



Dirección de Estudios de Posgrado  
Departamento de Servicios Escolares

TESIS DEFENDIDA POR  
**Lux Getsemany Juárez Casillas**  
Y APROBADA POR EL SIGUIENTE COMITÉ

---

Dr. Miguel Ángel del Río Portilla

*Co-Director del Comité*

---

Dr. Juan Pablo Lazo Corvera

*Co-Director del Comité*

---

Dra. Mónica Hernández Rodríguez

*Miembro del Comité*

---

Dr. Axayacatl Rocha Olivares

*Miembro del Comité*

---

Merixell Riquelme Pérez

*Coordinador del Programa de Posgrado en  
Ciencias con Orientación en Acuicultura*

---

Dr. David Hilario Covarrubias Rosales

*Director de Estudios de Posgrado*

29 de Junio de 2009

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN SUPERIOR  
DE ENSENADA**



---

**PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS  
EN CIENCIAS CON ORIENTACION EN ACUICULTURA**

---

**EXPRESIÓN DE TRES ENZIMAS DIGESTIVAS DURANTE LA ONTOGENIA  
LARVAL DEL LENGUADO DE CALIFORNIA *Paralichthys californucis***

TESIS

que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de  
MAESTRO EN CIENCIAS

Presenta:

LUX GETSEMANY JUAREZ CASILLAS

Ensenada, Baja California, México, Junio del 2009.

**RESUMEN** de la tesis de Lux Getsemany Juárez Casillas, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de MAESTRO EN CIENCIAS CON ORIENTACION EN ACUICULTURA. Ensenada, Baja California. Junio 2009.

**EXPRESIÓN DE TRES ENZIMAS DIGESTIVAS DURANTE EL DESARROLLO LARVAL DEL LENGUADO DE CALIFORNIA *Paralichthys californicus***

Resumen aprobado por:

---

Miguel Ángel del Río Portilla  
*Codirector del Comité*

---

Juan Pablo Lazo Corvera  
*Codirector de Comité*

El lenguado de California (*Paralichthys californicus*) representa un gran potencial para la acuicultura por su excelente calidad y precio en el mercado. Sin embargo, como en el caso de muchos peces marinos, existen algunas dificultades para su cultivo. Una de las más importantes es el abastecimiento de juveniles, debido a que en el cultivo las larvas requieren alimento vivo. Por otra parte, se desconocen los requerimientos nutricionales en etapas tempranas así como su capacidad digestiva y los cambios ontogenéticos durante el desarrollo larval.

El objetivo del presente estudio fue conocer la capacidad digestiva de las larvas del lenguado de California desde la eclosión hasta la metamorfosis, mediante la expresión y actividad de tres de las principales enzimas digestivas implicadas en la digestión de los nutrientes esenciales para esta especie. Se utilizaron iniciadores sintetizados a partir de la secuencia parcial del gen de las enzimas de los lenguados de invierno (*Pleuronectes americanus*) y del Atlántico (*Hippoglossus hippoglossus*) y se amplificaron los segmentos de los genes del tripsinógeno (TRY), del pepsinógeno (PEP) y de la lipasa activada por sales biliares (LBAL) a partir de RNA total extraído de larvas y juveniles utilizando la transcripción reversa y PCR (RT-PCR). Los productos de la PCR fueron secuenciados y se compararon con secuencias similares en el banco de genes. Los análisis correspondientes demostraron que las secuencias de aminoácidos obtenidos de los genes expresados en el lenguado de California, fueron similares a los zimógenos de las tres enzimas digestivas y éstas guardaron una relación filogenética cercana con otras especies tales como el lenguado japonés (*Paralichthys olivaceus*), el lenguado de invierno (*Pleuronectes americanus*) y el lenguado del Atlántico (*Hippoglossus hippoglossus*) entre otras.

Para los análisis de expresión enzimática se llevó a cabo un cultivo larvario en el laboratorio húmedo del Departamento de Acuicultura del CICESE, con huevos

fecundados y larvas recién eclosionadas de los reproductores mantenidos en cautiverio en The Cultured Abalone Inc. City Goleta CA., USA.

El análisis por RT-PCR reveló que la expresión del TRY y el PEP fueron evidentes al momento de la eclosión y la LBAL se presentó a los tres días después de la eclosión (DDE), correspondiente al momento de la primera alimentación. En este momento se presentó la actividad de la TRY y de la LBAL, pero la actividad proteolítica ácida total (tipo PEP) no fue evidente si no hasta los 18 DDE. Con los resultados obtenidos en el presente trabajo se corroboró que las larvas del lenguado de California tienen la capacidad para efectuar la digestión alcalina de proteínas y lípidos al momento de la primera alimentación. Esta capacidad de digestión estuvo en sincronía con la expresión génica de la TRY y la LBAL. Por otra parte, al encontrar la posible expresión del PEP en etapas anteriores a la maduración del sistema digestivo, así como la expresión en diferentes tejidos, se sugiere que es probable que exista un PEP en otros tejidos, distintos a los digestivos, por lo que no fue posible determinar la expresión ni el momento de primera actividad de las pepsinas digestivas durante el desarrollo larval del lenguado de California.

**Palabras Clave:** Expresión enzimática, Enzimas digestivas, Ontogenia larval y Lenguado de California

**ABSTRACT** of the thesis presented by **Lux Getsemany Juárez Casillas** as a partial requirement to obtain the MASTER OF SCIENCE degree in AQUACULTURE. Ensenada, Baja California, México June 2009.

**EXPRESSION OF THREE DIGESTIVE ENZYMES DURING DEVELOPMENT OF THE CALIFORNIA FLOUNDER LARVAE (*Paralichthys californicus*)**

The California flounder (*Paralichthys californicus*) has a great potential for aquaculture due to its excellent quality and high price in the national and international markets. However, as in the case of many marine fishes, there are some culture techniques difficulties. One of the most important is the juvenile supply, because larvae require live food. On the other hand, there is a lack of knowledge on the nutritional requirements of the California flounder early stages and its digestive capacity, besides the ontogenetic changes during larval development.

The aim of this study was to determine the digestive capacity of the California flounder larvae from hatch to metamorphosis, by measuring the expression and activity of three main digestive enzymes. Primers targeting the gene segments of tripsinogen (TRY), pepsinogen (PEP) and lipase activated by bile salts (LBAL) had been described for the winter flounder (*Pleuronectes americanus*) and Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). These primers were used to amplify TRY, PEP and LBAL in the California flounder from total RNA extracted from larvae and juveniles using the reverse transcriptase PCR (RT-PCR). PCR products were sequenced and analyzed. All three enzyme amino acid sequences derived from the cDNA sequences expressed in the California flounder were similar to those from other species and had a close phylogenetic relationship with other species such as Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*), the winter flounder (*P. americanus*) and the Atlantic halibut (*H. hippoglossus*), among others.

Fertilized eggs and newly hatched larvae were obtained from The Cultured Abalone Inc. City Goleta CA., USA. Larvae were grown at the fish culture laboratory of the Aquaculture Department CICESE and the analyses of enzyme expression were carried out with cultured larvae.

The RT-PCR analyses revealed that TRY and PEP were expressed at the hatching time, while LBAL was expressed three days after hatching (DDE), when the first feeding occurred. TRY and LBAL activities were present at first feeding, but the total acid proteolytic activity (type PEP) was not clear until 18 DDE. It is concluded that the California flounder larvae have the ability to make the alkaline digestion of proteins and lipids at first feeding. Additionally, the enzymatic activity of TRY and LBAL occurred in synchrony with the gene expression. Moreover, the expression of the PEP in stages prior to digestive system maturation, suggests that PEP may be expressed in other tissues, and not only in the stomach. Therefore, it was not

possible to determine the expression and the time of first activity of PEP during larval development of the California flounder.

**Key words:** enzymatic expression, digestive enzymes, larval ontogeny, California flounder

## **Dedicatorias**

### **A mis padres:**

Ing. Luis Manuel Juárez Medrano y

Guadalupe Casillas Domínguez.

Por su apoyo incondicional, su confianza y hacer de mi la mujer que ahora soy.

Mi mamá Virginia Casillas D.

Por siempre mostrarme el buen camino.

### **A mis hermanos:**

Luis Fco. Emmanuel Juárez C.

Ana Luisa Juárez R.

Erika Virginia C.

Por su cariño y compañía a lo largo de mi vida.

### **A mi Amor:**

Ing. Vladimir Varela Niebla

Por su comprensión, su amor incondicional y paciencia en estos días de trabajo.

**A mis maestros y amigos que creyeron en mí en todo momento**

## AGRADECIMIENTOS

**A mi Comité de tesis el Dr. Miguel Ángel del Río Portilla, el Dr. Juan Pablo Lazo Corvera, Dra. Mónica Hernández Rodríguez y el Dr. Axayacatl Rocha Olivares:** por sus valiosas enseñanzas, sabios consejos, correcciones y comentarios, para la culminación de mi tesis.

**Al M. en C. Omar Mendoza Porras y el Biol. Alberto Miranda,** Técnicos del laboratorio de genética del departamento de acuicultura, por su asesoría teórica y práctica en la estandarización de técnicas moleculares: Extracciones de ácidos nucleicos y amplificaciones por PCR y RT-PCR.

**Al M. en C. Emmanuel Martínez Montaña y la Oceanol. Yesika Solórzano Salazar:** por su asesoría en la estandarización y realización de las técnicas bioquímicas de actividad enzimática.

**Al M. en C. Mario Galaviz, la M en C. Verónica Vizcaíno, M.V.Z. Fernando Y. Gómez:** por su apoyo y asesoría en el cultivo larvario.

**A la Dra. María Teresa Viana y el Dr. Luis Enríquez (IIO, UABC), la Dra. María del Pilar Sánchez Saavedra (Acuicultura, CICESE):** por proporcionar material y equipo para los análisis bioquímicos y moleculares.

**A CONACYT y CICESE:** por su apoyo económico durante el ciclo del posgrado.

**A los investigadores de Acuicultura:** por sus valiosas enseñanzas y sabios consejos.

**Al personal de CICESE:** Investigadores, técnicos, secretarías, administrativos, etc. Quienes directa e indirectamente participaron en la realización de este trabajo. En especial a Varuni por estar al pendiente de las necesidades del laboratorio y los técnicos por su apoyo en el cultivo larvario y el manejo del sistema de recirculación del departamento de acuicultura.

**A mis amigos y compañeros de jornada:** Marisol, Socorro, Ana, Fernando, Luis, Paola, Catalina, Pablo, Ruth, Ivonne, Diana, Yanet, Christina, Sergio y Ángela: quienes proporcionaron apoyo y alegrías durante mi estancia en Ensenada.



## CONTENIDO

	Página
<b>Resumen español</b> .....	i
<b>Resumen inglés</b> .....	iii
<b>Dedicatorias</b> .....	v
<b>Agradecimientos</b> .....	vi
<b>Contenido</b> .....	vii
<b>Lista de Figuras</b> .....	x
<b>Lista de Tablas</b> .....	xiii
<b>I. Introducción</b> .....	1
I.1 General.....	1
I.2 Antecedentes.....	4
I.2.1 Cultivo de peces planos .....	4
I.2.2 El lenguado de California .....	5
I.2.3 Ontogenia del sistema digestivo en larvas de peces marinos .....	6
I.2.4 Alimentación y nutrición en larvas de lenguado de California .....	7
I.2.5 Enzimas digestivas y actividad enzimática en larvas de peces marinos .....	8
I.2.6 Estudios de actividad y expresión de las enzimas digestivas en peces marinos .....	10
<i>Actividad de las enzimas digestivas en peces marinos</i> .....	10
<i>Expresión génica de las enzimas digestivas</i> .....	12
<i>Tripsinógeno</i> .....	14
<i>Pepsinógeno</i> .....	15
<i>Lipasa activada por sales biliares</i> .....	16
<b>II. Objetivos</b> .....	17
II. 1 General .....	17
II. 2 Particulares .....	17
<b>III. Materiales y Métodos</b> .....	18
III.1 Análisis de secuencias y filogenético .....	18
III.1.1 Síntesis de cDNA por RT-PCR .....	18

CONTENIDO (continuación)	
III.1.2 Extracción de RNA total .....	18
III.1.3 Retrotranscripción .....	19
III.1.4 Electroforesis .....	20
III.1.2 Secuenciación .....	21
III.2 Análisis de expresión y actividad enzimática durante el desarrollo larval del lenguado de California .....	22
III.2.1 Obtención de los organismos y cultivo larvario .....	22
Cultivo y enriquecimiento de rotíferos .....	23
Eclosión y enriquecimiento de Artemia .....	23
III.2.2 Crecimiento larval .....	24
III.2.3 Toma y procesamiento de las muestras .....	24
III.2.4 Expresión génica .....	24
III.2.5 Preparación del extracto enzimático .....	25
III.2.5 Actividad de la tripsina .....	25
III.2.5 Actividad proteolítica ácida .....	25
III.2.5 Actividad de la lipasa activada por sales biliares .....	26
<b>IV. Resultados y Discusión .....</b>	<b>28</b>
IV.1 Retrotranscripción .....	28
IV.2 Secuencias de nucleótidos de los segmentos amplificados .....	29
IV.3 Desarrollo y crecimiento larvario .....	31
IV.4 Tripsinógeno (TRY) .....	33
IV.4.1 Secuencias del TRY del lenguado de California .....	33
IV.4.2 Comparación de las secuencias y relación filogenética .....	35
IV.4.3 Expresión y actividad de la tripsina durante el desarrollo larval ....	38
IV.5 Pepsinógeno (PEP) .....	40
IV.5.1 Secuencia del PEP del lenguado de California .....	40
IV.5.2 Comparación de las secuencias y relación filogenética .....	41
IV.5.3 Expresión y actividad de la pepsina durante el desarrollo larval ...	45
IV.6 Lipasa activada por sales biliares (LBAL) .....	48
IV.6.1 Secuencia de la LBAL del lenguado de California .....	48
IV.6.2 Comparación de las secuencias y relación filogenética .....	51
IV.6.4 Expresión y actividad de la lipasa activada por sales biliares durante el desarrollo larval .....	53
<b>V. Conclusiones .....</b>	<b>56</b>
<b>VI. Recomendaciones .....</b>	<b>57</b>

## CONTENIDO (continuación)

<b>VII. Literatura citada .....</b>	<b>58</b>
<b>Anexos .....</b>	<b>64</b>

## LISTA DE FIGURAS

<i>Figura</i>		<b>Página</b>
1	Producto de RT-PCR con iniciadores sintetizados de <i>P. americanus</i> (Pa) e <i>H. hippoglossus</i> (Hh), con RNA total extraído de un macerado de tejidos del sistema digestivo de juveniles de <i>P. californicus</i> , visualizado con una electroforesis de 90 V y 400mA por 30 minutos, en un gel de agarosa de uso rutinario al 1.5% y un marcador molecular (E) de 100 pb (Invitrogen).	29
2	Crecimiento en peso seco (mg) de las larvas de <i>P. californicus</i> durante el periodo experimental. DDE (edad en días después de la eclosión). Media $\pm$ D.E. (desviación estándar) ecuación de la curva exponencial ajustada.	31
3	Desarrollo larval del Lengado de California durante el periodo experimental. DDE (edad en días después de la eclosión).	32
4	Secuencia de nucleótidos y secuencia deducida de aminoácidos (negritas) del Tripsinógeno amplificada con iniciadores de <i>P. americanus</i> ( ) por RT-PCR con mRNA de tejido digestivo de juveniles y larvas de <i>P. californicus</i> . La diferencia en nucleótidos y aminoácidos entre los alelos Ia y Ib se indican por ▼ y ■ respectivamente. Además se señalan las asparginas involucradas en la actividad catalítica del TRY [D] y las cisteínas responsables de los enlaces disulfuro [C].	34
5	Comparación de la secuencia de aminoácidos del TRY del lengado de California en las diez especies con mayor similitud, así como la secuencia de las especies de las que se derivan los iniciadores utilizados para la RT-PCR. En <b>sombreado</b> se indican los sitios conservados entre las secuencias de las especies y en un sombreado más <b>oscuro</b> se encuentran señalados los sitios activos de los ácidos aspárticos involucrados en la actividad catalítica de la enzima. En <b>negro</b> se indican las cisteínas involucradas en los enlaces bisulfuro y en el <b>recuadro</b> se encierra el sitio donde hibridan los iniciadores RTTRY2/1 y RTTRY2/3.	37
6	Relación filogenética por el método de unión de vecinos (Neighbor Joining) de las secuencias de nucleótidos <b>(a)</b> y aminoácidos <b>(b)</b> de TRY del lengado de California y las 14 secuencias más similares existentes en el banco de genes, resultado del BLASTN (Apéndice A y B).	38
7	Expresión génica del tripsinógeno durante los primeros 20 días de desarrollo larval del lengado de California. Edad en días después de la eclosión (DDE). Con un marcador molecular de 100 pb indicado por (E) y el control negativo (-).	39

## LISTA DE FIGURAS (continuación)

<i>Figura</i>		<b>Página</b>
8	Actividad enzimática de la TRY durante los primeros días de crecimiento larval de <i>P. californicus</i> . Las barras indican la desviación estándar.	40
9	Secuencia de nucleótidos y aminoácidos (negritas) del pepsinógeno del lenguado de California, resultado de la RT-PCR y los iniciadores Rtpep1b-3b y RTHALPEP5'B-3'B2 indicados por ( ). Los sitios de diferencias de nucleótidos y aminoácidos entre los tres alelos son indicados mediante una caja de línea punteada sombreado (▼) y uno de los dos ácidos aspárticos asociados con los sitios activos es indicado por sombreado sólido (■), las cajas □ indican las tres cisteína que forman los enlaces bisulfuro y ▨ indica el sitio donde inicia el intrón en el PEP 1c.	42
10	Comparación de la composición de aminoácidos en las secuencias del PEP del lenguado de California y las diez secuencias con mayor similitud a ésta. En sombreado se indican los sitios conservados entre las secuencias de las especies y en un sombreado más oscuro se encuentran señalados los sitios del ácido aspártico involucrado en la actividad catalítica de la enzima. En negro se indican las cisteínas involucradas en los enlaces bisulfuro y en el recuadro se encierra el sitio donde hibridan los pares de iniciadores del lenguado de invierno y del Atlántico.	44
11	Relación filogenética por el método de unión de vecinos (Neighbor Joining) de las secuencias de nucleótidos (a) y aminoácidos (b) de PEP del lenguado de California y las 9 secuencias más similares existentes en el banco de genes (Apéndices C, D, E	45
12	Expresión génica de la PEP durante los primeros 20 DDE de crecimiento larval del lenguado de California. Marcador molecular de 100 pb (E). Edad de larvas en días después de la eclosión (DDE) y el control negativo (-).	46
13	Actividad total proteolítica ácida (tipo pepsina) durante los primeros días de crecimiento larval del lenguado de California (DDE). Las barras indican la desviación estándar.	47
14	Secuencia de nucleótidos y secuencia deducida de aminoácidos de las LBAL de <i>P. californicus</i> . Se indican los sitios de los iniciadores (RTBAL5' y 3'; RTHALBAL5' y 3'), los sitios de diferencia entre las secuencias de ambos alelos de la LBAL de <i>P. californicus</i> (▼) y uno de los tres sitios catalíticos (S <sup>79</sup> ) mediante sombreado. La región involucrada en la vinculación con sales biliares está subrayada (—). El sitio de la N-glicosilación está encerrado en un recuadro de línea continua □. El sitio activo de la serina se indica por un recuadro de línea semicontinua □	51

## LISTA DE FIGURAS (continuación)

<i>Figura</i>		<b>Página</b>
15	Comparación de la composición de aminoácidos en las secuencias del PEP del lenguado de California y las secuencias con mayor similitud a ésta. En <b>sombreado</b> se indican los sitios conservados entre las secuencias de las especies y en un sombreado más <b>oscuro</b> se señala uno de los tres sitios catalíticos de la LBAL. En <b>negro</b> se indican los activos conservados entre las especies.	53
16	Relación filogenética por el método de unión de vecinos (Neighbor Joining) de las secuencias de nucleótidos <b>(a)</b> y aminoácidos <b>(b)</b> de la LBAL del lenguado de California y las cinco secuencias más similares existentes en el banco de genes.	54
17	Expresión génica de la LBAL durante los primeros 20 días de desarrollo larval de <i>P. californicus</i> en días después de la eclosión (DDE). El marcador molecular de 100 pb es indicado por (E), se indica el control negativo (-).	55
18	Actividad enzimática de las LBAL durante los primeros días de crecimiento larval DDE de <i>P. californicus</i> . U (1 unidad=0.1 absorbancia a 400nm x 10). Las barras indican la desviación estándar.	55

## LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I	Secuencia de cebadores para la síntesis de cDNA de las enzimas digestivas, por medio de la RT-PCR (Murray <i>et al.</i> 2006).	20
II	Tamaños de las secuencias de nucleótidos de los genes de las enzimas digestivas del lenguado de California y las especies más similares a éste.	30

# Capítulo I

---

## Introducción

---

### I.1. General

La creciente demanda de diversas especies de importancia económica asociada a la explotación pesquera, ha originado el uso y expansión de la acuicultura como una alternativa para la producción de especies marinas. La acuicultura actualmente constituye una de las actividades económicas más utilizadas en la actualidad. Según los reportes de la FAO (2006), la acuicultura mundial ha crecido significativamente más rápido que otros sectores de producción de alimento, con una tasa promedio anual de 8.8 por ciento desde 1970 hasta 2004, comparado con el 1.2 por ciento de la captura pesquera y el 2.8 por ciento de la producción de carne. La producción mundial por acuicultura fue de 59.4 millones de toneladas (Mt) para 2004, con un valor de \$ 70.3 mil millones de dólares US, lo cual presentó un incremento anual del 6.9 por ciento en cantidad y el 7.7 por ciento en valor desde el 2002. En este periodo el porcentaje destinado al consumo humano incremento en un 8.9 %. El grupo de especies de mayor producción es el de los peces, alcanzando una producción aproximada a los 28 Mt para el 2004 (FAO, 2006).

