativo con respecto a la edad inmediata anterior. Esto fue mucho más evidente en las relaciones con la actividad de APN, encontrándose los incrementos en el día 150 con respecto del 60 dpe (APN/LAP), y en el día 120 con respecto del 60 dpe (APN/FAc). Dado que la actividad de APN es modulada por la dieta (Zambonino Infante y Cahu 1994), es posible que esta actividad no sea tan fidedigna como indicador de maduración.

En contraste, en las relaciones con la FAlc si hubo una coincidencia en el día de desarrollo y la significancia no estuvo tan alejada en el desarrollo. Para estas relaciones el incremento se encontró en el día 105, con respecto del 75 dpe, es decir con respecto del mes anterior. Además, en ese día 105 de desarrollo la actividad específica de todas las enzimas se incrementó significativamente, por lo que es posible que los 3.5 meses de edad sea la fecha en la cual la maduración de los enterocitos ocurre en el pez blanco. Si este fuera el caso, este organismo, a pesar de ser agástrico, seguiría el modelo de maduración digestiva descrito para los peces gástricos, aunque la maduración estaría ocurriendo mucho más tardíamente que en estos. Es decir, la maduración intestinal estaría siguiendo el modelo digestivo descrito para peces, independientemente de la existencia o ausencia de un estómago. No obstante, las dos situaciones arriba mencionadas (no coincidencia en la edad del indicador de maduración y que éste no es significativo respecto de la fecha de desarrollo inmediata anterior) hacen pensar que para el caso de peces agástricos estos indicadores no son suficientes para poder determinar cuando ocurre la maduración digestiva o, que ésta no ocurre como en el modelo descrito para peces gástricos. No obstante, en el caso de los pejerreyes *O. bonariensis* y *O. hatcheri*, otros atherinópsidos carentes de estómago, la coincidencia en la edad de maduración con diferentes indicadores y el incremento significativo con la fecha inmediata anterior parecen cumplirse mejor.

Con el indicador de maduración FAlc/FAc se reportó maduración digestiva, alrededor del segundo mes de post-eclosión (Toledo-Cuevas *et al.*, 2011), aunque las actividades no fueron medidas con las técnicas usadas para el establecimiento del modelo. Utilizando dichas técnicas, para *O. bonariensis* se reporta una coincidencia en los indicadores APN/LAP y FAlc/LAP para el día 28. Para *O. hatcheri* se detectaron varios incrementos significativos a lo largo del desarrollo, pero el único punto en el que coinciden los indicadores (APN/LAP y FAlc/LAP) es el 77 dpe (Toledo *et al.*, 2014, en preparación). Así que es posible que las

diferencias entre los hábitos alimenticios de estos dos géneros de atherinópsidos agástricos (Piedras y Pouey 2005; Ruiz 2005; Ross *et al.*, 2006) se traduzcan en diferencias en su proceso de maduración digestiva, de tal suerte que los indicadores de maduración son más claros en los pejerreyes que en el pez blanco de Pátzcuaro. El proceso de maduración digestiva es influenciado por diversos factores, tales como la especie, la velocidad de desarrollo del organismo y de su función digestiva, su estado nutricional, así como la calidad y cantidad de alimento suministrado (Cara *et al.*, 2002). No obstante, es relevante mencionar que las actividades digestivas membranales en los pejerreyes no fueron determinadas en membranas purificadas, por lo que cabe la posibilidad de que el efecto negativo de la purificación en estas actividades digestivas, en el pez blanco, estén afectado el hallazgo de indicadores más claros.

En las proporciones con LAP, se detectaron valores altos en los días 1 y 3 de post-eclosión, pero se descarta una maduración precoz para la especie por su corto desarrollo embrionario, los evidentes cambios morfológicos que se presentan en la etapa larvaria y por su dependencia al alimento vivo, así como su imposibilidad a ser destetada justo después de la eclosión. Estos picos de actividad enzimática podrían atribuirse al término de la absorción del saco vitelino, además del régimen de la alimentación de las especies (Alemán *et al.*, 2004).

El proceso de maduración es sensible a la calidad nutricional de la dieta; en consecuencia, la disparidad entre la composición de la dieta y las características digestivas de las larvas puede retrasar o prevenir la secuencia programada genéticamente del desarrollo intestinal (Zambonino-Infante y Cahu, 2001). Además, existe una relación de adaptación entre la producción y actividad de enzimas digestivas con el tipo de dieta suministrada, así como con los cambios en ésta (Wguolev y K'uzmina, 1993). No obstante, es muy improbable que la “maduración digestiva tardía”, de ser cierta en el pez blanco, haya sido debida al efecto de una dieta no apropiada para la especie, ya que los organismos fueron mantenidos solo con alimento vivo.

