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

TRABAJO DE TESIS

Expresión génica de las principales enzimas digestivas del pez blanco de Pátzcuaro, *Chirostoma estor,* durante su desarrollo larvario y juvenil.

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA**:**
IBQ. NANCY KARINA RIVERA DURÁN

DIRECTORA DE TESIS:
DRA. ELVA MAYRA TOLEDO CUEVAS

CODIRECTOR:
DR. DARIEL TOVAR RAMÍREZ (CIBNOR).

MORELIA, MICHOACÁN AGOSTO DEL 2016

DEDICATORIA

El presente trabajo va dedicado especialmente a mis queridos padres: Cirenia Durán y Juan Rivera, por su amor, trabajo y sacrificios todos estos años. Gracias a ustedes he logrado llegar hasta aquí.

A mis hermanos: Yeni, Paty, Juan, Diana, Sonia y Gerardo, porque siempre están allí con palabras de aliento cuando más se necesitan. Porque durante esta etapa, hemos compartido los buenos y malos momentos, como vencer el cáncer de Papá. Gracias!

A mis sobrinos: Tania, Miriam, Cesar, Jonathan, Fátima, Heidi, Neydi, Jimena, Maryam y la pequeña Itzayana; quienes son la alegría de la familia y enseñarme lo maravillosa que es la vida.

AGRADECIMENTOS

A Dios, por ser mi guía y llenarme de bendiciones, con cada una de las personas que estuvieron conmigo durante esta etapa de mi vida.

A mi directora de tesis, la Dra. E. Mayra Toledo Cuevas, por la oportunidad de ser su estudiante y brindarme su amistad. Por compartir conmigo de sus conocimientos. Por su tiempo, esfuerzo y dedicación para la realización de este trabajo.

A mi codirector de tesis, el Dr. Dariel Tovar Ramírez, por brindarme su amistad. Por siempre mantener el optimismo, compartir sus conocimientos y sus consejos durante la fase experimental.

A los Doctores: María Gisela Ríos Durán, Juan José Valdez Alarcón y Carlos Cristian Martínez Chávez por ser parte de mi comité tutoral y sus aportaciones para enriquecer este proyecto.

Al CONACYT, por el otorgamiento de la beca para manutención y, la beca mixta para la realización de la primera estancia de movilidad nacional.

Al PIFI por el apoyo económico para cubrir los gastos de traslado para la segunda estancia de investigación en el CIBNOR, La Paz, B.C.S.

Al fondo SEP-CONACYT, por el otorgamiento de la beca para la finalización del presente trabajo de investigación.

Al Dr. Daniel Godínez y M.C. Lindsay Platas por la ayuda otorgada en la parte del análisis estadístico, aunque este no es presentado en la tesis.

A los técnicos: Paty Hinojosa, Sibila Santos, Jesús y Lupita que siempre estuvieron al pendiente cuando los necesite y compartir de sus conocimientos.

Al M.C. Guillermo Corona por su colaboración y proporcionarme algunas secuencias de genes que fueron utilizadas en este proyecto.

A mis amigos de la maestría y amigos de las dos estancias en La Paz: Eduardo, Eugenio, Liz, Lupita, Anel, Cristela, Yesi, Mirtha, Yoo, Andressa y Carlos. Por las veces en las que me estuvieron ayudando y dando ánimos cuando los necesitaba.

Finalmente agradezco a mi familia, que siempre está presente en los momentos más importantes para mí.

CONTENIDO

1. RESUMEN 1

2. ABSTRAC 2

3. INTRODUCCIÓN 3

4. ANTECEDENTES 5

4.1. Ontogenia del sistema digestivo en peces 5

4.2. Expresión de genes de enzimas digestivas 9

4.2.1. Enzimas digestivas del estómago (peces gástricos) 9

4.2.2. Enzimas digestivas pancreáticas 10

4.2.3. Enzimas digestivas intestinales 12

4.3. Estudios sobre la bioquímica digestiva de *Chirostoma estor* 15

5. HIPÓTESIS 18

6. OBJETIVOS 19

6.1. Objetivo General 19

6.2. Objetivos Particulares 19

7. MATERIALES Y MÉTODOS 20

7.1. Obtención y mantenimiento de los organismos experimentales 20

7.2. Muestreos 21

7.3. Análisis biométricos 22

7.4. Extracción de RNA y síntesis de cDNA 22

7.5. Diseño de oligonucleótidos específicos 23

7.6. PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) 25

7.7. PCR de Punto Final de Amilasa. 26

7.8. Correlaciones 27

8. RESULTADOS 28

8.1. Parámetros fisicoquímicos del agua de los sistemas de cultivo 28

8.2. Crecimiento y supervivencia de los organismos 28

8.3. RNAs utilizados para la obtención de oligonucleótidos específicos y para la qPCR. 30

8.4. Expresión génica de enzimas pancreáticas 32

8.5. Expresión génica de enzimas intestinales 36

9. DISCUSIÓN 40

10. CONCLUSIONES 51

11. ANEXO 1 52
12. ANEXO 2 57
13. BIBLIOGRAFÍA 59

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Anatomía tisular del intestino (consulta en internet julio 2016)……..……...7

Figura 2. Esquema de alimentación durante el cultivo del pez blanco, hasta los 160 dpe……21

Figura 3. Esquema de trabajo para la qPCR en tiempo real…….23

Figura 4. Crecimiento durante el desarrollo larvario y juvenil del pez blanco de Pátzcuaro, *C. estor*. Promedio ± desviación estándar (DS); n=10……..29

Figura 5. Factor de condición durante el desarrollo larvario y juvenil del pez blanco de Pátzcuaro, *C. estor*. n=10…….……..…..……..29

Figura 6. Electroforesis de RNA total de pez blanco, en gel de agarosa al 1.2%, utilizado para la obtención de fragmentos de amplificación, que tras ser secuenciados, permitirían el diseño de oligos específicos; M, marcador de peso molecular……..…..30

Figura 7. Amplificación por PCR de distintos genes, a partir de un pool de cDNA de peces blancos. a) EF1y CNDP2; b) EF1, GAPDH, Amilasa (AMI) y APN; M, marcador de peso molecular. Gel de agarosa al 1.2%.....31

Figura 8. Electroforesis de RNA total obtenido durante la ontogenia de peces blancos, en gel de agarosa al 1.5%.....31

Figura 9. Análisis de estabilidad de los genes de referencia, de acuerdo al software RefFinder. EF1α, factor de elongación; GAPDH, gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa; RPL5, proteína ribosomal L5. Hacia la izquierda se muestran los genes más estables y hacia la derecha los menos estables……..32

Figura 10. Expresión relativa normalizada de genes de enzimas digestivas pancreáticas, durante el desarrollo larvario y juvenil del pez blanco *Chirostoma estor*. Los valores son promedios ± desviación estándar (DS) de cuatro réplicas técnicas de un pool de organismos de cada edad, P ≤ 0.05). Las letras representan las diferencias estadísticas a lo largo del desarrollo……..……33

Figura 11. Expresión relativa normalizada de mRNA de la amilasa pancreática, durante el desarrollo larvario y juvenil del pez blanco *Chirostoma estor*. Los valores son promedios ± desviación estándar (DS) de cuatro réplicas técnicas de un pool de organismos de cada edad. P ≤ 0.05). Las letras representan las diferencias estadísticas a lo largo del desarrollo……..35

Figura 12. Amplificación del cDNA de amilasa durante el desarrollo del pez blanco, evaluada mediante RT-PCR. Gel de agarosa al 1.5% Los números en la parte superior indican la edad de los organismos, en días después de la eclosión. M, marcador de 100pb……35

Figura 13. Expresión relativa normalizada de genes de enzimas digestivas intestinales, durante el desarrollo larvario y juvenil del pez blanco *C. estor*. Los valores son promedios ± desviación estándar (DS) de cuatro réplicas técnicas de un pool de organismos de cada edad. (P ≤ 0.05). Las letras representan las diferencias estadísticas a lo largo del desarrollo……..37

Figura 14. Evolución comparativa de los diferentes mRNA de las enzimas intestinales durante el desarrollo larvario y juvenil del pez blanco. APN, Leucin aminopeptidasa; CNDP2, dipeptidasa citosólica no específica; Fac, Fosfatasa ácida; FAlc, Fosfatasa alcalina. Los valores son promedios ± desviación estándar de las cuatro réplicas técnicas, de un pool de organismos de cada edad……..……..……..…39

Figura 15. Curva estándar de amplificaciones a partir de diluciones seriadas de cDNA de los genes de referencia; EF1, GAPDH y RPL5 con concentración conocida.n=4.52

Figura 16. Curva estándar de amplificaciones a partir de diluciones seriadas de cDNA de Amilasa (amy) y Fosfatasa acida (Pac) con concentración conocida. n=4……...52

Figura 17. Curva estándar de amplificaciones a partir de diluciones seriadas de cDNA de lipasa act. por sales biliares (BAL) y Quimotripsina (CHY) con concentración conocida. n=4……...53

Figura 18. Curva estándar de amplificaciones a partir de diluciones seriadas de cDNA de Leucina aminopeptidasa (APM), Tripsina (TRY) y Lipasa pancreática (LIP) con concentración conocida. n=4……..…….53

Figura 19. Curva estándar de amplificaciones a partir de diluciones seriadas de cDNA de Dipeptidasa citosólica no específica (CNDP2) con concentración conocida.n=4..54

Figura 20. Curva de disociación de los cuadruplicados de los genes de referencia; (a) GAPDH, (b) RPL5 y (c) EF1α. Se observa la amplificación de específica de un solo producto de PCR y la ausencia de dímeros de primer y amplificaciones inespecíficas…….…….54

Figura 21. Curva de disociación de los cuadruplicados de los genes de enzimas pancreáticas; (a) BAL, (b) Lipasa, (c) Quimotripsina, (d) Tripsina y (e) Amilasa. Se observa la amplificación de específica de un solo producto de qPCR y la ausencia de dímeros de primer y amplificaciones inespecíficas…….……..…...55

Figura 22. Curva de disociación de los cuadruplicados de los genes de enzimas de membrana de borde de cepillo; (a) LAP y (b) FAlc. Se observa la amplificación de específica de un solo producto de qPCR y la ausencia de dímeros de primer y amplificaciones inespecíficas……..……56

Figura 23. Curva de disociación de los cuadruplicados de los genes de enzimas de citosolicas; (a) CNDP2 y (b) FÁcida. Se observa la amplificación de específica de un solo producto de qPCR y la ausencia de dímeros de primer y amplificaciones inespecíficas……..56

1. RESUMEN

El pez blanco, *Chirostoma estor,* es una especie nativa del lago de Pátzcuaro. Aunque ya se ha logrado su cultivo, existen limitantes para escalarlo a nivel comercial y una de ellas es el contar con dietas balanceadas *ad hoc* y acordes a sus necesidades durante la ontogenia. Los estudios de fisiología digestiva existentes han contribuido a lograr este objetivo, pero poco se sabe del modelo y la temporalidad del proceso de maduración digestiva en peces con las características digestivas del pez blanco, agástricos y con un intestino corto, sin compensaciones anatómicas aparte de sus dientes branquiales adecuados para su hábito alimenticio zooplanctívoro. Por tal motivo, en este trabajo se estudió el perfil de expresión de las principales enzimas digestivas a lo largo del desarrollo larvario y juvenil, para contribuir a definir el modelo y temporalidad de la maduración digestiva del Pez Blanco. Los organismos fueron cultivados en la planta de producción de pez blanco del IIAF-UMSNH por 160 días, mantenidos solo con alimento vivo para evitar afectar el proceso de maduración digestiva. La cuantificación de los niveles de expresión génica fue realizada por la técnica de PCR en tiempo real. La expresión de todas las enzimas, tanto pancreáticas como intestinales, fue medida desde el momento de la eclosión. Los niveles de mRNA de tripsina aumentan del día 0 a los 80 días post-eclosión (dpe) y posteriormente disminuyen y fluctúan. Los niveles de mRNA de quimotripsina no varían durante el desarrollo y solo se incrementan en el día 60 dpe. Adicionalmente, casi durante toda la ontogenia del pez blanco, se detectó más del doble de mRNA de tripsina que de quimotripsina. La lipasa pancreática y la activada por sales biliares mostraron patrones de expresión muy similares, incrementándose a partir del día 0 hasta el 60 dpe, disminuyendo posteriormente. Los niveles de expresión de amilasa aumentaron durante el desarrollo, aunque esto coincidió con la posible presencia de isoformas de la enzima. La expresión de las fosfatasas alcalina y ácida también se incrementó durante el desarrollo; mientras que los niveles de mRNA de la leucina aminopeptidasa y la citosólica no específica (CNDP2) se mantuvieron constantes durante el desarrollo, con incrementos significativos en el día 60 y 80 (CNDP2), respecto del día 0. Los datos de expresión de enzimas citosólicas y membranales no lograron aportar indicios concluyentes de maduración intestinal. No obstante, la evolución comparativa de las diferentes cantidades de mRNA de las enzimas intestinales, durante el desarrollo larvario y juvenil, sugieren cambios en la funcionalidad del intestino, que deben ser confirmados con estudios de actividad digestiva. Adicionalmente, los resultados sugieren que la expresión de las enzimas citosólicas es activa al inicio del desarrollo, lo que junto con el inicio de la expresión de todas las principales enzimas digestivas analizadas sugiere que el organismo se está preparando para poseer un equipamiento enzimático con un amplio espectro. Finalmente, la alta correlación positiva entre fosfatasa alcalina (FAlc) y fosfatasa ácida (FAc), sugiere un tipo de compensación en su capacidad digestiva, manteniendo toda la actividad digestiva posible durante su desarrollo.

Palabras clave: Pez Blanco, agástrico, expresión génica, enzimas digestivas, ontogenia

2. ABSTRAC

The freshwater *Chirostoma estor* it's a native species from the Lake of Patzcuaro in Michoacan, Mexico. Although it's crop has achieved there are limitations to scale commercially, one of them is about having *ad hoc* balanced diets according to their needs during ontogeny.The research on digestive physiology have contributed to achieving this goal, but the pattern and timing of the divestive maduration is little known in fishes with digestives features as *C. estor*, like: no-stomach, short intestine, without anatomical offset, besides it's suitable branchial teeth for zooplanctivorous feeding. Therefore, in this research the expression profile of the main digestive enzymes along the larval and juvenile growth was studied, to help define the pattern and timing of digestive maduration on *C. estor*. The organisms were grown in the *C. estor* production plant of IIAF-UMSNH for 160 days, fed only with alive food to avoid affecting digestive maduration. Quantification of gene expression levels was performed by real time PCR. The expression of all enzymes, both pacreatic and intestinal was measured from hatching. The mRNA levels of trypsin increased from day 0 to 80 day post hatching (dph) and subsequently decreased and fluctuated. The mRNA levels of chymotrypsin not vary during growth and just increased on the 60 dph. Additionally, almost during entire ontogeny of *C. estor*, trypsin mRNA was detected more than twice chymotrypsin mRNA. Pancreatic lipase and biliar salt lipase (BAL) shown expession patterns too similar, increased from day 0 to 60 dph, decreased afterwards. The expession levels of amylase increased during growth, even tough this coincided with the possible presence of enzyme isoforms. The acid and alkaline phosphatases expression also increased during growth; whereas mRNA levels of the leucine-aminopeptidase and nonspecific cytosolic (CNDP2) were kept constant during growth, with significative increases at days 60 and 80, relative to day 0. Expression data of cytosolic and membrane enzymes failed to provide evidence of intestinal maduration. Nevertheless, the comparative evolution of different amounts of mRNA from intestinal enzymes, during larval and juvenil growth suggest changes in the gut function; this must be confirmed with digestive activity research. In addition, results suggest that cytosolic enzyme expression is active at the beggining of growth, which with the expression of main digestive enzymes analyzed suggest that organism is preparing to have an enzymatic equipment with broad spectrum. Finally, the high positivecorrelation between alkaline phosphatase (FAlc) and acid phosphatase (FAc) suggest a compensation in it's digestive capacity, keeping all digestive activity during growth.

Keywords: Freshwater, stomachless, gene expression, digestive enzymes, ontogeny

3. INTRODUCCIÓN

La acuicultura, definida como el cultivo de organismos acuáticos, cuyo desarrollo se basa en la ciencia, cada vez está recibiendo más atención puesto que atiende aspectos prioritarios, como la seguridad alimentaria, la reducción de la pobreza y garantiza la sostenibilidad ambiental. Se han registrado cerca de 567 especies acuáticas que se cultivan en todo el mundo y es el sector de producción de alimentos de más rápido crecimiento. El 50% de pescado que se consume a nivel mundial procede de la acuicultura (FAO, 2014).

En México, la acuicultura se ha desarrollado desde hace varias décadas; su práctica disminuye la importación de productos acuícolas y constituye una fuente de empleo y divisas (CONAPESCA, 2016). México cuenta con una gran biodiversidad de especies de peces. Dentro de esa diversidad se estima que el 57% de las 507 especies dulce acuícolas son endémicas (http://www.ib.unam.mx/cnpe/conservacion/especies-endemicas) y algunas son explotadas a través de las pesquerías y ofrecidas comercialmente en los mercados locales. Una de ellas es *Chirostoma estor*, comúnmente conocida como pescado blanco, la cual pertenece a la familia Atherinopsidae. *Chirostoma estor* es una especie endémica del lago de Pátzcuaro, ubicado en el estado de Michoacán, que cuenta con una gran importancia económica, social, cultural y ecológica. Desde hace varios años se ha reportado una severa disminución en sus poblaciones, por factores tales como la sobrepesca y el deterioro ambiental. Por este motivo desde hace más de 15 años se han realizado diversos estudios, que han culminado en su cultivo a escala piloto. Sin embargo, aún se cuenta con varios retos a resolver, siendo uno de los mayores el desarrollar protocolos óptimos de alimentación (Martínez-Palacios *et al.,* 2008), que promuevan mayores crecimientos y supervivencias de los peces.

Durante el desarrollo larvario y juvenil los peces presentan cambios morfológicos y fisiológicos en varios de sus sistemas, siendo de los más

importantes, los que ocurren en el sistema digestivo. Dichos cambios finalizan con la maduración digestiva, que es el momento en el que los organismos alcanzan su máxima capacidad digestiva, comparable a la del estadio adulto. El conocimiento del modelo y la temporalidad de este proceso de maduración contribuye al desarrollo de dietas *ad hoc* para las especies, y a lograr destetes (cambio del alimento vivo por alimento balanceado) más tempranos, reduciendo costos de producción en el cultivo (Aguilera, 2009). El conocimiento de dichos eventos puede ser logrado a través de estudios de bioquímica y fisiología digestiva, relacionados con estudios histológicos. No obstante, cada vez es más frecuente la incorporación de técnicas de biología molecular, que en conjunto con las otras técnicas permiten un mejor entendimiento de la funcionalidad del sistema digestivo y de los efectos de los nutrientes de las dietas sobre el crecimiento de los peces, entre otros aspectos.

A pesar de que se han realizado varios estudios en el pez blanco, para conocer el modelo y la temporalidad de dicho proceso de maduración digestiva (Toledo-Cuevas *et al.,* 2011; Hernández-González, 2014), éste aún no se ha logrado conocer con precisión. Esto seguramente influenciado por las características digestivas particulares de la especie, un pez agástrico, con dientes faríngeos, adecuados para su hábito zooplanctívoro y con un intestino corto, que carece de órganos o estructuras compensatorias (intestino grueso, ciegos pilóricos; Ross *et al.,* 2006).

Por tal motivo, en este trabajo se estudió el perfil de expresión génica de los precursores de las principales enzimas digestivas, pancreáticas e intestinales, para contribuir a definir el modelo y temporalidad de la maduración digestiva del Pez Blanco. Dado que el momento del destete durante el desarrollo de los organismos, así como el tipo de alimento influencian el proceso de maduración digestiva (Zambonino-Infante y Cahu, 2010), este estudio se realizó alimentando a los organismos solo con alimento vivo.

4. ANTECEDENTES

4.1. Ontogenia del sistema digestivo en peces

La mayor parte de la información publicada sobre el desarrollo anatómico, morfológico y funcional del sistema digestivo de los peces se centra en aquellas especies que son importantes para la acuicultura marina (Zambonino-Infante y Cahu, 2001; Zambonino-Infante *et al*., 2008; Holt, 2011). Los estudios de la ontogenia del tracto digestivo se basan en técnicas histológicas y bioquímicas, aunque en los últimos años estos estudios se han realizado simultáneamente con técnicas de biología molecular, permitiendo conocer los patrones de expresión temporal de los genes que están implicados en el desarrollo y la función del sistema digestivo.

Al eclosionar los peces marinos de ontogenia indirecta (es decir, aquellos que nacen con un sistema digestivo aún no completamente desarrollado), en su mayoría, presentan un tubo digestivo recto e indiferenciado. Posteriormente, durante el estadio larvario y juvenil, se llevan a cabo una serie de cambios que conducen a la diferenciación de regiones y órganos del sistema digestivo, como son la cavidad orobranquial, la faringe, el esófago, el hígado, el páncreas, los ciegos pilóricos, el intestino y el estómago. En el caso de los peces de agua dulce, que tienen un desarrollo de ontogenia directa, como los cíclidos, se presenta un desarrollo embrionario relativamente largo (los huevos tienen gran cantidad de vitelo) y al eclosionar sus tractos digestivos están relativamente completos, funcionales y listos para la alimentación exógena (Kendall *et al*., 1984).