En Latinoamérica, el cultivo comercial de peces marinos es una actividad que se desarrolla principalmente en las costas de Chile. En 1991 inició sus primeras transferencias tecnológicas desde el sector público (Universidades locales) y privado (Organismos extranjeros y nacionales) enfocado principalmente a la producción de peces planos como el Turbot o rodaballo (*Scophthalmus maximus*; Linnaeus, 1758), Hirame de Japón (*Paralichthys olivaceus*; Twmminck y



Schlegel, 1846), Halibut del Atlántico (*Hippoglossus hippoglossus*; Linnaeus, 1758) (Conklin, *et al.* 2004).

En México, se llevan a cabo diversas actividades acuiculturales orientadas principalmente a la producción de crustáceos, moluscos, peces de agua dulce y recientemente a peces marinos. Las especies más cultivadas son el camarón, la carpa, la tilapia, la trucha, el ostión y el bagre. Para el 2002, el país se ubicó en el séptimo lugar mundial de los países con mayor crecimiento en acuicultura, la cual aporta el cinco por ciento de la producción total pesquera. La producción controlada de juveniles de alta calidad y en cantidad suficiente es esencial para el desarrollo adecuado de la industria de cultivo de peces marinos. Por lo tanto, esfuerzos recientes se han enfocado a desarrollar técnicas eficientes para el larvicultivo. Producciones larvarias exitosas se han logrado para la cabrilla arenosa (*Paralabrax maculatofasciatus*; Steindachner, 1868), totoaba (*Totoaba macdonaldi*; Gilbert, 1890), el botete (*Sphoeroides annulatus*; Yenyns, 1842), lenguado de California (*Paralichthys californicus*; Ayres, 1859), la corvina dorada (*Sciaenops ocellatus*; Linnaeus, 1766), la corvina blanca (*Atractoscion nobilis*; Ayres, 1860) y huachinango (*Lutjanus peru*; Nichols y Murphy, 1922) y el pargo flamenco (*Lutjanus guttatus*; Steindachner, 1869) (García-Ortega y Lazo, 2004). Sin embargo, el cultivo de peces marinos presenta diversas dificultades para su desarrollo. Uno de los principales problemas es la obtención y cría de larvas, esto debido al desconocimiento de las condiciones ambientales óptimas para el cultivo, la falta de información acerca de los hábitos alimenticios, requerimientos nutricionales, los cambios ontogenéticos y del crecimiento larval.

Otro problema que presenta el cultivo de peces marinos es la alimentación de las larvas en etapas tempranas, debido a que está constituida por presas vivas, lo que genera un alto costo de producción, debido a que se requiere llevar a cabo un cultivo de apoyo paralelamente al cultivo larvario para la producción. Por lo tanto, existe un gran interés en la formulación de microdietas que sustituyan a las

presas vivas desde el inicio de la alimentación exógena. Idealmente estas dietas deben de ser de bajo costo, que estimulen su ingestión y digestión y que satisfagan las necesidades nutricionales de cada especie. Para ello es imprescindible conocer el desarrollo de la capacidad digestiva larval durante su ontogenia para poder modular las funciones digestivas disminuyendo el periodo de alimentación con presas vivas. Motivo por el cual, en el presente trabajo se evaluó la capacidad digestiva de las larvas del lenguado de California (*Paralichthys californicus*) durante su ontogenia, con base en la expresión génica y la actividad bioquímica de tres de las principales enzimas involucradas en los procesos digestivos. Además, se determinó si existe una sincronía en la expresión de los zimógenos y la primera actividad enzimática. La información derivada de esta investigación ayudará a ampliar el conocimiento y sentar las bases para contribuir al desarrollo de la formulación de dietas adecuadas para la alimentación de las larvas del lenguado de California en etapas tempranas de desarrollo.

## **I.2. Antecedentes**

### **I.2.1. Cultivo de peces planos**

Los peces planos se encuentran entre los más populares y valiosos usados para el consumo humano. Éstos contribuyen en gran medida a las pesquerías de todo el mundo y muchas especies se cotizan entre los precios más altos del mercado. Estas características los hacen candidatos atractivos para el cultivo intensivo (Howell y Yamashita, 2005).

El cultivo de peces planos en la región del Atlántico ha aumentando constantemente. Los miembros de este grupo de peces se encuentran en las listas de nuevas especies potenciales para la acuicultura. Este sector está dominado por el cultivo de alrededor de 5000 toneladas métricas por año del rodaballo Europeo (*Scophthalmus maximus*). Otras especies de importancia son el lenguado o Halibut del Atlántico (*Hippoglossus hippoglossus*), y el lenguado senegalense (*Solea senegalensis*; Koup, 1858) (Brown, 2002). En otras partes del mundo muchas especies del género *Paralichthys* son cultivadas. Este género incluye al lenguado japonés (*Palarichthys olivaceus*) y el lenguado de verano (*Paralichthys dentatus*; Linnaeus, 1766) (Howell y Yamashita, 2005).

Con el objetivo de disminuir la presión pesquera sobre el lenguado de California, se ha desarrollado un programa de desarrollo de la tecnología de cultivo para esta especie. En Redondo Beach, California, y Hubbs-SeaWorld Institute en San Diego, se mantiene un grupo de adultos que desovan en la primavera de cada año. En el 2002, con el apoyo del programa del colegio Sea Grant de California y proyectos Conacyt otorgados al CICESE en México, se inició con el desarrollo de un protocolo de cultivo y engorda de juveniles de lenguado de California destinados a la acuicultura comercial (Conklin *et al.* 2003; Lazo y Barón, 2005).

### **I.2.2. El lenguado de California**

El lenguado de California del género *Paralichthys* pertenece a la familia Paralichthyidae. Este organismo se distribuye desde Long Beach, Washington EUA, hasta Bahía Magdalena en Baja California Sur, México, por ello se ha clasificado a la especie como componente de la fauna norteña (Allen, 1988).

Los juveniles de lenguado de California son característicos de la comunidad de peces tanto en bahías como lagunas costeras y como adultos son importantes depredadores y acechadores de peces costeros. Los adultos desovan en aguas costeras durante los meses de febrero a agosto y las larvas se establecen en zonas cercanas a la costa. Entre los 27 y 42 días después de la eclosión (DDE), las larvas experimentan el proceso de metamorfosis e inician el comportamiento de asentamiento, cambiando de una forma bilateralmente simétrica del cuerpo y con comportamiento pelágico, a un juvenil asimétrico de forma plana sobre uno de los costados del cuerpo y adquiere un comportamiento bentónico. Después de la metamorfosis migran hacia aguas protegidas y semiprotegidas de bahías y estuarios donde crecen hasta retornar a su hábitat en mar abierto uno a dos años más tarde (Vargas-Carreño, 2005).

El lenguado de California es un recurso pesquero de gran importancia en las costas del Pacífico mexicano y del sur de California de los Estados Unidos. Esta especie alcanza las mayores tallas comerciales de toda la familia Paralichthyidae, por lo que se considera un producto óptimo para la acuicultura. Además, tiene una gran aceptación comercial por la textura y el sabor de su carne (Conklin *et al.* 2003). La mayor abundancia de esta especie se localiza entre los 30 y 100 m de profundidad, es un recurso que se explota todo el año, aunque la mejor temporada se concentra de mayo a julio: la región noroeste de México ocupa el primer lugar en la captura nacional (Carta Nacional Pesquera 2006).

### **I.2.3. Ontogenia del sistema digestivo en larvas de peces marinos**

Las larvas de peces marinos en su mayoría presentan gran cantidad de cambios fisiológicos y morfológicos durante su primer mes de vida. La gran mayoría de los peces marinos al momento de la eclosión carecen de un estómago funcional y su tracto gastrointestinal se desarrolla progresivamente durante la ontogenia larval reguladas genéticamente (Zambonino-Infante y Cahu, 2001). Douglas *et al.* (1999); Zambonino-Infante y Cahu (2001); Murray *et al.* (2006 y 2003); Gilsbert *et al.* (2003); Chen *et al.* (2006); Álvarez-González *et al.* (2006) y Zacarías-Soto *et al.* (2006) han realizado investigaciones acerca de este tema con varias especies de peces marinos donde han mostrado que el estómago, el páncreas y el intestino no se encuentran totalmente maduros en el momento de la eclosión y que estos órganos presentan algunos cambios morfológicos y funcionales durante el desarrollo larval. Tales estudios han sentado las bases para describir y determinar la capacidad digestiva de las distintas especies. En una descripción reciente de la ontogenia del sistema digestivo en las larvas del lenguado de California se encontró que al momento de la eclosión, su sistema digestivo está indiferenciado y tanto la boca como el ano se encuentran cerrados (Zacarías-Soto *et al.* 2006). La diferenciación del canal alimenticio (esófago, intestino pre- y post-valvular) es evidente a los 3 DDE (momento de la primera alimentación). Los gránulos zimógenos (precursores de las enzimas pancreáticas) son detectados en el páncreas un día antes de iniciar la alimentación exógena y su número aumenta en la primera alimentación. El estómago se diferencia morfológicamente entre los 27 y 30 DDE, en sincronía con el inicio de la migración del ojo (metamorfosis) (Gisbert *et al.* 2003; Zacarías-Soto *et al.* 2006). Para esta fase de desarrollo se distinguen la abundante presencia de las glándulas gástricas, la región cardiaca del estómago y las regiones pilóricas. Se obtuvieron resultados similares en estudios histológicos e histoquímicos durante la ontogenia del lenguado de California (Zacarías-Soto 2007).

### **I.2.3. Alimentación y nutrición en larvas de lenguado de California**

El alimento vivo (principalmente rotíferos y *Artemia*) son los principales constituyentes de la alimentación de las larvas en etapas tempranas de la mayoría de los peces marinos cultivados.

Por el momento, la formulación de dietas complementarias que sustituyen el alimento vivo en los cultivos de larvas de peces marinos se lleva a cabo a partir de cierta etapa de desarrollo y son especie-específicas. Existe poca información sobre las proporciones adecuadas de las principales fuentes de energía. La mayor parte de esta energía se utiliza para el desarrollo, crecimiento y metabolismo, la cual se obtiene de los amino ácidos libres y ácidos grasos (Lazo, 2000).

Los requerimientos de amino ácidos esenciales se satisfacen comúnmente con el suministro de dietas que reflejan directamente la composición de la larvas. Los peces marinos requieren altos niveles de ácidos grasos insaturados (HUFAs, por sus siglas en inglés), estos ácidos grasos esenciales son importantes para la estructura y la función de las membranas celulares. Se conoce poco de los requerimientos de vitamina y minerales de los peces marinos. La mayoría de las investigaciones se han enfocado en las vitaminas C, E y algunos en la vitamina A. Los niveles de éstas se suministran excediendo los niveles superiores requeridos para compensar la pérdida de estos compuestos durante la fabricación de dietas (Lazo, 2000).

El éxito del cultivo de peces marinos a nivel comercial se ve limitado por la nutrición de los organismos en la etapa larval debido a la pobre ingestión y digestión de las mismas. Por otra parte, el desconocimiento de las necesidades nutricionales de cada especie, dificulta la formulación de una dieta artificial que reemplace totalmente al alimento vivo durante el cultivo larval (Lazo, 2000).

Por ello, es preciso entender la evolución bioquímica de la maquinaria enzimática, los niveles de actividad, la ubicación y el tipo de enzimas para determinar la capacidad que tienen las larvas de los peces para digerir el alimento,

y de esta manera contar con las bases para formular dietas adecuadas a su capacidad.

#### **I.2.4. Enzimas digestivas y actividad enzimática en larvas de peces marinos**

Para determinar la capacidad de las larvas de peces marinos se suele caracterizar la evolución temporal de la maquinaria enzimática, la expresión génica y los niveles de actividad de éstas y así utilizar esta información para desarrollar dietas formuladas adecuadas a cada estadio de desarrollo de las larvas (Valverde-Chevarría, 2002).

Las enzimas digestivas son producidas en varios órganos, incluyendo el estómago, el páncreas, la vesícula biliar y las paredes del intestino. Sin embargo, las enzimas pueden provenir de las presas vivas o de las bacterias que conforman la flora intestinal. En los peces con un estómago completamente desarrollado y funcional, la digestión de la proteína comienza en un medio ácido en el cual la pepsina es la enzima principal. En contraste, en los peces que no secretan pepsinógeno para digerir las proteínas (i.e., la mayoría de las larvas de peces marinos), ni ácido clorhídrico para su activación, la digestión se lleva a cabo esencialmente por las enzimas pancreáticas e intestinales activas en un medio alcalino. De esta manera, en términos nutricionales se dice que las larvas de peces marinos aún no poseen una competencia digestiva plena (Lazo, 2000).

Las proteasas son enzimas que catalizan la hidrólisis de los enlaces peptídicos que forman la estructura primaria de las proteínas. Por tanto, son las enzimas de gran importancia en la digestión de las larvas de peces marinos, debido a que éstas requieren altas concentraciones de proteínas para su crecimiento y como fuente de energía. Por otra parte, sus presas (alimento vivo) tienen un alto contenido proteico. De esta manera, la proteína debe ser el principal

componente de las dietas formuladas para larvas de peces marinos, sin embargo, es el componente más caro.

El páncreas sintetiza y secreta en el lumen del intestino una cantidad de enzimas (proteasas, lipasas y carbohidrasas pancreáticas) en forma de precursores inactivos (zimógenos). Entre las proteasas más importantes se pueden mencionar a la tripsina, la quimiotripsina y la elastasa. Asimismo, entre las lipasas se destacan la lipasa dependiente de sales biliares, la lipasa neutra y las fosfolipasas. Por último, entre las carbohidrasas más importantes se encuentran las amilasas y las maltasas (Kolkovski *et al.* 2007).

La tripsina (E.C.3.4.21.4) es una endoproteasa pancreática que hidroliza los enlaces peptídicos de las proteínas constituidos por lisina y arginina. La enzima se sintetiza como un precursor o zimógeno inactivo (tripsinógeno) que es activado en el lumen del estómago por la enteroquinasa presente en la membrana de los enterositos. La tripsina, a su vez se encarga de la activación de la mayoría de zimógenos pancreáticos (quimiotripsinógeno, procarboxipeptidasa A y B y otras proteasas). Asimismo, la tripsina muestra actividades esterasa que pueden ser determinadas usando sustratos específicos. Su pH óptimo se sitúa alrededor de 8.0 (Alarcón, 1997). En larvas de peces marinos la actividad de la enzima tipo tripsina aparece muy tempranamente en el desarrollo, desde la apertura de la boca (Zambonino-Infante y Cahu, 2001).

La pepsina (E.C. 3.4.23.1) es un grupo de proteasas ácidas presentes en el jugo gástrico de mamíferos, aves, anfibios y peces y realiza actividad proteolítica a un pH óptimo cercano a 1.0. Las células de las glándulas gástricas denominadas oxyntopépticas, produce el pepsinógeno y lo secretan al lumen del estómago (Lazo *et al.* 2007). A diferencia de la tripsina, la actividad tipo pepsina aparece hasta el final de la etapa larval en el periodo cercano a la maduración del sistema digestivo (Zambonino-Infante y Cahu, 2001).



El segundo grupo de nutrientes esenciales más importantes para la alimentación de las larvas de peces marinos son los lípidos, debido a que los lípidos son una fuente importante de energía y de ácidos grasos esenciales. Las enzimas que metabolizan o degradan a los lípidos son principalmente de dos tipos, la lipasa neutra no-específica y la lipasa pancreática específica activada por co-lipasa y sales biliares. Los lípidos son emulsificados por las sales biliares para facilitar su digestión, ya que aumentan la superficie disponible (interfase agua-lípido) en el lípido para la acción de las enzimas. Las enzimas actúan sobre sus respectivos sustratos liberando ácidos grasos, los cuales son absorbidos por las células de la pared del intestino anterior y resintetizados intracelularmente antes de su transporte subsiguiente al hígado (Lazo, 2000). Una de las lipasas más estudiadas en la digestión de peces marinos es la lipasa activada por sales biliares (LBAL E. C. 3.1.1.1). La LBAL es también conocida como lipasa carboxilo-éster o esterasa colesterol, que cataliza la hidrólisis de los ácidos grasos esterificados en el glicerol y del carboxil éster y del colesterol, además de las vitaminas solubles en ácidos grasos como las vitaminas A, D y E. Esta enzima es secretada en el intestino y al combinarse con las sales biliares realizan la emulsificación y la digestión de los lípidos (Alarcón, 1997). En general, se puede considerar que al inicio de la alimentación exógena las larvas de peces marinos ya poseen varias de sus enzimas digestivas (Lazo, 2000).

#### **I.2.5. Estudios de actividad y expresión de las enzimas digestivas de peces marinos**

##### **Actividad de las enzimas digestivas en peces marinos**

Algunos investigadores consideran que la inhabilidad de las larvas de peces para usar las microdietas formuladas se debe a la insuficiente actividad de las enzimas digestivas, y que tal deficiencia, en el caso de las larvas silvestres, se ve compensada por las enzimas digestivas de las presas vivas. Sin embargo,

Zambonino-Infante y Cahu (1994) encontraron que las larvas de la lobina Europea (*Dicentrarchus labrax*; Linnaeus, 1758) presentan una alta actividad de las enzimas pancreáticas aún cuando no se les alimenta con presas vivas.

Otros estudios sobre el análisis de la actividad enzimática en larvas del lenguado del Atlántico (*H. hippoglossus*), permitieron determinar el periodo óptimo para la realización del cambio de alimento vivo al inerte (mejor conocido como destete) de esta especie para obtener un mejor crecimiento y digestión del alimento y así eliminar el riesgo de inanición (Gawlicka *et al.* 2000).

En la búsqueda por determinar la capacidad digestiva de las larvas de corvina blanca y evaluar si la digestibilidad de fuentes proteicas específicas cambia durante la ontogenia, se detectó la actividad alcalina proteolítica, tipo tripsina, tipo leucina-aminopeptidasa y tipo quimi tripsina antes de la primera alimentación (Valverde-Chavarría, 2002). Por tanto, se sugiere que la alta actividad específica inicial está programada genéticamente y no está únicamente determinada por la ingesta de alimento vivo. Sin embargo, se sugirió que es probable que las características físico-químicas del agua también modulen en cierta medida los niveles de actividad de las enzimas digestivas. Por otra parte, el encontrar un aumento en la actividad de las proteasas ácidas al momento de la formación del estómago, la cual también se relaciona con el tipo y cantidad de nutrientes en la dieta, hace suponer que la alta producción enzimática podría ser una respuesta compensatoria ante el nuevo alimento (Alarcón 1997).