Como se ha mencionado, en el pez blanco *Chirostoma estor*, la actividad digestiva membranal incrementa a lo largo del desarrollo. Sin embargo, la actividad digestiva citosólica no decae, sino que permanece alta. Estos hallazgos sugieren que la especie mantiene toda la capacidad digestiva que posee, compensando así las limitaciones de su sistema digestivo, tal como sugieren Zambonino-Infante *et al.* (2009), el diferente patrón en las actividades de las enzimas intestinales podrían resultar de diferencias en la maduración intestinal y de diferentes respuestas fisiológicas entre las especies.

Gisbert *et al.*, (2009) sugieren que la maduración de los enterocitos está relacionada a una menor dependencia de las larvas en la actividad pinocítica, lo cual no parece ser el caso de *Chirostoma estor*. El proceso de absorción de proteínas por pinocitosis podría ser un proceso especializado de las larvas, como respuesta a la falta de enzimas proteolíticas ácidas producidas por el estómago (Hamlin *et al.*, 2000).

La absorción de proteínas por pinocitosis y su digestión intracelular posiblemente son conferidas como una ventaja adaptativa en la etapa larvaria, como mecanismo de digestión y absorción larvaria (Govoni *et al.* 1986; Moyano *et al.*, 1996). La pinocitosis de nutrientes se caracteriza por presentar vesículas citoplasmáticas y vacuolas en el epitelio intestinal (Bisbal y Bengtson 1995), que disminuyen cuando se forma el estómago y aumenta la digestión extracelular (Luizi *et al.*, 1999). Aunque aún no se cuenta con estudios histológicos del desarrollo del sistema digestivo de *C. estor*, en dos especies de pejerrey (*Odontesthes bonariensis* y *O. hatcheri*) se han observado vacuolas pinocíticas desde la primera semana de post-eclosión y hasta la semana 11 (Toledo *et al.*, 2014, en preparación). La evaluación de la capacidad digestiva suele relacionar el desarrollo de los órganos del sistema digestivo a la cuantificación de las enzimas digestivas durante la ontogenia, como se ha realizado en diferentes especies, como el; rodaballo (*Scophthalmus maximus*), dorada (*Sparus aurata*), platija (*Pleuronectes americanus*), fletán del Atlántico (*Hippoglossus hippoglossus*), lubina europea (*Dicentrarchus labrax*), lenguado senegalés (*Solea senegalensis*), sargos (*Diplodus sargus*), la anguila japonesa (*Anguilla japonica*), lenguado (*Paralichthys californicus*) y el jurel (*Seriola lalandi*) (Cousin *et al.*, 1987; Moyano *et al.*, 1996; Baglolle *et al.*, 1998; Martínez *et al.*, 1999; Gawlicka *et al.*, 2000; Zambonino-Infante y Cahu 2001; Ribeiro *et al.*, 2002; Caraet *et al.*, 2002; Álvarez-González *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2006).

IX. CONCLUSIONES

Todas las actividades enzimáticas digestivas evaluadas fueron detectadas desde el momento de la eclosión, sugiriendo que el pez blanco posee un equipo enzimático desde los primeros estadios.

La actividad digestiva con mayores niveles fue la de la Leucin alanin peptidasa (LAP), que fue incrementándose conforme el desarrollo de *Chirostoma estor* y que permaneció constante hasta los 135 dpe. La FAc mostró el mismo patrón que LAP, aunque con menores valores de actividad. Estos hallazgos sugirieron que el pez blanco conserva características neoténicas para estas actividades citosólicas.

Las actividades digestivas membranales también mostraron un incremento gradual con el crecimiento, aunque sus valores fueron mucho menores que los de las citosólicas. Al parecer su actividad fue afectada negativamente por el proceso de purificación de membranas.

Así que al parecer *C. estor* mantiene toda la capacidad digestiva que posee, citosólica y membranal, seguramente para compensar las restricciones digestivas que su sistema presenta: un intestino corto, ausencia de estómago y de estructuras anatómicas compensatorias.

La maduración digestiva parece ocurrir en el 105 dpe. Pero, el modelo de maduración descrito para peces con estómago no parece cumplirse en esta especie agástrica, dado que solo los indicadores con FAlc coincidieron en una misma fecha de desarrollo y porque el incremento de la proporción es significativo hasta el día 75. Así que parece que estos indicadores no son suficientes para determinar el momento de adquisición de la madurez digestiva en especies con las características anatomo-digestivas como ésta. Aunque es posible que la actividad citosólica siempre alta y la baja actividad membranal hayan afectado el hallazgo de indicadores más claros.

En el caso de que la maduración digestiva en *C. estor* esté ocurriendo en el día 105 del desarrollo, ésta es mucho más tardía que en peces gástricos de aguas templadas e incluso de aguas frías.

X. PERSPECTIVAS Y/O RECOMENDACIONES

Los resultados obtenidos en el presente estudio son muy interesantes, ya que nunca antes se había realizado un estudio tan detallado de la capacidad digestiva del pez blanco de Pátzcuaro,

Dadas las dificultades para el desarrollo de este experimento, con la utilización de bastante material biológico, solo se puede contar con 2 replicas biológicas. Se recomienda utilizar por lo menos 3 replicas biológicas para tener mayor confiabilidad de los datos.