Los cambios que se llevan a cabo en el sistema digestivo son prácticamente los mismos para todas las especies de peces (Zambonino *et al*., 2008). Sin embargo, varía la temporalidad de los eventos. Cortes-Ortiz (2016), describe el desarrollo del sistema digestivo de dos miembros de la familia Atherinopsidae (a la cual pertenece el pez blanco y los pejerreyes sudamericanos

Odontesthes bonariensis y *O. hatcheri*). A pesar de ser peces agástricos, los cambios encontrados son los mismos que para peces gástricos. Durante el desarrollo larvario, el esófago aparece como un ducto corto y rudimentario, que conecta la región posterior de la faringe con el intestino anterior (o el estómago, para el caso de los peces gástricos). Posteriormente, el esófago se alarga y expande con pliegues (criptas) hacia el lumen y la mucosa muestra en su epitelio estratificado una mayor cantidad de células de moco (células caliciformes), como se ha observado en el día 4 dpe para ambas especies de pejerrey. La presencia de estas células es una característica de diferenciación y funcionalidad, puesto que son las encargadas de la secreción de moco, que sirve como lubricante y es considerado útil para la digestión del alimento. En algunas especies marinas, como en la tenguayaca, *Petenia splendida* (Álvarez-González *et al.*, 2008) las células caliciformes son detectadas cuando ocurre la apertura de la boca o antes de la alimentación exógena. Mientras que en otras especies, como en el lenguado de California *Paralichthys californicus* (Gisbert *et al.,* 2004a) y el sargo *Diplodus sargus* (Ortiz-Delgado *et al.*, 2003), estas células son detectadas tiempo después, durante el desarrollo.

El intestino es la sección mayor del tracto digestivo y es el principal sitio de digestión y absorción de nutrientes. Al momento de la eclosión, en los peces de ontogenia indirecta, el intestino es un tubo recto e indiferenciado (Santamaria *et al.,* 2004; Ibrahim *et al.,* 2006; Önal *et al.,* 2010). El epitelio intestinal está conformado de cuatro tipos celulares: enterocitos, células neuroendocrinas, células caliciformes y células bastón. Los enterocitos son las células más abundantes y son los involucrados en la digestión intracelular, membranal, absorción de nutrientes y osmorregulación. Durante el desarrollo larvario se pueden distinguir, en algunas especies de peces, tres regiones en el intestino; anterior, posterior y recto (Zambonino-Infante *et al.,* 2008). En los pejerreyes *O. bonariensis* y *O. hatcheri,* desde la primera semana de vida se observan las tres secciones del intestino bien desarrolladas (Cortes-Ortiz, 2016).

Durante el desarrollo, el intestino comienza a elongarse y su mucosa a plegarse (capa de epitelio simple formado por células conocidas como enterocitos, que tienen contacto con la luz del intestino; figura 1), constituyendo las denominadas vellosidades. Adicionalmente, también se desarrollan pliegues en la membrana apical de los enterocitos, conocidos como microvellosidades o membrana de borde de cepillo. Ambos pliegues incrementan cientos de veces la superficie de digestión y absorción de este importante órgano. La maduración de los enterocitos se caracteriza por prominentes microvellosidades, que coincide con el aumento en la actividad de enzimas de la membrana de borde de cepillo (Cahu y Zambonino-Infante,1994; 2001).

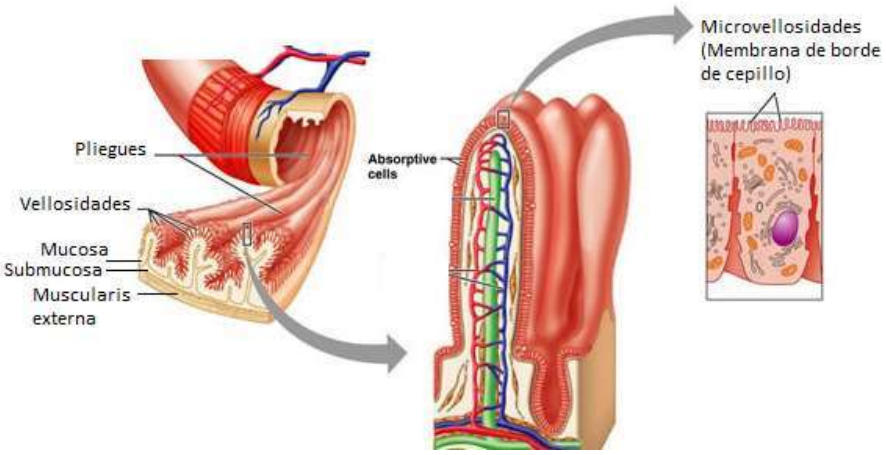


Figura 1. Anatomía tisular del intestino (consulta en internet julio 2016).

En varias especies de peces gástricos, la transición de larva a juvenil se ve evidenciada por la formación de ciegos pilóricos, órganos formados al final del estómago, junto al esfínter pilórico y al inicio del intestino. Los ciegos pilóricos están involucrados en la digestión y absorción de nutrientes, principalmente de lípidos (Zambonino-Infante *et al.,* 2008). El número de ciegos puede ser variable entre las especies, considerándose adaptaciones en el sistema digestivo de los peces que incrementan el área intestinal, sin incrementar la longitud y el grosor del intestino.

Otro evento importante en la ontogenia es el desarrollo del páncreas, que ocurre después de la eclosión. Este es un órgano con una función esencial en la

digestión de todos los nutrientes, puesto que sintetiza una gran variedad de enzimas digestivas, tales como la amilasa, la lipasa, fosfolipasa A2 y tripsina. Dichas enzimas son vertidas, a través del proceso de secreción pancreática, al intestino, sitio donde llevan a cabo su función. El páncreas también sintetiza y secreta bicarbonato, que junto con la bilis producida por el hígado, alcalinizan al bolo alimenticio ácido, proveniente del estómago, para un óptimo funcionamiento de las enzimas en el intestino. El proceso de desarrollo del páncreas se puede dividir en tres fases: 1) la aparición de un primordio al momento de la eclosión; 2) la diferenciación de la células exocrinas (células productoras de enzimas digestivas), así como la formación de los conductos excretores y de los vasos sanguíneos, antes de la apertura de la boca y 3) el crecimiento del órgano, que generalmente se presenta durante la transición de larva a juvenil (Zambonino *et al*., 2008). Aunque la maduración del páncreas ocurre progresivamente, las principales enzimas pancreáticas digestivas han sido detectadas antes de la apertura de la boca o incluso desde el momento de la eclosión (Ribeiro *et al.,* 1999; Hoehne-Reitan *et al.,* 2001). No obstante, el proceso de secreción de dichas enzimas digestivas se adquiere posteriormente y de hecho es un indicador de la maduración de este órgano. La actividad de las enzimas digestivas pancreáticas muestra un importante incremento durante el desarrollo larvario (Ribeiro *et al*., 1999a; Zambonino Infante y Cahu, 2001).

El último evento de la maduración digestiva, en el caso de peces gástricos, ocurre con la formación y posterior maduración del estómago, que generalmente se presenta entre la 4a y 5a semana después de la eclosión. En el estómago completamente desarrollado se distinguen tres regiones: la cardiaca, la fúndica y la pilórica. La mucosa de la región fúndica contiene un gran número de glándulas gástricas tubulares simples, compuestas por células oxintico-pépticas. Éstas son las productoras de pepsina y ácido clorhídrico, que llevan a cabo la digestión y desnaturalización de los nutrientes (Zambonino *et al*., 2008). El inicio del funcionamiento del estómago se caracteriza por un aumento en la secreción de HCl y la actividad de pepsina, eventos que se acompañan de la disminución en la actividad de las proteasas alcalinas (Holt, 2011; Galaviz *et al.,* 2012) y el final del

periodo larvario de los peces marinos de ontogenia indirecta (Zambonino *et al*., 2008).

4.2. Expresión de genes de enzimas digestivas

La ontogenia del sistema digestivo es un proceso programado genéticamente, en donde los genes de las enzimas digestivas siguen un cierto patrón de expresión (transcripción a mRNA) durante el desarrollo larvario. Sin embargo, la dieta puede modular los niveles de expresión y a su vez influenciar en el proceso de maduración digestiva, consecuentemente en la capacidad de digestión y absorción (Holt, 2011).

4.2.1. Enzimas digestivas del estómago (peces gástricos)

La expresión génica de pepsinógeno es un indicador de la funcionalidad plena de las glándulas gástricas del estómago. El pepsinógeno es el precursor de la pepsina, la forma activa de la enzima. Éste es activado por la acción del HCl, secretado por la subunidad α de la bomba de protones (H^+/K^+-ATPase) (Darias *et al.,* 2007). Aunque el final del periodo larvario se caracteriza por el funcionamiento del estómago (Zambonino *et al*., 2008), el momento y el nivel de la expresión génica de los precursores de enzimas digestivas no son iguales en todas las especies. En el pargo rosa, *Lutjanus guttatus,* la expresión de pepsinógeno fue detectada a los 18 días post-eclosión (dpe), dos días antes de la actividad de pepsina y la aparición de las glándulas gástricas (Galaviz *et al.,* 2012). En el besugo, *Pagrus pagrus*, la expresión del pepsinógeno y la bomba de protones se detectaron a partir de los 30 dpe, aumentando con el desarrollo (Darias *et al.,* 2007). Mientras tanto en el fletán, *Hippoglossus hippoglossus*, la expresión de pepsinógeno fue detectada hasta los 80 dpe, por lo que su capacidad de digestión de proteínas se vio limitada hasta la completa funcionalidad de las glándulas gástricas (Murray *et al.,* 2006). Esta distinta temporalidad en la maduración del estómago sugiere la estrategia digestiva de las larvas de peces, es decir, está en función de la fisiología de cada especie de pez.

4.2.2. Enzimas digestivas pancreáticas

En el páncreas exocrino de las larvas recién eclosionadas se ha detectado la expresión de los genes de tripsinógeno, amilasa y lipasa, indicando que la producción de las enzimas es necesaria para la digestión antes de la alimentación exógena (Lazo *et al.,* 2007). Las larvas de peces dependen principalmente de enzimas digestivas serin-proteasas (grupo de proteasas que se caracterizan por tener un residuo de serina muy reactivo en su sitio activo) para la digestión de las proteínas del alimento. Una de ellas es la tripsina, sintetizada por las células acinares del páncreas en forma de tripsinógeno, un precursor inactivo (zimógeno) que evita la autodigestión del páncreas. Cuando el tripsinógeno es secretado hacia el lumen del intestino, es activado por la enzima enterocinasa. Posteriormente, la tripsina puede autoactivarse, así como a otro gran número de enzimas digestivas, tales como el quimotripsinógeno, proelastasa y procarboxipeptidasa. Por tanto, la activación de la tripsina es esencial para la digestión de proteínas (Mathews, 2010; Voet y Voet, 2007).

La expresión de mRNA tripsinógeno ha sido detectada desde el desarrollo embrionario en algunas especies de peces, pero después de la eclosión se presentan cambios progresivos en sus niveles de expresión que coinciden con el desarrollo del páncreas y del intestino (Darias *et al*., 2007a). En los peces gástricos, los niveles de mRNA y actividad de tripsina descienden con la aparición de actividad de la pepsina (Kornert *et al.,* 2011; Galaviz *et al.,* 2012; Hansen *et al.,* 2013). No obstante, aún en el botete diana, *Sphoeroides annulatus,* un pez agástrico, también se detectaron niveles máximos de expresión de tripsinógeno (que coincidían con la maduración del páncreas e intestino) y una disminución, tanto de la síntesis como de la actividad de tripsina, posterior a los 28 dpe, lo que sugirió un papel más importante de otras enzimas en el proceso de digestión del alimento (García-Gasca *et al*., 2006).

Dentro de la familia de las serin proteasas también se encuentra la quimotripsina, cuya función es hidrolizar los enlaces peptídicos adyacentes a residuos aminoacídicos aromáticos (Phe, Trp o Tyr) o a residuos hidrofóbicos,

como la metionina (Met). Esta enzima se sintetizada también en forma inactiva, como quimotripsinógeno. El quimotripsinógeno es activado por la tripsina y sus niveles de mRNA y actividad han sido utilizados como indicadores del estatus nutricional de los peces (Cara *et al.,* 2007).

Por otro lado se encuentra la α-amilasa, la enzima responsable de la hidrólisis del enlace glucosídico del almidón y del glucógeno. El perfil de expresión de mRNA de esta enzima representa otro buen ejemplo de un cambio ontogénico en peces marinos con estómago. Zambonino-Infante y Cahu (2001) demostraron que en larvas de la lubina Europea, *Dicentrarchus labrax*, los niveles de mRNA y la actividad de esta enzima son altos en los estadios tempranos pero disminuyen durante el desarrollo larvario, lo cual ha sido ya reportado en otras especies marinas (Darias *et al.,* 2006; Ma *et al.,* 2001; Kortner *et al.,* 2011). Sin embargo, se ha demostrado que esta disminución del mRNA es independiente de la concentración de los glúcidos de la dieta (Péres *et al*., 1996).

La expresión de los genes es influenciada no solo por la historia de vida de cada especie, sino también por factores bióticos y abióticos, como la temperatura del agua y la disponibilidad y composición del alimento (Alarcón-López *et al.,* 1998). En larvas del lenguado de invierno, *Pleuronectes americanus*, un pez herbívoro que consume algas en las primeras etapas del desarrollo y después rotíferos, se observaron incrementos en los niveles de mRNA de la amilasa durante la metamorfosis. Posteriormente los niveles de mRNA disminuyeron ligeramente, pero en el estadio adulto volvieron a incrementarse. Douglas *et al*. (2000) sugirieron que estas variaciones podían deberse a las condiciones de cultivo, incluyendo la cantidad y calidad de la dieta.

Otra de las enzimas pancreáticas es la lipasa activada por sales biliares (Bile Activated Lipase; BAL). Esta lipasa tiene una gran importancia en peces marinos, puesto que actúa sobre ésteres de cera y triacilglicéridos ricos en ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs), sustratos abundantes en las presas de estos ambientes pero malos sustratos para la lipasa pancreática, la de mayor importancia en vertebrados terrestres (Patton *et al.,* 1995). En las larvas de *P.*

americanus la expresión de BAL ocurre desde el momento de la apertura de la boca (Murray *et al.,* 2003), mientras que en otras especies inicia al momento de la eclosión (Hoehne-Reitan *et al.,* 2001a). Recientemente, en la lubina asiática, *Lates calcarifer,* se reportó el primer estudio de los niveles de expresión y actividad enzimática de BAL durante el desarrollo larval. Los niveles de expresión de BAL fueron paralelos a los de la amilasa, presentando un pronunciado incremento del día 0 a los 6 dpe y posteriormente una disminución hasta el día 18 (Srichanun *et al.,* 2013). En contraste, la expresión de BAL aumentó con el crecimiento de los ciegos pilóricos y el páncreas (del 48 al 62 dpe) durante la ontogenia del bacalao del Atlántico, *Gadus morhua* (Sæle *et al.*, 2010), sugiriendo que la regulación de la expresión de este gen puede ser especie-específica.

4.2.3. Enzimas digestivas intestinales

En el intestino se localizan enzimas digestivas en dos áreas subcelulares de los enterocitos. Una es la membrana de borde de cepillo (la que se encuentra hacia la luz del tracto digestivo). En ésta se localizan y actúan enzimas digestivas como la leucin aminopeptidasa (APN) y la fosfatasa alcalina (FAlc). La APN (EC 3.4.11.2) es una metalo peptidasa (enzima que utiliza un metal como cofactor) que hidroliza el residuo amino terminal de oligopéptidos (fragmentos más pequeños que las proteínas) (Matsui *et al.,* 2006) generados tras la hidrólisis de las proteínas por las proteasas gástricas y pancreáticas. Esta enzima está involucrada en la maduración del intestino (Zambonino-Infante y Cahu, 1994a).

La FAlc (EC 3.1.3.1) es una enzima que hidroliza ésteres de monofosfato; es decir, elimina grupos fosfato de diversas moléculas, incluyendo nucleótidos, proteínas y alcaloides. Se expresa exclusivamente en las microvellosidades de los enterocitos y es considerada como un excelente marcador de la diferenciación de la maduración de los enterocitos (Zambonino-Infante y Cahu, 2010), demostrándose que su actividad se correlaciona con la absorción extracelular de nutrientes (Tengjaroenkul *et al.,* 2000; Holt, 2011). Además, la FAlc tiene la capacidad de desfosforilar lipopolisacáridos de bacterias, por lo que es un factor de defensa en la mucosa intestinal (Goldberg *et al.,* 2008).

La expresión de genes que codifican para enzimas y transportadores en la membrana de borde de cepillo es decisiva para la habilidad de digestión y absorción de los nutrientes del alimento en los peces (Hakim *et al*., 2009). En *L. calcarifer* se evaluaron los niveles de actividad y expresión de mRNA de APN y FAlc hasta el día 30 de post-eclosión. Después de eclosionar las larvas, los niveles de mRNA de APN tuvieron una fluctuación y después descendieron, mientras que los niveles de FAlc fueron altos hasta los 3 dpe, pero posteriormente también disminuyeron. Sin embargo, los niveles de actividad de ambas enzimas aumentaron durante el desarrollo (Srichanun *et al.*, 2013).

La segunda área subcelular del enterocito en donde se sintetizan enzimas digestivas es el citosol. Una de estas enzimas es la peptidasa citosólica leucin alanin peptidasa (LAP). Ésta lleva a cabo la digestión intracelular de las proteínas y péptidos introducidos mediante procesos de pinocitosis, durante las primeras semanas de vida, antes del desarrollo del estómago, en larvas de peces marinos de ontogenia indirecta. La actividad de la enzima es alta en este periodo, disminuyendo una vez que el intestino ha alcanzado su madurez y por tanto la actividad de las enzimas de membrana es alta (Zambonino-Infante y Cahu, 2001). Otra de estas enzimas citosólicas es la fosfatasa ácida (FAc) (EC 3.1.3.2), una enzima que libera grupos fosfatos unidos a una diversidad de moléculas, durante la digestión de nutrientes. La FAc actúa eficientemente en ambientes ácidos y se encuentra en los lisosomas. Además, se le ha asociado a cuerpos de inclusión y absorción pinocítica en el intestino (Watanabe y Sawada, 1985). El patrón de expresión de mRNA de ambas enzimas se desconoce hasta ahora.

4.3. Indicadores de maduración digestiva en peces.

El funcionamiento del páncreas constituye uno de los primeros pasos en el proceso de maduración del sistema digestivo. Desde antes de la eclosión se inicia la síntesis de zimógenos de enzimas digestivas, evidenciándose por la presencia gránulos en las células exocrinas del primordio del páncreas (Ortiz-Delgado, *et al*., 2003; Zambonino *et al*., 2008). Por esta razón, la actividad de las enzimas

digestivas ha sido un indicador útil de la maduración digestiva. Cahu y Zambonino-Infante (1994) y Cahu *et al.* (2004) determinaron que el nivel de actividad de α-amilasa es un indicador de maduración del páncreas. En varias especies su actividad es alta en el estado larvario, pero disminuye durante el desarrollo ontogénico. Por otro lado, el aumento en la expresión de BAL se relaciona con el desarrollo del páncreas (Sæle, Ø., *et al.*, 2010). En peces gástricos, la expresión y actividad de tripsina es alta, pero los niveles bajan cuando aparece la actividad de pepsina, que a su vez es indicativa de un estómago funcional (Galaviz *et al.,* 2012; Hansen *et al.,* 2013). Previamente comienza la expresión de pepsinógeno, considerado también un indicador de funcionalidad gástrica (Wu *et al.,* 2011). De esta manera la expresión de los genes que codifican para enzimas digestivas pueden ser usados como marcadores del desarrollo larvario en los peces (Holt, 2011).

Al madurar digestivamente el intestino hay una disminución progresiva en la actividad de las enzimas citosólicas, como la de LAP, coincidiendo con el incremento en la actividad de las enzimas de borde de cepillo de los enterocitos, específicamente de FAlc y APN. El punto de cruce de las actividades membranales y citosólicas ha sido determinado, por tanto, como un indicador de madurez digestiva (Zambonino-Infante y Cahu, 2001). De igual forma lo es el incremento en la relación de la actividad total de las enzimas membranales contra las citosólicas, que indica un incremento de las primeras sobre las últimas y/o una disminución de las citosólicas sobre las membranales (Zambonino-Infante y Cahu, 1994). En el sargo picudo, *Diplodus puntazo*, la maduración de los enterocitos fue determinada a los 30 dpe, aunque la actividad membranal (FAlc y APN) continuó incrementandose hasta el final del experimento (50 dpe). En contraste, la actividad de LAP tuvo su máxima actividad a los 7 dpe y después de este día comenzó a disminuir, siendo cinco veces menor que las enzimas de membranales (del 21-50 dpe) (Suzer *et al.,* 2007).

Es relevante mencionar que toda la investigación sobre el modelo de maduración digestiva se ha centrado en peces gástricos marinos de ontogenia

indirecta. Poco es el trabajo que se ha realizado en peces agástricos (García-Gasca *et al*., 2006), y más áun en atherinópsidos, cuyos miembros parecen compartir no solo el ser agástricos sino el poseer un intestino corto (Horn *et al*., 2006) y prácticamente no presentar estructuras anatómicas compensatorias a dichas limitaciones de su sistema digestivo. En los pejerreyes *O. bonariensis y O. hatcheri* fue posible encontrar un aumento en la relación de actividades membranales contra citosólicas, FAlc/FAc y FAlc/LAP, en la semana 9 post-eclosión (pe) (Toledo-Cuevas *et al.,* 2011). Un segundo estudio definió de manera más precisa dicho incremento entre la 2a y 3er semana pe (Herrera-Vargas, 2011). No obstante, probablemente compensando la ausencia de estómago, la actividad de LAP se mantiene alta (evaluada hasta los 3 meses pe). Estos datos sugieren que estas especies, a pesar de ser agástricas, siguen el modelo de maduración digestiva descrito para peces gástricos.