En estudios realizados sobre el desarrollo de la capacidad digestiva en larvas de abadejo (*Melanogrammus aeglefinus*; Linnaeus, 1758) y bacalao del Atlántico (*Gadus morhua*; Linnaeus, 1758), se llegó a la conclusión de que ambas especies son capaces de digerir proteínas y lípidos desde el momento en que abren la boca, además de que tienen una capacidad limitada para digerir carbohidratos (Pérez-Casanova *et al.* 2006). Algunos estudios sobre el desarrollo ontogénico de las enzimas digestivas en larvas del jurel cola amarilla (*Seriola*

*lalandi*; Valenciennes, 1833) indican que esta especie puede digerir proteínas, lípidos y carbohidratos en una fase temprana. Sin embargo, los niveles de carbohidratos en la composición de las dietas deben ser bajos, ya que se encontró baja actividad específica de amilasas aún después de los 18 DDE (Chen *et al.* 2006; Lazo y Montes, 2007).

En un estudio de la ontogenia de las enzimas digestivas del lenguado de California se ha encontrado la actividad total de las proteasa alcalinas y las leucin-aminopeptidasas en el momento de la eclosión y las proteasas ácidas totales hasta los 35 DDE (Muguet, 2004). Zacarías-Soto *et al.* (2006) evaluaron la capacidad proteolítica de las larvas del lenguado de California usando análisis histológicos y bioquímicos, donde encontraron que las larvas recién eclosionadas poseen actividad proteolítica alcalina antes de la primera alimentación. Además proponen que el destete en el lenguado de California se puede realizar adecuadamente a los 36 DDE. Por otra parte, Álvarez-González *et al.* (2006) concluyeron que el equipamiento total enzimático para esta especie escompletado entre los días 18 y 30 después de la eclosión, por lo que proponen que el destete de las larvas del lenguado de California puede ser posible en ese tiempo.

### **Expresión génica de las enzimas digestivas**

Los cambios fisiológicos que presentan todos los seres vivos incluyendo los peces marinos son generados por la expresión espacio-temporal de los genes de cada una de las estructuras del organismo (Zambonino-Infante y Cahu, 2001). Por ello, otra manera de determinar la capacidad digestiva en larvas de peces marinos es caracterizar el momento de la expresión de los genes de cada una de las enzimas digestivas, una forma de hacerlo es determinando la transcripción y producción de ARN mensajero (por sus siglas en inglés, mRNA) mediante la técnica de retrotranscripción (RT-PCR, por sus siglas en inglés).

La definición de gen es compleja, pero para fines del presente trabajo se considerará como un gen a la secuencia o segmento de DNA necesario para la síntesis de una proteína. El proceso de síntesis de una proteína se puede resumir en dos pasos; a) la transcripción de DNA a RNA mensajero (mRNA, por sus siglas en inglés) y b) la traducción del mRNA a una proteína.

Cabe mencionar, que muchos genes se encuentran constituidos por regiones que codifican aminoácidos (exones) e interrumpidos por regiones no codificantes (intrones). Estas últimas son eliminadas en el procesamiento del mRNA. La secuencia de bases presente en el mRNA determina la secuencia de aminoácidos de la proteína por medio del código genético.

La retrotranscripción y amplificación (RT-PCR) es la síntesis de DNA complementario (cDNA, por sus siglas en inglés) a partir de mRNA por una enzima llamada Retrotranscriptasa (o transcriptasa reversa) y la amplificación del producto por PCR. Por su alta especificidad esta técnica es utilizada en investigaciones fisiológicas para determinar la presencia de los genes de interés (Murray *et al.* 2006).

Desde este punto de vista, se han realizado muchos estudios sobre la expresión génica de las enzimas digestivas como indicador del desarrollo fisiológico de las larvas de peces marino, así como estudios de modulación enzimática con cambios en el ambiente y la nutrición de los organismos. Uno de ellos es el realizado por Murray *et al.* (2006) en el cual se describió el desarrollo histológico y fisiológico del sistema gastrointestinal del lenguado del Atlántico (*H. hippoglossus*) desde el tiempo de la primera alimentación hasta la metamorfosis. En este estudio utilizaron iniciadores de PCR sintetizados a partir de la secuencia parcial de las enzimas digestivas: Tripsinógeno, pepsinógeno y lipasa activada por sales biliares del lenguado de invierno (*P. americanus*) para determinar la expresión de las mismas enzimas durante el desarrollo larval del lenguado del Atlántico. Además se obtuvo la secuencia parcial de cada una de las enzimas, la cual fue comparada en

su composición de aminoácidos con la secuencia de estas enzimas en otras especies.

Otras investigaciones al respecto, integran los estudios de expresión espacio-temporal de los zimógenos de las enzimas digestivas, así como la relación filogenética basada en la secuencia de amino ácidos, donde destacan las proteasas tripsina (TRY) y pepsina (PEP), además las lipasas como las dependientes de las sales biliares (LBAL).

### **Tripsinógeno**

En un estudio realizado con larvas de lobina europea (*D. labrax*) (Péres *et al.* 1998) acerca de la regulación de la actividad y los niveles de mRNA del tripsinógeno y el zimógeno de la amilasa, se ha demostrado que los mecanismos moleculares que controlan la adaptación a la dieta, de la tripsina y la amilasa son reguladas independientemente, además de que son dependientes de la edad e influenciados por la composición y la calidad de la dieta. Los niveles de mRNA y la actividad de la tripsina fueron influenciados principalmente por la naturaleza de la proteína en la dieta y la ración de *Artemia*, pero la concentración de la proteína en la dieta no afectó los niveles de mRNA (Péres *et al.* 1998).

La expresión génica de las enzimas tripsinas, quimotripsina, elastasa, carboxilpepsidasa A y B, y la lipasa se ha encontrado en el páncreas de las larvas de muchos peces marinos. En el caso del lenguado japonés (*P. olivaceus*) se encontró la expresión del tripsinógeno desde la primera alimentación tres días post-fertilización (Srivastava *et al.* 2002). En el lenguado de invierno (*P. americanus*) se detectó la expresión de tres tripsinógenos (TRY) a diferentes edades; por ejemplo, el TRY 2 se expresó a los 5 DDE, el TRY 1 extraído de los ciegos pilóricos, mostró bajos niveles de expresión y sólo en la fase tardía larval y la metamorfosis, por último el TRY 3 extraído del intestino se expresó sólo después de los 20 DDE. Por otra parte, la actividad tipo tripsina fue evidente desde la

eclosión y continuó presente hasta el final de los 25 DDE (Pérez-Casanova *et al.* 2004).

La expresión del gen del tripsinógeno fue detectado en etapas tempranas de desarrollo del botete diana (*Sphoeroides annulatus*), se inicia en los huevos fertilizados, muestra un incremento constante en los huevos de 75 horas después de la fertilización y posteriormente desarrolla un incremento gradual durante el desarrollo larval (García-Gasca *et al.* 2006).

### **Pepsinógeno**

En el lenguado de invierno, se detectaron dos formas posibles del pepsinógeno A que difieren en su punto isoeléctrico. Estas dos formas se amplificaron a partir del estómago (Douglas *et al.* 1999). El análisis por RT-PCR indicó que estos pepsinógenos se expresan secuencialmente. La expresión del pepsinógeno A IIa se detectó en larvas de 13 DDE e incrementó conforme inició la metamorfosis. El pepsinógeno A IIb se expresó junto con el promotor  $\alpha$  responsable de la secreción de ácido clorhídrico a los 20 DDE, tiempo en el cual aparecen las glándulas gástricas y el incremento de la actividad de las pepsinas. De esta manera, Douglas *et al.* (1999) consideran pertinente suministrar a las larvas del lenguado de invierno de 20 DDE una dieta formulada. Posteriormente, se determinó por análisis de hibridación *in situ* que la expresión de los pepsinógenos IIa, IIb y el promotor  $\alpha$  ocurre en algunas células de las glándulas gástricas, lo que demostró que estas células son capaces de sintetizar pepsinógenos y secretar ácido clorhídrico simultáneamente (Gawlicka *et al.* 2001).

En un estudio sobre la ontogenia del estómago funcional durante el desarrollo larval del dorada común (*Pagrus pagrus*; Linnaeus, 1758) se localizó por hibridación *in situ* el mRNA de un pepsinógeno. Los primeros signos de las glándulas se detectaron a los 19 DDE y la complementación de su desarrollo morfológico se mostró a los 26 DDE. La expresión del pepsinógeno fue evidente en

las glándulas gástricas desde los 30 DDE en adelante. Las condiciones ácidas en el jugo gástrico se detectaron en larvas alimentadas alrededor de los 35 DDE (Darias *et al.* 2005).

### **Lipasa activada por sales biliares**

Se ha logrado amplificar dos lipasas del lenguado de invierno (*P. americanus*); una más relacionada con las gástricas, lingual y lipasa ácida lisosomal de otros vertebrados y la otra relacionada con la lipasa activada por sales biliares. La secuencia de nucleótidos y aminoácidos de ambas lipasas presentan una alta similitud con las lipasas del conejo, del perro y del humano. Por otra parte los resultados moleculares y bioquímicos indican que las larvas del lenguado de invierno están equipadas con enzimas necesarias para la digestión de lípidos tan pronto como abren la boca y la lipasa predominante empleada por esta especie es la activada por sales biliares (Murray *et al.* 2003). Resultados similares fueron obtenidos por Pérez-Casanova *et al.* (2004) con el abadejo y Murray *et al.* (2006) en el lenguado del Atlántico.

Dado que los estudios de expresión y actividad enzimática de las larvas de peces marinos representan una de las fuentes de información más importantes para la formulación de microdietas adecuadas al estadio de desarrollo de las larvas y a que actualmente se busca optimizar el protocolo de cultivo a gran escala del lenguado de California (*P. californicus*), resulta fundamental ampliar el conocimiento de la capacidad digestiva de las larvas del lenguado de California mediante el análisis de la expresión y la actividad de tres de las enzimas claves (tripsina, pepsina y lipasa activada por sales biliares) para la digestión de nutrientes en el sistema digestivo de los peces marinos.

## Capítulo II

---

### Objetivos

---

#### II.1. General

Determinar el momento en el cual se expresan por primera vez las enzimas digestivas: tripsina, pepsina y lipasa activada por sales biliares y su actividad durante el desarrollo larval en el lenguado de California.

#### II.2. Particulares

- Obtener el cDNA y la secuencia de cada una de las tres enzimas digestivas a partir del sistema digestivo de juveniles del lenguado de California.
- Comparar las secuencias obtenidas con las secuencias existentes en el banco de genes y estimar las relaciones filogenéticas.
- Determinar el momento en que se expresan cada una de las enzimas digestivas durante el desarrollo larval.
- Determinar si hay sincronía entre la expresión génica y la actividad enzimática.



## Capítulo III

---

### Materiales y Métodos

---

#### III.1. Análisis de secuencias y filogenético

##### III.1.1. Síntesis de cDNA por RT-PCR

Para la obtención de cDNA se extrajo RNA total de 30 mg de un macerado de tejidos del sistema digestivo de un juvenil de *P. californicus* de aproximadamente 15 cm de longitud estándar y 8 meses de edad, después se corroboraron los resultados con juveniles cultivados en el Departamento de Acuicultura del Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada. La disección se llevó a cabo en el Laboratorio de Nutrición Acuícola, se disecó parte del estómago, el intestino y los ciegos pilóricos del sistema digestivo.

##### III.1.2. Extracción de RNA total

El procedimiento de extracción se realizó de acuerdo al protocolo del Kit RNeasy de Qiagen (27220 Turnberry Lane Suite 200 Valencia, CA 91355) (Srivastava *et al.* 2002). El proceso inició con la lisis celular agregando 600µl de amortiguador RLT el cual contiene tiocianato de guanidina para la inactivación de las RNAasas, incubándolo un minuto. Después de centrifugar por tres minutos a 15,000 x g (Eppendorf Centrifuge 5415R), se adicionaron 500µl de etanol al 70% para proveer las condiciones de vínculo con la membrana de sílice, posteriormente se colocaron 700µl de la muestra en la columna con la membrana de sílice, donde se realizaron: un lavado con 700µl de amortiguador RW1 y dos con 500µl de amortiguador RPE, con centrifugaciones a 10, 000 x g por un minuto entre los lavados. Finalmente se eluyó el RNA con 50µl de agua libre de nucleasas, el cual

fue almacenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  para posteriormente realizar la RT-PCR. Antes de realizar la RT-PCR, el RNA total se incubó con DNasa de 10 000 unidades (Roche, No. Cat. 04 716 728 001) durante una hora a  $37^{\circ}\text{C}$ , después para detener la reacción de la enzima se agregó EDTA (pH8.0) a una concentración final de 8 mM y se calentó a  $75^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos.

### **III.1.3. Retrotranscripción**

Una vez obtenido el RNA total de cada muestra, se continuó con la síntesis de DNA complementario (cDNA) por medio de la retrotranscripción y amplificación con la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) en un solo paso, para esto se utilizó un Kit de RT-PCR Onestep de Qiagen, siguiendo el procedimiento recomendado por el proveedor; la reacción se llevó a cabo agregando  $10\mu\text{l}$  de amortiguador 5x,  $2\mu\text{l}$  de mezcla de dNTP's ( $10\mu\text{M}$ ),  $2\mu\text{l}$  de mezcla de enzima,  $2\mu\text{l}$  de solución Q,  $2\mu\text{l}$  de cada cebador [ $10\mu\text{M}$ ] (Murray *et al.* 2006) (Tabla I),  $5\mu\text{l}$  de RNA total extraído de cada muestra mas  $15\mu\text{l}$  de agua libre de RNAsas para llevar a un volumen de reacción final de  $40\mu\text{l}$ . Las condiciones de RT-PCR se llevaron a cabo de acuerdo con Murray *et al.* (2006): 30 minutos a  $50^{\circ}\text{C}$ ; 15 minutos a  $95^{\circ}\text{C}$ ; 35 ciclos de 45 segundos a  $94^{\circ}\text{C}$ , 45 segundos a  $53^{\circ}\text{C}$ , 1 minuto de  $72^{\circ}\text{C}$ ; y un ciclo de 2 minutos a  $72^{\circ}\text{C}$ .

Tabla I. Secuencia de cebadores para la síntesis de cDNA de las enzimas digestivas, por medio de la RT-PCR (Murray *et al.* 2006).

Primer	Secuencia de aminoácidos	Secuencia de nucleótidos (5'-3')	Tamaños de los fragmentos esperados
<i>Tripsinógeno (lenguado de invierno)</i>			400
RTTRYP2/1	KSRVE	CAAGTCCCGTGTGGAGG	
RTTRYP2/3	SCQGD*	AGTCACCCTGGCAAGAGTC	
<i>Pepsinógeno (lenguado de invierno)</i>			370
RTpep1b	SSNAQQ	AGCAGCAATGCTCAGCAG	
RTpep3b	AYVSQSN*	TGCTCTGAGAGACGTAGG	
<i>Pepsinógeno (lenguado del Atlántico)</i>			202
RTHALPEP5'B	VFGGYDA	GGTCTTCGGTGGTTACGATG	
RTHALPEP3'B2	SDISNMN*	ATTCATGTTGCTGATGTCACTGGA	
<i>Lipasa activada por sales biliares (lenguado de invierno)</i>			540
RTBAL5'	GANFLDN**	GGTGCTAACTTCCTGGACAAC	
RTBAL3'	PVIDGDF*	AAGTCGCCATCGATCACGGG	
<i>Lipasa activada por sales biliares (lenguado del Atlántico)</i>			404
RTHALBAL5'	TMGFLST	AACTATGGGCTTCCTGAGCA	
RTHALBLA3'	SPDSPIV*	CAATGGGGCTATCAGGTGAG	

\* Complementario \*\* Sitio activo de la serina protrasa

### III.1.4. Electroforesis

Para visualizar el resultado de la RT-PCR se realizó una electroforesis en una cámara electroforética (BIORAD Mini Sub-Cell GT 9204355) con un gel de agarosa uso rutinario (Sigma-Aldrich) al 1.5%. Las condiciones de la electroforesis fueron: 90 Voltios (V), 400 miliAmperes (mA) por 45 minutos (Power NPAC 300 100-120 V, Serie 282BR07573); se utilizó como marcador una escalera de 100 pares de bases (pb) (Invitrogen life technologies, Carlsbad CA) y un amortiguador de Tris-borato EDTA (TBE) al 0.5 x.

La visualización se realizó en un transiluminador de luz UV (BIORAD, UV Transilluminator 2000 SN: 64S/02129) y se tomaron fotografías a blanco y negro,

modo manual F 8.0 +2 DEV con una cámara digital (MPEGMOVIE EX, Digital Still Camera DSC-S85, SONY).

### **III.1.5. Secuenciación**

La secuenciación de ambas hebras complementarias se llevó a cabo en el laboratorio Microchemical Core Facility de la Universidad Estatal de San Diego CA (SDSU). Primeramente se secuenció el segmento amplificado de cada una de las enzimas a partir de la RT-PCR de RNA total extraído de un macerado de los tejidos del estómago, el intestino, el páncreas y los ciegos pilóricos de un juvenil de lenguado de California con una longitud de 13 cm. Posteriormente se obtuvo la secuencia del segmento amplificado en la RT-PCR para cada una de las enzimas a partir de RNA total extraído de las larvas completas de 10 DDE.

Debido a la presencia del pepsinógeno en la etapa larval temprana del lenguado de California, se consideró la posible presencia de un pepsinógeno en otros tejidos diferentes al sistema digestivo. Por lo que se realizaron análisis de expresión en los tejidos de músculo y piel. De la amplificación por RT-PCR se obtuvo la secuencia del pepsinógeno presente en intestino, estómago, piel y músculo de dos juveniles de lenguados de California.

Las secuencias obtenidas de los segmentos amplificados de los zimógenos de las TRY, PEP y LBAL del lenguado de California se visualizaron y procesaron utilizando el programa MEGA 4.0 y se analizaron mediante las herramientas básicas de búsqueda de alineaciones locales (por sus siglas en inglés BLAST) del banco de genes (GeneBank) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) para buscar la similitud en la secuencia de nucleótidos y de aminoácidos con las secuencias de otras especies. Se realizó un análisis filogenético con aquellas secuencias que presentaron una mayor similitud al lenguado de California por el método de unión de vecinos (Neighbor Joining) con el número de diferencias entre secuencias de aminoácidos (Hall, 2004), considerando las secuencias registradas en el GeneBank hasta el 25 de mayo de 2009.

La proporción de similitud de las secuencias de aminoácidos de las enzimas de las especies más cercanas y las del lenguado de California se calculó dividiendo el número de aminoácidos conservados entre el número de aminoácidos que componen los segmentos considerados para la comparación, multiplicado por cien (Ecuación 1).

$$\% \text{ de similitud} = \left( \frac{\# \text{ de aminoácidos conservados}}{\# \text{ de sitios comparados}} \right) * 100 \quad (1)$$

## **III.2. Análisis de expresión y actividad enzimática durante el desarrollo larval de *P. californicus***

### **III.2.1. Obtención de los organismos y cultivo larvario**

Se obtuvieron huevos fecundados y larvas recién eclosionadas de la reproducción en cautiverio en The Cultured Abalone Inc. City Goleta CA., USA.

El cultivo larval fue realizado en un sistema de agua de mar recirculada, que consistió en tres estanques de fibra vidrio con una capacidad de 500 l, a una densidad aproximada de 50 larvas por litro, con una temperatura promedio de 18.16 ( $\pm 0.236$ ) °C, oxígeno disuelto de 6.29 ( $\pm 0.056$ ) mg l<sup>-1</sup> y una salinidad promedio de 32.31 ( $\pm 0.124$ ) ‰.