Las técnicas que se utilizaron para las actividades membranales quizás no fueron las más adecuadas para esta especie, ya que aunque se realizó la purificación de BBM, los resultados fueron menores a los esperados y en consecuencia no se observa un patrón claro de maduración digestiva en las proporciones. Se recomienda estandarizar y utilizar los protocolos de Cahu y Zambonino-Infante, 2001, para la determinación de la actividad membranal.

Los indicadores que se utilizaron no reflejan claramente cuando sucede la maduración digestiva, por lo cual, se recomienda realizar estudios histológicos y el uso de otros indicadores de maduración, para confirmar el momento y modelo de maduración digestiva de esta especie, y de esta forma contribuir a lograr mejores y más tempranos destetes.

Así mismo, con base en los resultados obtenidos, se recomienda realizar gradualmente el destete a los 3.5 meses de post eclosión.

Finalmente; los resultados de este trabajo darán la pauta para la elaboración de mejores dietas, acordes a las necesidades de cada estadio de la especie con base en su capacidad digestiva, logrando así mejoras en la supervivencia y crecimiento

XI. BIBLIOGRAFÍA

- Alliot, E., A. Pastoureaud y J. Trellur. 1977. Evolution des activités enzymatiques dans le tube digestif au cours de la vie larvaire du bar (*Dicentrarchus labrax*). Variations des protéinogrammes et des zymogrammes, Colloq. Int. Cent. Nat. Rech. Sci. 4, 85-91.
- Alarcón, F.J. 1997. Procesos digestivos en peces marinos: Caracterización y aplicaciones prácticas. Tesis de Doctorado, Universidad de Almería, España. 187 pp.
- Álvarez-González, C.A., J.L. Ortiz-Galindo, S. Dumas, S.F. Martínez-Díaz, D.E. Hernández-Ceballos, T. Grayeb del Alamo, M. Moreno-Legorreta, R. Peña-Martínez y R. Civera-Cerecedo, 2001a. Effect of stocking density on the growth and survival sand bass *Paralabrax maculatofasciatus* larvae in a closed recirculation systems. J. World Aquacult. Soc. 32, 130-137.
- Álvarez González, C. A. (2003). Actividad enzimática digestiva y evaluación de dietas para el destete de larvas de la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* (*Percoidei: Serraniadae*) (Doctoral dissertation, Instituto Politécnico Nacional. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas.).
- Álvarez-González, C. A., Cervantes-Trujano, M., Tovar-Ramírez, D., Conklin, D. E., Nolasco, H., Gisbert, E., & Piedrahita, R. (2005). Development of digestive enzymes in California halibut *Paralichthys californicus* larvae. *Fish Physiology and Biochemistry*, 31(1), 83-93.
- Álvarez-González, C. A., Moyano-López, F. J., Civera-Cerecedo, R., Carrasco-Chávez, V., Ortiz-Galindo, J. L., & Dumas, S. 2008. Development of digestive enzyme activity in larvae of spotted sand bass *Paralabrax maculatofasciatus*. 1. Biochemical analysis. *Fish physiology and biochemistry*, 34(4), 373-384.
- Barbour, C.D. 1973. The systematics and evolution of the genus *Chirostoma Swainson* (Pisces: Atherinidae). *Tulan Studies in Zoology and Botany*, 18 (3): 97-141.
- Balon, E.K. 1984. Reflections on some decisive events in the early life of fishes. *Transactions of the American Fisheries Society* 113: 178-185.
- Babaei, S. S., Abedian Kenari, A., Nazari, R., & Gisbert, E. 2011. Developmental changes of digestive enzymes in *Persian sturgeon* (*Acipenser persicus*) during larval ontogeny. *Aquaculture*, 318(1), 138-144.
- Baglole, C.J., G.P. Goff y G.M. Wright. 1998. Distribution and ontogeny of digestive enzymes in larval yellowtail and winter flounder. *J. Fish Biol.* 53, 767-784
- Baraggi, V. y R.T. Lovel. 1986. Digestive enzyme activities in striped bass from first feeding through larva development. *Trans. Am. Fish. Soc.* 115, 478-484.
- Balcazar, J.L., de Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Cunningham, D., Vendrell, D., Muzquiz, J.L. 2006. The role of probiotics in aquaculture. *Vet. Microbiol.* 114, 173-186
- 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.