4.3. Estudios sobre la bioquímica digestiva de *Chirostoma estor*

Las diferentes especies de peces han desarrollado estructuras y mecanismos digestivos acordes a su hábito alimenticio, que les permiten utilizar una amplia diversidad de alimentos vegetales y animales. Así mismo, el tracto digestivo de los peces ha incorporado diversas adaptaciones para la hidrólisis y absorción de los nutrientes. Sin embargo, existen peces que carecen de estómago, siendo éstos y algunas larvas de anfibios los únicos vertebrados sin este importante órgano. El estómago es el primer sitio de digestión en los peces, porque carecen de enzimas digestivas en la cavidad orobranquial, a diferencia de los vertebrados terrestres, en los que la actividad digestiva comienza en la boca. En el estómago se lleva a cabo la desnaturalización de las moléculas por el pH ácido e inicia la hidrólisis de nutrientes, principalmente de las proteínas.

El tracto digestivo de *Chirostoma estor* no presenta estómago. Posee un intestino corto sin engrosamientos ni musculatura y carece también de ciegos pilóricos. El pH a lo largo del tracto digestivo oscila entre neutro y alcalino (Ross *et al*., 2006). Dado lo anterior, es probable que la compensación a dichas limitaciones digestivas esté dada por el tipo y/o actividad de las enzimas digestivas

que posee (Toledo-Cuevas, inédito). Se han encontrado indicios que sugieren que la lipasa pancreática es más importante en los estadios tempranos larvarios, siéndolo posteriormente la BAL (Hernández-González, 2011). La actividad de amilasa aumenta durante los primeros 30 dpe (Herrera-Vargas, 2007), en lugar de decaer durante el desarrollo, como se ha descrito en otros peces. En organismos adultos, hay una mayor actividad de tripsina respecto de quimotripsina (Rivera-Durán, 2014). Se demostró que *Chirostoma estor* tienen la capacidad de capturar proteína por endocitosis, en el estadio juvenil, a los 90 dpe (Toledo-Cuevas, 2016). Asimismo, la alimentación de juveniles con dietas ricas en colesterol incrementa la endocitosis de proteínas, en las células intestinales, en la región media y distal del tracto digestivo (Tenorio-Patiño, inedito). Sin embargo, se requiere de estudios adicionales para evaluar si el incremento del colesterol dietario mejora las tasas de crecimiento de los peces cultivados (como consecuencia del incremento en la endocitosis de proteínas y con ello un mejor aprovechamiento de las proteínas de la dieta), así como para evaluar si el uso de dicha concentración de colesterol no tiene impactos en la salud de la especie.

Se han llevado a cabo también estudios para establecer el modelo de maduración digestiva de esta especie. Los resultados de la secreción de tripsina sugieren que la maduración final del páncreas ocurre a los 75 dpe, aunque los datos de secreción de la lipasa activada por sales biliares (BAL) indican que ocurre el día 120. Estos hallazgos sugieren una distinta temporalidad en la síntesis de dichas enzimas digestivas.

Contrario a lo que sucede en peces gástricos, hallazgos iniciales mostraron que tanto la actividad de la enzima membranal FAlc como la de la citosólica LAP aumentan durante el periodo larvario (hasta los 30 dpe), incrementándose la actividad de LAP a los 90 dpe (Toledo-Cuevas *et al.,* 2011). No obstante, a diferencia de lo encontrado en los pejerreyes, no se logró detectar un incremento en la relación de actividad de enzimas membranales contra citosólicas (FAlc/LAP) (Toledo-Cuevas *et al.,* 2011). Un nuevo y más amplio estudio sugiere que la maduración digestiva de *C. estor* parece ocurrir en el día 105 pe, pero los

resultados no lograron ser concluyentes (Hernández-González 2014). Lo que sí se encontró es que la especie mantiene toda su capacidad digestiva intestinal, ya que la actividad de LAP aumentó durante el estadio juvenil y así permaneció hasta el final del periodo evaluado, hasta los 150 dpe. Mas aún, la actividad de LAP se encontró alta en organismos adultos, siendo este hallazgo un nuevo indicio de que estas especies de atherinópsidos parecen compensar con su tipo y actividad de enzimas digestivas. Altas actividades de LAP han sido también reportadas en peces gástricos, pero no hay reportes previos de que la actividad vaya en aumento durante el desarrollo.

En relación a estudios moleculares, en *C. estor* la actividad de lipasa parece ser regulada transcripcionalmente, en el estadio larvario; mientras que la tripsina es inicialmente regulada a nivel post-transcripcional y posteriormente transcripcionalmente (Toledo-Cuevas *et al.,* 2011), tal como se ha reportado para otras especies de peces gástricos (Zambonino-Infante y Cahu, 2001).

La presente investigación busca determinar indicadores moleculares de maduración digestiva, que ayuden a definir el modelo y la temporalidad de la misma en esta especie. También se pretende generar información que pueda contribuir a definir los mecanismos de regulación de los genes de las principales enzimas digestivas del pez blanco.

5. HIPÓTESIS

Los perfiles de expresión de genes de las enzimas digestivas membranales y citosólicas, durante la ontogenia, son indicadores útiles para determinar la maduración digestiva del Pez Blanco.

6. OBJETIVOS

6.1. Objetivo General

Conocer el perfil de expresión de las principales enzimas digestivas del Pez Blanco, durante el desarrollo larvario y juvenil.

6.2. Objetivos Particulares

- Identificar genes de las principales enzimas digestivas del pez blanco y cuantificar su expresión relativa, durante la ontogenia larvaria y juvenil.

- Verificar si los perfiles de expresión de las enzimas digestivas evaluadas (amilasa, lipasas, tripsina, fosfatasa alcalina y ácida, aminopeptidasa N y Dipeptidasa citosólica no específica) contribuyen a determinar el modelo y la temporalidad del proceso de maduración digestiva de *C. estor*.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. Obtención y mantenimiento de los organismos experimentales

Se obtuvieron huevos de pez blanco de la Planta Piloto de Producción de peces del Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales, de la UMSNH. Fue necesario el cultivo de dos lotes de larvas recién eclosionadas de pez blanco, debido al bajo rendimiento de eclosión del huevo. Para el lote 1, el cultivo se realizó en el mes de mayo del 2015 y para el lote 2, fue en el mes de julio del mismo año. Los organismos fueron cultivados, siguiendo las indicaciones de manejo reportadas por Martínez-Palacios *et al.* (2004).

Después de 7 a 8 días de incubación, a una temperatura promedio de 21°C y a una salinidad de 8, la eclosión tuvo lugar y las larvas fueron mantenidas en tanques de 4 L de capacidad, los cuales se encontraban dentro de cajas de cultivo de 45 L, en un sistema de recirculación. Aquí fueron cultivadas hasta los 27 dpe, a una salinidad de 8. Posteriormente los organismos fueron transferidos a sistemas de canaletas de 90 L de capacidad, en agua dulce, donde permanecieron hasta el final del experimento, teniendo el cultivo un periodo total de 160 días. Los organismos fueron alimentados solo con alimento vivo, tres veces al día, *ad libitum*, siguiendo el esquema de alimentación establecido para el pez blanco (Figura 2) (Martínez-Palacios *et al.*, 2004). El fotoperiodo que se utilizó fue de luz continua durante los primeros 10 días, para mejorar la supervivencia. Posteriormente el fotoperiodo fue natural (12hL : 12hO). La temperatura del agua del sistema no fue controlada, pero si monitoreada con sensores que registraron la temperatura cada 1.5 horas, las 24 horas, durante todo el periodo de cultivo. Los parámetros fisicoquímicos (salinidad, nitratos, nitritos, amonio, pH y oxígeno disuelto) del agua fueron monitoreados cada 10 días, hasta el final del experimento. La salinidad fue evaluada con un refractómetro (ATAGO S/Mill-E), el oxígeno disuelto con un oxímetro YSI 55/25. El pH se determinó por medio de un potenciómetro Fisher Modelo Accumet. La concentración de amonio, nitratos y nitritos se determinó por espectrofotometría, utilizando un Fotómetro YSI-9500.

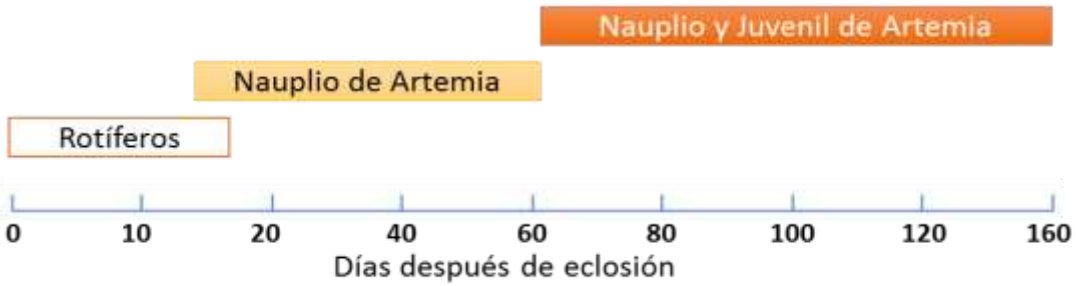


Figura 2. Esquema de alimentación durante el cultivo del pez blanco, hasta los 160 dpe.

7.2. Muestreos

Los muestreos se llevaron a cabo los días 10, 30, 60, 80, 100, 120 y 160 post-eclosión, con cinco réplicas para cada día de muestreo. El número de organismos de cada replica, para cada edad, fue seleccionado para obtener aproximadamente 100 mg de peso húmedo de tejido (Tabla 1). Las muestras se obtuvieron a la misma hora del día (8:30 am), teniendo los organismos un ayuno de 17 horas, para detectar datos basales (Villafuerte, 2015). Los organismos fueron sacrificados en agua fría con hielo. Se enjaguaron con agua destilada y después se eliminó el exceso de agua con papel filtro. Posteriormente se realizó el pesado de las muestras obtener 100 mg de peso húmedo de tejido y fueron almacenadas en RNA*later*® (Ambion, Inc), de acuerdo al protocolo descrito por el comerciante, y posteriormente almacenadas a -80°C, donde permanecieron hasta el momento de su análisis.

Tabla 1. Organismos utilizados, por réplica biológica, para cada día de muestreo

Días de post-eclosión	Núm. de Organismos	Peso Húmedo de Tejido (mg)	Tipo de muestra
10	40	100	Organismos completos
30	10	100	Organismos completos
60	5	100	segmento del cuerpo*
80	3	100	segmento del cuerpo*
100	3	100	segmento del cuerpo*
120	3	100	segmento del cuerpo*
160	3	100	segmento del cuerpo*

*segmento del cuerpo donde se encuentra el tracto digestivo

7.3. Análisis biométricos

Durante los días de muestreo se evaluó el crecimiento de los organismos, en longitud total y peso húmedo, con la finalidad de saber si los organismos utilizados para la cuantificación de mRNA de las principales enzimas digestivas tuvieron un crecimiento normal. Con los datos de longitud total y peso húmedo se determinaron la tasa específica de crecimiento (TEC) y el factor de condición (K), en cada uno de los intervalos de desarrollo, de acuerdo a la edad en la que fueron muestreados los organismos.

$$TEC\ \left(\frac{\%}{Día}\right) = \frac{\mathrm{Ln}(Y2) - \mathrm{Ln}(Y1)}{Periodo\ de\ desarrollo} x\ 100$$

Donde: Ln=logaritmo natural
Y2 = peso final
Y1 = peso inicial
Periodo de desarrollo = edad final- edad inicial

$$Factor\ de\ condición\ (K) = \frac{Peso\ humedo}{(Longitud\ total)^3} x\ 100$$

7.4. Extracción de RNA y síntesis de cDNA

El RNA total de cada una de las muestras (replicas biológicas) fue extraído, siguiendo las instrucciones del kit FastRNA® PRO (MPBiomedicals). El RNA fue resuspendido en 40 µl de agua DEPC (agua tratada con Dietilpirocarbonato, sustancia que inhibe a las ribonucleasas, enzimas que degradan al RNA) al 0.1%. Éste fue tratado con DNAsa, para eliminar el posible DNA contaminante. Para esto, de cada muestra se tomaron 1 µg de RNA, 1µl de Buffer DNAsa 10X, 1 U de DNAsa y el volumen necesario de agua DEPC, para obtener un volumen final de 10µl. Las mezclas se agitaron suavemente y se incubaron a 37°C, durante 30 min. La reacción se detuvo mediante la adición de 1µl de EDTA 25 mM, incubando a 65°C por 10 min.

Posteriormente, la concentración del RNA fue evaluada utilizando la absorbancia a 260 nm en un NanoDrop (Thermo Scientific). La calidad del RNA se

verificó mediante su integridad, buscando las bandas íntegras y características de las subunidades ribosomales 18 y 28S. Para esto, 5 µl de cada muestra de RNA se mezclaron con 1 µl de buffer de carga (Blue Juice®, Invitrogen). Las muestras fueron cargados en geles de agarosa al 1.5%, con TAE 1X (Tris, Ácido acético, EDTA) y preteñidos con Sybr Safe (Invitrogen) (1µl/10 mL). La electroforesis se llevó a cabo durante 1 hora a 90 V. Las imágenes fueron registradas mediante un sistema de fotodocumentación GelDoc+ (Biorad).

La síntesis de cDNA se realizó a partir de 2 µg de cada uno de los RNA tratados con DNAasa, utilizando el kit Improm II (Promega), de acuerdo al protocolo del fabricante.

7.5. Diseño de oligonucleótidos específicos

Para el diseño de oligos específicos para los genes de interés, se requiere de tener su secuencia o parte de la misma. Los oligos específicos de las enzimas digestivas del pez blanco, analizadas en este trabajo, fueron diseñados utilizando dos herramientas en línea (http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/ y www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html). A partir de las secuencias obtenidas de la siguiente forma:

Para el caso de GAPDH, EF1α, amilasa, APN y la Dipeptidasa citosólica no específica (CNDP2), se usaron los oligos degenerados utilizados para otras especies de peces. Cabe mencionar que la única secuencia de peptidasa citosólica reportada es la de CNDP2, por lo que fue la que se amplificó, en sustitución de la leucin alanin peptidasa (LAP). A partir de los RNAs de organismos de pez blanco de 10, 20 y 30 dpe, obtenidos de un trabajo previo (Moreno Basurto, 2009; Toledo-Cuevas *et al.* 2011), que se encontraban en buen estado (Figura 6), se obtuvieron los cDNA correspondientes. Posteriormente, se hizo un pool de esos cDNA y se procedió a la amplificación de fragmentos, usando los arriba mencionados oligos degenerados (Figura 7 a y b). Las condiciones de la PCR fueron: 1 ciclo a 95°C por 30 seg, para la desnaturalización inicial, seguido de 35 ciclos de 95°C por 1 min, 52-62°C por 1 min de acuerdo a la temperatura de alineamiento de cada secuencia a amplificar y 72°C por 1min; finalizando con una

incubación a 72°C, por 7 min, para la extensión de los productos. Los productos de PCR fueron purificados con el kit GENECLEAN® SPIN (MP Biomedicals), y secuenciados (http://www.ibt.unam.mx/sintesis/). Todas las secuencias se confirmaron por análisis BLASTX (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST), logrando obtener fragmentos de los genes de GAPDH, EF1α, amilasa, APN y CNDP2 del pez blanco.

Para las enzimas de quimotripsina, BAL, Fosfatasa alcalina y ácida, los oligos específicos fueron diseñados a partir de las secuencias obtenidas del transcriptoma del pez blanco (Corona-Herrera y Martínez-Chávez, inédito).

Finalmente, para el caso de Tripsina, Lipasa pancreática, β-actina y RPL5 se usaron los oligos específicos ya obtenidos para el pez blanco (Moreno Basurto, 2009; Toledo-Cuevas *et al.* 2011; Corona-Herrera, Inédito).

En la Tabla 2, se muestra la secuencia de los oligonucleótidos específicos de las enzimas digestivas analizadas en este trabajo y de los genes de referencia usados.

Tabla 2. Oligonucleótidos específicos diseñados para la qPCR

	Genes	Oligonucleótidos específicos
Enzimas pancreáticas	Amilasa	Fw 5' AGGCTGACCAGACGACAGTT 3'
		Rv 5' GGTTCAACGCTGGAAAAGAG 3'
	Tripsina	Fw 5' GTAGCAGTGAGCAGCAGAGA 3'
		Rv 5' TGAACTCTGGGTACCACTTCTGT 3'
	Quimotripsina	Fw 5' TCCAGTGATGTAGCAAGGGTAA 3'
		Rv 5' TATCTTTGTGGCCTTCGGTAAC 3'
	Lipasa	Fw 5' TGCTGGGATCACTTAAGGAAAAG3'
		Rv 5' CCAAGGCTGTAGCCAATCAGAT 3'
	Lipasa act. Por sales biliares	Fw 5' GTTGGGAGTTGACAGATGGAA 3'
		Rv 5' AACAACCTGGTCCTGTCTCCT 3'
Enzimas citosólicas	Dipeptidasa citosólica no específica	Fw 5' GGTCAGGCTCAACACCAAATA 3'
		Rv 5' AAGTTGTGGAGAAGCAGGTGA 3'
	Fosfatasa ácida	Fw 5' AACAAAGCCTCTGAGCCAAA 3'
		RV 5' TTGTATGTTTCCGTGCGTGT 3'
Enzimas membranales	Fosfatasa alcalina	Fw 5' CTCGAAAAGACCCATAAGACGA 3'
		Rv 5' CCGCAAAGACAAGAGAAACCTA 3'
	Aminopeptidasa N	Fw 5' ACCGATGGAGTTTTGATTCG 3'
		Rv 5' CATGGCTCCAGCGTTAAAAT 3'
Genes de referencia	GAPDH	Fw 5' CTGTCTTCCAGTGTATGAAGC 3'
		Rv 5' CGTATTTGTCCTCGTTGACT 3'
	EF1 α	Fw 5' GTATCTCCAAGAACGGACAG 3'
		Rv 5' GGTTGTAGCCAATCTTCTTG 3'
	Proteína ribosomal L5	Fw 5' TTGGAGAACCTCACGATCATTC 3'
		Rv 5' GAGGGAAAGACGGACTACTTTG 3'
	β-actina	Fw 5' CTCTTCCAGCCTTCCTTCCT 3'
		Rv 5' TCTCCTTCTGCATCCTGTCA 3'

7.6. PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR)

Debido al gran número de análisis requeridos, tiempo y costos se trabajó con un pool de cDNA de las cinco réplicas experimentales, de cada edad de muestreo (Figura 3). La cuantificación de la expresión de las enzimas digestivas se realizó en un termociclador de tiempo real CFX96 Touch™ Real-Time detection System (BioRad), generando previamente un intervalo dinámico, con curvas estándar de calibración, para cada uno de los transcritos a analizar (Anexo 1). Se usó el

SsoAdvanced™ SYBR® Green Supermix como intercalador para detectar y cuantificar la expresión de los genes de interés (Tabla 2). Los genes de referencia utilizados fueron: factor de elongación (EF1α), gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa (GAPDH), proteína ribosomal L5 y β-Actina (Tabla 2). Los niveles de expresión fueron calculados y graficados mediante los algoritmos del software Bio-Rad CFX Manager V 3.0. (Anexo 2).

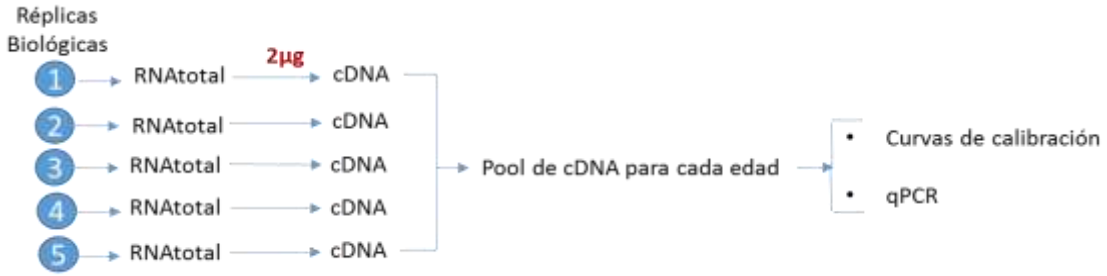


Figura 3. Esquema de trabajo para la qPCR en tiempo real.

La evaluación y selección de los genes de referencia útiles para la cuantificación de la expresión génica, durante la ontogenia del pez blanco, se hizo utilizando RefFinder, en el cual se integran los principales programas de algoritmos computacionales disponibles en la actualidad (geNorm, NormFinder, BestKeeper y el método comparativo Ct), para comparar y clasificar los genes de referencia candidatos (http://fulxie.0fees.us/?type=reference), en términos de su estabilidad, que significa qué tanto varía su expresión a lo largo de las condiciones experimentales, en este caso, durante la ontogenia.

7.7. PCR de Punto Final de Amilasa.

Se realizó una PCR de punto final para evaluar la presencia de mRNA de la amilasa en el pez blanco, durante los primeros 160 dpe. La amplificación se realizó utilizando el cDNA de cada uno de los días de muestreo. Las condiciones de la PCR fueron: 1 ciclo de 95°C por 30 seg, 35 ciclos de 95°C por 1 min, 60°C por 1 min y 72°C por 1min; finalizando con una incubación a 72°C, por 7 min. Los productos de amplificación fueron visualizados en un gel de agarosa al 1.5% con TAE, preteñido con Gelgreen (Biotium) (1µl/10 mL). La electroforesis se llevó a

cabo durante 1 hora, a 90V. La imagen fue registrada mediante un transiluminador de luz blanca/ UV (Bi-O-Vision) y una cámara portátil.