La alimentación con presas vivas se suministró considerando que las larvas abren la boca a los tres días después de la eclosión (DDE) siguiendo el protocolo descrito por Zacarías-Soto *et al.* (2006). La ración de alimento consistió en tres rotíferos por ml de la especie *Brachionus plicatilis* enriquecidos con ácidos grasos altamente insaturados. Después las larvas se alimentaron con un promedio de 8, 13, 18, 11 rotíferos por ml entre los días 4-8, 9-13, 14-17 y 18-34 DDE respectivamente. Posteriormente, en conjunto con los rotíferos se suministró un promedio de tres *Artemia salina* por ml entre los días 14-24 DDE. Después de los

24 DDE se alimentó sólo con *A. salina* en un promedio de cinco y siete artemias por ml.

### **III.2.2. Cultivo y enriquecimiento de rotíferos**

El cultivo de rotífero fue llevado a cabo en el Departamento de Acuicultura del CICESE. Éste consistió en un sistema de tres estanques de 500 l a temperatura ambiente, con aireación y alimentación constante. Los rotíferos fueron alimentados con una mezcla de microalgas de las especies *Isocrisis sp.* y *Nannocloropsis sp.* Los rotíferos fueron cosechados por la mañana con una malla de 60µm y enjuagados con agua de mar desinfectada con luz UV. Antes de ser suministrados a las larvas, los rotíferos se enriquecieron por un periodo de 12 horas con ácidos grasos altamente insaturados, a una concentración de 125mg/l para 200-500 rotíferos/ml (RATIO HUFA Enrich, Salt Creek Inc., EEUU). El proceso de enriquecimiento se realizó en el laboratorio húmedo del Departamento de Acuicultura del CICESE, donde se mantuvo a los rotíferos en estanques cilíndricos de 300 l de capacidad, con una temperatura de 20°C, salinidad de 33‰ y aireación constante.

### **III.2.3. Cultivo y enriquecimiento de Artemia**

Los quistes de *Artemia* (SALT Creek Inc., Salt Lake City, UT, USA) se hidrataron en agua dulce por una hora con aireación constante. Posteriormente se incubaron en una solución fría de hipoclorito de sodio al 75% con agitación constante para desencapsular los quistes hasta observar una coloración naranja. Inmediatamente después se enjuagó con agua corriente en una malla de 125µm. La incubación para la eclosión se realizó en estanques cónicos de 200 l, a una temperatura de 28 °C, con iluminación (> 1000 lux) y aireación constante (burbujas grandes) por un periodo de 24 horas. Posteriormente se realizó el

proceso de enriquecimiento por 12 horas con ácidos grasos a concentración de 300 mg/l para 300 nauplios/ml a 25 °C, de igual manera que los rotíferos.

#### **III.2.4. Crecimiento larval**

Para la determinación de la curva de crecimiento de los organismos se tomaron seis larvas por triplicado de las muestras de 1, 4 y 7 DDE; cuatro organismos de las muestras de 10, 15 y 20 DDE y tres organismos de las muestras de 26, 30 y 40 DDE. Se obtuvo el peso húmedo de las muestras contenidas en navecillas de aluminio libres de humedad, después se desecaron las muestras exponiéndolas a 60°C por 24 horas, en una estufa (Liofilizadora Freezemobile 12EL. Marca Virtis); posteriormente se obtuvo el peso seco de las muestras.

#### **III.2.5. Toma y procesamiento de las muestras**

Se tomó una muestra por cada estanque de cultivo. Para los ensayos de expresión enzimática se procesó en fresco, realizando inmediatamente la extracción del RNA total de las larvas completas de los días 0 – 10 DDE y se disecaron las larvas a partir de los 12 DDE e inmediatamente se realizó la RT-PCR. Para los análisis de actividad enzimática, se almacenaron dos conjuntos de muestras a -40°C. Además se respaldó en una solución preservadora (RNA later) un conjunto de tres replicas de las muestras, las cuales después fueron usadas para la corroboración de los resultados.

#### **III.2.6. Expresión génica**

Para el análisis de expresión génica de las enzimas durante el desarrollo larval del lenguado de California, se siguió el procedimiento anteriormente descrito para la extracción de RNA total y RT-PCR para la obtención del cDNA del segmento del gen de cada enzima. Para la extracción de RNA total se utilizó un macerado de

las larvas colectadas por cada muestra (30 larvas de 0 a 4 DDE, 10 larvas de 7 a 20 DDE y 5 larvas de 26 a 35 DDE).

### **III.2.7.Preparación del extracto enzimático**

De los 0 a los 20 DDE se realizó un homogenizado de las larvas completas de cada muestra, y a partir de los 26 DDE se disecaron las larvas y se realizó el homogenizado utilizando la masa visceral. Cada homogenizado fue diluido en un mililitro de agua destilada, después se centrifugaron las alícuotas a 20,200 x g (Centrifuge 5417 R Eppendorf AG) durante 30 minutos a 4°C. Posteriormente se recuperó el sobrenadante y se colocó en un nuevo tubo el extracto enzimático, inmediatamente después se almacenaron las alícuotas a -50°C hasta su análisis.

### **III.2.8.Actividad enzimática tipo tripsina**

La actividad enzimática de la TRY (al igual que en el caso de la LBAL) fue medida por triplicado desde los 0 a los 7 DDE, tomando en cuenta lo reportado por Zacarías-Soto *et al.* (2006). Se usó como sustrato N $\alpha$ -Benzoil-dl-Arginina-P-nitroanilida (BAPNA) siguiendo la técnica de Erlanger *et al.* (1961). La reacción se inició añadiendo 80 $\mu$ l de extracto enzimático a 560  $\mu$ l del sustrato y se dejó incubar por 30 minutos a 37°C en un baño María. Inmediatamente después se detuvo la reacción añadiendo 160 $\mu$ l de ácido acético al 30%, posteriormente se dejó reposar por 15 minutos a temperatura ambiente para medir la absorbancia a una longitud de  $\lambda = 400$  nm (Espectrofotómetro 6505 UV/Visible, Jenway). Se utilizó tripsina comercial (SIGMA Tipo IX, de páncreas porcino) en una concentración de reacción de 2.5  $\mu$ g/ml como control positivo. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.



### **III.2.9. Actividad proteolítica ácida tipo Pepsina**

El ensayo para medir la actividad enzimática de la pepsina se realizó usando las muestras desde los 20 hasta los 40 DDE. Se utilizó como sustrato hemoglobina (Hb) al 2% de acuerdo con la técnica descrita por Sarath *et al.* (1989). La reacción se inició agregando 100  $\mu$ l de extracto enzimático a 300  $\mu$ l de sustrato Hb, previamente incubada por 10 minutos a 37°C. Para llevar a cabo la reacción se incubó la mezcla del extracto enzimático con el sustrato por 60 minutos a 37°C. Una vez transcurrido el tiempo de incubación se detuvo la reacción añadiendo a la misma 600  $\mu$ l de ácido tricloracético (TCA) al 5%. Posteriormente se dejó reposar por 30 minutos a 4°C y después se centrifugó a 20,200 x g durante 5 minutos. Se utilizó el sobrenadante de cada muestra, para medir la absorbancia a 280 nm en celdas de cuarzo con el espectrofotómetro de luz UV y luz visible (Espectrofotómetro UV-Vis 1400, HACH). Se utilizó pepsina porcina comercial (SIGMA) en una concentración de reacción de 10  $\mu$ g/ml como control positivo. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

### **III.2.10. Actividad de la lipasa activada por sales biliares**

Para medir la actividad de las lipasas activadas por las sales biliares se utilizaron las muestras de los 0 a los 7 DDE. Empleando como sustrato 4-nitrofenil-caproato a 0.35 mM en una solución amortiguadora de pH 7.4, de Tris a 0.5 M, taurocolato+NaCl a 6 mM, de acuerdo con la técnica descrita por Gjellesvik (1992). Primeramente se colocaron 700  $\mu$ l de sustrato preparado en una celda de cuarzo, posteriormente se añadió 15  $\mu$ l del extracto enzimático de cada muestra (en el caso del blanco se agregó buffer pH 7.4 Tris-HCL a 0.5 M en lugar del extracto enzimático), se midió la absorbancia antes de la reacción a una longitud de onda de 400 nm en un espectrofotómetro de luz UV-visible (PharmaSpec UV-1700, Shimadzo) y se incubó por 9 minutos a 30°C para volver a medir la absorbancia a

400 nm. Como control positivo se utilizó una lipasa de bovino comercial (Sigma-Aldrich) a 1.0 µg/ml. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

La actividad se midió como actividad total en unidades por larva (U/larva). Donde U se definió como el incremento de 0.1 unidades de absorbancia/min. Los valores reportados representan la media de tres mediciones realizadas en muestras independientes.

### **Actividad total:**

$$U/larva = \left( \frac{\text{Abs./min} * FD * 1000}{E * VM} \right) / \# \text{ larvas} \quad (2)$$

Donde el cambio en la absorbancia por minuto es la diferencia entre la absorbancia de la muestra y la del blanco dividida entre el tiempo de incubación, FD es el factor de dilución (volumen total de la reacción/volumen de extracto), 1000 es el volumen de agua en que se homogenizaron las larvas, E es 0.01 (proteasas totales y tripsina) ó 0.1 (quimotripsina y aminopeptidasa) y VM es el volumen de extracto utilizado.

## Capítulo IV

---

### Resultados y Discusión

---

Con el objetivo de conocer el desarrollo y las necesidades de muchas especies con potencial para la acuicultura, se han realizado diversos estudios relacionados con la capacidad digestiva de los organismos. Algunos investigadores han analizado la expresión a nivel transcripcional de las principales enzimas encargadas de la digestión, para ser usados como indicadores de la capacidad digestiva larval de los organismos.

#### IV.1. Retrotranscripción

En el presente trabajo se sintetizó, amplificó y secuenció el cDNA de los segmentos de los genes de las enzimas: Tripsina (TRY), Pepsina (PEP) y lipasas activadas por sales biliares (LBAL), a partir del RNA total extraído de un macerado de tejidos de: estómago, ciegos pilóricos e intestino de los juveniles del lenguado de California. Esto se realizó mediante la técnica de retrotranscripción y amplificación en un solo paso (RT-PCR) usando iniciadores sintetizados a partir de la secuencia parcial de las enzimas del lenguado del Atlántico y el lenguado de invierno (Murray *et al.* 2006). Esta información fue usada para hacer un análisis filogenético y caracterizar el patrón temporal de las enzimas digestivas en larvas del lenguado de California durante su ontogenia.

La retrotranscripción dio como resultado la amplificación de un segmento de ~420 pb del tripsinógeno (TRY) con los iniciadores RTTRYP2/1-2/3. En el caso del Pepsinógeno (PEP) se amplificó un segmento de ~370 pb con RTpep1b-2b y un segmento de ~200 pb con RTHALPEP5'B-3'B2. Para los segmentos del gen de la lipasa activada por sales biliares (LBAL), se obtuvo un segmento >500 pb y el otro

de ~400 pb con los iniciadores RTBAL5'-3' y RTHALBAL5'-3', respectivamente (Fig. 1). El tamaño de los segmentos amplificados para cada una de las enzimas coincidió con el esperado y el reportado para el lenguado del Atlántico (Murray *et al.* 2006)(Tabla 2).

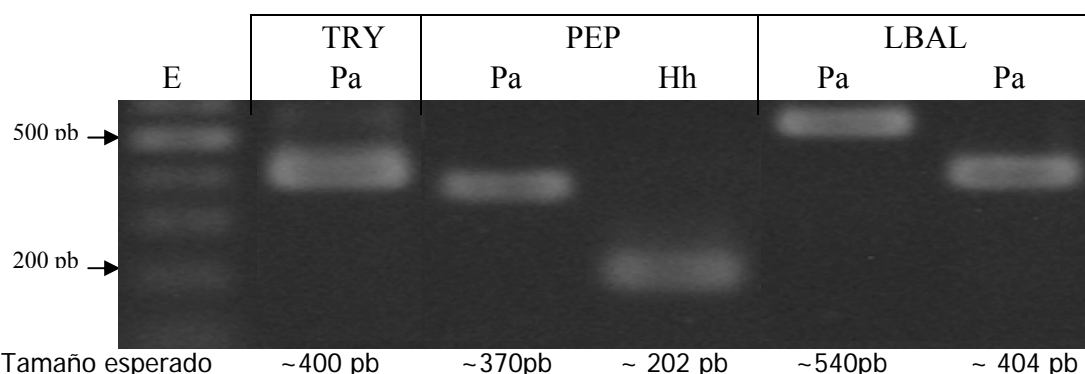


Figura 1. Producto de RT-PCR con iniciadores sintetizados de *P. americanus* (Pa) e *H. hippoglossus* (Hh), con RNA total extraído de un macerado de tejidos del sistema digestivo de juveniles de *P. californicus*, visualizado con una electroforesis de 90 V y 400mA por 30 minutos, en un gel de agarosa de uso rutinario al 1.5% y un marcador molecular (E) de 100 pb (Invitrogen).

## IV.2. Secuencias de nucleótidos de los genes de las enzimas digestivas

Una vez que se sintetizó el cDNA y amplificó el segmento del gen de cada una de las enzimas digestivas, se obtuvo su secuencia de nucleótidos. Éstas se alinearon con las secuencias de sus respectivos iniciadores y las secuencias de las enzimas de las especies que presentaron una mayor similitud al lenguado de California, según el resultado del análisis por BLASTN (Apéndices A-L). De esta manera se pudo observar una equivalencia en los tamaños de las secuencias donde se alinean los iniciadores de este estudio (Tabla 2). Con éstos resultados se determinó que era posible utilizar los iniciadores para la TRY, la PEP, y la LBAL diseñados para el lenguado de invierno y el lenguado del Atlántico (Murray *et al.* 2006) en los estudios de expresión de las enzimas durante el desarrollo larval del lenguado de California.

Tabla 2. Tamaños de las secuencias de nucleótidos de los genes de las enzimas digestivas del lenguado de California y las especies más similares a éste.

Especie	TRY		PEP		LBAL	
	Alelo	Tamaño	Alelo	Tamaño	Alelo	Tamaño
<i>P. californicus</i>	la	397	la	370	la	536
	lb	397	lb	231	lb	536
			lc	353		
<i>P. olivaceus</i>	AB029751 <sup>t</sup>	397	AB120129 <sup>m</sup>	370		
	AB029750 <sup>t</sup>	397				
	EU007656 <sup>c</sup>	394				
<i>P. americanus</i>	AF012463 <sup>g,r</sup>	397	AF156791 <sup>f</sup>	370	AF512561 <sup>qs</sup>	537
			AF156788 <sup>fs</sup>	370		
<i>H. hippoglossus</i>	AY860207 <sup>t</sup>	396	AY860204 <sup>t</sup>	370	EU412430 <sup>h</sup>	537
	AY862987 <sup>t</sup>	322	AY860205 <sup>t</sup>	370	AY860206 <sup>s</sup>	536
	EU412468 <sup>h</sup>	397	EU413439 <sup>h</sup>	370		
<i>P. bicoloratus</i>	EU007657 <sup>c</sup>	324				
<i>Solea senegalensis</i>	AB359190	397				
	AB359189 <sup>p</sup>	397				
<i>Salmon salar</i>	BT047303 <sup>o</sup>	397				
<i>Epinephelus</i>						
<i>coicoides</i>	FJ426120 <sup>b</sup>	397				
<i>Oncorhynchus keta</i>	AB449357 <sup>k</sup>	397				
<i>Thunnus orientalis</i>			AB440201 <sup>u</sup>	370		
<i>Sineperca schezeri</i>			EU807927 <sup>e</sup>	370		
<i>S. aurata</i>			EU163284 <sup>w</sup>	370		
<i>Trematomus</i>						
<i>bernacchii</i>			AJ550950 <sup>a</sup>	370		
<i>D. labrax</i>					EU647691 <sup>v</sup>	537
<i>Tetraodon</i>						
<i>nigroviridis</i>					CR654166 <sup>l</sup>	537

Carginale *et al.* (2004) **(a)**, Chang y Lee, (2008) (no publicado) **(b)**, Cheng y Zhang, 2007 (no publicado) **(c)**, Darias *et al.* (2007) **(d)**, Deng *et al.* (2008) 8no publicado) **(e)**, Douglas *et al.* (1999) **(f)**, Douglas y Gallant, (1998) **(g)**, Douglas *et al.* (2008) **(h)**, García-Gasca *et al.* (2006) **(i)**, Gawlicka y Horn, (2005) (no publicado) **(j)**, Iyacuchii y Toyota (2008) (no publicado) **(k)**, Jaillon *et al.* (2004) **(l)**, Kurokawa, (2003) (no publicado) **(m)**, Leong *et al.* (2008) (no publicado) **(n)**, Leong *et al.* (2008) (no publicado) **(o)**, Machado *et al.* (2008) **(p)**, Murray *et al.* (2003) **(q)**, Murray *et al.* (2004) **(r)**, Murray *et al.* (2006) **(s)**, Suzuki *et al.* (2002) **(t)**, Taji *et al.* (2009) **(u)**, Teranova *et al.* (2008) (no publicado) **(v)** y Yufera *et al.* (2007) (no publicado) **(w)**.

Para los estudios de expresión espacio-temporal de los genes y la actividad de las enzimas digestivas en el lenguado de California, se llevó a cabo un cultivo larvario donde se obtuvo la curva de crecimiento con los resultados del peso seco y se observó de manera general el desarrollo larval.

### IV.3. Desarrollo y crecimiento larvario

El crecimiento en peso seco de las larvas durante el bioensayo se ajustó a un modelo exponencial ( $R^2 = 0.86$ ) (Figura 2). A los 3 DDE, las larvas tenían un peso seco de  $0.099 \pm 0.088$  mg. Entre los 3 y los 20 DDE el crecimiento de las larvas es prácticamente constante (0.2-0.3 mg) aumentando a partir de los 20 DDE.

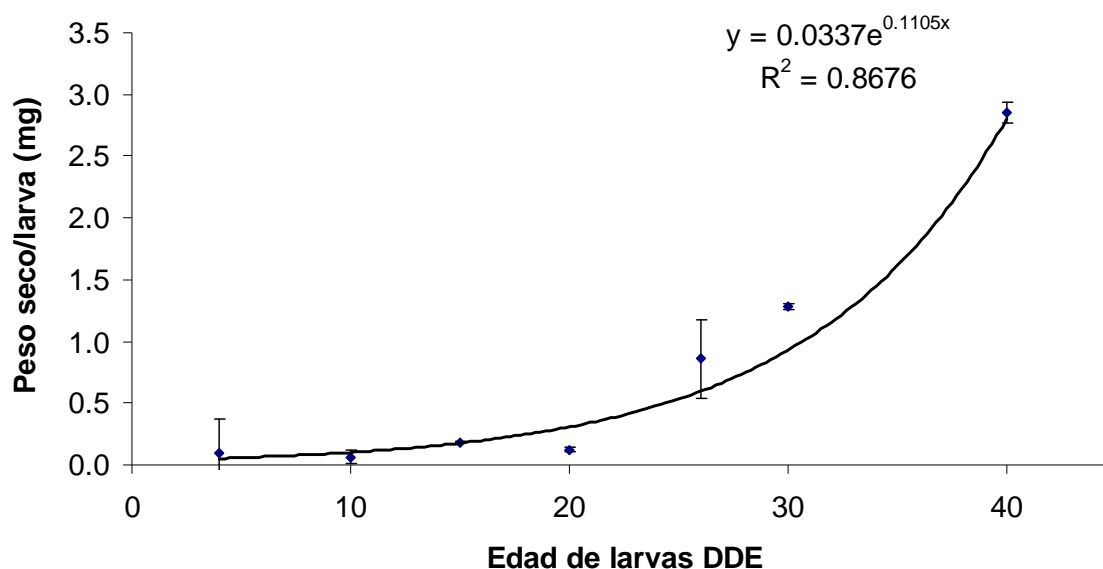


Figura 2. Crecimiento en peso seco (mg) de las larvas de *P. californicus* durante el periodo experimental. DDE (edad en días después de la eclosión). Media  $\pm$  D.E. (desviación estándar) ecuación de la curva exponencial ajustada.

Al momento de la eclosión las larvas presentaron un sistema digestivo indiferenciado, con una o dos gotas de aceite inmersas en el saco vitelino, además de la cavidad bucal y el ano cerrado. Entre los 3 y 4 DDE se observó la división del intestino en dos regiones, la zona anterior o prevalvular y la región posterior o postvalvular y la apertura de la boca (Fig. 3). A los 12 DDE inició el reacomodo de los órganos internos. Entre los 25 y 30 DDE comenzó la migración ocular y el asentamiento de la mayoría de las larvas, además presentaron la aleta caudal definida y se observó un reacomodo de los órganos debido al cambio de simetría. A los 35 DDE se observó físicamente un juvenil bien diferenciado (Fig. 3).