- Bergmeyer HV, Gacoehm K, Grassl M 1974. In: Methods of Enzymatic Analysis, HV Bergmeyer (eds).New York: Academic Press. vol. 2 p. 428–429.
- Bisbal , G.A. , and Bengtson , D.A. 1995 . Development of the digestive tract in larval summer fl ounder . Journal of Fish Biology 47 : 277 – 291 .
- Bornscheuer, U. T. 2002. Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. *FEMS microbiology reviews*, 26(1), 73-81.
- Buddington RK. 1985. Digestive secretions of lake sturgeon *Acipenser fulvescens* during early development. *J. Fish Biol.*, 26: 715-724
- Buchet, V., Zambonino-Infante, J.L. & Cahu, C.L., 2000. Effect of lipid level in a compound diet on the development of red drum *Sciaenops ocellatus* larvae. *Aquaculture* 184, 339-347.
- Cahu, C., Zambonino Infante, J.L., 1994. Early weaning of sea bass *Dicentrarchus labrax*. Larvae with a compound diet: effect on digestive enzymes. *Comp. Biochem. Physiol.* 109A, 213_222.
- 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, 431-437.
- Cahu, C. 1996. Nutrition des larves de poisson; 1. Développement des enzymes digestives et modifications induites par l'aliment. Journées INRA-IFREMER, Nutrition des Poissons 21-22 fév. Saint-Pée-sur-Nivelle.
- Cara, J.B, Moyano J. F, Fernández D.C, Y.M. 2002. Actividad de enzimas digestivas durante el desarrollo larvario del Sargo (*Diplodus sargus*). Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura; 110-121.
- Chen, B.N., Qin, J.G., Kumar, S.M., Hutchinson, W.G. and Clarke, S.M. 2006. Ontogenetic development of digestive enzymes in yellowtail kingfish *Seriola lalandi* larvae. *Aquaculture*, 260: 264–271.
- Cousin, J.C.B., F. Bauding-Laurencin y J. Gabaudan. 1987. Ontogeny of enzymatic activities in fed and fasting turbot, *Scophthalmus maximus* L.J. *Fish Biol.* 30, 15-33.
- Crane FL, Goldenberg H, Morré DJ, Löw H. 1979. Dehydrogenases of the plasma membrane. *Subcell Biochem.* 1979;6:345–399.
- Coutteau, P., Geurden, I., Camara, M.R., Bergot, P., Sorgelos, P. 1997. Review on the dietary effects of phospholipids in fish and crustacean larviculture. *Aquaculture*. 155, 149-164.
- Cuvier-Péres, A., & Kestemont, P. 2001. Development of some digestive enzymes in Eurasian perch larvae *Perca fluviatilis*. *Fish Physiology and Biochemistry*, 24(4), 279-285.
- Dabrowski, K., & Kozak, B. (1979). The use of fish meal and soyabean meal as a protein source in the diet of grass carp fry. *Aquaculture*, 18(2), 107-114.
- Dabrowski, K., 1984. The feeding of fish larvae: Present “state of the art” and perspectives. *Reprod. Nutr. Dev.*, 24:807-833

- Dabrowski, K. and D.A. Culver, 1991. The physiology of larval fish, digestive tract and formulation of starter diets. *Aquacult. Mag.*, 17: 49-61.
- Dixon, M. y E. Webb. 1979. *Enzymes*. 3a edición, Academic Press. New York.
- Díaz-López, M., F.J. Moyano-López, L.F. García-Carreño, F.J. Alarcón y M.C. Sarasquete. 1997. Substrate-SDS-PAGE determination of protease activity through larval development in sea bream. *Aquacult. Inter.* 5, 461-471.
- Dinis, M. T., F. Sores, L. Ribeiro y C. Sarasquete, 1997. Histochemistry of carbohydrates, proteins and lipids during swimbladder development in seabream, *Sparus aurata* and seabass,
- Divakaran, S., Kim, D.G., Ostrwski, A.C., 1999. Digestive enzymes present in Pacific threadfin *Poldactylus sexfiles* (Bloch an Schneider 1801) and bluefin trevally *Caranx melampygus* (Cuvier 1833). *Aquac. Res.* 30, 781-787.
- Dyer, B.S. Chernoff B. 1996. Phylogenetic relationships among atheriniform fishes (Teleostel: Atherinomorpha). *J. Zool Soc.* 69 p.
- Engen, P.C. 1968. Organogenesis in the walleye surfperch, *Hyperprosopon argenteum* (Gibbons). *Calif. Fish Game* 54, 156-169.
- Escaffre A.M., Zambonino Infante J.È.L., Cahu C.L., Mambrini M., Bergot P., Kaushik S.J. 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.
- Essed, Z. Fernández, F. Alarcón, F. Moyano, F. 2002. Caracterización de la actividad proteasa digestiva de atún rojo *Thunnus thynnus* (Linnaeus, 1758). Escuela Politécnica Superior. Universidad de Almería. La Cañada, España.
- Furné, M., Hidalgo, MC., Lopez, A., Garcia Gallego, M., Morales, A.E., Domezain, A. y Sanz, A., 2005. Digestive enzyme activities in Adriatic surgeon *Acipenser naccarii* and rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. A comparative study. *Aquaculture* 250,391-398.
- Gatesoupe, F.J. 1999. The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture* 180:147-165.
- Gal-Garber O. y Z. Uni. 2000. Chicken Intestinal Aminopeptidase: Partial Sequence of the Gene, Expression and Activity. *Poultry Science* 79:41-45.
- Galaviz, M. A., García-Ortega, A., Gisbert, E., López, L. M., & Gasca, A. G. (2012). Expression and activity of trypsin and pepsin during larval development of the spotted rose snapper *Lutjanus guttatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 161(1), 9-16.
- Gawlicka, A, Parent, B, Horn, M.H, Ross, N, Opstad, I, Torrissen, O.J. 2000. Activity of digestive enzymes in yolk-sac larvae of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*): indication of readiness for first feeding. *Aquaculture* 184: 303-314.