7.8. Correlaciones

Los datos fueron primeramente evaluados con una prueba de normalidad Ryan-Joiner. Como los niveles de expresión no siguieron una distribución normal, se realizó una transformación de potencia ($x^{0.5}$) a los valores de expresión de mRNA de todas las enzimas digestivas, para normalizarlos. Posteriormente para cuantificar el grado en que se relacionan los perfiles de expresión de mRNA de las enzimas digestivas, se realizaron correlaciones entre las dos lipasas (Lipasa pancreática y BAL) y entre las enzimas intestinales. Para las fosfatasas (alcalina y ácida) y para las dos lipasas se realizaron correlaciones de Pearson; mientras que para APN *vs* CNDP2 se utilizó la correlación de Spearman, al no cumplirse los supuestos de normalidad (prueba de normalidad Ryan-Joiner).

Para todos los análisis se consideró un nivel de significancia de $P \leq 0.05$. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el uso del programa GraphPad Prism version 5 para Windows.

8. RESULTADOS

8.1. Parámetros fisicoquímicos del agua de los sistemas de cultivo

En la Tabla 3 se presenta el promedio de los parámetros fisicoquímicos del agua de los sistemas de cultivo, durante el periodo de crecimiento de los organismos. Estos se mantuvieron estables y dentro de los intervalos reportados para el óptimo crecimiento y supervivencia del pez blanco (Martínez-Palacios *et al*., 2004).

Tabla 3. Calidad del Agua de Cultivo

PARAMETRO	Días de post-eclosión*	
	0- 26	27-160
SALINIDAD	8	0
NITRITOS (mg/L NO_2)	0.043±0.04	0.044±0.03
NITRATOS (mg/L NO_3)	3.27±1.08	2.76±0.99
AMONIO (mg/L NH_4)	0.20±0.36	0.20±0.30
OXÍGENO (mg/mL)	5.14±1.38	5.82±1.06
pH	8.35±0.27	8.35±0.20
Temperatura (°C)	23.8 ±1.224	22.87±1.055

* Sistema de cultivo utilizado durante el intervalo indicado de crecimiento de los peces blancos. Valores promedio ± Desviación Estándar

8.2. Crecimiento y supervivencia de los organismos

El crecimiento del pez blanco de Pátzcuaro, durante los 160 dpe, es representado en términos de longitud total (medida desde la punta de la boca hasta la punta de los lóbulos de la aleta caudal) y peso húmedo, describiendo un comportamiento lineal y potencial, respectivamente (Figura 4). Al final del periodo de cultivo se tuvo una supervivencia del 63.27 %.

Durante el periodo larvario (hasta el 30 dpe) el pez blanco tuvo una tasa específica de crecimiento de 14.83%/día. Además, se calculó la TEC (Tabla 4) y el factor de condición (Figura 5) en los intervalos del desarrollo en donde se realizó el muestreo de los organismos.

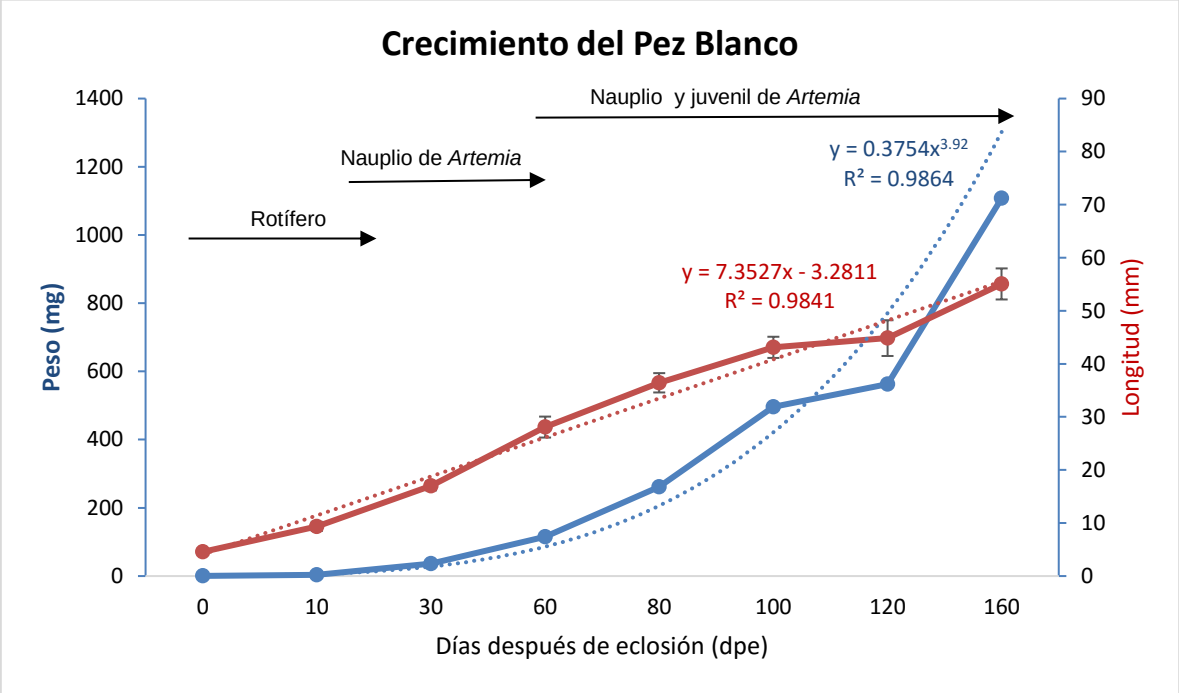


Figura 4. Crecimiento durante el desarrollo larvario y juvenil del pez blanco de Pátzcuaro, *C. estor*. Promedio ± desviación estándar (DS); n=10.

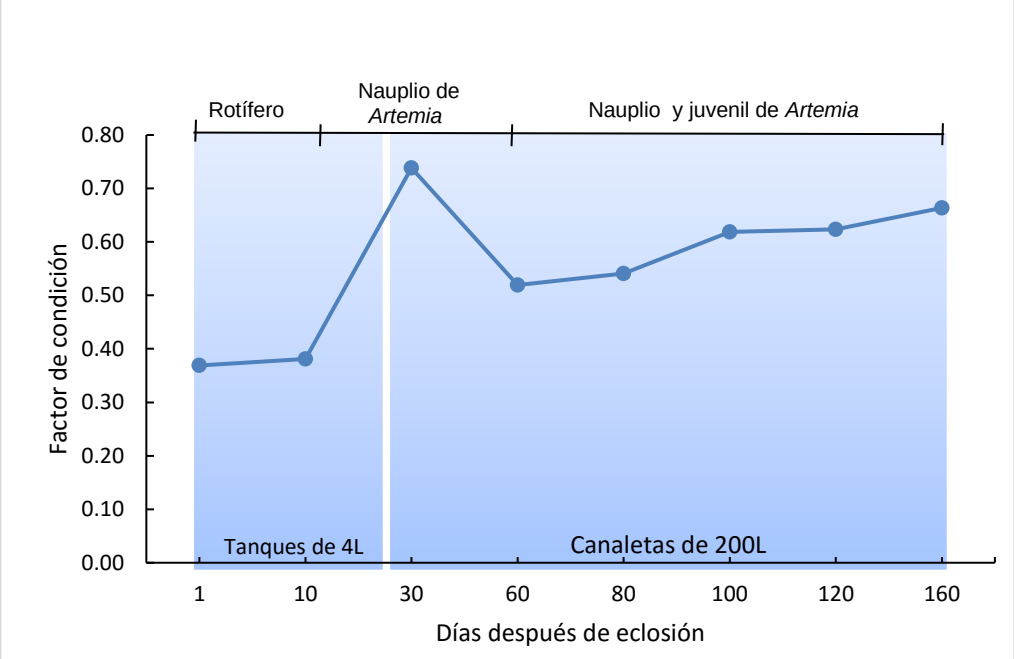


Figura 5. Factor de condición durante el desarrollo larvario y juvenil del pez blanco de Pátzcuaro, *C. estor*. n=10.

Tabla 4. Tasa específica de crecimiento

Intervalo de desarrollo (dpe)	(% / Día)
0-10	9.93
11-30	17.51
31-60	14.55
61-80	24.94
81-100	27.28
101-120	21.01
121-160	15.75

8.3. RNAs utilizados para la obtención de oligonucleótidos específicos y para la qPCR

En la Figura 6, se muestra la electroforesis del RNA que fue obtenido por Moreno-Basurto, 2009; y utilizado para obtener el cDNA que sirvió para la obtención de los fragmentos (RT-PCR, Figura 7) de los genes GAPDH, EF1α, amilasa, APN y CNDP2, de cuyas secuencias se diseñaron los oligos específicos para la qPCR. El RNA se encontraba lo suficientemente integro, ya que se veían claras las bandas correspondientes a las subunidades ribosomales 5, 18 y 28S.

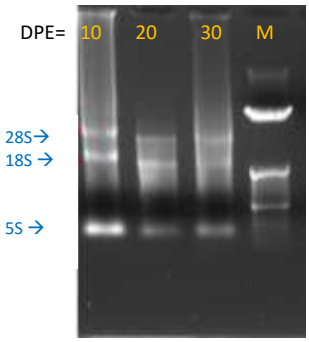


Figura 6. Electroforesis de RNA total de pez blanco, en gel de agarosa al 1.2%, utilizado para la obtención de fragmentos de amplificación, que tras ser secuenciados, permitirían el diseño de oligos específicos; M, marcador de peso molecular.

En la Figura 7 se muestra el producto de PCR de genes de referencia y algunos genes de enzimas digestivas, cuyas secuencias fueron utilizadas para el diseño de oligos específicos (Tabla 2). Los productos fueron únicos y del peso molecular (PM) esperado.

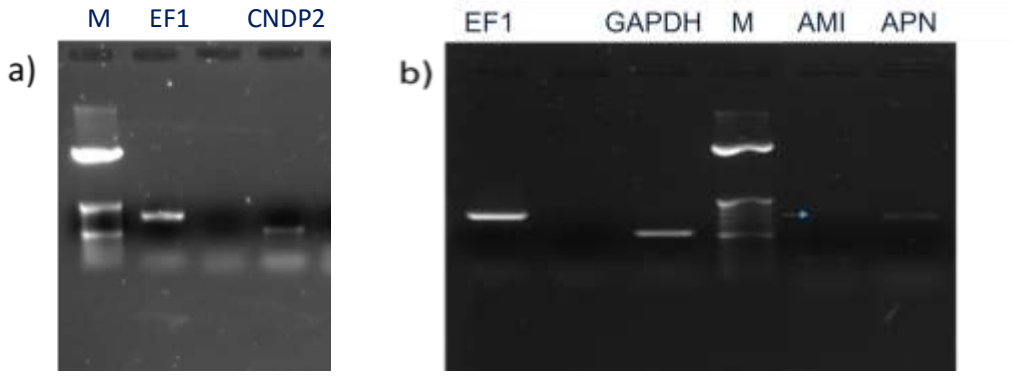


Figura 7. Amplificación por PCR de distintos genes, a partir de un pool de cDNA de peces blancos. a) EF1y CNDP2; b) EF1, GAPDH, Amilasa (AMI) y APN; M, marcador de peso molecular. Gel de agarosa al 1.2%.

Por otro lado se muestra la calidad del RNA de las muestras obtenidas de pez blanco, durante la ontogenia (Fig 8). Se encontró que el RNA se encuentra en buenas condiciones, puesto que las bandas correspondientes a las subunidades ribosomales 18 y 28S se ven íntegras. La concentración del RNA estuvo dentro del intervalo de 461.89 a 881 ng/µl, con una pureza de 1.7 - 2.1 (280/260) y 1.59 - 1.96 (260/230). El primer valor indica la relación entre la cantidad de proteína y la de ácidos nucleico en la muestra de RNA, siendo el valor deseado de 1.7 a 2.2. La segunda relación es la de ácidos nucleicos y fenoles o compuestos fenolicos, siendo el valor deseado de 2 a 2.2. Los valores encontrados de las dos relaciones se encontraban dentro de los límites reportados para un RNA de buena calidad, por lo que se prosiguió al ensayo de qPCR, tanto para los genes endógenos como para los genes de las enzimas digestivas estudiadas (Tabla 2).

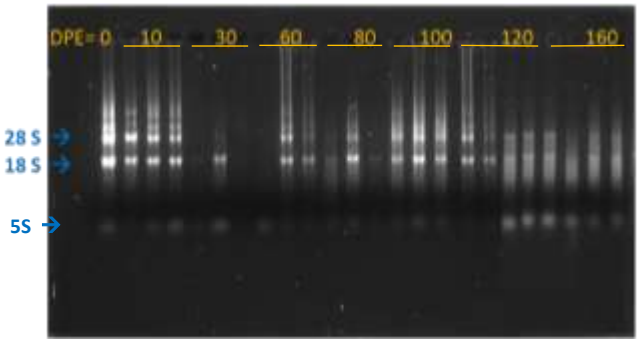
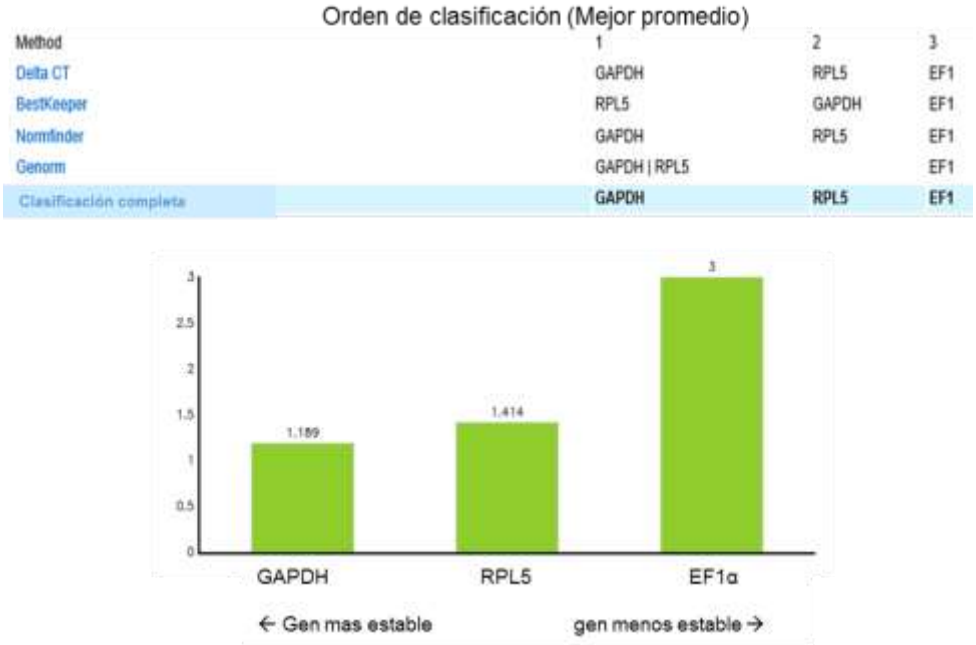


Figura 8. Electroforesis de RNA total obtenido durante la ontogenia de peces blancos, en gel de agarosa al 1.5%.

La estabilidad de los genes endógenos utilizados en este estudio, cuya expresión fue evaluada bajo las mismas condiciones que los genes de interés, se muestra en la Figura 9. De acuerdo al análisis, GAPDH es gen de referencia más estable, seguido de RPL5, siendo el menos estable el gen EF1α. Con base a esta información, la expresión de los genes de enzimas digestivas se normalizó con el gen GAPDH.



Orden de clasificación (Mejor promedio)

Method	1	2	3
Delta CT	GAPDH	RPL5	EF1
BestKeeper	RPL5	GAPDH	EF1
Normfinder	GAPDH	RPL5	EF1
Genorm	GAPDH | RPL5		EF1
Clasificación completa	GAPDH	RPL5	EF1

Figura 9. Análisis de estabilidad de los genes de referencia, de acuerdo al software RefFinder. EF1α, factor de elongación; GAPDH, gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa; RPL5, proteína ribosomal L5. Hacia la izquierda se muestran los genes más estables y hacia la derecha los menos estables.

8.4. Expresión génica de enzimas pancreáticas

En la figura 10 se muestran los perfiles de expresión relativa de mRNA de las enzimas digestivas pancreáticas: Tripsina, Quimotripsina, Lipasa pancreática, Lipasa activada por sales biliares (BAL) y Amilasa, a lo largo de la ontogenia larvaria y juvenil del Pez blanco. La expresión de mRNA de todas las enzimas pancreáticas fue detectada desde el momento de la eclosión. Los niveles de mRNA de tripsina aumentaron notablemente del día 0 a los 10 dpe. Posteriormente los niveles disminuyeron y fluctuaron, pero se mantuvieron altos

respecto del 0 dpe y el día 120 pe se presentó el máximo nivel de expresión (Fig. 10a). Mientras que los niveles de mRNA de quimotripsina fueron más altos los primeros 60 dpe y después disminuyeron (Fig. 10b). Durante todo el periodo de cultivo se detectaron niveles mayores de expresión de mRNA de tripsina que de quimotripsina, siendo poco más del doble, excepto para los días 10, 30 y 60 pe, donde el nivel de expresión relativa de mRNA de tripsina y quimotripsina fue semejante.

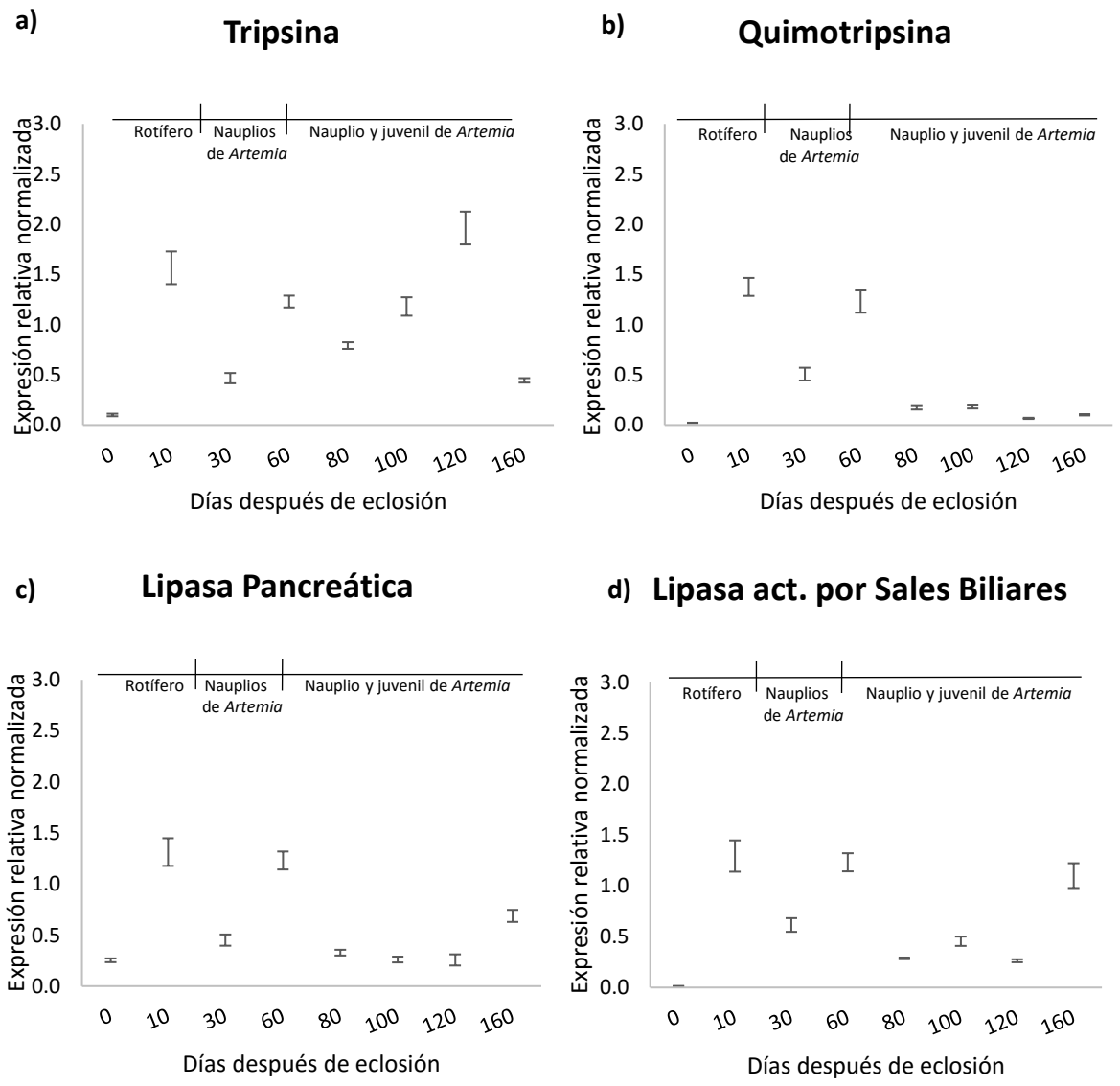


Figura 10. Expresión relativa normalizada de genes de enzimas digestivas pancreáticas, durante el desarrollo larvario y juvenil del pez blanco *Chirostoma estor*. Los valores son promedios ± desviación estándar (DS) de cuatro réplicas técnicas de un pool de organismos de cada edad, $P \leq 0.05$). Las letras representan las diferencias estadísticas a lo largo del desarrollo.