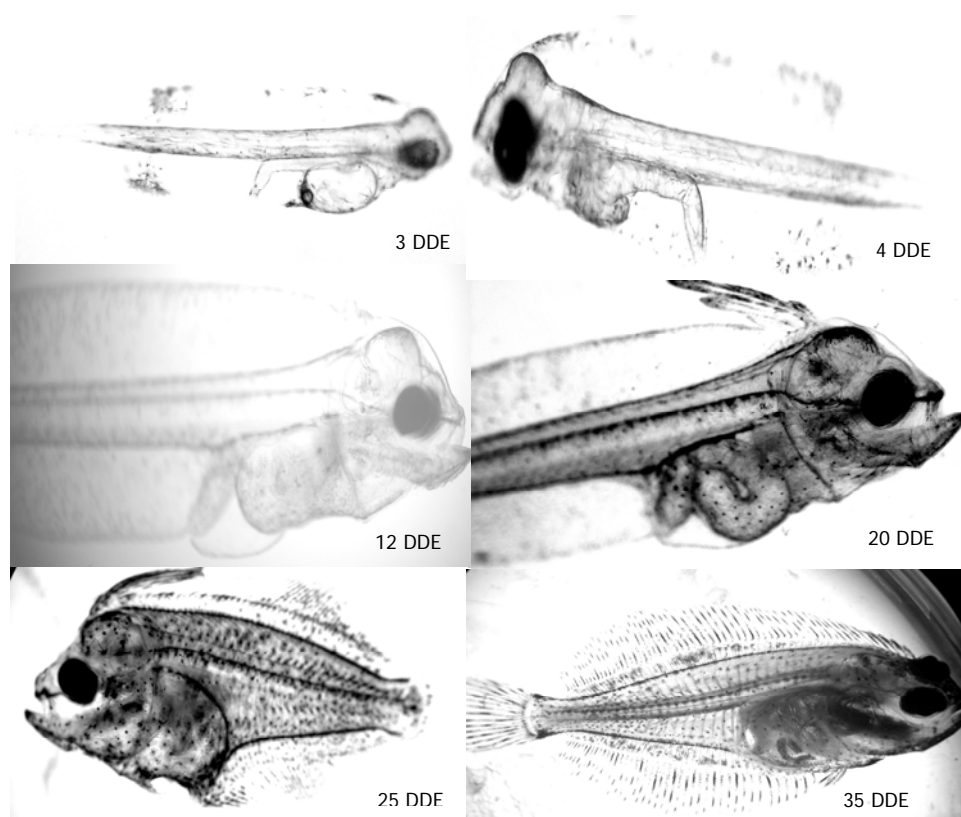


Figura 3. Desarrollo larval del Lenguado de California durante el periodo experimental. DDE (edad en días después de la eclosión).

El crecimiento en peso seco de las larvas del lenguado de California fue estable los primeros 20 DDE similar al obtenido por Muguet (2004), el desarrollo morfológico aparente tuvo gran similitud al reportado por Zacarías-Soto *et al.* (2007) y Gisbert *et al.* (2003) para la misma especie. Las larvas del lenguado de California son muy similares en su desarrollo a otros peces marinos como el lenguado de invierno, el lenguado del Atlántico, el lenguado Japonés (*P. olivaceus*), la pescadilla (*M. aeglefinus*) y el bacalao común (*Gadus norhua*). Pues a los 3 DDE estas especies abren tanto la boca como el ano y por tal motivo, en esta etapa las larvas son capaces de ingerir alimento (Murray *et al.* 2004 y 2006; Suzuki *et al.* 2002 y Pérez *et al.* 1998 y 2006)

El crecimiento y desarrollo de las larvas del lenguado de California en el presente estudio, se relacionó con la expresión y actividad enzimática durante el desarrollo larval.

#### **IV.4. Tripsinógeno (TRY)**

Algunos estudios sobre los mecanismos moleculares de las adaptaciones digestivas en varias especies de peces marinos ha mostrado que en etapas larvales tempranas, estas especies de peces marinos cuentan con la capacidad de realizar la digestión proteica en condiciones alcalinas (Péres *et al.* 1998; Srivastava *et al.* 2002; Murray *et al.* 2004 y 2006 y Pérez-Casanova *et al.* 2006).

##### **IV.4.1. Secuencias del TRY del lenguado de California**

En el lenguado de California se obtuvo la secuencia parcial de dos alelos posibles de un segmento del gen del tripsinógeno amplificado mediante una RT-PCR con los iniciadores RTTRY2/1 y RTTRY2/3. Los segmentos de los genes tuvieron un tamaño de 397 nucleótidos y su traducción dio como resultado una secuencia de 132 aminoácidos (Tabla 2 y Fig. 4).

Los alelos del tripsinógeno (Ia y Ib) exhiben tres cambios de nucleótidos en los sitios 160, 175 y 266. Cada una de estas sustituciones dio como resultado tres diferencias en la secuencia de aminoácidos en los sitios 54, 59 y 89. Estas diferencias consisten en la sustitución de una isoleucina en el alelo Ia por una leucina en el Ib, una glutamina (alelo Ia) en lugar de una lisina (alelo Ib) y una serina (alelo Ia) por una aspargina (alelo Ib). Estos sitios de sustitución no forman parte de algún sitio catalítico de la enzima, por lo tanto se puede considerar que no produce un cambio trascendental en la estructura de la proteína.



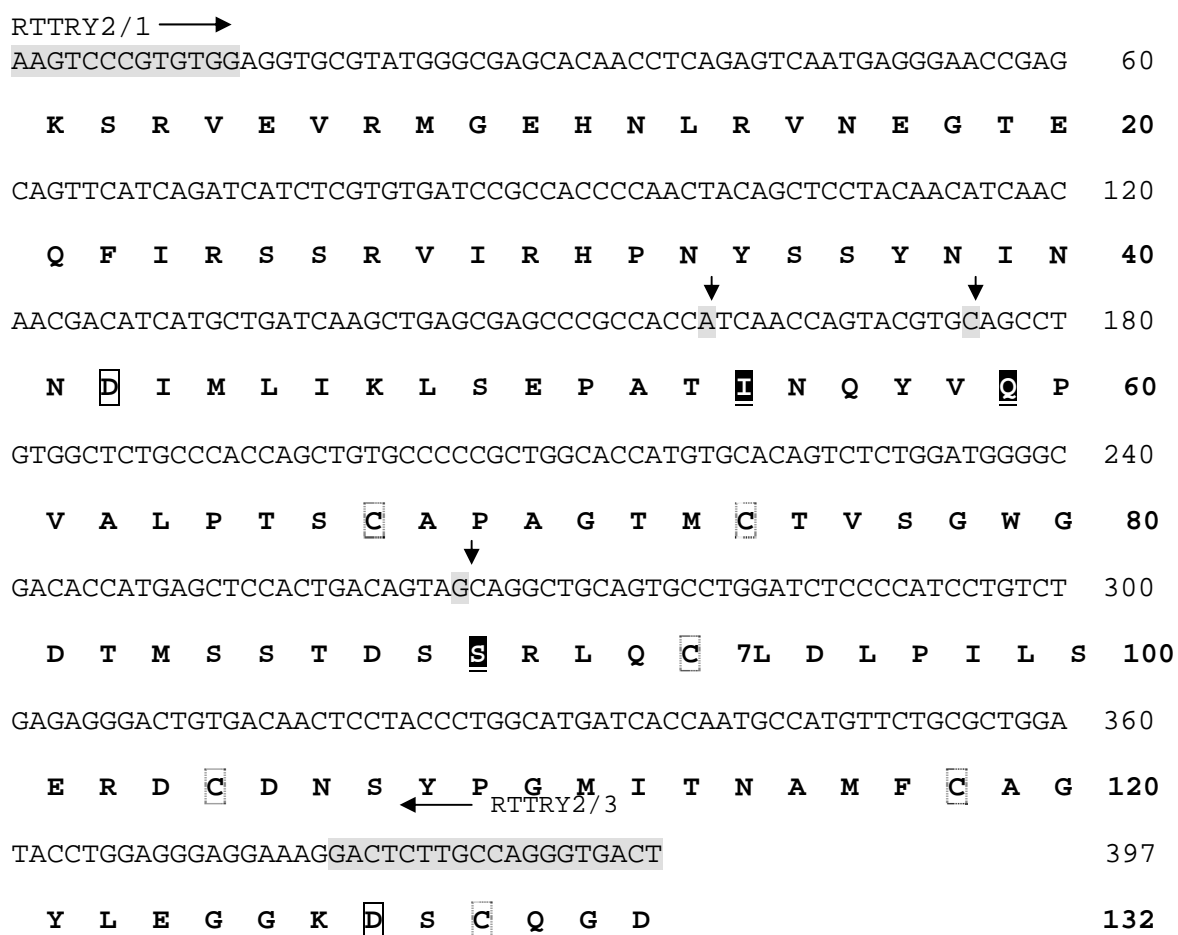


Figura 4. Secuencia de nucleótidos y secuencia deducida de aminoácidos (negritas) del Tripsinógeno amplificada con iniciadores de *P. americanus* ( ) por RT-PCR con mRNA de tejido digestivo de juveniles y larvas de *P. californicus*. La diferencia en nucleótidos y aminoácidos entre los alelos Ia y Ib se indican por ▼ y ■ respectivamente. Además se señalan las asparginas involucradas en la actividad catalítica del TRY **D** y las cisteínas responsables de los enlaces disulfuro **C**.

La secuencia del tripsinógeno contiene dos de las tres asparginas esenciales para la actividad catalítica y conformacional en las posiciones 42 y 128, además de seis de las cisteínas responsables de la formación de enlaces bisulfuro, en las posiciones 67, 74, 94, 105, 119 y 130 (Fig. 4). Estos sitios están también presentes en el tripsinógeno del lenguado japonés (*P. olivaceus*) (Suzuki *et al.* 2002).

#### IV.4.2. Comparación de las secuencias y relación filogenética

Al realizar una comparación de las secuencias del tripsinógeno del lenguado de California y otras especies altamente similares, de acuerdo con los resultados del BLASTN del GeneBank (Apéndices A y B) se pudo observar una conservación del 69.75 % de los nucleótidos y un 63.91% de aminoácidos (Fig. 5).

En el análisis comparativo de las secuencias de nucleótidos y aminoácidos del TRY del lenguado de California se obtuvieron dos alelos (1a y 1b) los cuales guardan una alta similitud entre ellos (99%). Se comparó con las especies que presentan mayor similitud y con el lenguado de invierno (*P. americanus*), ya que de esta última se sintetizaron los iniciadores utilizados para este estudio. Entre ambos alelos del tripsinógeno del lenguado de California y el lenguado japonés se observó una similitud de 98% y 93% con los tripsinógenos (AB029751, EU007656 y AB029750) (Suzuki, *et al.* 2002), 95%, 93% y 91% con una cobertura de 99%, 93% y 100% respectivamente al lenguado del Atlántico (AY860207, AY862987 y EU412468, respectivamente) (Murray *et al.* 2004 y 2006 y Douglas *et al.* 2008) y 89% al lenguado de invierno (AF012463). También conserva un 91% con la secuencia EU007657 de *P. bicoloratus* (Chen y Zhang 2007; no publicado) y un 89% al lenguado senegalense (*Solea senegalensis*; AB359190 y AB359189), al salmón del Atlántico (*Salmo salar*; Kaup 1858), al bacalao estuarino (*Epinephelus coioides*; Halmilton 1822; FJ426120), al salmón (*Oncirhynchus keta*, Walbaum 1792; AB449357)(Fig. 6 y Apéndices A y B).

Al hacer una comparación de las secuencias de aminoácidos de los alelos del tripsinógeno entre estas especies se puede ver la conservación de los residuos esenciales en la actividad catalítica y la estructura conformacional de la proteína, presentes también en las proteasas serina del lenguado japonés (Suzuki, *et al.* 2002). Además, se pudo observar que la secuencia de los tripsinógenos de las otras especies también presentan la secuencia de los iniciadores RTTRY2/1-2/3 a excepción del alelo del lenguado del Atlántico (AY862987) el cual carece de los

primeros dos aminoácidos. Por otra parte se pueden observar la inserción de dos aminoácidos en una de las secuencias del tripsinógeno del lenguado del Atlántico (EU412468), el lenguado de invierno (AF012463), las dos secuencias del lenguado senegalense (AB359189 y AB539190), el bacalao estuarino (FJ426120), el salmón del Atlántico (BT047303) y el salmón (AB449357).

1a P.cal	KSRVE	VRMGE	HNLRVNEGTE	QFIRSSRVIR	HPNYSSYNIN	NDIMLIKLS	50		
1b P.cal	KSRVE	VRMGE	HNLRVNEGTE	QFIRSSRVIR	HPNYSSYNIN	NDIMLIKLS			
AB029751	KSRVE	VRIGE	HNLRVYEETE	QFISSSRVIR	HPNYSSYNIN	NDIMLIKLS			
EU007656	KSRVE	VRMGE	HNLRVNEGTE	QFIRSAREIR	HPNYSSYNIN	NDIMLIKLS			
AB029750	KSRVE	VRMGE	HHIKINEGTE	QFISSERVIR	HPNYSSYNIN	NDIMLIKLS			
EU412468	KSRVE	VRMGE	HHIRVNEGTE	QYISSARVFR	HPNYSSYNID	NDVMLIKLSK			
AY860207	KSRVE	VRMGE	HNLRVNEGTE	QYISSARVIR	HPNYSSYNIN	NDIMLIKLSK			
AY862987	--RVK	VRMGE	HHIRVNEGTE	QYISSARVFR	HPNYSSYNID	NDVMLIKLSK			
AF012463	KSRVE	VRMGE	HKIRVNEGTE	QFVSSRVIR	HPNYDSWNID	NDIMLIKLSK			
AB359190	KSRVE	VRMGE	HNIQVTEGSE	QFISSSRVIR	HPNYSSYNIN	NDIMLIKLSR			
AB359189	KSRVE	VRLGE	HNLRYTEGNE	QFISSSRVIR	HPNYSSYNIN	NDIMLIKLSK			
EU007657	KSRVE	VRMGE	HHIRVNEGTE	QFISSSRVIR	HPNYSSYNID	NDIMLIKLSK			
BT047303	KSRVE	VRLGE	HNIQVTEGSE	QFISSSRVIR	HPNYSSYNID	NDIMLIKLSK			
FJ426120	KSRVE	VRLGE	HNIKVTEGSE	QFISSSRVIR	HPNYSSYNIN	NDIMLIKLS			
AB449357	KSRVE	VRLGE	HNIKVTEGSE	QFISSSRVIR	HPNYSSYNID	NDIMLIKLSK			
1a P.cal	PATLNQYVQP	VALPTS	CAPA	GTMCTVSGWG	DTMSSTDSS-	-LQCLDLPIL	100		
1b P.cal	PATLNQYVQP	VALPTS	CAPA	GTMCTVSGWG	DTMSSTDSS-	-LQCLDLPIL			
AB029751	PATLNQYVQP	VALPTS	CAPA	GTMCTVSGWG	DTMSSTDSS-	-LQCLDLPIL			
EU007656	PATLNQYVQP	VALPTS	CAPA	GTMCTVSGWG	DTMSSTDSS-	-LQCLDLPIL			
AB029750	PATLNQYVQP	VALPTS	CAPA	GTMCTVSGWG	DTMSSTDSS-	-LQCLDLPIL			
EU412468	PAVFNQYVQP	VALPTS	CAPA	GTMCTVSGWG	DTMSSTDSS-	-LQCLDLPIL			
AY860207	PATLNQYVQP	VALPTS	CAPA	GTMCTVSGWG	DTMSSTDSS-	-LQCLDLPIL			
AY862987	PAVFNQYVQP	VALPTS	CAPA	GTMCTVSGWG	DTMSSTDSS-	-LQCLDLPIL			
AF012463	PATLNQYVQP	VALPTS	CAPA	GTMCTVSGWG	DTMSSTDSS-	-LQCLDLPIL			
AB359190	SATLNQYVKT	VALPSS	CAPA	GTMCKVSGWG	DTMSSTDSS-	-LQCLDLPIL			
AB359189	SATLNQYVKT	VALPSS	CAPA	GTMCKVSGWG	DTMSSTDSS-	-LQCLDLPIL			
EU007657	PATLNQYVKT	VALPSS	CAPA	GTMCKVSGWG	DTMSSTDSS-	-LQCLDLPIL			
BT047303	PATLNQYVQP	VALPTS	CAPA	GTMCTVSGWG	DTMSSTDSS-	-LQCLDLPIL			
FJ426120	PATLNQYVQP	VALPTS	CAPA	GTMCTVSGWG	DTMSSTDSS-	-LQCLDLPIL			
AB449357	PATLNQYVQP	VALPSS	CAPA	GTMCTVSGWG	DTMSSTDSS-	-LQCLDLPIL			
1a P.cal	SERDC	DN	NSYP	GMITNAMF	CA	GYLEGGK	SC	QGD	133
1b P.cal	SERDC	DN	NSYP	GMITNAMF	CA	GYLEGGK	SC	QGD	
AB029751	SERDC	DN	NSYP	GMITNAMF	CA	GYLEGGK	SC	QGD	
EU007656	SERDC	DN	NSYP	GMITNAMF	CA	GYLEGGK	SC	QGD	
AB029750	SDRDC	DN	NSYP	GMITNAMF	CA	GYLEGGK	SC	QGD	
EU412468	SFSDC	DN	NSYP	GMITNAMF	CA	GYLEGGK	SC	QGD	
AY860207	SDRDC	DN	NSYP	GMITNAMF	CA	GYLEGGK	SC	QGD	
AY862987	SFSDC	DN	NSYP	-----	-----	-----	-----	---	
AF012463	SFSDC	DN	NAYP	GMITNAMF	CA	GYLEGGK	SC	QGD	
AB359190	SERDC	DN	NSYP	GMITNAMF	CA	GYLEGGK	SC	QGD	
AB359189	SERDC	DN	NSYP	GMITNAMF	CA	GYLEGGK	SC	QGD	
EU007657	SFRDC	DN	NAYP	-----	-----	-----	-----	---	
BT047303	SYSDC	DN	NSYP	GMITNAMF	CA	GYLEGGK	SC	QGD	
FJ426120	SKEDC	DN	NAYP	GMITNAMF	CA	GYLEGGK	SC	QGD	
AB449357	SYSDC	DN	NSYP	GMITNAMF	CA	GYLEGGK	SC	QGD	

Figura 5. Comparación de la secuencia de aminoácidos del TRY del lenguado de California en las diez especies con mayor similitud, así como la secuencia de las especies de las que se derivan los iniciadores utilizados para la RT-PCR. En **sombreado** se indican los sitios conservados entre las secuencias de las especies y en un **sombreado más oscuro** se encuentran señalados los sitios activos de los ácidos aspárticos involucrados en la actividad catalítica de la enzima. En **negro** se indican las cisteínas involucradas en los enlaces bisulfuro y en el **recuadro** se encierra el sitio donde hibridan los iniciadores RTTRY2/1 y RTTRY2/3. Ver texto para el nombre de las especies.