- Gomez-Gil, B., Roque, A. & Turnbull, J. F. 2000. The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms. *Aquaculture* 191, 259–270.
- Govoni, J.J. 1980. Morphological, histological and functional aspects of alimentary canal and associated organ development in larval *Leiostomus xanthurus*. *Rev. Can. Biol.* 39, 69-80.
- Govoni JJ., Boehlert GW., Watanabe Y. 1986. The physiology of digestion in fish larvae. *Environmental Biology of Fishes* 16 (1-3): 59-77.
- Guerreiro, I., de Vareilles, M., Pousão-Ferreira, P., Rodrigues, V., Dinis, M. T., & Ribeiro, L. 2010. Effect of age-at-weaning on digestive capacity of white seabream. *Diplodus sargus*. *Aquaculture*, 300(1), 194-205.
- Guillaume J, Kaushik S, Bergot P & Métailler R. 1999. Nutrition and Feeding of fish and crustaceans. INRA. UK. Pp. 35-45 y de la 247-249.
- Gisbert, E., Gimenez, G., Fernandez, I., Kotzamanis, Y., Estevez, A., 2009. Development of digestive enzymes in common dentex *Dentex dentex* during early ontogeny. *Aquaculture* 287, 381–387.
- Guija E., M. Soberón y H. Haak-Mares. 2007. Mecanismo de acción de las fosfatasa ácidas de bajo peso molecular. *An Fac Med* 68(4) Lima.
- 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.
- Harris, H. 1989. The human alkaline phosphatases: what we know and what we don't know. *Clin. Chim. Acta* 186, 133-150.
- Hamlin, H.J., I.H. Von Herbing y L.J. Kling. 2000. Histological and morphological evaluations of the digestive tract and associated organs of haddock throughout posthatching ontogeny. *J. Fish Biol.* 87, 716-732.
- Hakim Y, Rowland SJ, Guy JA, Mifsud C, Uni Z, Harpaz S. 2007 Effects of genetic strain and holding facility on the characteristics of alkaline phosphatase and brush border enzymes in silver perch (*Bidyanus bidyanus*). *Aquacul Res* 38:361–372
- Henning 1987. Nucleotide sequence of the gene for the peptidoglycan-associated lipoprotein of *Escherichia coli* K12. *Eur.J.Biochem.* 163:73-77
- Hernández-González M.A. 2011. Influencia de la disponibilidad de alimento sobre la actividad de las principales enzimas digestivas en larvas del Pez Blanco de Pátzcuaro (*Chirostoma estor*). Tesis de Licenciatura. Facultad de Biología Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Pp 39.
- Higgs, J. Dong, F. 2000. *Encyclopedia of Aquaculture*. New York, USA.
- Horn, M. H., Gawlicka, A. K., German, D. P., 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.

- Hubbs, C.L. 1958. *Dikellorhynchus* and *Kanazawaichthys*: nominal fish genera interpreted as base on prejuveniles of *Malacanthus* and *Antennarius*, respectively. *Copeia* 1958, 282-285
- Hjelmeland, K., Pedersen, B.H., Nilssen, E.M., 1988. Trypsin content in intestines of herring larvae, *Clupea harengus*, ingesting inert polystyrene spheres or live crustacea prey. *Marine Biology* 98, 331-335.
- Hoehne-Reitan, K. & E. Kjørsvik, 2004. Functional development of the liver and exocrine pancreas in teleost fish. *American Fisheries Society Symposium*, 40: 9–36
- 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(2):97-107 p.
- Jimenez-Martinez, L. D., Alvarez-González, C. A., Tovar-Ramírez, D., Gaxiola, G., Sanchez-Zamora, A., Moyano, F. J., ... & Palomino-Albarrán, I. G. (2012). Digestive enzyme activities during early ontogeny in Common snook (*Centropomus undecimalis*). *Fish physiology and biochemistry*, 38(2), 441-454.
- Kendall, Jr., A. W., E. H. Ahlstrom and H.G. Moser. 1984. Ontogeny and Systematics of fishes. Early life history stages of fishes and their characters. In: Moser, H.G., W. J. Richardson, D. M. Cohen, M. P. Fahay, A. W. Kendall, Jr., and S. L. Richardson (Eds.) *Amer. Soc. Ichthyol. Herpetol.*, Allen Press. Spec. Publ. 1, Lawrence, Kansas:1984.11-22.
- 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.
- Kvåle A., Mangor-Jensen A., Moren M., Espe M. & Hamre K. 2007 Development and characterisation of some intestinal enzymes in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) and Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) larvae. *Aquaculture* 264, 457-468.
- Kolkovski, S. 2001. Digestive enzymes in fish larvae and juveniles—implications and applications to formulated diets. *Aquaculture*, 200(1), 181-201.
- Kolkovski, S., 2006. Amino acids as feed attractants for marine fish larvae. *World Aquaculture Symposium*, 2006. Florence, Italy.
- Kurokawa, T., Suzuki, T. 1998. Development of intestinal brush border aminopeptidase in the larval Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture* 162, 113-124.
- Kubitza, F.; Cyrino, J.E.P.; ONO, E.A. 1998. Rações comerciais para peixes no Brasil: situação atual e perspectivas. *Panorama da Aqüicultura*. v.8, p.38-49, 1998
- Lauff, M. & Hofer, R. 1984. Proteolytic enzymes in fish development and the importance of dietary enzymes. *Aquaculture*, 37: 335-346.
- Lazo, J.P., Dinis, M.T., Holt, G.J., Faulk, C. & Arnold, C.R. 2000. Co-feeding microparticulate diets with algae: toward eliminating the need of zooplankton at first feeding in larval red drum (*Sciaenops ocellatus*). *Aquaculture*, 188:339-351.