La lipasa pancreática y BAL mostraron patrones de expresión muy similares, presentándose los niveles más altos de expresión de mRNA los días 10 y 60 pe; después de este día los niveles disminuyeron, aunque volvieron a incrementar para el día 160 pe (Fig. 10c y 10d). En la tabla 5 se muestra la correlación entre las lipasas, en la cual se muestra una fuerte correlación positiva (r = 0.97), lo que indica que existe un alto grado de asociación de la expresión de mRNA de estas lipasas.

Tabla 5. Correlación entre las Lipasas

	Correlación de Pearson	**r^2**	**P**	**Correlación significativa**
Lipasa Pancreática/BAL (0-160)	0.97	0.94	< 0.0001	si

La expresión de mRNA de amilasa se presenta también desde el momento de la eclosión. Fue baja su expresión en el día 0 pe y presentó una tendencia a aumentar durante el desarrollo (Fig. 11). Sin embargo, es importante mencionar que a partir del día 80 se detectaron dos picos en la curvas de disociación (Fig. 21e, Anexo 2), sugiriendo la amplificación de más de un mRNA de amilasa (posibles isoformas) en la qPCR. Estos dos picos de amplificación no son producto de la formación de dímeros de oligonucleótidos o productos inespecíficos, puesto que cuando se realizó la curva estándar de amplificación correspondiente (Fig. 16, Anexo 2), la gráfica de la curva de disociación únicamente mostró un pico. Por tanto se buscó mayor evidencia de la existencia de isoformas de amilasa, a través de una amplificación por PCR de punto final (Fig. 12). Como se puede apreciar, desde el día 0 pe y hasta el día 60 existe una sola banda de amplificación; no obstante, la del día 0 tiene aproximadamente 250 pares de bases (pb), mientras que la de los otros días de desarrollo es de 149 pb. Por otro lado, a partir del 80 dpe se observaron dos bandas de amplificación, correspondiendo a la banda de 149 pb y a una nueva de 300 pb. A pesar de que la evaluación es solo cualitativa, se pudo apreciar que la banda de 149 pb disminuyó en su intensidad a lo largo del desarrollo, hasta ser casi imperceptible en el 160 dpe. Por otro lado la banda de aproximadamente 300 pb fue muy intensa desde el 80 dpe y se mantuvo

constante hasta el final del periodo de desarrollo estudiado. Adicionalmente, a partir del día 100 se observaron nuevas bandas de amplificación, de menos de 110 pb y de mucho menor intensidad. No obstante, en necesario la secuenciación de todas las bandas amplificadas para confirmar la presencia de las isoformas de amilasa.

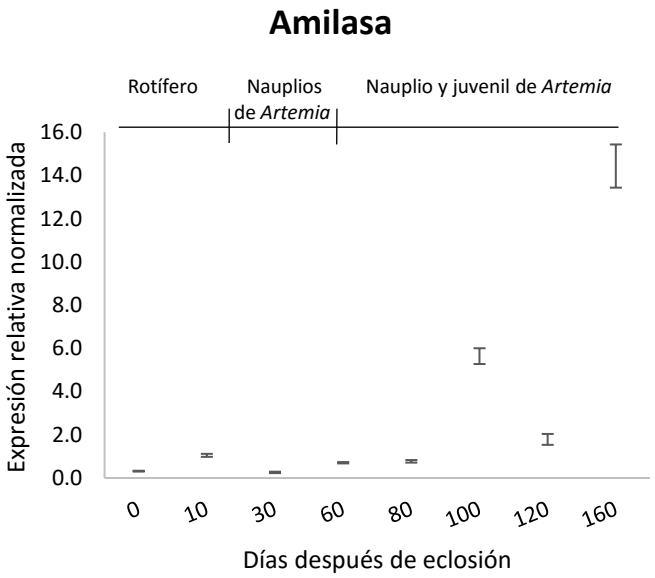


Figura 11. Expresión relativa normalizada de mRNA de la amilasa pancreática, durante el desarrollo larvario y juvenil del pez blanco *Chirostoma estor*. Los valores son promedios ± desviación estándar (DS) de cuatro réplicas técnicas de un pool de organismos de cada edad. P ≤ 0.05). Las letras representan las diferencias estadísticas a lo largo del desarrollo.

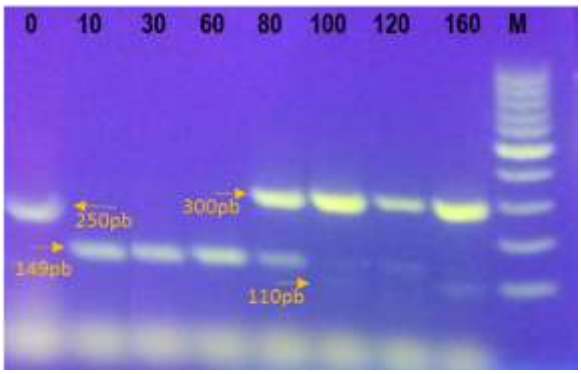
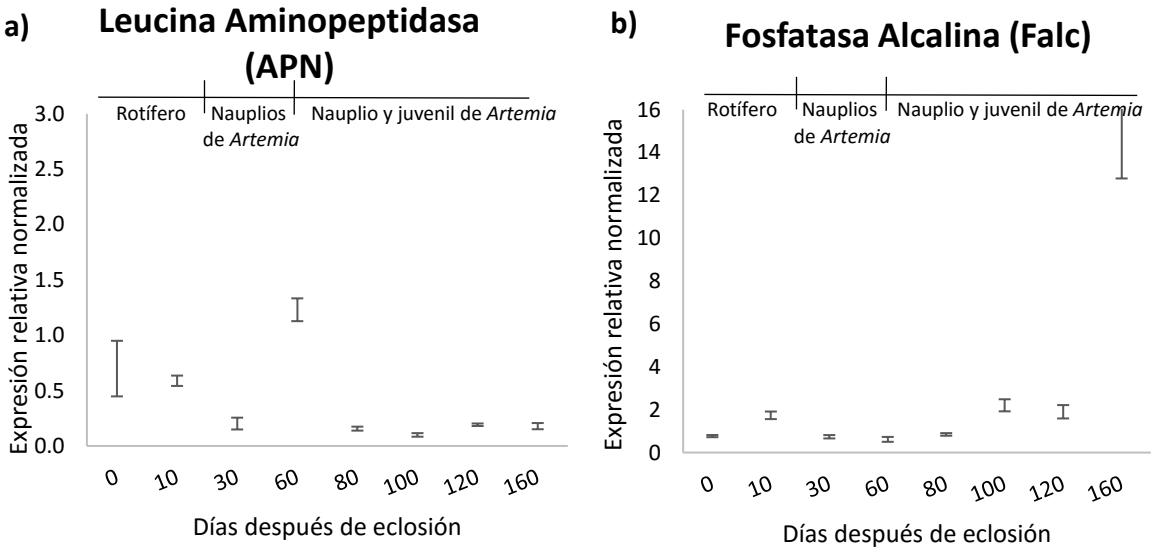


Figura 12. Amplificación del cDNA de amilasa durante el desarrollo del pez blanco, evaluada mediante RT-PCR. Gel de agarosa al 1.5% Los números en la parte superior indican la edad de los organismos, en días después de la eclosión. M, marcador de 100pb.

8.5. Expresión génica de enzimas intestinales

Al igual que para las enzimas pancreáticas, la expresión de las enzimas intestinales evaluadas se observó desde las larvas recién eclosionadas (0 dpe) (Figura 13). Los niveles de mRNA de APN fueron en decremento hasta el día 30 pe, pero en el día 60 pe se tuvo un nivel de expresión máximo (Fig. 13a). Mientras que la expresión de mRNA de la Fosfatasa Alcalina aumentó durante el desarrollo, siendo el nivel máximo presentado el día 160 pe (Fig. 13b).

La expresión de mRNA de CNDP2 presentó altos niveles hasta el día 60 pe; Aunque después de este día los niveles bajaron, en el día 160 pe se volvieron a incrementar (Fig. 13c). En cuanto al nivel de expresión de mRNA de la Fosfatasa Ácida, este al igual que CNDP2 en el día 0 fue alto, pero posteriormente tendió a disminuir con algunas fluctuaciones durante el desarrollo. No obstante, en el día 160 pe se volvieron a incrementar los niveles (Fig. 13d).



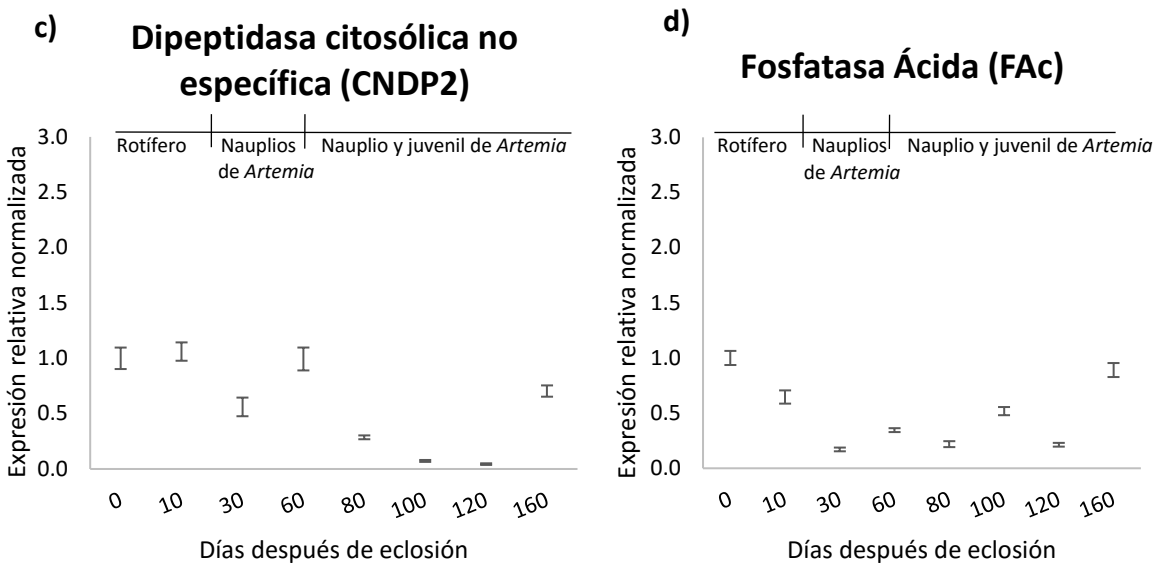


Figura 13. Expresión relativa normalizada de genes de enzimas digestivas intestinales, durante el desarrollo larvario y juvenil del pez blanco *C. estor*. Los valores son promedios ± desviación estándar (DS) de cuatro réplicas técnicas de un pool de organismos de cada edad. ($P \leq 0.05$). Las letras representan las diferencias estadísticas a lo largo del desarrollo.

Por otro lado, se quiso averiguar si se podría encontrar alguna relación entre la expresión de los genes de enzimas digestivas membranales y citosólicas, que sugiriera una maduración intestinal. Ante la imposibilidad de hacer proporciones (como se hacen para actividades totales digestivas membranales y citosólicas), porque los datos de expresión son relativos, se hicieron correlaciones, aunque las correlaciones solo comparan perfiles o patrones, no valores individuales, a diferencia de las proporciones, en las que se evalúa un nivel de actividad sobre otra en cada edad. Se realizaron tres grupos de correlaciones: a lo largo de los 160 días del cultivo y en dos periodos, de 10 a 80 y de 80 a 160 dpe. Estos últimos son los periodos en donde hay patrones semejantes; es decir, la expresión de las enzimas a comparar sube o baja de forma similar. No obstante, esto solo se pudo realizar para los datos de expresión de las enzimas cuya distribución de datos es similar: FAlc *vs* FAc, cuyos datos tienen una distribución normal y APN *vs* CNDP2, cuyos datos no cumplen la normalidad.

En la Tabla 6 se muestran las correlaciones, y en ella se puede observar que hay una correlación significativa y relativamente alta durante todo el

desarrollo; mientras que en los períodos de 10 a 80 y de 80 a 160 dpe las correlaciones son menores y no son significativas. Una baja correlación en la expresión de las enzimas membranales y citosólicas, en estos periodos, habría sugerido que alguna de éstas tenía una mayor expresión que la otra, lo que se encontró, pero sin significancia estadística.

Tabla 6. Correlaciones entre Enzimas Intestinales

	Correlación de Pearson	Correlación de Spearman	r^2	P	Correlación significativa
FAlc/Fácida (0-160 dpe)	0.71		0.55	0.048	Si
FAlc/Fácida (10-80 dpe)	0.86		0.74	>0.05	No
FAlc/Fácida (80-160 dpe)	0.55		0.27	>0.05	No
APN/CNDP2 (0-160 dpe)		0.90		0.004	Si
APN/CNDP2 (10-80 dpe)		0.80		>0.05	No
APN/CNDP2 (80-160 dpe)		0.4		>0.05	No

Finalmente y para tener otra forma de visualizar si en algún momento la expresión de las enzimas membranales era mayor que la de las citosólicas, se representó la expresión de las enzimas intestinales en porcentajes, asignándole el 100% al nivel más alto de expresión de mRNA de cada enzima (figura 14). Se puede apreciar que las enzimas citosólicas (FAc y CNDP2) comienzan su expresión muy activamente al inicio del periodo evaluado, pero la expresión de CNDP2 cayó en el día 100 pe, cuando la FAlc inicia su expresión más activa, sin embargo las citosólicas vuelven a incrementar en el día 160 pe.

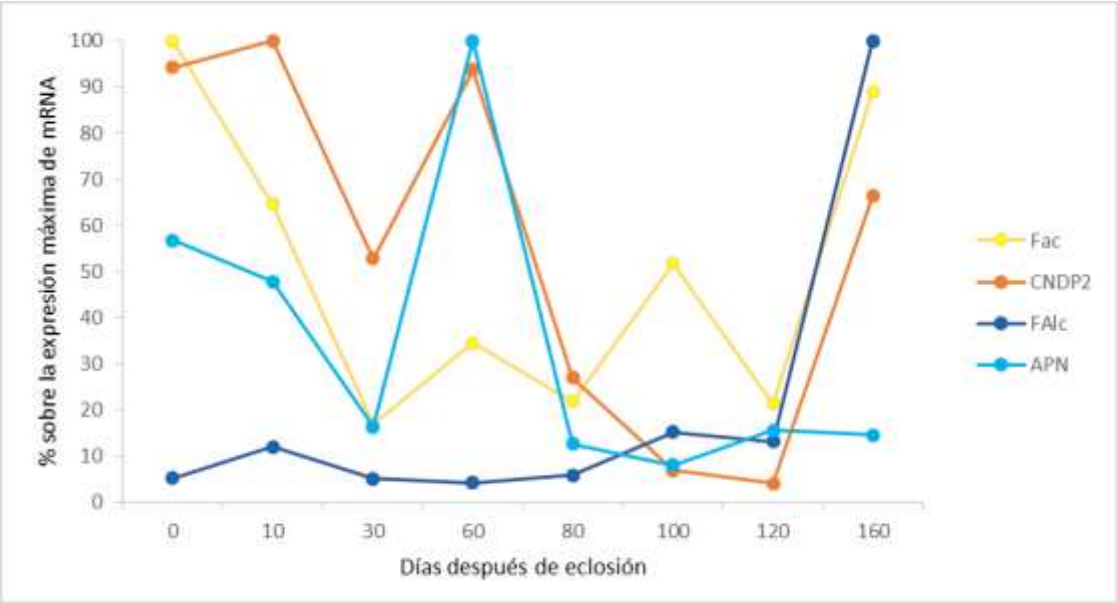


Figura 14. Evolución comparativa de los diferentes mRNA de las enzimas intestinales durante el desarrollo larvario y juvenil del pez blanco. APN, Leucin aminopeptidasa; CNDP2, dipeptidasa citosólica no específica; Fac, Fosfatasa ácida; FAlc, Fosfatasa alcalina. Los valores son promedios ± desviación estándar de las cuatro réplicas técnicas, de un pool de organismos de cada edad.

9. DISCUSIÓN

El interés por desarrollar dietas que proporcionen óptimos crecimientos y supervivencia en los peces blancos del Lago de Pátzcuaro, en cultivo, ha promovido el estudio del desarrollo y la fisiología de su sistema digestivo, durante la ontogenia de la especie. El desarrollo del sistema digestivo está genéticamente programado y las enzimas digestivas siguen un patrón de expresión, que también está regulado genéticamente. Todos los cambios anatómicos y fisiológicos que ocurren durante el desarrollo del tracto gastrointestinal finalizan con la maduración digestiva (Zambonino-Infante y Cahu 2001), siendo el momento en el que los organismos alcanzan una capacidad digestiva semejante a la de ejemplares adultos. No obstante, poco se sabe del modelo y la temporalidad del proceso de maduración digestiva en peces con las características del pez blanco (Hernández-González, 2014).

En este trabajo el crecimiento de los peces blancos, en términos de longitud total, tuvo un comportamiento lineal similar al reportado anteriormente por Hernández-González (2014). No obstante, los organismos del presente trabajo tuvieron un mayor crecimiento hasta los 100 dpe (TEC de 7.06 %/día y factor de condición de 0.38-0.62), comparado con lo reportado por Hernández-González (2014; TEC de 5.88 %/día y factor de condición de 0.20-0.52). Pero, a partir del 120 dpe la TEC y el factor de condición en este estudio fueron menores; 15.75 %/día y 0.62-0.66, en contraste con 21.93 %/día y 0.93-1.02 (Hernández-González, 2014). Esta menor TEC posiblemente está relacionada con la limitación del espacio de cultivo, puesto que los peces del trabajo de Hernández-González (2014) fueron transferidos a tanques de 3 m^3, a los 101 dpe. Se sugiere la evaluación de los efectos de la limitación de espacio en esta especie sobre el crecimiento, así como la existencia del fenómeno de crecimiento compensatorio (Ali *et al.,* 2003). Por otro lado, la tasa específica de crecimiento de todo el periodo larvario fue de 14.83 %/día, una unidad mayor a la reportada por Martínez-Palacios *et al.* (2004), Toledo-Cuevas *et al.* (2011) y Hernández-González (2014), seguramente porque la temperatura de cultivo de este trabajo se asemeja más a la

temperatura óptima de cultivo para el pez blanco (Martínez-Palacios *et.al.*, 2002) y a la mayor frecuencia de alimentación.

Al comparar el crecimiento de las larvas de pez blanco de este trabajo, alimentadas con *Brachionus plicatillis* y nauplios de *Artemia* hasta los 30 dpe, contra el de larvas alimentadas solo con *B. plicatillis* y destetadas a los 10 dpe con dietas microagregadas (Martínez-Angeles, 2015), se encontró que éste es semejante en términos de longitud total. Adicionalmente, en todos los casos se tuvo una supervivencia mayor al 60%. Estos resultados y el de Hernández-González (2007) confirman que la *Artemia* puede ser eliminada durante la etapa larvaria del pez blanco, lo que representará un gran ahorro en su cultivo.

Cuando se calculó la tasa específica de crecimiento en términos de peso húmedo, en periodos de desarrollo (Tabla 4) y el factor de condición, se pudo apreciar que el menor valor se presentó durante el periodo en el cual los organismos fueron alimentados con rotífero (del 0 al 10 dpe), de manera similar a lo observado en la lubina asiática, *Lates calcarifer* (Srichanun *et al.,* 2013). Esto puede deberse a la diferencia en la composición nutricional de los rotíferos y la *Artemia* (Ortega *et al.,* 2000) ó a que la energía disponible está siendo destinada prioritariamente para los cambios fisiológicos que ocurren en los primeros estadios larvarios, en lugar de ser destinada para el crecimiento del organismo (figura 4). Esto último parece ser lo más factible dado que el crecimiento durante el periodo larvario, con el uso o no de *Artemia*, fue semejante, como se mencionó anteriormente.

En las últimas décadas se han realizado estudios sobre la ontogenia del tracto gastrointestinal de las larvas de peces marinos, permitiendo conocer cómo son los cambios morfológicos y funcionales en su sistema digestivo y el efecto de la dieta sobre la capacidad digestiva (Kawai, 1973; Smith 1992; Zambonino-Infante y Cahu, 2001). No obstante, los estudios moleculares permiten una visión más integral de los cambios que se presentan durante el desarrollo e incluso pueden servir para complementar la información acerca de la condición nutricional de los organismos (Cuenca-Soria *et al.,* 2013). También permiten obtener una estimación

más precisa de la funcionalidad del sistema digestivo, al poder detectar la expresión de los genes de enzimas digestivas, a nivel transcripcional, durante la ontogenia. Dichos estudios han permitido determinar que la transcripción de las principales enzimas digestivas ocurre antes de la apertura de la boca, como en las larvas de *P. americanus* (Murray *et al.,* 2003); *L. calcarifer* (Srichanun *et al.,* 2013) y *Sphoeroides annulatus* (García-Gasca *et al.,* 2006). Todas a excepción de la pepsina, enzima que comienza a trascribirse tras haberse desarrollado el estómago e iniciar su funcionamiento, último evento de la maduración del sistema digestivo (Darias *et al.,* 2007; Galaviz *et al*., 2012; Chi *et al.,* 2013). De manera similar, en el presente estudio se encontró que la expresión de mRNA de todas las enzimas digestivas analizadas fue detectada desde el momento de la eclosión. Hasta donde nuestro conocimiento abarca, éste constituye el reporte más completo (desde el desarrollo larvario hasta el juvenil) en peces agástricos y en particular en atherinópsidos.