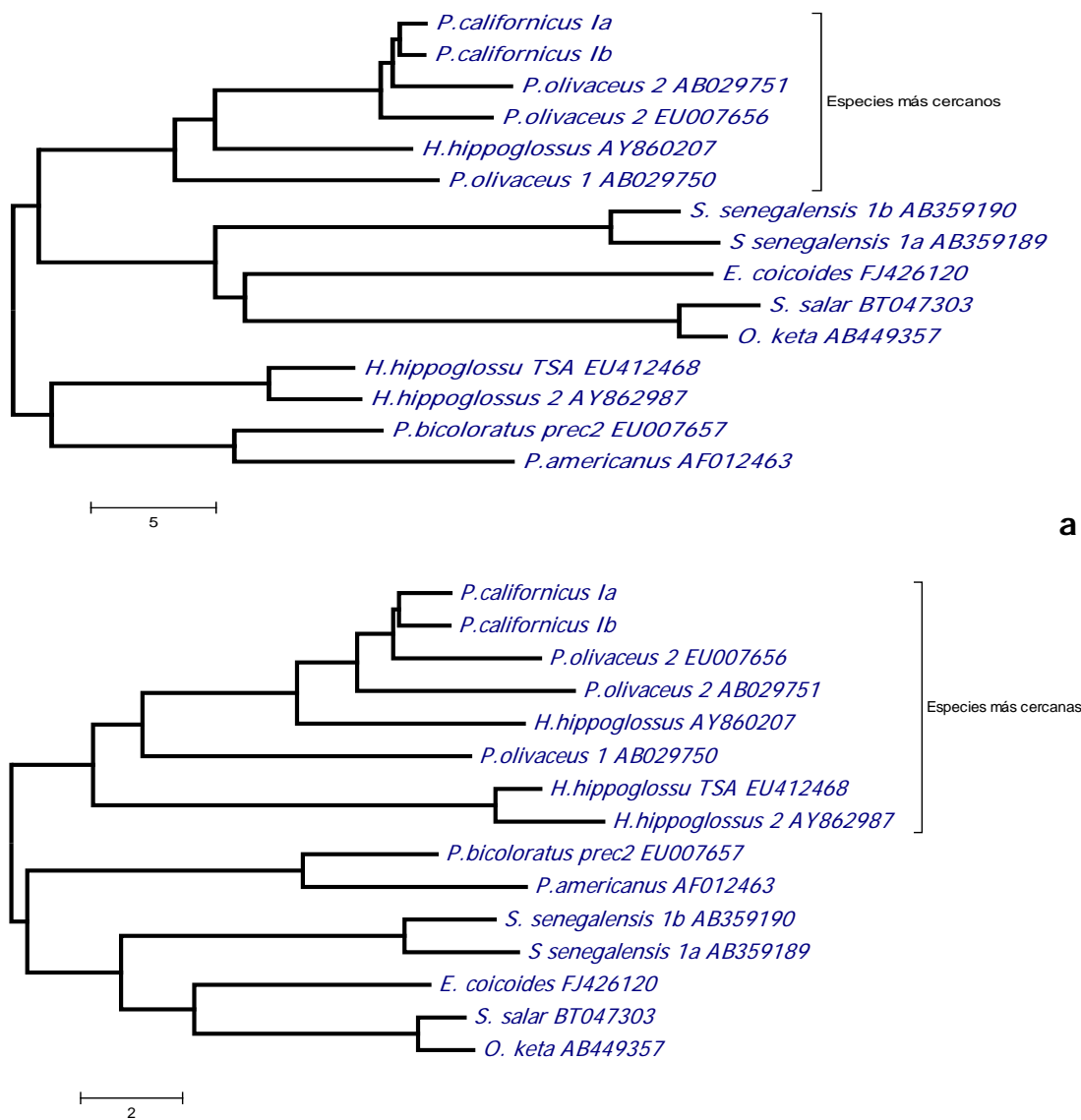


Figura 6. Relación filogenética por el método de unión de vecinos (Neighbor Joining) de las secuencias de nucleótidos **(a)** y aminoácidos **(b)** de TRY del lenguado de California y las 14 secuencias más similares existentes en el banco de genes, resultado del BLASTN (Apéndices A y B).

En el análisis de relaciones filogenéticas de los tripsinógenos de las especies más cercanas y el lenguado de California por el método de unión de vecinos, se puede observar la división de tres grupos de especies. Entre las especies que más se asemejan al lenguado de California están principalmente el lenguado japonés (*P. olivaceus*) y el lenguado del Atlántico (Fig. 6). Sin embargo, al relacionar las secuencias de aminoácidos se puede ver claramente la formación de sólo dos

grupos, en donde siguen siendo el lenguado japonés y el del Atlántico las especies que presentan una mayor semejanza al lenguado de California.

#### IV.4.3. Expresión y actividad de la tripsina durante el desarrollo larval

La expresión del tripsinógeno en las larvas de *P. californicus*, resultado de la RT-PCR, mostró bajos niveles de transcripción al momento de la eclosión, con un aumento de niveles de mRNA hasta los 20 DDE. No se presentó producto alguno en la reacción de control negativo (Fig. 7).

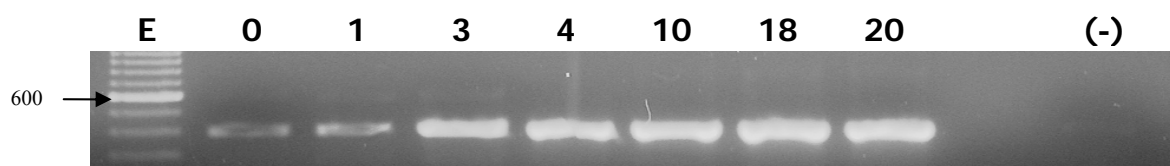


Figura 7. Expresión génica del tripsinógeno durante los primeros 20 días de desarrollo larval del lenguado de California. Edad en días después de la eclosión (DDE). Con un marcador molecular de 100 pb indicado por (E) y el control negativo (-).

La actividad enzimática total del TRY se detectó a bajos niveles a un DDE ( $0.211 \pm 0.0764$  U/larva) e incrementó de manera constante conforme las larvas se desarrollaron (Fig. 8). Debido a que en el presente trabajo sólo se buscó determinar el momento en que se presenta la primera actividad enzimática, los ensayos consideraron sólo los primeros 18 DDE.

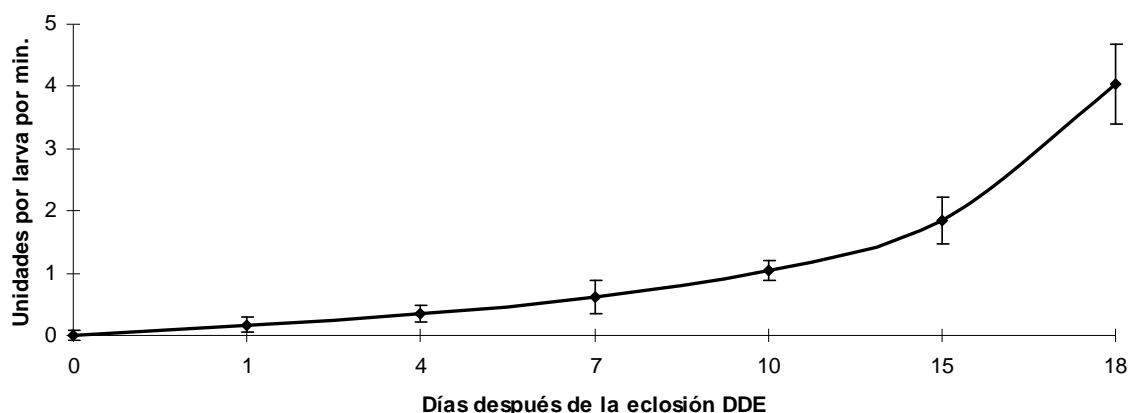


Figura 8. Actividad enzimática de la TRY durante los primeros días de crecimiento larval de *P. californicus*. Las barras indican la desviación estándar.

La expresión en bajos niveles de transcripción del tripsinógeno del lenguado de California en el momento de la eclosión y su aumento gradual a lo largo de su desarrollo, presentó un patrón de expresión muy similar al de la lobina europea (*D. labrax*) en la cual se supone que la expresión del zimógeno de la tripsina está regulada genéticamente y es dependiente de la edad de las larvas (Perés *et al.* 1998). Otro patrón de expresión similar se reportó para el botete diana (*S. annulatus*) donde se encontró un bajo nivel de mRNA de un tripsinógeno en huevos después de 24 horas de la fertilización, los cuales se mantuvieron constantes los primeros 2 DDE y posteriormente incrementó a los 3DDE (momento de la apertura de la boca)(García-Gasca *et al.* 2006).

De la misma manera, en un estudio de la expresión de varias enzimas a lo largo del desarrollo larval del eglefino (*M. aeglefinus*) y del bacalao del Atlántico (*G. morhua*) se expresó un tripsinógeno en larvas recién eclosionadas de ambas especies (Pérez-Casanova *et al.* 2006). La presencia de una baja actividad enzimática desde el primer día después de la eclosión y el aumento constante a lo largo del desarrollo larval también se presenta en las investigaciones realizadas por Zacarías-Soto *et al.* (2006) y Álvarez-González *et al.* (2006) en el lenguado de

California y también para otras especies tales como en el lenguado japonés (Srivastava *et al.* 2002) y el lenguado de invierno (Murray *et al.* 2004).

En el presente estudio no se realizó el análisis para diferenciar la expresión del tripsinógeno en diferentes tejidos y órganos del sistema digestivo, pero en otras investigaciones se ha logrado detectar y diferenciar la expresión del tripsinógeno en el páncreas (Srivastava *et al.* 2002; Pérez-Casanova *et al.* 2006; Murray *et al.* (2004) y (2006). Asimismo, se ha localizado la expresión de tres tipos de tripsinógenos en diferentes tejidos de peces marinos tales como: el intestino, los ciegos pilóricos, el intestino pilórico y cardiaco utilizando los iniciadores GAPDH, GAPDHF2 y GAPDHR1 (Murray *et al.* 2004).

## **IV.5. Pepsinógeno (PEP)**

### **IV.5.1. Secuencia del PEP del lenguado de California**

Se obtuvieron las secuencias sentido y antisentido de 14 amplificaciones del segmento del gen del pepsinógeno del lenguado de California, el cual resultó en la identificación de tres posibles alelos (Ia, Ib y Ic) de este gen (Fig. 9). Los tres alelos presentaron seis diferencias a nivel de nucleótidos, de las cuales sólo dos produjeron la sustitución de los aminoácidos: la isoleucina (I) en el PEP Ia por la tirosina (Y) en los PEP Ib y Ic y la sustitución de la asparagina (N) en el PEP Ia por la serina (S) en los PEP Ib y Ic en las posiciones 15 y 74 de la secuencia de aminoácidos.

En todas las secuencias es posible identificar uno de los ácidos aspárticos ( $D_{60}$ ) que componen el sitio activo situado en la posición 60, así como las tres cisteínas ( $C_{51,55y94}$ ) involucradas en la formación de los enlaces bisulfuro encontrados en el pepsinógeno. En la secuencia nucleotídica del alelo Ic se localizó la inserción de un segmento de 120 pb que posiblemente podría tratarse de un intrón. Este intrón localizado en la posición del nucleótido 119 señalado en la Fig. 9, presenta una alta similitud en su secuencia a la del pepsinógeno del lenguado



de invierno (*P. americanus*; AF156791), equivalente al 92% respecto al 97% de cobertura entre ambas secuencias. El segmento del intrón no fue considerado para hacer el análisis de la relación filogenética entre las especies con mayor similitud al lenguado de California (Fig. 11 y Apéndices C, D y F).

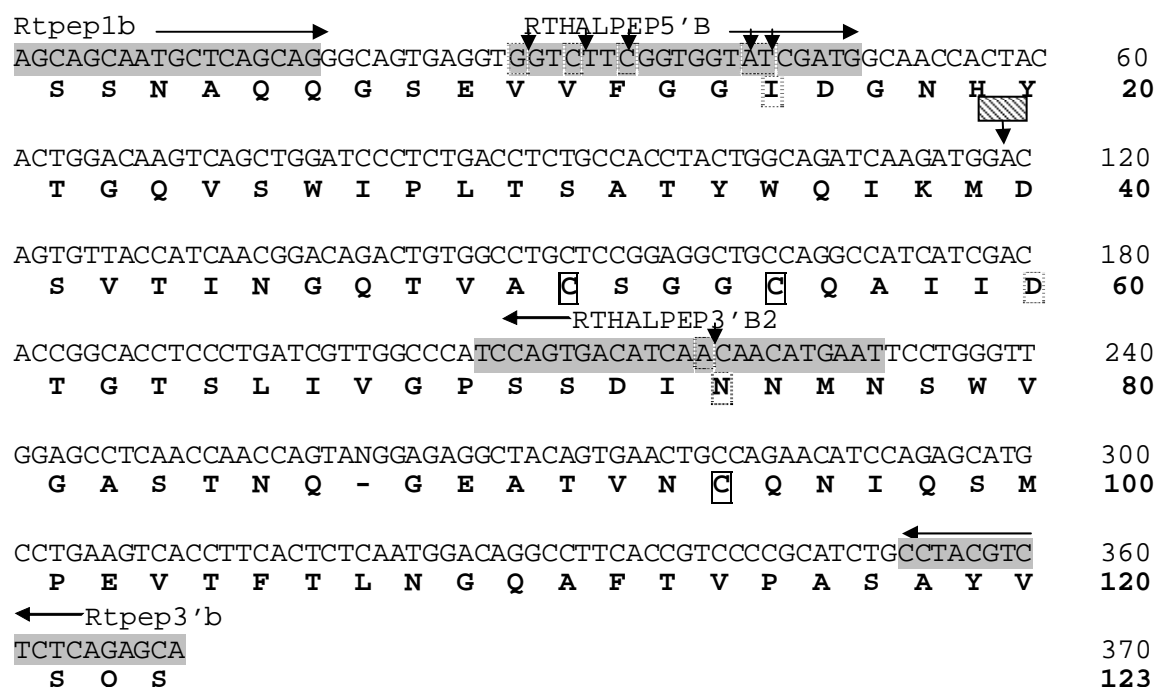


Figura 9. Secuencia de nucleótidos y aminoácidos (negritas) del pepsinógeno del lenguado de California, resultado de la RT-PCR y los iniciadores Rtpep1b-3b y RTHALPEP5'B-3'B2 indicados por (■). Los sitios de diferencias de nucleótidos y aminoácidos entre los tres alelos son indicados mediante una caja de línea punteada sombreado (▤) y uno de los dos ácidos aspárticos asociados con los sitios activos es indicado por sombreado sólido (■), las cajas □ indican las tres cisteína que forman los enlaces bisulfuro y ▨ indica el sitio donde inicia el intrón en el PEP 1c.

#### IV.5.2. Comparación de las secuencias y relación filogenética

En el presente estudio se obtuvieron tres posible alelos del pepsinógeno del lenguado de California, los cuales presentaron un 77.02 % de conservación entre ellos, esto debido al mayor tamaño que presenta el segmento 1a. Además de la presencia de un intrón en la secuencia 1c, no existe diferencia entre la secuencia

1b y 1c. Se observó una conservación del 95% en los pepsinógenos del lenguado del Atlántico (EU413439, AY860205 y AY860204), el lenguado de invierno (AF156788) de una cobertura total del 100%; además de un 98, 91 y 89% de una cobertura del 99% con el lenguado japonés, atún azul del Pacífico (*Thunnus orientales*, Temminck y Schlegel 1844) y el mandarín dorado (*Sineperca schezerii*, Steindachner 1892) respectivamente. Con un 98% de cobertura se presenta un 97% de conservación entre los pepsinógenos del lenguado de invierno (AF156791) y el lenguado de California (alelo 1a). Igualmente se observó que la dorada (*Sphoeroides aurata*, Linnaeus 1758) guarda un 92% y el bacalao esmeralda (*Trematomus bernacchii*, Boulenger 1902) guarda un 91% de conservación con el lenguado de California, éstos con un 96 y 95 % de cobertura entre las secuencias (Apéndices C, D y F).

Se realizó un análisis comparativo y la relación filogenética con la secuencia de aminoácidos entre el pepsinógeno del lenguado de California y el pepsinógeno de las especies más similares a éste (Fig. 10). También se observó entre estas especies una alta similitud de uno de los dos ácidos aspártico (D<sub>60</sub>) involucrados en la actividad catalítica de las PEP y las tres cisteínas que forman los enlaces bisulfuro en el lenguado del Atlántico y de invierno (Douglas *et al.* 1999 y Murray *et al.* 2006) (Fig. 10).

P.calif Ia	SSNAQQGSEV	VFGGID	GNHY	TGQVSWIPLT	SATYWQIKMD	SVTINGQTVA	CSGGCQAIID	60
P.calif Ib	SSNAQQGSEV	VFGGYD	GNHY	TGQVSWIPLT	SATYWQIKMD	SVTINGQTVA	CSGGCQAIID	
P.calif Ic	SSNAQQGSEV	VFGGYD	GNHY	TGQVSWIPLT	SATYWQIKMD	SVTINGQTVA	CSGGCQAIID	
EU413439	SSNAQQGSEV	VFGGSD	SSHF	TGQISWIPLT	SATYWQIKMD	SVTINGQTVA	CSGGCQAIID	
AY860205	SSNAQQGSEV	VFGGYD	DANHF	TGQISWIPLT	SATYWQIKMD	SVTINGQTVA	CSGGCQAIID	
AY860204	SSNAQQGSEV	IFGGTD	SSHY	TGQISWIPLT	SATYWQIKMD	SVTINGQTVA	CSGGCQAIID	
AF156788	SSNAQQGSEV	IFGGTD	SSHY	TGQISWIPLT	SATYWQIKMD	SVTINGQTVA	CSGGCQAIID	
AB120129	SSNNQQGSEV	VFGGID	GNHY	TGQVSWIPLT	SATYWQIKMD	SVTINGQTVA	CSGGCQAIID	
AB440201	SSNSQQGNEV	VFGGID	SSHY	TGKITWIPLT	SATYWQIQMD	SVTINGQTVA	CSGGCQAIID	
EU807927	SSNSEQGSEV	VFGGID	SSHY	TGQITWIPLS	SATYWQIKMD	SVTINGQTVA	CSGGCQAIID	
AF156791	SSNAQQGSEV	IFGGTD	SSHY	TGQISWIPLT	SATYWQIKMD	SVTINGQTVA	CSGGCQAIID	
EU163284	SGNSEQGSEV	VFGGTD	SNHY	TGQITWIPLS	SATYYQISMD	SVTINGQTVA	CSGGCQAIID	
AJ550950	SSKSAQDSEV	VFGGID	SSHY	TGQIIWIPLS	SDTYWQIKMD	SVTINGQTVA	CAGGCQAIID	
P.calif Ia	TGTSLIVGPS	SDINNMN	SWV	GASTNQYGEA	TVNCQNIQSM	PEVTFTLNGQ	AFTVPAS	AYV
P.calif Ib	TGTSLIVGPS	SDISNMN						
P.calif Ic	TGTSLIVGPS	SDISNMN						
EU413439	TGTSLIVGPS	SDISNMN	SWV	GASTNQYGEA	TVSCQNIQSM	PDVTFTLDGK	AFTVPAS	AYV
AY860205	TGTSLIAGPS	SDISNMN	SWV	GASTNQYGEA	TVNCQNIQSM	PDVTFTLDGK	AFTIPAS	AYV
AY860204	TGTSLIVGPN	SDISNMN	SWV	GASTNQYGEA	TVSCQNIQSM	PDVTFTLNGK	AFTVPAS	AYV
AF156788	TGTSLIVGPN	SDISNMN	SWV	GASTNQYGEA	TVSCQNIQSM	PDVTFTLNGK	AFTVPAS	AYV
AB120129	TGTSLIVGPT	NDINNMN	SWV	GASTNQYGEA	TVNCQNIQSM	PEVTFTLNGK	AFTVPAS	AYV
AB440201	TGTSLIVGPS	RDIYNMN	AWV	GASTTQNGDA	TVNCQNIQSM	PEVTFTLNGH	AFTIPASAYV	
EU807927	TGTSLIVGPT	SDINNMN	AWV	GASTNQYGEA	VVSCQNIQSM	PDVTFTLNGQ	AFTIPAS	AYV
AF156791	TGTSLIVGPN	SDISNMN	SWV	GASTNQYGEA	TVSCQNIQSM	PDVTFTLNGK	AFTVPASAYV	
EU163284	TGTSLIVGPT	SDINNMN	SWV	GASTNEYGEA	TVNCQNIQSM	PDVTFTLNGH	AFTVPAS	AYV
AJ550950	TGTSQIVGPT	SDISNMN	SWV	GASTNQYGEA	RVNCQNIQSM	PEVTFTLNGN	AFTIPAS	AYV
P.calif Ia	SQS							
EU413439	SQS							
AY860204	SQS							
AY860205	SQS							
AF156788	SQ?							
AB120129	SQS							
AB440201	SQS							
EU807927	FQN							
AF156791	SQS							
EU163284	SQS							
AJ550950	SQS							

Figura 10. Comparación de la composición de aminoácidos en las secuencias del PEP del lenguado de California y las diez secuencias con mayor similitud a ésta. En **sombreado** se indican los sitios conservados entre las secuencias de las especies y en un **sombreado más oscuro** se encuentran señalados los sitios del ácido aspártico involucrado en la actividad catalítica de la enzima. En **negro** se indican las cisteínas involucradas en los enlaces bisulfuro y en el **recuadro** se encierra el sitio donde hibridan los pares de iniciadores del lenguado de invierno y del Atlántico. Ver texto para el nombre de las especies.