- Le Huërou-Luron I, Peiniau J., Guilloteau P., Aumaitre A. 2000. Are the activities of intestinal pepsidases age- and diet-dependent in piglets? In: The 8th International Symposium on Digestive Physiology in Pigs. Uppsala, Sweden. Lindberg J.E., Ogle B.: 20-22
- Lluch Cota, S.E. 1995. Variación espacio temporal de pigmentos fotosintéticos en el Golfo de Tehuantepec derivados de datos de satélite (CZCS). Tesis de Maestría. La Paz, Baja California Sur, México, Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas. 68 p
- Liu ZY, Wang Z, Xu SY, Xu LN 2008. Partial characterization and activity distribution of proteases along the intestine of grass carp, *Ctenopharyngodon idella* (Val.). *Aquac Nutr* 14:31–39
- Liu, W., Zhang, X.-M., Wang, L.-B., 2010. Digestive enzyme and alkaline phosphatase activities during the early stages of *Silurus soldatovi* development. *Zoological Research* 31, 627–632.
- López-Ramírez, G., C.A. Cuenca-Soria, C.A. Álvarez-González, D. Tovar-Ramírez, J.L. Ortiz-Galindo, N. Perales-García, G. Márquez-Couturier, L. Aris-Rodríguez, J.R. Indy, W.M. Contreras-Sánchez,
- E. Gisbert and F.J. Moyano. 2010. Development of digestive enzymes in larvae of Mayan cichlid *Cichlasoma urophthalmus*. **Fish Physiol. Biochem.** Doi:10.1007/s10695-010-9431-6.
- Luizi F.S., Gara B., Shields R.J. and Bromage N.R. 1999. Further description of the development of the digestive organs in Atlantichalibut (*Hippoglossus hippoglossus*) larvae, with notes on differential absorption of copepod and *Artemia* prey. *Aquaculture* 176, 101-116.
- Ma, H, Cahu, C, Zambonino J, Yu H, Duan Q, Le Gall M.M, Mar K. 2005. Activities of selected digestive enzymes during larval development of large yellow croaker (*Pseudoscia nacrocea*). *Aquaculture*. 245: 239- 248.
- Maroux S., Louvard D., Baratti J. 1973 .The aminopeptidases from hog-intestinal brush border. *Biochem. Biophys. Acta*, 321:282-295.
- Martínez-Lagos, R., Tovar-Ramírez, D., Gracia-López, V., & Lazo, J. P. (2014). Changes in digestive enzyme activities during larval development of leopard grouper (*Mycteroperca rosacea*). *Fish physiology and biochemistry*, 40(3), 773-785.
- Martínez-Palacios C.A, Ríos-Durán M.G, Campos-Mendoza A, Toledo-Cuevas E.M, Aguilar-Valdéz M.C, Ross L.G. 2002. Desarrollo tecnológico alcanzado en el cultivo del pez blanco de Pátzcuaro. *Avances en el cultivo del pez blanco*. SAGARPA. pp169-189.
- Martínez-Palacios C.A., Comas Morte J., Tello-Ballinas J.A., Toledo-Cuevas M. & Ross L.G. 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.
- Martínez, Palacios C. A., Racotta I. S., Ríos-Duran M.G., Palacios E., Toledo-Cuevas E. M. and Ross L. G. 2006. Advances in applied research for the culture of Mexican silversides (*Menidia*, Atherinopsidae). *Biocell*, 30(1):137-148.