Aunque se ha reportado que el tipo de alimentación puede influir en la expresión de las enzimas digestivas (Kornert *et al.,* 2011), esto parece no ocurrir en el pez blanco, puesto que no se encontró relación entre las fluctuaciones de los niveles de mRNA con los cambios en la alimentación. Los resultados sugieren que los genes que codifican para las enzimas digestivas se pueden estar transcribiendo de acuerdo a un programa genético, independientemente de la dieta (al menos del alimento vivo), como se ha reportado en las larvas de peces marinos (Zambonino y Cahu, 2001; Darias *et al*., 2006).

Las proteasas alcalinas, como la tripsina y quimotripsina, tienen un papel importante en la hidrólisis de las proteínas en los estadios tempranos de las larvas de los peces de ontogenia indirecta, dado que aún no se ha desarrollado un estómago funcional. En el pez blanco, la cantidad relativa de mRNA de tripsina fue incrementándose hasta los 80 dpe, pero posteriormente disminuyó, aunque sus niveles fueron más altos que en el 0 dpe, independientemente de la variación del número de muestras utilizadas en c/día de muestreo. En *L. calcarifer* se reportó una disminución en los niveles de mRNA de tripsina y quimotripsina, incluyendo en

su actividad específica, en el día 18 post-eclosión, por el desarrollo de un estómago funcional y por tanto por la contribución de la digestión ácida (Srichanun *et al.,* 2013). Este resultado está correlacionado con reportes que mencionan que al iniciar la actividad del estómago, las actividades proteolíticas alcalinas disminuyen, manteniéndose altas en peces agástricos (Rathore *et al.,* 2005; Chakrabarti *et al.,* 2006). Al ser el pez blanco un organismo agástrico, la disminución en los niveles de mRNA de tripsina puede deberse al incremento en la actividad de otras enzimas digestivas, como las fosfatasas intestinales, ácida y alcalina, cuya expresión mostró una tendencia de incremento durante el desarrollo. No obstante, es posible que el bajo nivel de expresión de tripsina, alcanzado tras los 80 dpe, sea suficiente para mantener la actividad necesaria para la digestión en el pez blanco. Estos datos serán confirmados para complementar los estudios de expresión de este trabajo.

Es interesante notar que durante todo el periodo de cultivo se detectaron niveles mayores de mRNA de tripsina que de quimotripsina, siendo más del doble. De forma equivalente también se ha detectado mayor actividad de tripsina que de quimotripsina en adultos de esta especie (Rivera-Durán, 2014), sugiriendo que estas dos enzimas pudieran estar reguladas trancripcionalmente y lo que pudieran ser indicios de la mayor importancia de la tripsina en larvas de pez blanco (Hernández-González, 2011). Asimismo, en pejerreyes se ha detectado niveles de tripsina mayores que de quimotripsina (Rivera-Durán, 2014), por lo que seguramente ésta es otra de las compensaciones a las restricciones del sistema digestivo de estos atherinópsidos (Toledo-Cuevas, inédito).

Por otro lado, dado que la ingesta de alimentos estimula la secreción de tripsina (Pedersen *et al*., 1987) y consecuentemente el nivel de actividad de esta enzima está ligado a la composición y frecuencia de alimentación, la composición de las proteínas de los rotíferos podrían también estar estimulando la expresión de la tripsina en los primeros días de desarrollo del pez blanco. Esto por el alto porcentaje de arginina y lisina en este alimento vivo, residuos de aminoácidos donde específicamente hidroliza la tripsina (Kibria *et al.,* 1997). Inclusive Toledo-

Cuevas *et al.,* (2011) describen una regulación transcripcional de esta enzima en el día 10 post-eclosión.

En este estudio se observó un aumento en los niveles de mRNA de quimotripsina, en el día 60 pe, los cuales coinciden con una disminución de la TEC. Cuando los niveles de transcrito de tripsina fueron mayores que los de quimotripsina, la TEC también fue mayor. Este hallazgo coincide con lo reportado anteriormente para otras especies, en donde existe una relación directa entre los niveles de actividad de tripsina y el aumento en su proporción con los de quimotripsina con un mayor crecimiento (Cara *et al.,* 2007). En otras palabras, el aumento de la expresión de quimotripsina está asociado con el periodo en el que hay una reducción de la tasa de crecimiento, sin embargo aún se desconoce si los aminoácidos aromáticos (fenilalanina y tirosina) en los que incide quimotripsina en exceso, podrían afectar los sistemas biológicos del organismo de una manera similar como los contaminantes tóxicos orgánicos (tales como benceno, bifenilos policlorados y las dioxinas), ya que contienen un anillo de benceno libre similar (Rungruangsak-Torrissen *et al.,* 2006). Por otro lado, las variaciones en la tasa de crecimiento de los peces pueden ser un reflejo del costo de la metamorfosis, con motivo del inicio de una nueva función vital (Balon, 2002).

La expresión de las dos lipasas verdaderas reportadas en peces, la lipasa pancreática y la lipasa activada por sales biliares (BAL), fue detectada desde el momento de la eclosión en el pez blanco, siendo más alta la de la lipasa pancreática que la de BAL. En contraste, en *P. americanus* la lipasa pancreática fue la única que se expresó en organismos recién eclosionados, aunque en bajos niveles. BAL fue detectada hasta la apertura de la boca (5 dpe), cuando las larvas iniciaron su alimentación con rotíferos, ricos en lípidos (Murray *et al.,* 2003).

La presencia de lipasas está relacionada con los nutrientes del saco vitelino, especialmente aquellos con prominentes gotas de aceite; la absorción de éste coincide con la disminución de las actividades de estas enzimas (Ozkizilcik *et al*., 1996). En consecuencia, las evidentes gotas de aceite de los huevos de pez blanco podrían explicar la alta y temprana expresión de las lipasas, dado que el

total agotamiento de las gotas de aceite ocurre entre los 9,10 y 11 dpe (Rios-Durán *et al.,* 2014). Adicionalmente, el hallazgo de una fuerte correlación en la expresión de las dos lipasas sugiere un amplio espectro de digestión de lípidos en esta especie. Pero además, la temprana expresión de BAL seguramente está relacionada con los ancestros marinos del pez blanco (Barbour, 1973), de acuerdo a lo sugerido por Kurtovic *et al.* (2009); quien reporta que BAL es la lipasa más activa y principal en los peces marinos. No obstante, se ha detectado una mayor actividad de la lipasa pancreática que de BAL en el estadio larvario del pez blanco (Hernández-González, 2011). Adicionalmente, aunque el perfil de expresión de las dos lipasas coincide con lo reportado en *L. calcalifer*, hay una distinta temporalidad. El nivel de expresión de BAL en *L. calcalifer* aumentó durante la primera semana de post-eclosión y posteriormente disminuyó (Srichanun *et al.,* 2013), mientras que en el pez blanco la disminución ocurre después de los dos meses de edad.

Respecto al perfil de expresión de la lipasa pancreática, nuestro muestreo no nos permitió confirmar el aumento reportado por Toledo-Cuevas *et al.* (2011) a los 20 dpe. Los autores reportan un aumento en la expresión de esta lipasa en ese día del desarrollo, seguido de una disminución en el día 30; mientras que nuestros resultados muestran que los niveles de mRNA para esta enzima se mantiene constantes en los días 10 y 30 pe.

Un hallazgo interesante es el incremento observado en la expresión de amilasa durante el desarrollo larvario y juvenil del pez blanco, contrario a lo reportado en otras especies: larvas de *G. morhua* (Kortner *et al*., 2011), *D. labrax* (Péres *et a*l., 1998), *Pagrus pagrus* (Darias *et al*., 2006), *Ompok bimaculatus* (Pradhan *et al.,* 2013) y *L. calcarifer* (Srichanun *et al.,* 2013); en las cuales la expresión y actividad de amilasa comienzan con altos niveles durante la primera semana de post-eclosión y posteriormente disminuyen. Se sabe que la ontogenia del sistema digestivo es un proceso programado genéticamente (Zambonino-Infante y Cahu, 2001; Lazo *et al.,* 2011) pero modulado por la dieta y factores ambientales (Zambonino-Infante *et al*., 2008). La actividad de amilasa sigue un patrón similar a

la de lactasa en mamíferos, cuya actividad desaparece a una cierta edad en la que la energía necesaria para el metabolismo se puede obtener no sólo de hidratos de carbono, sino también de otros nutrientes. Por esta razón, no es inesperado que la actividad de la amilasa disminuya a medida que la larva crece (Henning *et al.,* 1994). Así que el incremento en los niveles de amilasa en el pez blanco llama la atención. No obstante, se detectó la presencia de más de un transcrito de amilasa a partir de los 80 dpe, incluso cambios en éstos durante la ontogenia de la especie (Figura 8), sugiriendo la existencia de isoenzimas con un papel distinto durante el desarrollo. Aunque estos resultados aún deben confirmarse, secuenciando los fragmentos de amplificación obtenidos, al parecer son un tipo distinto de isoenzimas quienes incrementan su expresión en los peces blancos de más de casi 3 meses de edad. Esto sugeriría una mejora en la capacidad de digestión de carbohidratos de la especie. Incluso, Herrera-Vargas (2007) reporta un incremento en la actividad de amilasa durante el estadio larvario, pero estos resultados serán corroborados en muestras del mismo cultivo usado para este trabajo. El incremento en la expresión de amilasa, y posiblemente su actividad, podría también estar relacionado con el contenido de glucógeno del alimento vivo, con el que se mantuvieron a los organismos durante todo el cultivo. Alternativamente, las isoenzimas de amilasas podrían estar jugando un papel diferente al digestivo, siendo una posibilidad exploratoria a futuro la movilización interna de las reservas energéticas.

Como ya se ha mencionado, el proceso de maduración digestiva es uno de los cambios morfológicos y funcionales más importantes durante las primeras semanas de vida de muchas especies de peces teleósteos marinos, de ontogenia indirecta. La maduración digestiva incluye la funcionalidad del páncreas exocrino (para la síntesis de enzimas digestivas), el inicio de su función secretora, y el desarrollo completo y la funcionalidad del intestino y estómago, siendo éste el último órgano en desarrollarse. El éxito de este proceso determina la capacidad de los organismos para digerir dieta balanceadas (Moyano *et al.*, 1996). En este estudio se cuantificó la expresión de enzimas intestinales (citosólicas y membranales), para conocer su perfil durante el desarrollo larvario y juvenil de los

peces blancos, datos que posteriormente podrán ser relacionados con la actividad de dichas enzimas y por tanto darán indicios de los mecanismos por los cuales éstas son reguladas. Pero, además se evaluaron para analizar su utilidad como indicadores moleculares de maduración digestiva.

El perfil de expresión de APN tuvo un máximo en el día 60 pe, que coincide con el aumento notable en la actividad total de esta enzima en el estudio de Hernández-González (2014), a pesar de que las muestras provienen de cultivos diferentes. Este hallazgo sugiere que en ese momento del desarrollo deben estar ocurriendo cambios significativos en el intestino, determinados genéticamente. Dichos cambios deben estar relacionados con la programación y regulación genética de APN y/o con cambios en la morfología y funcionalidad del intestino, por ejemplo con el máximo desarrollo de las microvellosidades (Zambonino-Infante y Cahu, 2001). La expresión de genes que codifican para enzimas catalíticas y transportadoras de la membrana de borde de cepillo es crucial para las etapas finales de la digestión y absorción de los nutrientes, a través de la membrana epitelial del intestino.

Aunque el perfil de expresión de la FAlc se incrementó durante el desarrollo del pez blanco, se observó un primer aumento en los niveles de expresión en el día 80 post-eclosión, ocurriendo el segundo al final del periodo evaluado, a los 160 dpe. Es relevante mencionar que para todas las enzimas digestivas intestinales evaluadas, tanto membranales como citosólicas, se detectaron incrementos en los 60 y/o 80 dpe. Estos datos parecen reflejar un período importante en el desarrollo y capacidad del sistema digestivo intestinal de la especie, así como la absorción de nutrientes.

El incremento en la actividad de FAlc está relacionada con la maduración de los enterocitos y con la adquisición de una sistema digestivo desarrollado (Zambonino-Infante y Cahu, 2001), por lo que es considerado como un indicador de maduración digestiva en varias especies, tales como el bagre mantequilla, *Ompok bimaculatus* (Kumar *et al*., 2012) y la cabrilla arenera, *Paralabrax maculatofasciatus* (Álvarez-González *et al*., 2008). En esta última especie, el

incremento en la actividad de FAlc (a los 12 dpe) está relacionado con una disminución simultánea en la actividad de la enzima citosólica leucín alanin peptidasa (Zambonino-Infante y Cahu, 2001). En el caso del pez blanco, tanto la expresión de FAlc, en el presente estudio, como su actividad en dos estudios bioquímicos anteriores se incrementa durante el desarrollo; pero no hay una disminución en la actividad de LAP, ni en proporción de FAlc (Toledo-Cuevas *et al.*, 2011; Hernández-González 2014). En contraste, aunque ambas actividades también se incrementan en los otros únicos atherinópsidos cultivados, los pejerreyes *O. bonariensis* y *O. hatcheri,* con una anatomía externa y digestiva muy semejante a la de los peces blancos (Herrera-Vargas, 2011, Aguilar Valdez, 2012), en estas especies si se presenta un incremento en las proporciones de actividades membranales y citosólicas, sugiriendo una maduración digestiva intestinal (Herrera-Vargas, 2011; Toledo-Cuevas *et al.*, 2011) acorde al modelo propuesto por Zambonino-Infante y Cahu (2001).

La dipeptidasa citosólica no especifíca (EC: 3.4.13.18) al igual que la leucin alanin peptidasa (LAP), participa en la hidrólisis de dipéptidos hidrófobos que han sido absorbidos por pinocitosis (Nicholson *et al*., 1974). Algunos autores han demostrado que las larvas de peces adquieren proteínas a través de pinocitosis, y que dichas proteínas son digeridas intracelularmente por este tipo de peptidasas, en las células de la mucosa intestinal (Govoni *et al*. 1986; Moyano *et al*., 1996). Este proceso ya también fue demostrado recientemente en el pez blanco (Tenorio-Patiño, inédito). En peces marinos de ontogenia indirecta, los niveles de dichas peptidasas citosólicas son altos durante las etapas larvales, antes de la aparición de un estómago funcional, y por tanto son consideradas una característica de un intestino digestivo inmaduro (Guillaume et al., 1999). Posteriormente, su actividad disminuye progresivamente con el crecimiento de las larvas (Zambonino-Infante *et al*., 2008).

En el pez blanco el nivel de expresión de CNDP2 se mantiene constante durante el desarrollo, pero presenta incrementos significativos en los 60 y 80 dpe. De manera similar, Hernández-González (2014) reporta un incremento significativo

en la actividad específica de LAP, en el 105 dpe. Asimismo, en los pejerreyes la actividad de LAP no sólo se presentó a lo largo del desarrollo, hasta el estadio juvenil, sino incluso se incrementó en el 63 dpe (Herrera-Vargas, 2011; Toledo-Cuevas, 2016). Aunque altos niveles de enzimas citosólicas ya habían sido reportadas en peces agástricos (Guillaume et al., 1999), no había reportes del comportamiento, a nivel transcripcional y actividad, a lo largo de la ontogenia. Adicionalmente, estos hallazgos sugieren que tanto los altos niveles de proteasas alcalinas como los de las peptidasas citosólicas (como LAP y CNDP2) podrían ser los mecanismos de compensación de los sistemas digestivos limitados de estos atherinópsidos (Toledo-Cuevas, 2016). No obstante, también es posible que la alta concentración de proteínas solubles en el alimento vivo (Srivastava *et al.,* 2005) estuviera estimulando la expresión y actividad de dichas peptidasas citosólicas, por lo que estos resultados necesitan ser contrastados con hallazgos de los niveles de estas actividades en peces blancos silvestres.

De forma similar a lo encontrado con las dipeptidasas citosólicas, los niveles de expresión de la Fosfatasa ácida (FAc), la otra enzima intestinal citosólica (este trabajo) y su actividad, no disminuyen durante la ontogenia de los peces blancos (Toledo-Cuevas *et al.*, 2011; Hernández-González 2014); contrario a lo observado en varias especies marinas, todas ellas gástricas, como el *Pagrus pagrus* (Cara *et al*., 2002) y *Diplodus sargo* (Guerreiro *et al*., 2010).

Como uno de los objetivos de este trabajo era el averiguar si los resultados moleculares podrían servir como indicadores de maduración intestinal, se decidió realizar correlaciones entre la expresión génica de las enzimas intestinales membranales con respecto de las citosólicas. Esto porque no es posible realizar proporciones, como se hace para actividades enzimática digestiva, porque los datos de expresión son relativos a un gen de referencia. Pero también porque la expresión de las enzimas citosólicas no disminuye durante el desarrollo, al igual que su actividad. Se encontró una alta correlación positiva de FAlc/FAc durante los 160 dpe (Tabla 5), lo cual sugiere que la expresión de ambos transcritos presenta una tendencia a incrementar de forma semejante. Al evaluar los dos periodos

donde la FAlc/FAc y APN/CNDP2 tienen perfiles semejantes (Tabla 5), se encontró que si bien la correlación es baja, lo que podría significar que la tendencia de incremento o decremento (según la expresión de las enzimas comparadas y el periodo) es distinta y por tanto las enzimas membranales tendrían una expresión mayor que las citosólicas, o las citosólicas una expresión menor que las membranales, la correlación no fue estadísticamente significativa. Por tanto, buscamos otra forma de analizar ese patrón, que fue el representar las expresiones como porcentajes (Figura 10). El análisis muestra que las enzimas citosólicas comienzan a expresarse muy activamente al inicio del periodo evaluado, y posteriormente caen en el 120 dpe, cuando la FAlc inicia su expresión más activa, sugiriendo una maduración intestinal en esta edad. Este tipo de representaciones ha sido usado anteriormente por otros autores (Cara *et al.*, 2002; Kim *et al.,* 2001), para representar el desarrollo comparativo de las actividades enzimáticas en la etapa larvaria, sugiriendo que pone de manifiesto desarrollos estructurales, que podría también aplicarse a la expresión de mRNA de enzimas digestivas. En apoyo a esto, los resultados de Hernández-González (2014) sugieren también una maduración digestiva a los 105 dpe. A pesar de que diversos autores sugieren que en ciertos momentos del desarrollo, la actividad de las enzimas digestivas no está regulada transcripcionalmente, y datos no mostrados que correlacionan la expresión con la actividad (Hernández-González, 2014) sugieren lo mismo para el pez blanco, el mejor desempeño de esta especie con alimento balanceado (que es alrededor de los 4 meses, comunicación personal, Carlos Martínez) sugieren que es la edad en la cual la capacidad digestiva intestinal pudo haber alcanzado la madurez.

10. CONCLUSIONES

Los niveles de mRNA de todas las enzimas digestivas analizadas fueron detectados desde el momento de la eclosión en el pez blanco de Pátzcuaro. Esto sugiere que el aparato digestivo ya esta funcionando plenamente desde el momento de la eclosión organismo está preparando para poseer todo el equipamiento enzimático que requiere para su crecimiento.

Hay una mayor cantidad de mRNA de tripsina que de quimotripsina durante los 160dpe analizados. Además, la expresión de Tripsina y quimotripsina están relacionadas con las tasas de crecimiento en esta especie.

Las dos enzimas que participan en la degradación de lípidos, lipasa pancreática y lipasa activada por sales biliares, presentan una fuerte correlación en el perfil de expresión de mRNA durante el desarrollo larvario y juvenil, sugiriendo un amplio espectro de la especie para la digestión de diferentes tipos de lípidos.

Se detectaron varias isoformas de amilasa durante el estadio juvenil del pez blanco, lo cual coincidió con el aumento en la expresión de mRNA de esta enzima.

La expresión de las fosfatasas alcalina y ácida también se incrementaron durante el desarrollo; mientras que los niveles de mRNA de la leucina aminopeptidasa y la citosólica no específica (CNDP2) se mantuvieron constantes durante el desarrollo, con tendencias a incrementarse en los días 60 y 80 post-eclosión (CNDP2), respecto del día 0 dpe.

No se encontraron datos concluyentes sobre la utilidad de estos estudios moleculares como indicadores de maduración digestiva: los perfiles de expresión de las enzimas intestinales no mostraron un punto de cruce, como se ha descrito con actividades enzimáticas para indicar maduración digestiva. Sin embargo, la expresión de las enzimas citosólicas (CNDP2 y FAc) parece tener una mayor importancia en las primeras etapas del desarrollo, hasta el 120 dpe, cuando FAlc tiene un incremento en su expresión, lo cual sugiere cambios en la funcionalidad del intestino, que deben ser confirmados con estudios de actividad digestiva. Finalmente, la alta correlación positiva entre FAlc y FAc, sugiere un tipo de compensación en su capacidad digestiva, manteniendo toda la actividad digestiva posible durante su desarrollo.