El análisis filogenético mostró que los alelos del pepsinógeno del lenguado de California presenta una alta conservación en la composición de nucleótidos y aminoácidos con el pepsinógeno de otras especies (Apéndices C, D y E), tales como el lenguado japonés (Douglas *et al.* 2008), el de invierno (Douglas *et al.*

1999, Murray *et al.* 2006), el del Atlántico (Murray *et al.* 2006) siendo estas tres especies las que presentan mayor similitud en las secuencias de sus PEP a las del lenguado de California. Las especies más lejanas filogenéticamente son el atún azul del Pacífico, el mandarín dorado y la dorada (Fig.11).

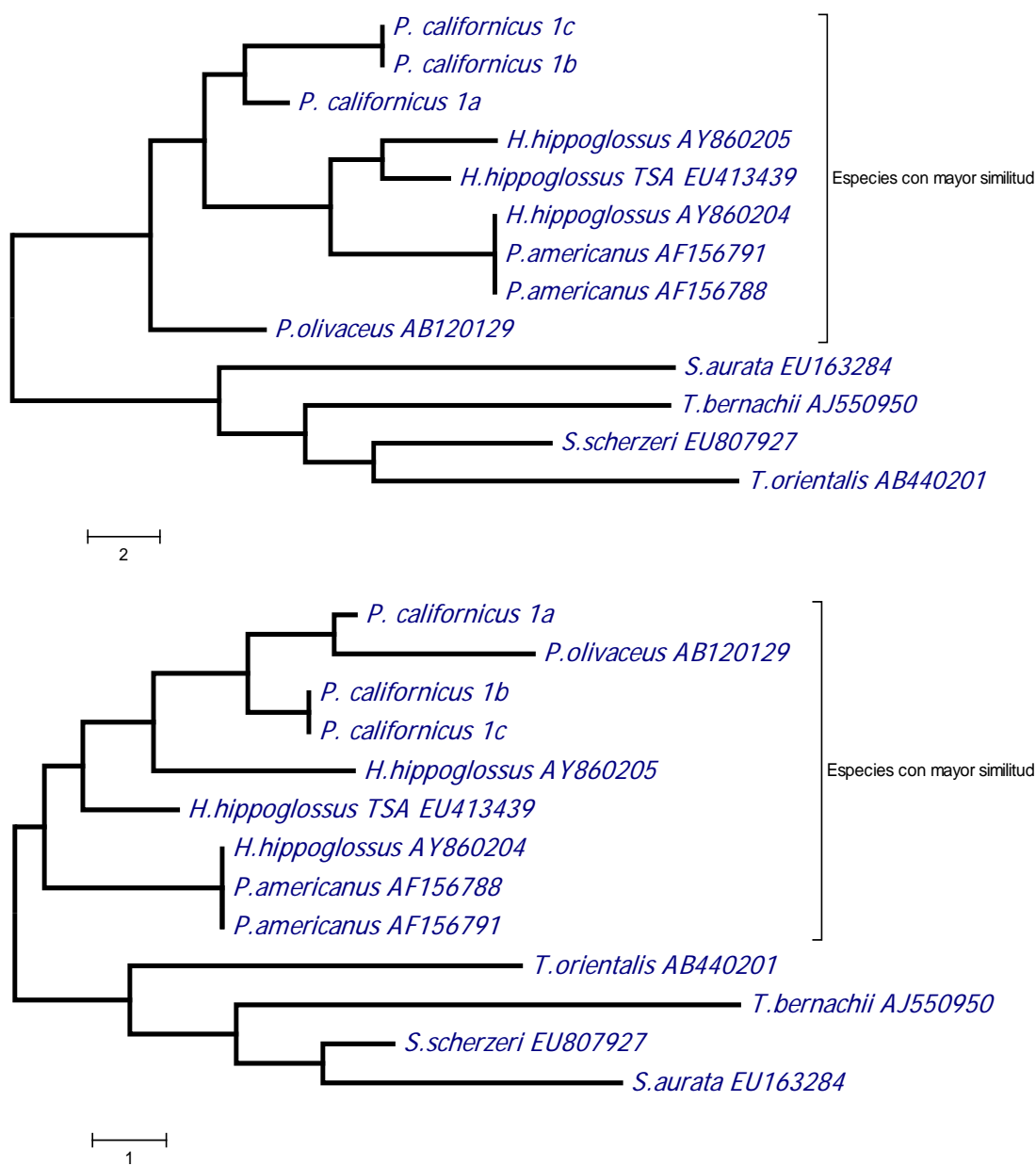


Figura 11. Relación filogenética por el método de unión de vecinos (Neighbor Joining) de las secuencias de nucleótidos **(a)** y aminoácidos **(b)** de PEP del lenguado de California y las 9 secuencias más similares existentes en el banco de genes (Apéndices C, D, E).

### IV.5.3. Expresión y actividad de la pepsina durante el desarrollo del lenguado de California

La expresión del pepsinógeno fue detectado por primera vez a un DDE por la amplificación del segmento del gen del pepsinógeno por medio de una RT-PCR utilizando los iniciadores RT-HALPEP5'B-3'B2; el nivel de expresión se mantuvo constante durante los primeros 20 DDE. No se observó amplificación en la reacción de control negativo (Fig. 12).

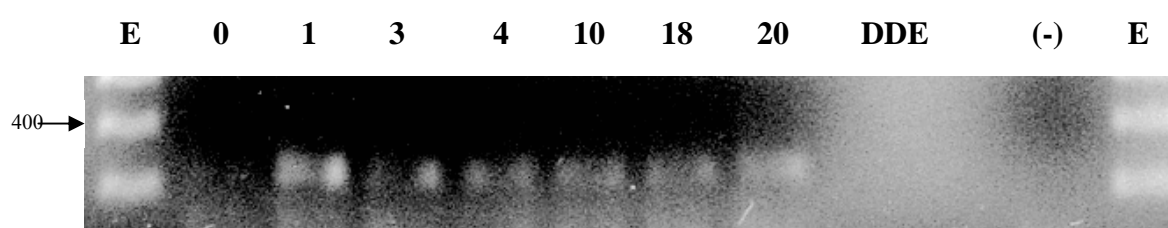


Figura 12. Expresión génica de la PEP durante los primeros 20 DDE de crecimiento larval del lenguado de California. Marcador molecular de 100 pb (E). Edad de larvas en días después de la eclosión (DDE) y el control negativo (-).

La actividad total ácida fue detectada en las larvas del lenguado de California a partir de los 10 DDE ( $1.813 \pm 0.090$  mg) y se mantuvo constante entre los 18 y los 30 DDE ( $6.880 \pm 3.737$ ). Fue a partir de los 33 DDE que se presentó un notable aumento en la actividad total ácida en las larvas del lenguado de California (Fig. 13).

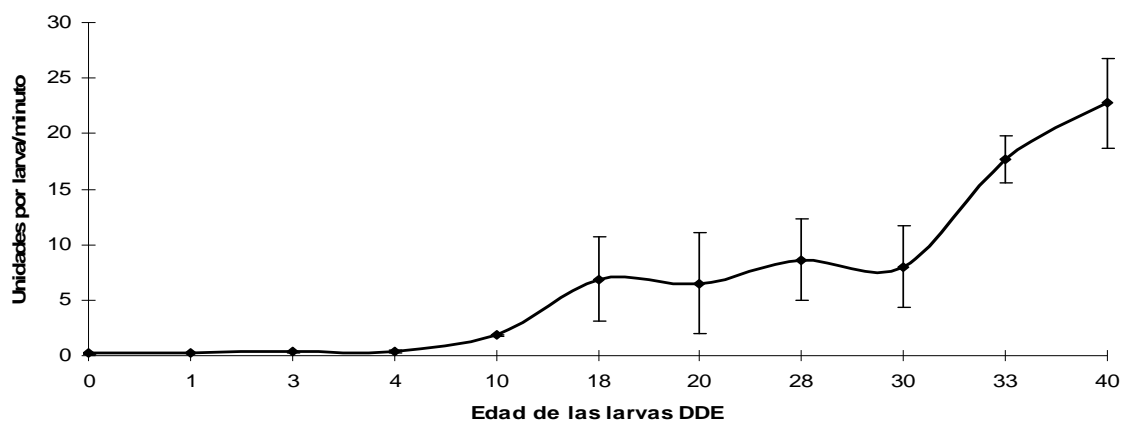


Figura 13. Actividad total proteolítica ácida (tipo pepsina) durante los primeros días de crecimiento larval del lenguado de California (DDE). Las barras indican la desviación estándar.

Debido a que se presentó la expresión del PEP en etapas muy tempranas de desarrollo larval, aun cuando no se habían desarrollado las glándulas gástricas en las larvas según los trabajos de Gisbert *et al.* (2004) y Zacarías-Soto *et al.* (2006), se realizó un análisis de RT-PCR con RNA total extraído del músculo, piel, intestino y estómago para detectar la amplificación del PEP en estos tejidos. Se incubó el RNA total con DNAsas para descartar la posibilidad de la amplificación DNA genómico. La retrotranscripción con el RNA total de estos tejidos resultó positiva. De esta manera no fue posible determinar el momento preciso de expresión del PEP durante el desarrollo de las larvas del lenguado de California. Al obtener la amplificación del gen del PEP por la RT-PCR de RNA total extraído de los cuatro tejidos y los iniciadores RTPEP 1b-3b, se obtuvo un producto del pepsinógeno >370 pb en todos los tejidos y como se utilizaron larvas completas para obtener el homogenizado del extracto enzimático, no se logró determinar el momento de la primera actividad enzimática de las PEP gástrica durante el desarrollo larval, pues resulta probable que la actividad detectada no sea específicamente gástrica.

Se han detectado patrones de expresión similares para el lenguado de invierno por Douglas *et al.* (2004) al considerar que la secreción del PEP se debió a las células gástricas en proliferación. Por otra parte, en el lenguado del Atlántico sí

se detectó la expresión del PEP después de la aparición histológica de las glándulas gástricas (Murray *et al.* 2006), por lo que consideran que la expresión del pepsinógeno no puede ocurrir si no hasta que las larvas están bien desarrolladas y la metamorfosis haya concluido. Sin embargo, para la etapa de desarrollo larval en la cual se detectó la expresión del PEP en el lenguado de California, no contaba aun con un sistema digestivo bien desarrollado y las glándulas gástricas no se habían detectado histológicamente (Gilsberg *et al.* 2003 y Zacarías-Soto *et al.* 2006). Es muy probable que la PEP detectada tempranamente en el lenguado de California provenga de la expresión de algún otro tejido del organismo. En un estudio realizado con el pez globo (*Takifugu rubripes*, Temminck y Schegel, 1850), el cual es una especie que carece de un estómago funcional, se encontró la presencia de un PEP en su genoma, el cual tiene una alta similitud a un pepsinógeno del lenguado de invierno (ADD56283 y ADD56284) y el lenguado japonés (AB120129). Por lo que al hacer un análisis de expresión del PEP en varios tejidos se encontró expresado a nivel transcripcional en la piel del pez globo (Kurokawa *et al.* 2005). Por lo que consideraron que la expresión del pepsinógeno en esta especie pudo deberse a una evolución funcional, debido a la degeneración de las glándulas gástricas y a su expresión en otros tejidos. Además suponen que al igual que la anguila japonesa (*Anguilla japonica*) las proteasas epidermales tales como las Catepepsinas L y B juegan un papel de defensa no específica en la piel de estos organismos. De tal forma, podemos suponer que la presencia del pepsinógeno en los tejidos como la piel y el músculo en el lenguado de California puede tener funciones diferentes a la digestión gástrica.

Conjuntamente la actividad de las proteasas ácidas detectadas en este estudio se presentó en bajos niveles a los 10 DDE, sin embargo, debido a las propiedades de la hemoglobina, como sustrato para los ensayos de actividad enzimática (no altamente específico de la pepsina) hizo suponer que la actividad detectada entre los 18 y 33 DDE, pudo deberse a otras proteasa ácidas también

presentes en distintos tejidos de los peces. No obstante, Álvarez-González *et al.* (2006) encontraron un patrón de actividad enzimática de las proteasas ácidas muy similar en larvas completas del lenguado de California. Con los resultados obtenidos en el presente estudio donde se detectó la posible expresión del pepsinógeno en tejidos diferentes a los digestivos (músculo y piel) del lenguado de California, se puede sugerir que la actividad de las proteasas ácidas (tipo pepsina) detectada en etapas tempranas de desarrollo larval del lenguado de California puede no corresponder a la actividad digestiva de las pepsinas gástricas (Álvarez-González *et al.* 2006). Si no deber se a la presencia de pepsinas u otras proteasas ácidas (catepepsinas entre otras) en músculo y piel. Lo cual contrastan con los resultados presentados por Zacarías-Soto *et al.* (2006) y Gisbert *et al.* (2003), quienes encontraron la actividad total ácida y la presencia de las glándulas gástricas en larvas de lenguado de California mayores a los 33 DDE.

#### **IV.6. Lipasa activada por sales biliares (LBAL)**

La lipasa activada por sales biliares es producida principalmente en el páncreas, sin embargo, presenta una gran actividad de hidrolasas (Wang y Hartsuck, 1993).

Algunos estudios han descrito el desdoble de lípidos en diferentes regiones del sistema digestivo y varias lipasas se han purificado de peces. De esta manera, se ha logrado caracterizar lipasas mediante ensayos específicos de expresión génica y actividad en diferentes tejidos y etapas de desarrollo larval de peces (Murray *et al.* 2003 y 2006; Pérez-Casanova *et al.* 2004 y 2006 y Zacarías-Soto *et al.* 2006 y Zacarías-Soto, 2007).

##### **IV.6.1. Secuencia de la LBAL del lenguado de California**

Se obtuvo la secuencia de dos posibles alelos del segmento amplificado del gen de la LBAL (LBAL Ia y Ib) de un tamaño de 536 nucleótidos (Tabla 2 y Fig.



14). En la secuencia se presentan dos diferencias entre sí; una por sustitución sinónima (en la que la sustitución del nucleótido no produce cambio en la secuencia de aminoácidos) y otra no-sinónima (cuya sustitución de nucleótidos produce cambio en la secuencia de aminoácido) en los sitios 192 y 373 respectivamente. Al hacer la traducción de la secuencia de nucleótidos se obtiene una secuencia de 178 aminoácidos, en la cual se presenta una sustitución de aminoácidos en la posición 125 (una valina por una isoleucina), esta última sustitución no afecta la estructura bioquímica de las enzimas debido a que ambos aminoácidos son no polares (Lodish *et al.* 2005).

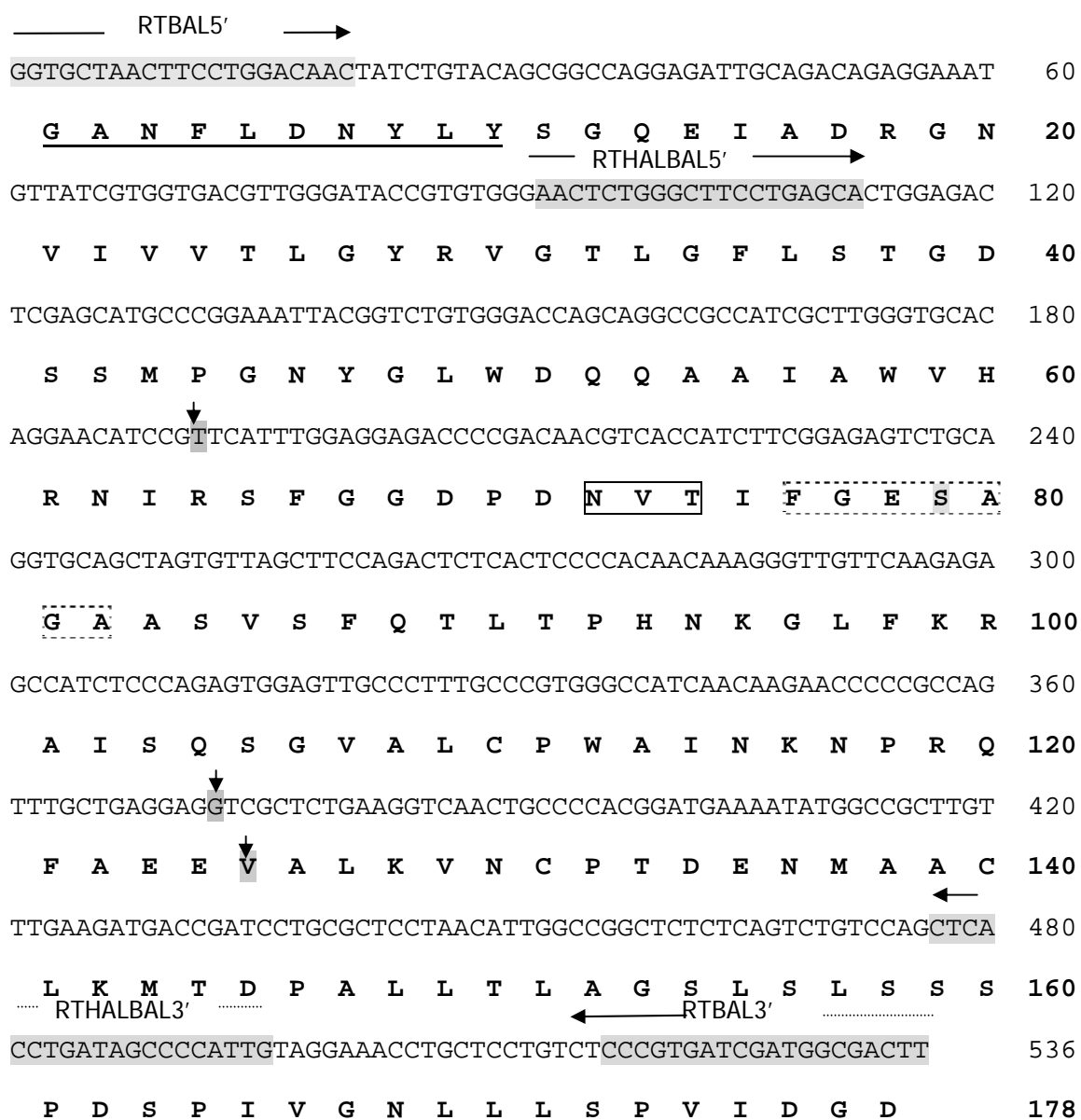


Figura 14. Secuencia de nucleótidos y secuencia deducida de aminoácidos de las LBAL de *P. californicus*. Se indican los sitios de los iniciadores (RTBAL5' y 3'; RTHALBAL5' y 3'), los sitios de diferencia entre las secuencias de ambos alelos de la LBAL de *P. californicus* (▼) y uno de los tres sitios catalíticos (S<sup>79</sup>) mediante sombreado. La región involucrada en la vinculación con sales biliares está subrayada (—). El sitio de la N-glicosilación está encerrado en un recuadro de línea continua  . El sitio activo de la serina se indica por un recuadro de línea semicontinua  .