- Martínez-Palacios, C.A., Rios-Duran, M. G., Fonseca-Madrigal, J., Toledo-Cuevas, E.M., Sotelo-Lopez., A., G., Ross, L. 2008. Developments in the nutrition of *Menidia estor* Jordan 1880. *Aquaculture Research*, 2008, 39, 738-747.
- Morelos, M. G., Segura, V., Chacón, A., 1994. Desarrollo embrionario del pez blanco de Pátzcuaro *Chirostoma estor* Jordan 1873 (Pisces: Atherinidae). *Zoología Informa*,
- Morais, S., Cahu, C., Zambonino - Infante, J.L., et al. 2004. Dietary TAG source and level affect performance and lipase expression in larval sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Lipids* 39 : 449 – 458.
- Moyano, F. J., Díaz, M., Alarcón, F. J., Sarasquete, M. C., 1996. Characterization of digestive enzymes activity during larval development of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Fish Physiol. Biochem.* 15: 121-130.
- Moyano FJ, Barros AM, Prieto A, Cañavate JP, Cárdenas. 2006. Evaluación de la ontogenia de enzimas digestivas en larvas de hurta, *Pagrus auriga* (Pisces: Sparidae). *Aqua* 22:39-47
- Munilla-Moraín R, Stark JR 1990. Metabolism in marine flatfish—VI. Effect of nutritional state on digestion in turbot, *Scophthalmus maximus* (L.). *Comp Biochem Physiol* 95B(3):625-653
- 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.
- Nicholson JA., Kim YS. 1975. A one-step L-amino acid oxidase assay for intestinal peptide hydrolase activity. *Anal. Biochem.* 63:110-117. *Physiol. Bioch.* 18:59-69. sea bream. *Aqu. Inter.* 5 (5):461-471.
- Oseguera, L., 1990. Caracterización morfológica de estadios embrionarios y juveniles de *Chirostoma grandocule* Steindachner (1896) y verificación del híbrido con *Chirostoma attenuatum* Meek (1902) del lago de Pátzcuaro, Mich., México. Tesis Profesional. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Escuela de Biología. Morelia, Michoacán. 65 p.
- Parra, O., S. Basualto, R. Urrutia & C. Valdovinos. 1999. Estudio comparativo de la diversidad fitoplanctónica de cinco lagos de diferentes niveles de eutroficación del área litoral de la región del Biobio (Chile). *Gayana botánica* 56(2): 93-108.
- Pedersen, B.H. y K.P. Andersen. 1992. Induction of trypsinogen in herring larvae (*Clupeaharengus*). *Mar. Biol.* 112. 559-56.
- Piedras S.R.N. & Pouey J.L.O.F. 2005. Alimentação do peixe (*Odontesthes bonariensis*, Atherinopsidae) nas lagoas Mirim e Mangueira, Rio Grande do Sul, Brasil. *Iheringia, Série Zoologia* 95, 117-120
- Portella MC, Tasser MB, Jomori RK, Carneiro DJ. 2002. Substituição do Alimento Vivo na Larvicultura. In: *Memorias de Simpósio Brasileiro de Aquicultura, 2002, Goiânia –Go. Anais; Goiânia: ABRAQ, 2002.*
- Planas, M. and Cunha, I. 1999. Larviculture of marine fish: problems and perspectives. *Aquaculture*, 177: 171-190.
- Pradhan, P. K., Jena, J., Mitra, G., Sood, N., & Gisbert, E. 2013. Ontogeny of the digestive enzymes in butter catfish *Ompok bimaculatus* (Bloch) larvae. *Aquaculture*, 372, 62-69.

- Ribeiro, L., J.L. Zambonino-Infante, C. Cahu. y M.T. Dinis. 1999. Development of digestive enzymes in larvae of *Solea senegalensis*, Kaup 1858. *Aquaculture* 170, 465-473.
- Ribeiro L, Zambonino-Infante JL, Cahu CL, Dinos MT 2002. Digestive enzymes profile of *Solea senegalensis* post larvae fed *Artemia* and a compound diet. *Fish Physiol Biochem* 27:61-69
- Ríos-Durán, M. G. 2000. Actividad proteolítica en larvas de pez blanco *Chirostoma estor* copandaro (Pices: Atherinidae): Implicaciones para su cultivo. Tesis de maestría. U.M.S.N.H. 53p.
- Rønnestad, I., W.M. Koven, A. Tandler, M. Harel and H.J. Fyhn, 1994. Energy metabolism during development of eggs and larvae of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Mar. Biol.*, 120: 187-196.
- Rønnestad, I., C.R. Rojas-García, S.K. Tonheim y L.E.C. Conceição. 2001. In vivo studies of digestion and nutrient assimilation in marine fish larvae. *Aquaculture* 201, 161-175.
- Rosenlund, G., & Halldórsson, Ó. 2007. Cod juvenile production: research and commercial developments. *Aquaculture*, 268(1), 188-194.
- Ross L.G, Martínez-Palacios C.A, Aguilar M.C, Beveridge M.C.M., Chavez S.M.C. 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 *Chirostoma estor estor* Jordan 1880. *Journal of Fish Biology* 68: 1-13
- Ruiz A.E. 2005 Biología del pejerrey patagónico, *Odontesthes hatcheri* (Eigenman, 1909) Dyer, 1993, en el embalse Florentino Ameghino, Chubut, Argentina. *Naturalia patagónica* 2, 118-121.
- Sipaúba-Tavares, L. H., A. F. Barros, and F. M. De Braga. 2003. Effect of macrophyte in the water quality in fishpond. *Acta Scientiarum*, 25:101-106.
- Solórzano, P. A. 1963. Algunos aspectos biológicos del pescado blanco del Lago de Pátzcuaro, Michoacán. México DF: Secretaría de Industria y Comercio. Dirección General de Pesca.
- Srichanun, M., Tantikitti, C., Vatanakul, V., & Musikarune, P. (2012). Digestive enzyme activity during ontogenetic development and effect of live feed in green catfish larvae (*Mystus nemurus* Cuv. & Val.). *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 34(3), 247-54.
- Stroband, H.W.J. y K.R. Dabrowski. 1981. Morphological and physiological aspects of the digestive system and feeding in fresh-water fish larvae. pp. 355-374. En: M. Fontaine, (Ed.). *Nutrition des Poissons*. C.N.R.S. Paris
- Suzer, C., Aktülün, S., Çoban, D., Okan Kamacı, H., Saka, Ş., Fırat, K., & Albaz, A. 2007. Digestive enzyme activities in larvae of sharpnose seabream (*Diplodus puntazzo*). *Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 148(2), 470-477.
- Tocher, D. R., Bell, J. G., McGhee, F., Dick, J. R., & Fonseca-Madrugal, J. 2003. Effects of dietary lipid level and vegetable oil on fatty acid metabolism in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) over the whole production cycle. *Fish Physiology and Biochemistry*, 29(3), 193-209.