11. ANEXO 1

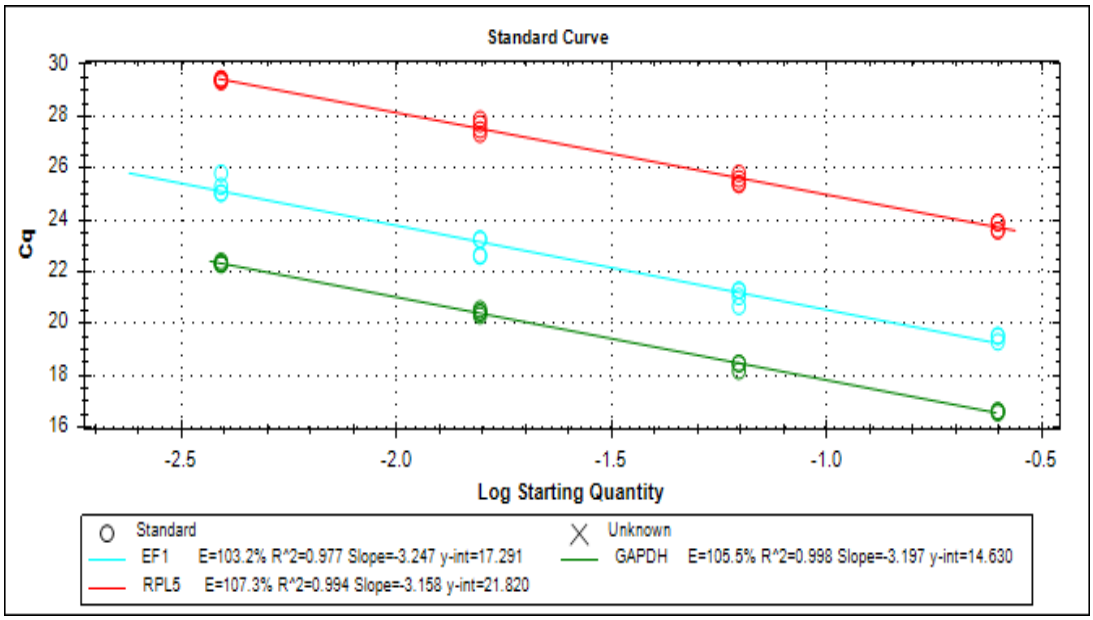


Figura 15. Curva estándar de amplificaciones a partir de diluciones seriadas de cDNA de los genes de referencia; EF1, GAPDH y RPL5 con concentración conocida. n=4

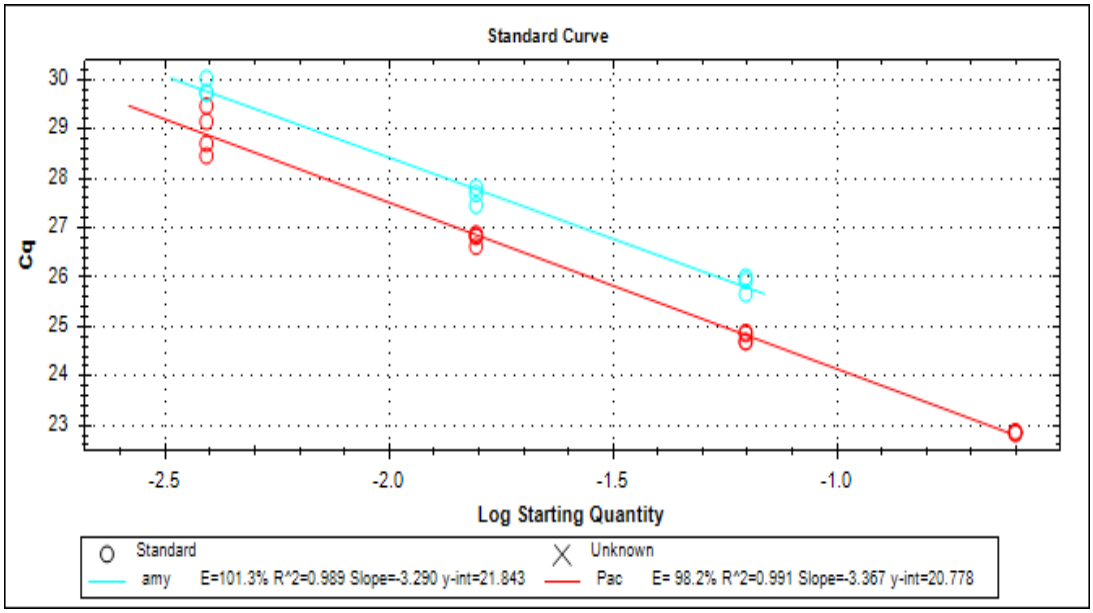


Figura 16. Curva estándar de amplificaciones a partir de diluciones seriadas de cDNA de Amilasa (amy) y Fosfatasa acida (Pac) con concentración conocida. n=4

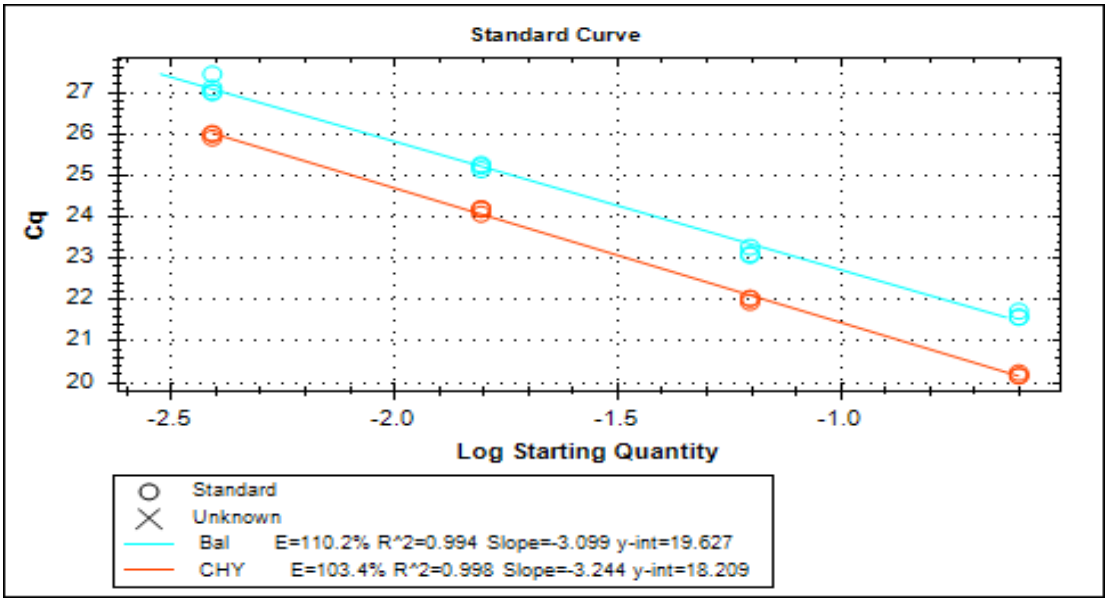


Figura 17. Curva estándar de amplificaciones a partir de diluciones seriadas de cDNA de lipasa act. por sales biliares (BAL) y Quimotripsina (CHY) con concentración conocida. n=4

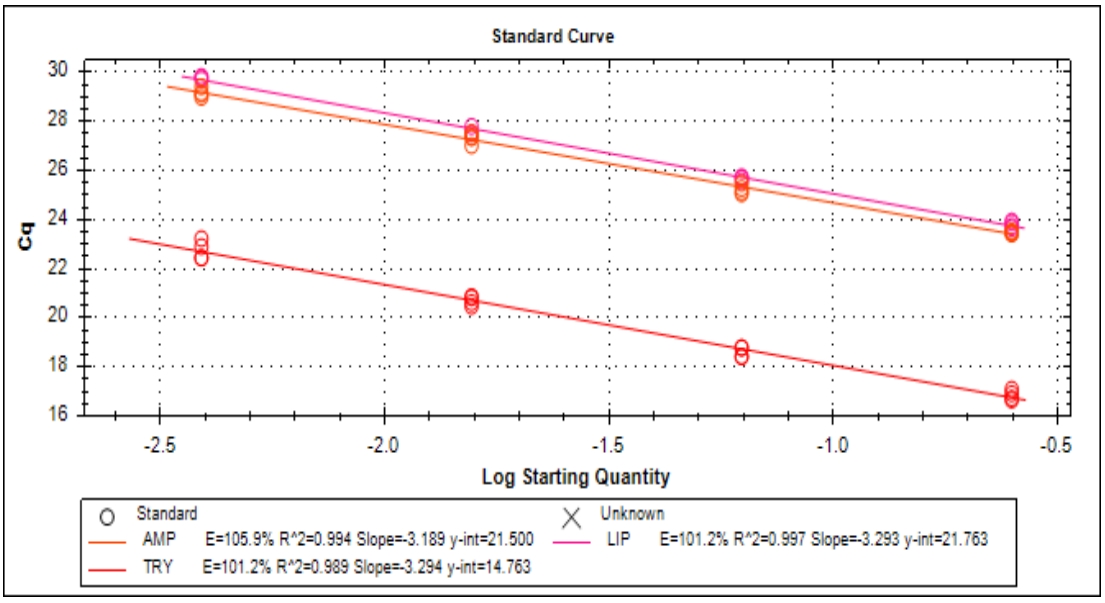


Figura 18. Curva estándar de amplificaciones a partir de diluciones seriadas de cDNA de Leucina aminopeptidasa (APM), Tripsina (TRY) y Lipasa pancreática (LIP) con concentración conocida. n=4

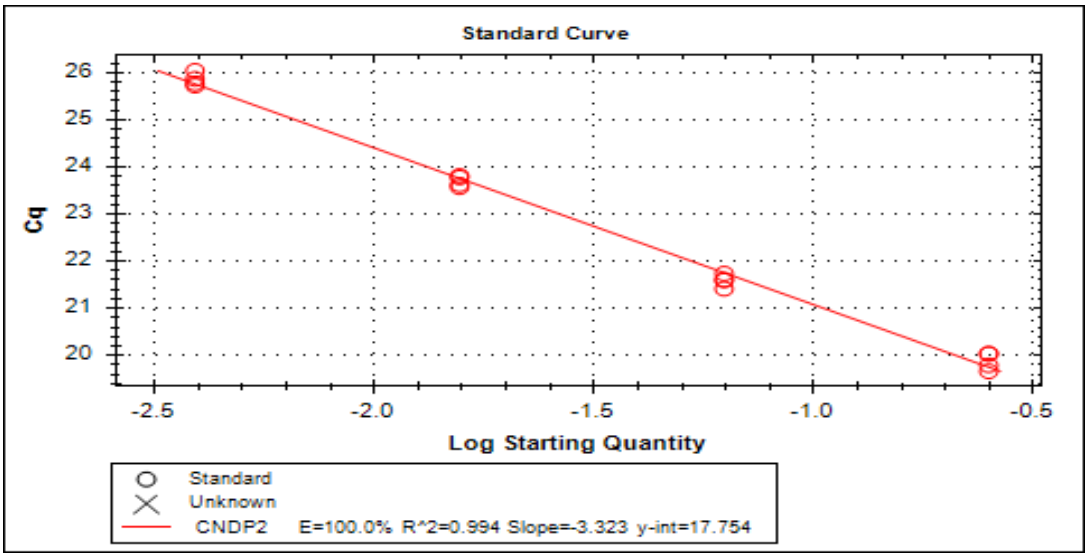


Figura 19. Curva estándar de amplificaciones a partir de diluciones seriadas de cDNA de Dipeptidasa citosólica no específica (CNDP2) con concentración conocida. n=4

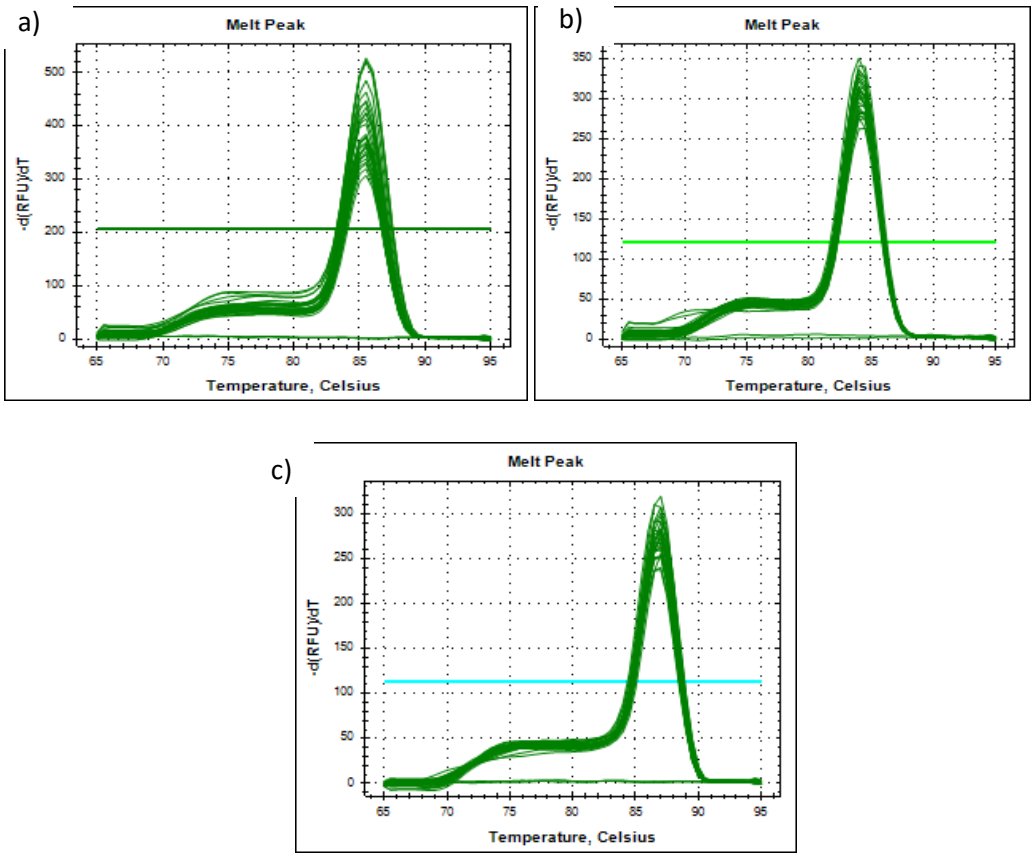


Figura 20. Curva de disociación de los cuadruplicados de los genes de referencia; (a) GAPDH, (b) RPL5 y (c) EF1α. Se observa la amplificación de específica de un solo producto de PCR y la ausencia de dímeros de primer y amplificaciones inespecíficas.

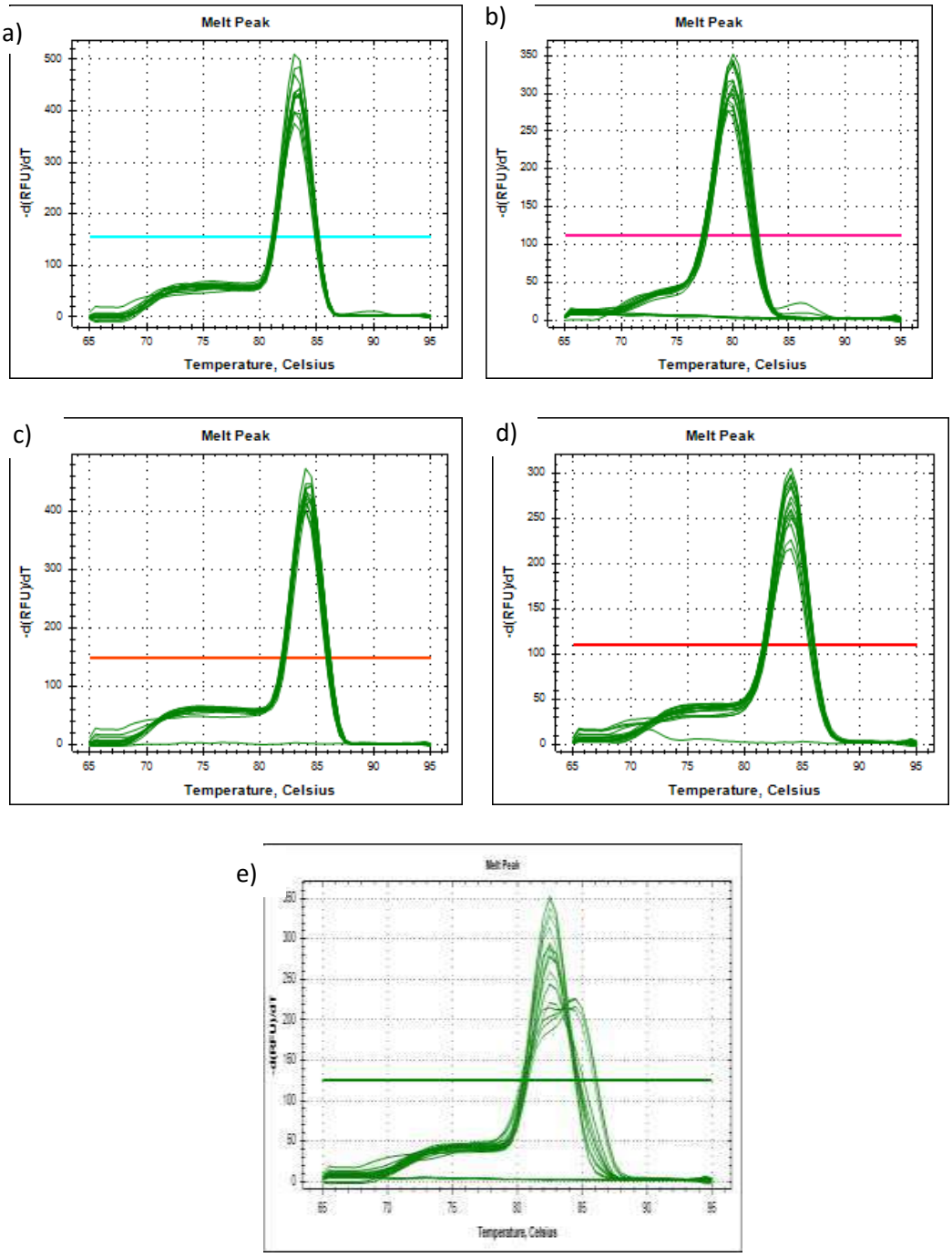


Figura 21. Curva de disociación de los cuadruplicados de los genes de enzimas pancreáticas; (a) BAL, (b) Lipasa, (c) Quimotripsina, (d) Tripsina y (e) Amilasa. Se observa la amplificación de específica de un solo producto de qPCR y la ausencia de dímeros de primer y amplificaciones inespecíficas.

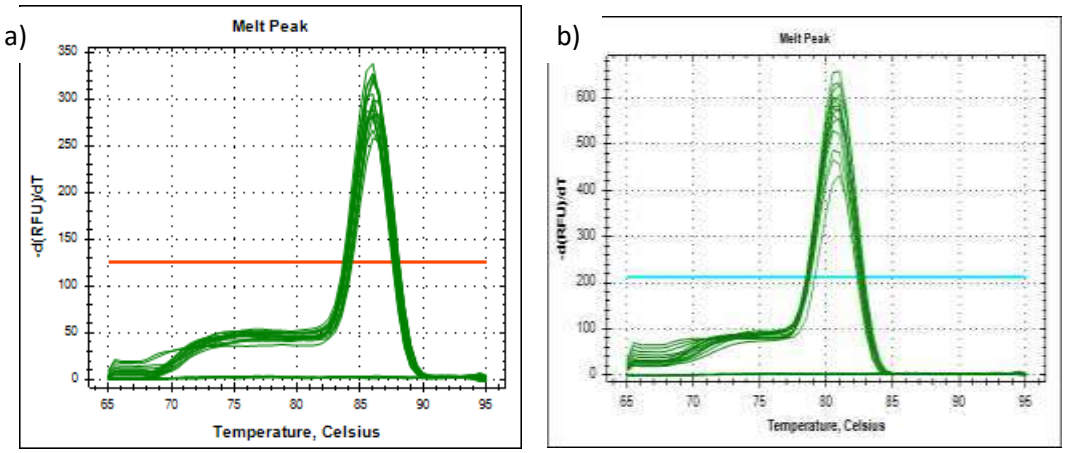


Figura 22. Curva de disociación de los cuadruplicados de los genes de enzimas de membrana de borde de cepillo; (a) LAP y (b) FAlc. Se observa la amplificación de específica de un solo producto de qPCR y la ausencia de dímeros de primer y amplificaciones inespecíficas.

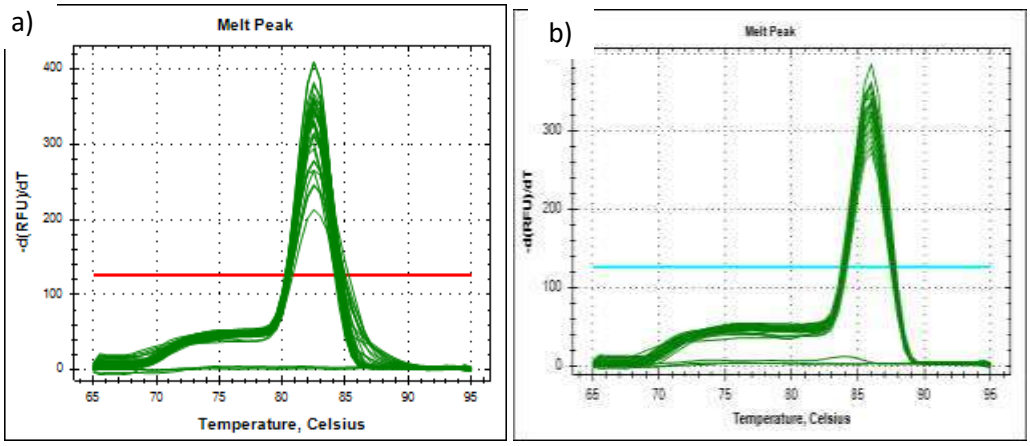


Figura 23. Curva de disociación de los cuadruplicados de los genes de enzimas de citosolicas; (a) CNDP2 y (b) FÁcida. Se observa la amplificación de específica de un solo producto de qPCR y la ausencia de dímeros de primer y amplificaciones inespecíficas.

12. ANEXO 2

El software de Bio-Rad CFX Manager V 3.0. realiza el cálculo de la cuantificación relativa normalizada para c/u de los genes evaluados en este trabajo, utilizando las formulas presentadas a continuación.