- Toledo-Cuevas M, Moyano L.F.J, Tovar-Ramírez D, Álvarez-González C.A, Strüssman C, Martínez-Chávez C. C, Martínez-Palacios C. A. 2011. Development of digestive biochemistry in the initial stages of three cultured Atherinopsids. Scholar One Manuscript Central. Aquaculture Research. 1-11. doi:10.1111/j.1365-2109.2011.02853.x.
- Toledo-Cuevas, E.M., Herrera-Vargas, M.A., Strüssmann, C.A., Tovar-Ramírez, D., Fonseca Madrigal, J., Nolasco Soria, H., Martínez-Palacios, C.A., Chávez-Sánchez, M.C. 2014. Maduration of the digestive system of two agastric species: the south american atherinopsidae pejerrey *Odontesthes bonariensis* and *O. hatchery* (En preparación).
- Tong, X.H., Xu, S.H., Liu, Q.H., Li, J., Xiao, Z.Z., Ma, D.Y., 2013. Stages of embryonic development and changes in enzyme activities in embryogenesis of turbot (*Scophthalmus maximus* L.). Aquaculture International 21, 129–142.
- Uscanga-Martínez, A., Perales-García, N., Álvarez-González, C. A., Moyano, F. J., Tovar-Ramírez, D., Gisbert, G. E., ... & Indy, J. R. 2011. Changes in digestive enzyme activity during initial ontogeny of bay snook *Petenia splendida*. *Fish physiology and biochemistry*, 37(3), 667-680.
- Vu, T.T. 1976. Étude du développement du tube digestif des larves de bar *Dicentrarchus labrax*(L.). Arch. Zool. Exp. Gen. 117, 493-509.
- Watanabe, T. y N. Sawada. 1985. Larval development of digestive organs and intestinal absorptive functions in the freshwater goby *Chaenogobius annularis*. Bull. Tohoku Reg. Fish. Res. Lab. 37, 1-10.
- Walford, J., Lam, T. J., 1993. Development of digestive tract and proteolytic enzyme activity in seabass (*Late calcarifer*) larvae and juveniles. Aquaculture, 109: 187-205.
- Yang, R., Xie, C., Fan, Q., Gao, C. and Fang, L. 2010. Ontogeny of the digestive tract in yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco* larvae. Aquaculture. 302, 112-123.
- Zambonino-Infante J.L. y Cahu C. 1994. Development and responses to a diet change of some digestive enzymes in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. Fish Physiol. Biochem. 12: 399-408.
- Zambonino-Infante, J.L. y C.L. Cahu. 2001. Ontogeny of the gastrointestinal tract of marine fish larvae. Comp. Biochem. Physiol. 130C, 477-487.
- Zambonino J. L. & Cahu C. 2007. Dietary modulation of some digestive enzymes and Metabolic processes in developing marine fish: Applications to diet formulation. *Aquaculture*, 268(1-4), 98-105
- Zambonino-Infante, J., Gisbert, E., Sarasquete, C., Navarro, I., Gutiérrez, J., Cahu, C.L., 2009. Ontogeny and physiology of the digestive system of marine fish larvae. In: Cyrino, J.E.O., Bureau, D., Kapoor, B.G. (Eds.), Feeding and Digestive Functions of Fish. Science Publishers, Inc, Enfield, USA, pp. 277–344.
- Zouiten, D, Khemis, I. B. Besbes, R. Cahu, C. 2008. Ontogeny of the digestive tract of thick grey mullet (*Chelon larosus*) larvae reared in “mesocosms”. Aquaculture 279, 166-172.