Eficiencia de la reacción para la cuantificación y la expresión génica

La eficiencia de la reacción (E) describe la cantidad que su blanco está siendo producido en cada ciclo en el protocolo. Una eficiencia del 100% significa que se está duplicando su gen con cada ciclo. La evidencia sugiere que el uso de medición precisa de la eficiencia de cada primer dará resultados más exactos cuando se analizan los datos con las fórmulas matemáticas utilizadas.

El valor predeterminado de eficiencia utilizado en los cálculos de expresión génica es 100%. Durante el desarrollo del ensayo, la eficiencia de cada primer está típicamente evaluado y registrado. Para evaluar la eficiencia de la reacción, se genera una curva estándar utilizando diluciones seriadas de una muestra representativa a través de un rango dinámico relevante, y luego se registra la eficiencia para el análisis de la expresión de genes subsiguiente.

La eficiencia (E) en las fórmulas de eficiencia se refiere a las "eficiencias" como se describe por Pfaffl (2001) y Vandesompele et al. (2002). En estas publicaciones, una eficiencia de 2 (duplicación perfecta con cada ciclo) es equivalente a una eficiencia del 100% en este software.

$$E = 10^{\left(\frac{-1}{m}\right)}$$

Donde:

m = Pendiente de la línea derivada de la curva estándar

El software tiene la opción de convertir los cálculos de eficiencia utilizados mediante las siguientes relaciones matemáticas:

E = (% Eficiencia * 0,01) + 1

% Eficiencia = (E - 1) * 100

Cantidad relativa (ΔCq)

La cantidad relativa (ΔCq) para cualquier muestra (GI) se calcula con la siguiente fórmula:

$$Cantidad\ Relativa_{muestra(GI)} = E_{GI}{}^{(C_{q(min)} - C_{q(muestra)})}$$

Donde:

E = Eficiencia de amplificación del oligonucleótido. Esta eficiencia se calcula con la fórmula (% Eficiencia * 0,01) + 1, donde el 100% de eficiencia = 2
Cq (min) = Cq promedio para la muestra con el promedio más bajo para Cq del GI
Cq (muestra) = Cq promedio de la Muestra
GI = Gen de interés

La expresión normalizada (ΔΔCq)

La expresión normalizada es la cantidad relativa de su gen de interés normalizado a las cantidades de los genes o secuencias de referencia en su sistema biológico. En el software se selecciona el gen o genes de referencia. El cálculo para la expresión normalizada se describe en la siguiente fórmula, que utiliza la cantidad relativa calculada para la evaluación (Cq):

$$Expresion\ Normalizada_{muestra(GI)} = \frac{Cq_{muestra(GI)}}{Cq_{muestra(Ref)}}$$

Dónde:

Cq = cantidad relativa de una muestra
Ref = gen de referencia o más de un gen referencia en cada muestra
GI = Gen de interés

A condición de que los genes de referencia no cambian su nivel de expresión en el sistema biológico, el cálculo de la expresión normalizada tendrá en cuenta las diferencias de carga o variaciones en el número de células que se representa en cada una de sus muestras.

13. BIBLIOGRAFÍA

Aguilar Valdez M. del C. (2012). Descripción y Comparación de las Estructuras asociadas a la alimentación de cuatro especies de Peces Atherinópsidos con potencial para la Acuicultura. Tesis de Maestría. Maestría Institucional en Ciencias Biológicas. IIAF-UMSNH.

Aguilera, A. R. (2009). Avances y Perspectivas en Microdietas para Larvas de Peces. *AquaTIC*, (30), 1-18.

Alarcón-López, F. J., y Martínez-Díaz, M. I. (1998). Fisiología de la digestión en larvas de peces marinos y sus aplicaciones al cultivo larvario en masa. *Aquatic, Nov*, *5*, 1-7.

Ali, M., Nicieza, A., & Wootton, R. J. (2003). Compensatory growth in fishes: a response to growth depression. *Fish and fisheries*, *4*(2), 147-190.

Alpbaz, A. (2007). Digestive enzyme activities in larvae of sharpsnout seabream (*Diplodus puntazzo*). *Comp Biochem Phys A*, *148*, 470477Tengjaroenkul.

Alvarez-González, C. A., Moyano-López, F. J., Civera-Cerecedo, R., Carrasco-Chávez, V., Ortiz-Galindo, J. L., y 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.

Balon Eugene K. (2002). Epigenetic processes, when *natura non facit saltum* becomes a myth, and alternative ontogenies a mechanism of evolution. Environmental Biology of Fishes 65: 1–35

Baragi, V., y Lovell, R. T. (1986). Digestive enzyme activities in striped bass from first feeding through larva development. *Transactions of the American Fisheries*

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. *Society*, *115*(3), 478-484.

Cara, B., Moyano, F. J., Zambonino, J. L., y Fauvel, C. (2007). Trypsin and chymotrypsin as indicators of nutritional status of post-weaned sea bass larvae. *Journal of Fish Biology*, *70*(6), 1798-1808.

Chakrabarti, R., Rathore, R. M., Mittal, P., y Kumar, S. (2006). Functional changes in digestive enzymes and characterization of proteases of silver carp (♂) and bighead carp (♀) hybrid, during early ontogeny. *Aquaculture*, *253*(1), 694-702.

Chi, L., Xu, S., Xiao, Z., Lin, F., Ma, D., Zhao, C., y Li, J. (2013). Pepsinogen A and C genes in turbot (*Scophthalmus maximus*): Characterization and expression in early development. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, *165* (1), 58-65.

Cortes-Ortiz E. (2016). Evaluación anatómica e histológica del sistema digestivo de dos especies de aterinópsidos, *Odontesthes bonariensis* y *Odontesthes hatcheri*, durante su ontogenia larvaria**.** Tesis de maestría. IIAF. U.MS.N.H. Pp. 23

Cuenca et al. (2013). Avances en la Fisiología Digestiva de la Mojarra Castarrica Cichlasoma urophthalmus. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Alvarez-González, C. (Eds), Contribuciones Recientes en Alimentación y Nutrición Acuícola, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, pp. 460-493.

Darias, M. J., Murray, H. M., Gallant, J. W., Astola, A., Douglas, S. E., Yúfera, M., y Martínez-Rodríguez, G. (2006). Characterization of a partial α-amylase clone from red porgy (*Pagrus pagrus*): expression during larval development. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, *143*(2), 209-218.

Darias, M. J., Murray, H. M., Gallant, J. W., Douglas, S. E., Yúfera, M., y Martínez-Rodríguez, G. (2007). Ontogeny of pepsinogen and gastric proton pump expression in red porgy (*Pagrus pagrus*): determination of stomach functionality. *Aquaculture*, *270*(1), 369-378.

Darias, M. J., Murray, H. M., Gallant, J. W., Douglas, S. E., Yúfera, M., y Martínez-Rodríguez, G. (2007). The spatio temporal expression pattern of trypsinogen and bile salt-activated lipase during the larval development of red porgy (*Pagrus pagrus*, Pisces, Sparidae). *Marine Biology*, *152*(1), 109-118.

Diaz, M. , Moyano , F.J. , Garcia - Carreno , F.L. , et al. 1997a . Substrate - SDS - PAGE determination of protease activity through larval development in sea bream . *Aquaculture International* 5 : 461 – 471 .

Douglas, S. E., Mandla, S., y Gallant, J. W. (2000). Molecular analysis of the amylase gene and its expression during development in the winter flounder, *Pleuronectes americanus*. *Aquaculture*, *190*(3), 247-260.

FAO, 2014; El estado mundial de la pesca y la acuicultura Oportunidades y desafíos, Roma

Farrell, A. P. (2011). *Encyclopedia of fish physiology: from genome to environment*. Academic Press. P.p. 752,1629

Galaviz, M. A., García-Ortega, A., Gisbert, E., López, L. M., y 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.

García-Gasca, A., Galaviz, M. A., Gutiérrez, J. N., y García-Ortega, A. (2006). Development of the digestive tract, trypsin activity and gene expression in eggs and larvae of the bullseye puffer fish *Sphoeroides annulatus*. *Aquaculture*, *251* (2), 366-376.

Goldberg, R. F., Austen, W. G., Zhang, X., Munene, G., Mostafa, G., Biswas, S., y Warren, H. S. (2008). Intestinal alkaline phosphatase is a gut mucosal defense factor maintained by enteral nutrition. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *105*(9), 3551-3556.

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., y 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. UK: Springer Verlag. pp. 35-45 y 247-249.

Hakim, Y., Rowland, S. J., Guy, J. A., Mifsud, C., Uni, Z., y 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*).*Aquaculture Research*, *38*(4), 361-372.

Hakim, Y., Harpaz, S., y Uni, Z. (2009). Expression of brush border enzymes and transporters in the intestine of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) following food deprivation. *Aquaculture*, *290*(1), 110-115.

Henning, S.J., Rubin D.C., Shulman, R.J. 1994. Ontogeny of the intestinal mucosa. In: Johnson, L.R. (Ed), Physiology of the gastrointestinal tractr, 3rd edition Raven Press, New York, pp 571-610.

HernándezGonzález A. (2007). Efecto de la densidad de población en el crecimiento de larvas de pez blanco *Chirostoma estor estor* (Pisces: Atherinidae). Tesis de Licenciatura. Facultad de Biología, UMNSH. Directores del Proyecto: Dr. Carlos Martínez Palacios y Dra. Elva Mayra Toledo Cuevas.

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.

Herrera-Vargas M.A. (2007). Evaluación de la capacidad pancreática digestiva de larvas de pez blanco *(Menidia estor)*. Tesis de Licenciatura. IIAF. U.MS.N.H

Herrera-Vargas M. A. Titulación, 12 de septiembre de 2011. Maestría Institucional en Ciencias Biológicas. UMSNH

Hoehne-Reitan, K., Kjørsvik, E. y Gjellesvik, D. R. (2001a). Development of bile salt dependent lipase in larval turbot. Journal of Fish Biology 58, 737–745. doi: 10.1006/jfbi.2000.1483.

Hoehne-Reitan, K., Kjørsvik, E., y Reitan, K. I. (2003). Lipolytic activities in developing turbot larvae as influenced by diet. *Aquaculture International*, *11*(5), 477-489.

Holt, G. Joan, (2011). Larval Fish Nutrition (1st ed., pp. 1-46). John Wiley y Sons, Inc. (ID: 12024)

Horn, M. H., Gawlicka A. K., German, D. P., Logothetis, E. A., Cavanagh, J. W., Boyle, K. S., (2006). Structure and function of the stomachless digestive system in three related species of New World silverside fishes *(Atherinopsidae)* representing herbivory, omnivory, and cRNAivory. Marine Biology 149, 1237–1245

Ibrahim, F. S., Rana, K. J., Goddard, J. S., y Al Amri, I. S. (2006). Morphological development of post hatch larval goldlined seabream *Rhabdosargus sarba* (Forskål, 1775). *Aquaculture Research*, *37*(12), 1156-1164.

KAWAI, S., y IKEDA, S. (1973). Development of the digestive enzymes of rainbow trout after hatching and the efect of dietary change on the activities.*Bull Japan Soc Science Fish*, *38*(3), 265-269.

Kendall, Jr., A. W., E. H. Ahlstrom and H.G. Moser. (1984). Ontogeny and Systematics of fishesd.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.

Kibria, G., Nugegoda, D., Fairclough, R., Lam, P., y Bradly, A. (1997). Zooplankton: its biochemistry and significance in aquaculture. *NAGA, The Iclarm Quarterly*, *20*(2), 8-14.

Kim B.G., Divakaran S. Brown C.l. Ostrowski C.A. (2001). Comparative digestive enzyme ontogeny in two marine larval fishes: Pacific threadfin (*Polydactylus sexfilis*) and bluefin trevally (*Caranx melampygus*). *Fish Physiology y Biochemistr*y.24:225-241

Kortner, T. M., Overrein, I., Øie, G., Kjørsvik, E., y Arukwe, A. (2011). The influence of dietary constituents on the molecular ontogeny of digestive capability and effects on growth and appetite in Atlantic cod larvae (*Gadus morhua*). *Aquaculture*, *315*(1), 114-120.

Kortner, T. M., Overrein, I., Øie, G., Kjørsvik, E., Bardal, T., Wold, P. A., y Arukwe, A. (2011). Molecular ontogenesis of digestive capability and associated endocrine control in Atlantic cod (*Gadus morhua*) larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular y Integrative Physiology*, *160*(2), 190-199.

Krogdahl, A. C., y Bakke-McKellep, AM (2005). El ayuno y la realimentación causa cambios rápidos en la masa de tejido intestinal y capacidades de enzimas digestivas de salmón del Atlántico (*Salmo salar L.*). *Bioquímica y Fisiología Comparada Parte A: Molecular y Fisiología Integrativa*, *141* (4), 450-460.

Kurtovic, I., Marshall, S., Zhao, X., Simpson, B.K., 2009. Lipases from mammals and fishes. Rev. Fish. Sci. 17, 18–40.

Lazo, J. P., Dinis, M. T., Holt, G. J., Faulk, C., y 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*(3), 339-351.

Lazo, J. P., Darias, M. J., y Gisbert, E. (2011). Ontogeny of the digestive tract. *Larval fish nutrition*, 3-46.

Martínez-Palacios, C. A., Ríos-Durán, M. G., Fonseca Madrigal, J., Toledo Cuevas, M., López, A. S., y Ross, L. G. (2008). Developments in the nutrition of *Menidia estor* Jordan 1880. *Aquaculture Research*, *39*(7), 738-747.

Martínez-Palacios, C. A., Morte, J. C., Tello-Ballinas, J. A., Toledo-Cuevas, M., y 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*(1), 509-522.

Matsui, M., Fowler, J.H., Walling, L.L., (2006). Leucine aminopeptidases: diversity in structure and function. Biol. Chem. 387, 1535–1544.

Moreno Basurto M. D. (2009). Cuantificación de la Expresión de los genes de Tripsina y Lipasa durante la ontogenia larvaria del pez blanco del Lago de Pátzcuaro *Menidia estor*. Facultad de Biología, UMSNH. Tesis de Licenciatura.

Moyano FJ, Diaz M, Alarco´n FJ, Sarasquete MC (1996). Characterization of digestive enzyme activity during larval development of gilthead seabream (Sparus aurata). Fish Physiol Biochem 15:121–130

Munilla-Moran, R.R. Stark, J.R. and Barbour, A. (1990). The role of exogenous enzymes in digestion in cultured turbot larvae *Scophthalmus maximus* L. Aquaculture. 88, 337-350.

Murray, H. M., Gallant, J. W., Perez-Casanova, J. C., Johnson, S. C., y Douglas, S. E. (2003). Ontogeny of lipase expression in winter flounder.*Journal of fish biology*, *62*(4), 816-833.

Murray, H. M., Gallant, J. W., Johnson, S. C., y Douglas, S. E. (2006). Cloning and expression analysis of three digestive enzymes from Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) during early development: predicting gastrointestinal functionality. *Aquaculture*, *252*(2), 394-408.

Önal, U., Çelik, İ., y Cirik, Ş. (2010). Histological development of digestive tract in discus, Symphysodon spp. larvae. *Aquaculture international*, *18*(4), 589-601.

Ortega, A. G., Cruz-Suárez, L. E., Ricque-Marie, D., y Tapia-Salazar, M. (2000). Valor nutricional de los quistes de Artemia y su uso como fuente de proteína en

dietas artificiales para larvas de peces. *Cruz-Suárez, LE; Ricque-Marie, D.; Tapia-Salazar, M*, 287-299.

Ortiz-Delgado, J. B., Darias, M. J., Cañavate, J. P., Yúfera, M., y Sarasquete, C. (2003). Organogenesis of the digestive tract in the white seabream, *Diplodus sargus*. Histological and histochemical approaches.

Ozkizilcik S., Chu F-LE., Place A.R. (1996). Ontogenetic changes of lipolytic enzymes in striped bass (Morone saxatilis). Comp Biochem Physiol 113B:631–637

Patton, J. S., Nevenzel, J. C. y Benson, A. A. (1975). Specificity of digestive lipases in hydrolysis of wax esters and triglycerides studied in anchovy and other selected
fish. Lipids 10, 575–583.

Péres, A., Cahu, C. L., Infante, J. Z., Le Gall, M. M., y Quazuguel, P. (1996). Amylase and trypsin responses to intake of dietary carbohydrate and protein depend on the developmental stage in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae.*Fish physiology and biochemistry*, *15*(3), 237-242.

Pradhan, P. K., Jena, J., Mitra, G., Sood, N., y Gisbert, E. (2013). Ontogeny of the digestive enzymes in butter catfish Ompok bimaculatus (Bloch) larvae.*Aquaculture*, *372*, 62-69.

Rathore, R. M., Kumar, S., y Chakrabarti, R. (2005). Digestive enzyme patterns and evaluation of protease classes in Catla catla (Family: Cyprinidae) during early developmental stages. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, *142*(1), 98-106.

Ríos-Durán, M. G., Navarrete-Ramírez, P., Fonseca-Madrigal, J., Mendez-Ortiz, E., Palacios, E., Racotta, I. S., y Martínez-Palacios, C. A. (2014). Optimizing initial feeding of the Pike silverside Chirostoma estor: oil droplet depletion, point of no return, growth and fatty acid utilization in larvae fed enriched rotifers. *Aquaculture Nutrition*.

Ross, L. G., Martínez-Palacios, C. A., Aguilar Valdez, M., Beveridge, M. C. M., y Chavez Sanchez, M. C. (2006). Determination of feeding mode in fishes: 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*(6), 1782-1794.

Rungruangsak-Torrissen, K., Moss, R., Andresen, L. H., Berg, A., y Waagbø, R. (2006). Different expressions of trypsin and chymotrypsin in relation to growth in Atlantic salmon (*Salmo salar L.*). *Fish Physiology and Biochemistry*, *32*(1), 7-23.

Santamarıa, C. A., de Mateo, M. M., Traveset, R., Sala, R., Grau, A., Pastor, E., y Crespo, S. (2004). Larval organogenesis in common dentex Dentex dentex L.(Sparidae): histological and histochemical aspects. *Aquaculture*,*237*(1), 207-228.

Sæle, Ø., Nordgreen, A., Olsvik, P. A., y Hamre, K. (2010). Characterization and expression of digestive neutral lipases during ontogeny of Atlantic cod (*Gadus*

morhua). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular y Integrative Physiology*, *157*(3), 252-259.

Smith, M. W. (1992). Diet effects on enterocyte development. *Proceedings of the Nutrition Society*, *51*(02), 173-178.Srichanun, M., Tantikitti, C., Vatanakul, V., y Musikarune, P. (2012). Digestive enzyme activity during ontogenetic development and effect of live feed in green catfish larvae (Mystus nemurus Cuv. y Val.). *Songlanakarin Journal of Science and Technology*, *34*(3), 247-54.

Srichanun, M., Tantikitti, C., Utarabhand, P., y Kortner, T. M. (2013). Gene expression and activity of digestive enzymes during the larval development of Asian seabass (*Lates calcarifer*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, *165*(1), 1-9.

Srivastava, A., Hamre, K., Stoss, J., Chakrabarti, R., Tonheim, S. K., 2006. Protein content and amino acid composition of the live feed rotifer (*Brachionus plicatilis*): With emphasis on the water soluble fraction. *Aquaculture* 254: 534–543

Suzer, C., Aktülün, S., Çoban, D., Kamacı, H. O., Saka, Ş., Fırat, K., y Alpbaz, A. (2007). Digestive enzyme activities in larvae of sharpsnout seabream (*Diplodus puntazzo*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular y Integrative Physiology*, *148*(2), 470-477.

Tengjaroenkul, B., Smith, B. J., Caceci, T., y Smith, S. A. (2000). Distribution of intestinal enzyme activities along the intestinal tract of cultured Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L. *Aquaculture*, *182*(3), 317-327.

Toledo-Cuevas, E. M., Moyano López, F. J., Ramírez, D. T., Strüssmann, C. A., Álvarez-González, C. A., Martínez-Chávez, C. C., y Martínez-Palacios, C. A. (2011). Development of digestive biochemistry in the initial stages of three cultured Atherinopsids. *Aquaculture Research*, *42*(6), 776-786.

Toledo-Cuevas, E.M. (2016). Primer informe parcial del proyecto de Ciencia Básica CONACyT “determinación del modelo de maduración digestiva de las tres especies de atherinópsidos cultivados”.

Uscanga-Martínez, A., Perales-García, N., Alvarez-González, C. A., Moyano, F. J., Tovar-Ramírez, D., Gisbert, G. E. y 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.

Villafuerte-Herrera L. S. (2011). “Efecto del fotoperiodo y de la disponibilidad de alimento sobre la actividad enzimática digestiva de larvas del pez blanco del Lago de Pátzcuaro, *Menidia estor*”. Tesis de Licenciatura. Facultad de Biología, UMSNH. Director: Dra. Elva Mayra Toledo Cuevas. Codirector: Dr. C. Cristian Martínez Chávez.

Wu, X., Washio, Y., Aritaki, M., Fujinami, Y., Shimizu, D., Hashimoto, H., y Suzuki, T. (2011). Staging of initial pepsinogen and chitinase expression and complete

gastric gland development within the larval stomach of Japanese flounder, spotted halibut, seven-band grouper and greater amberjack.*Aquaculture*, *314*(1), 165-172.

Zambonino-Infante, J.L. y C.L. Cahu. 2001. Ontogeny of the gastrointestinal tract ofmarine fish larvae. Comp. Biochem. Physiol. 130C, 477-487.

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

Zambonino-Infante, J. L., y Cahu, C. L. (2010). Effect of nutrition on marine fish development and quality. *Recent Advances in Aquaculture Research Transworld Research Network, Kerala, India*, 103-124.