Para la LBAL del lenguado de California, el sitio de vinculación con las sales biliaris (GANFLDNYLY) inicia en la posición número uno de la secuencia de aminoácidos y es altamente conservada al lenguado del Atlántico, el lenguado de invierno y el eglefino (*Melanogrammus aeglefinus*) (Murray *et al.* 2003, 2006; Pérez-Casanova *et al.* 2004). En este sitio también se ubica el iniciador (RTBAL5') (Murray *et al.* 2006) y es posiblemente una de las razones por la que se eligió este sitio para diseñar los iniciadores del lenguado de invierno (RTBAL5'3'). En este sitio se observó una diferencia con respecto al lenguado del Atlántico en la posición del aminoácido 8 presentando una tirosina (Y) en lugar de una histidina (H) (Fig.15). Los sitios de la N-glicosilación (NVT) y el activo de serina (FGESAGA) son altamente conservados, presentes en la posición 72 y 76 de la secuencia de nucleótidos respectivamente (Murray *et al.*, 2004, 2006). Uno de los tres sitios catalíticos característicos de la LBAL se encontró en la región 76-82 y fue similar al presentado por la pescadilla (Pérez-Casanova *et al.* 2004).

#### **IV.6.2. Comparación de las secuencias y relación filogenética**

Al realizar un análisis de las secuencias de nucleótidos de las LBAL por el BLASTN se observó que en el lenguado de California se presenta una similitud del 94% en su composición nucleotídica con las secuencias del lenguado del Atlántico (*H. hippoglossus*, EU412430 y AY860206), en un 93% al lenguado de invierno (*P. americanus*, AF512561), un 82% al (*Tetraodon nigroviridis*, ) y en un 87% con la lobina europea (*D. labrax*, EU647691) de un 85% de cobertura total, de acuerdo con los resultados obtenidos en BLASTN (Apéndices F y G). Se observaron en total 145 de sustitución de nucleótidos y 46 de aminoácidos entre las siete secuencias de comparación. Sin embargo, tales sustituciones no se encuentran dentro de los sitios activos de las secuencia de aminoácidos (Fig. 15).

P.calif Ia	-ANFLDNYLY	SGQEIADRGN	VIVVTLGYRV	GTLGFLS	TGD	SSMPGNYGLW	DQQAIAWVH	60
P.calif Ib	GANFLDNYLY	SGQEIADRGN	VIVVTLGYRV	GTLGFLS	TGD	SSMPGNYGLW	DQQAIAWVH	
EU412430	GANFLDNYLY	SGQEIADRGN	VIVVTLGYRV	GTMGFLS	TGD	SSMPGNYGLW	DQHAIAWVH	
AY860206	GANFLDNHLY	SGQEIADRGN	VIVVTLGYRV	GTMGFLS	TGD	SSMPGNYGLW	DQHAIAWVH	
AF512561	GANFLDNYLY	SGQEIADRGN	VIVVTLGYRV	GTMGFLS	TGD	SSMPGNYGLW	DQQAIAWVH	
CR654166	GANFLDNYLY	SGQEIAERK	VIVVTVGYRV	GTLGFLS	SGD	SGLPGNFWLW	DQQAIAWVH	
EU647691	-----	-----	----TLGYRV	GTLGFLS	TGD	SGLPGNYGLW	DQHTAIAWVH	
P.calif Ia	RNIRSFGGDP	DNVTIFGESA	GAASVSFQTL	TPHNKGLFKR	AISQSGVALC	PWAINKNPRQ	120	
P.calif Ib	RNIRSFGGDP	DNVTIFGESA	GAASVSFQTL	TPHNKGLFKR	AISQSGVALC	PWAINKNPRQ		
EU412430	RNIRSFGGDP	DNVTVFGE	GAASVSFQTL	TPHNKGLFKR	AISQSGVALC	PWAINKNPRR		
AY860206	RNIRSFGGDP	DNVTVFGE	GAASVSFQTL	TPHNKGLFKR	AISQSGVALC	PWAINKNPRR		
AF512561	RNIRSFGGDP	DNVTIFGESA	GAASVSFQTL	TPHNKGLFKR	AISQSGVALC	PWAINKNPRR		
CR654166	RNIRSFGGDP	DNITLFGESA	GGASVSFQTL	TPHNKGMIRR	AISQSGVALC	PWGVNRNPRK		
EU647691	RNIRSFGGDP	DKITIFGESA	GGASVSFQTL	TPHNKGLYKR	AISQSGVALC	PWAINKNPRR		
P.calif Ia	FAEEVALKVN	CPTDENMAAC	LKMTDPALLT	LAGSLSLS	SS PDSPI	VGNNLL	LSPVIDGD	179
P.calif Ib	FAEEIALKVN	CPTDENMAAC	LKMTDPALLT	LAGSLSLS	SS PDSPI	VGNNLL	LSPVIDGD	
EU412430	FAEEVALKVN	CPTDQTMAAC	LKMTDPALLT	LAGSLSLA	SS PDSPI	VGNNLL	LSPVIETAS	
AY860206	FAEEVALKVN	CPTDQTMAAC	LKMTDPALLT	LAGSLSLA	SS PDSPI	VGNNLL	LSPVI-GDF	
AF512561	FAEEIALKVN	CPTDQSMAAC	LKMTDPALLT	LAGSLSLT	SS PDSPI	LDNLL	LSPVIDGDF	
CR654166	LAEEIALKVN	CPTDDKMVAC	LRMADPKQLT	LAGSLDITGS	PDHPI	LFSLD	LSPVVDGDF	
EU647691	FAEEVALKVN	CPTDQSMAAC	LKMTDPALLT	LAGSLSIS	SS PDHPL	VNNLV	LSPVIDGDF	

Figura 15. Comparación de la composición de aminoácidos en las secuencias del PEP del lenguado de California y las secuencias con mayor similitud a ésta. En **sombreado** se indican los sitios conservados entre las secuencias de las especies y en un **sombreado más oscuro** se señala uno de los tres sitios catalíticos de la LBAL. En **negro** se indican uno de los tres sitios activos y las cisteínas involucradas en los enlaces bisulfuro. Ver texto para el nombre de las especies.

La composición de aminoácidos de las LBAL del lenguado de California es semejante en un 72.99% de sus nucleótidos y 74.30% de sus aminoácidos las otras especies. De los cuales, el zimógeno de LBAL del lenguado de California guarda un 94% de similitud con la secuencia del lenguado del Atlántico (AY860206 y EU412430, Murray *et al.* 2003, 2006; Douglas *et al.* 2008, en impresión), un 93% al lenguado de invierno (AF512561) con una cobertura total de las secuencias. Con la lobina europea (*D. labrax*) la similitud es del 87% (EU647691) de un 85% de cobertura y un 82% de un 92% de cobertura total de la secuencia del pez globo manchas verdes (CR654166, Jaillon *et al.* 2004) siendo esta última especie la más lejana al lenguado de California.

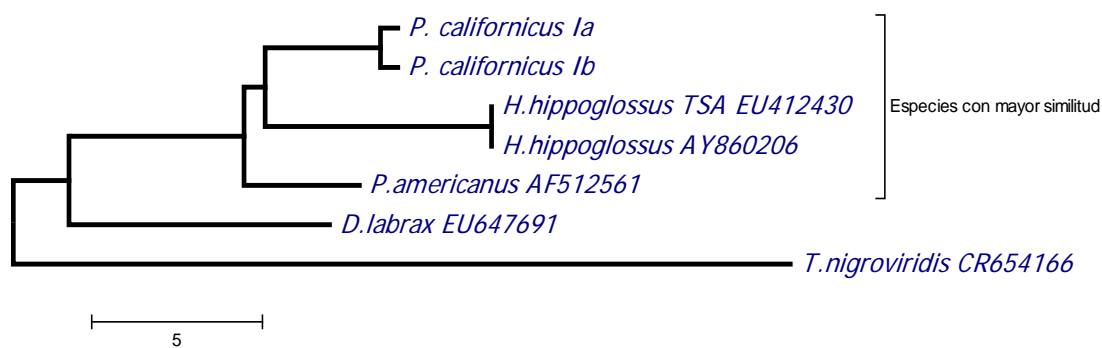
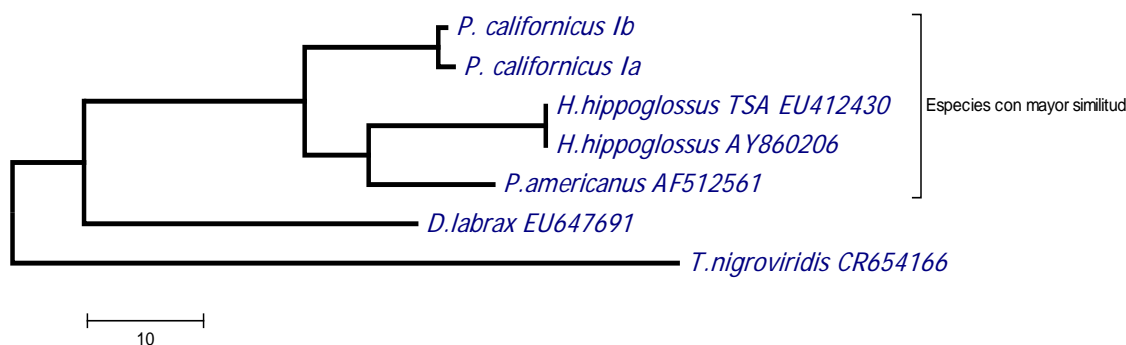


Figura 16. Relación filogenética por el método de unión de vecinos (Neighbor Joining) de las secuencias de nucleótidos **(a)** y aminoácidos **(b)** de la LBAL del lenguado de California y las cinco secuencias más similares existentes en el banco de genes.

De acuerdo con la relación filogenética de las LBAL, el lenguado de California presenta una mayor similitud con las LBAL del lenguado del Atlántico y de invierno que con la secuencia de la lobina europea (*D. labrax*) y del pez globo manchas verdes (*Tetraodon nigroviridis*, Marion de Proce, 1822).

#### **IV.6.3. Expresión y actividad de la lipasa activada por sales biliares durante el desarrollo larval**

Al realizar el alineamiento de las secuencias del segmento amplificado del gen de los zimógenos de la LBAL amplificados con los iniciadores RTBAL 5'-3' y sus respectivos iniciadores, se pudo visualizar que el segmento amplificado con los iniciadores RTHALBAL5'-3' es un segmento más pequeño del gen que se localiza dentro de la secuencia que amplifican los iniciadores RTBAL 5'3'. Por tanto, se

decidió utilizar estos últimos (RTBAL5'-3') para la determinación de la expresión génica de esta enzima durante el desarrollo larval de *P. californicus*, el cual presentó el tamaño esperado (~540 pb) (Tabla 2). Además no se obtuvo producto alguno en la reacción del control negativo (Fig. 17).

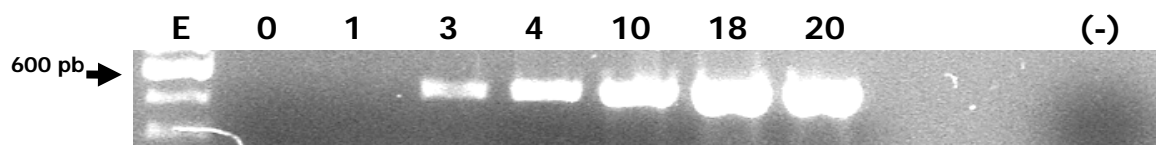


Figura 17. Expresión génica de la LBAL durante los primeros 20 días de desarrollo larval de *P. californicus* en días después de la eclosión (DDE). El marcador molecular de 100 pb es indicado por (E), se indica el control negativo (-).

No se detectó la expresión de LBAL a los 0 y 1 DDE, un bajo nivel de expresión a nivel de transcripción de la LBAL se detectó a los 3 DDE y fue aumentando conforme se fueron desarrollando las larvas (Fig. 17). En sincronía con la expresión génica de la LBAL, se presentó una baja actividad enzimática a los 3DDE. Esta actividad aumentó a los 4 DDE ( $2.75 \pm 0.694$  U/larva) y después disminuye a los 7 DDE (Fig. 18).

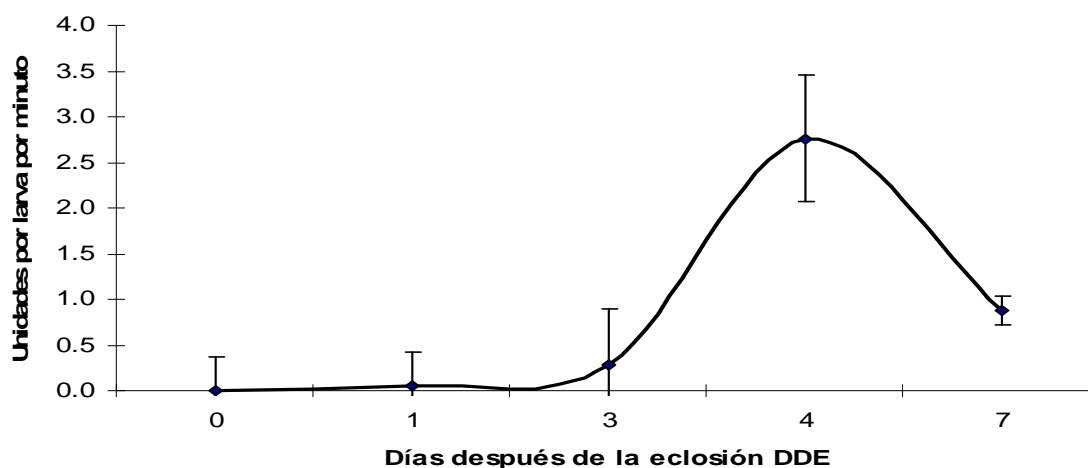


Figura 18. Actividad enzimática de las LBAL durante los primeros días de crecimiento larval DDE de *P. californicus*. U (1 unidad=0.1 absorbancia a 400nm x 10). Las barras indican la desviación estándar.

Se ha logrado detectar la expresión de LBAL en los ciegos pilóricos, el intestino, el bazo y el recto del lenguado de invierno (*P. americanus*) (Murray *et al.* 2003), además de presentarse en estos tejidos se presenta en el estómago del egléfino (*M. aeglefinus*) (Pérez-Casanova *et al.* 2004). Como no era el objetivo del presente trabajo, en el lenguado de California no se realizó el análisis de la expresión en los diferentes tejidos digestivos para la LBAL ni la TRY. Sin embargo, se pudo detectar la expresión génica y la actividad de la LBAL desde los 3 DDE, cuya expresión coincidió con la aparición del páncreas y la abertura de la boca (Gisbert *et al.* 2003; Zacarías-Soto, 2007). Murray *et al.* (2003) encontraron la expresión de la LBAL en larvas de 5 DDE del lenguado de invierno (*P. americanus*), al momento en el que las larvas abren la boca. Mientras que en larvas del egléfino (*M. aeglefinus*) y el bacalao del Atlántico (*Gadus morhua*) se encontró la expresión de las LBAL al momento de la eclosión (Pérez-Casanova *et al.* 2004, 2006). En el presente estudio se ha mostrado que la expresión de la LBAL es dependiente de la fase de desarrollo, ya que se observó el aumento gradual de la cantidad de mRNA transcrito a lo largo del desarrollo larval, a partir de los 3DDE. Además, se observó que en el momento que se presentó la actividad de la LBAL no mostró diferencia en tiempo con el momento de expresión génica.

Con estos resultados se considera que a partir de los 3 DDE (momento de la abertura de la boca y la primera alimentación) las larvas del lenguado de California cuentan con la capacidad para digerir lípidos, al igual que diversas especies de teleósteos.

## Capítulo V

---

### Conclusiones

---

- Es posible utilizar los iniciadores de los lenguados de invierno (*P. americanus*) y del Atlántico (*H. hippoglossus*) para sintetizar y amplificar el cDNA de los genes de las enzimas digestivas TRY, PEP y LBAL del lenguado de California.
- Las secuencias de aminoácidos de los segmentos amplificados, corresponden a los genes que codifican para los zimógenos de las enzimas digestivas: tripsinógeno, pepsinógeno y lipasa activada por sales biliares del lenguado de California.
- La composición de nucleótidos y aminoácidos de las enzimas digestivas del lenguado de California guardan una alta relación con las enzimas del lenguado japonés (*P. olivaceus*), el lenguado de invierno y el lenguado del Atlántico entre otras especies.
- Las larvas del lenguado de California poseen la capacidad para la digestión alcalina de proteínas y lípidos al momento de la primera alimentación.
- La actividad enzimática de la TRY y la LBAL ocurrió en sincronía con la expresión génica de las mismas.
- Es probable que exista un PEP en otros tejidos distintos a los digestivos (piel y músculo) en el lenguado de California.
- Debido a la posible presencia de un pepsinógeno en piel y músculo, no fue posible determinar la expresión ni el momento de primera actividad de las pepsinas digestivas durante el desarrollo larval del lenguado de California .



## Capítulo VI

---

### Recomendaciones

---

- Realizar un análisis para detectar en qué tejidos del lenguado de California ocurre la expresión génica del pepsinógeno.
- Utilizar un sustrato más específico que la hemoglobina, para determinar la actividad de las pepsinas en las larvas del lenguado de California.
- Realizar un análisis alozímico y bioquímico de las pepsinas para determinar si existe una diferencia entre las enzimas que se expresan en la piel, el músculo y el estómago.

## Capítulo VII

---

### Literatura citada

---

Alarcón, L.F.J. 1997. Procesos digestivos en peces marinos: Caracterización y aplicaciones prácticas. Universidad de Almería, España. 292 pp.

Allen, L.G. (1988). Recruitment, distribution and feeding habits of young of the year California halibut (*Paralichthys californicus*) in the vicinity of Alamitos Bay-Long Beach Harbor, California, 1983-1985. Bull Southern California Acad. Sci. 87 (1): 1988. 19-30 pp.

Álvarez-González, C.A., Cervantes-Trujano, M., Tovar-Ramírez, D., Conklin, D.E., Nolasco, H., Gisbert, E. y Piedrahita, R. 2006. Development of digestive enzymes in California halibut *Paralichthys californicus* larvae. Fish Physiol. Biochem. 31: 83-93.

Applebaum, S.L., Pérez, R., Lazo, J.P. y Holt, G.J. 2001. Characterization of chymotrypsin activity during early ontogeny of larval red drum (*Sciaenops ocellatus*). Fish Physiol. Biochem. 25: 291-300.

Brown, N. 2002. Flatfish farming systems in the Atlantic region. Reviews in Fisheries Science, 10 (3E4): 403-419pp.

Carginale, V., Trinchella, F., Capasso, C., Scudiero, R., Riggio, M. y Parisi, E. 2004a. Adaptive evolution and functional divergence of pepsin gene family. Gene, 333: 81-90.

Carginale, V., Trinchella, F., Capasso, C., Scudiero, R. y Parisi, E. 2004b. Gene amplification and cold adaptation of pepsin in Antarctic fish. A possible strategy for food digestion at low temperature. Gene 336: 195-205.

Cervantes-Trujano. 2002. Avances en el cultivo de lenguado de California *Paralichthys californicus* (2002-11-22).

Chen, B.N., Qin, J.G., Kumar, M.S., Hutchinson, W.G. y Clarke, S.M. 2006. Ontogenetic development of digestive enzymes in yellowtail kingfish *Seriola lalandi* larvae. Aquaculture 260: 264-271.

- Conklin D.E., Piedrahita, R.H., Merino, G.E., Muguét, J.B., Bush, D.E., Gisbert, E., Rounds, J. y Cervantes-Trujano, M. 2004. Development of California halibut, *Paralichthys californicus*, culture. J. Appl. Aquacul. 14 (3/4): 143-154.
- Darias, M.J., Murray, H.M. Martínez-Rodríguez, G., Cárdenas, S. y Yúfera, M. 2005. Gene expression of pepsinogen during the larval development of red porgy (*Pagrus pagrus*). Aquaculture 248: 245-252.
- Darias, M.J., Murray, H.M. Gallant, J.W., SOuglas, S.E., Yufera, 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 (1-4): 369-378.
- Douglas, S.E. y Gallant, J.W. 1998. Isolation of cDNAs for trypsinogen from the winter flounder *Pleuronectes americanus*. J. Mar. Biotechnol. 6 (4): 214-219.
- Douglas, S.E., Gawlicka, A., Mandlam S. y Gallant, J.W. 1999. Ontogeny of the stomach in winter flounder: characterization and expression of the pepsinogen and proton pump genes and determination of pepsin activity. J. Fish Biol. 55: 897-915.
- Douglas, S.E, Knickle, L.C., Williams, J., Flight, R. M. y Reith, M.E. 2008. The Atlantic halibut microarray: Application to development studies. J. Fish Biol. 72 (9): 2391-2406.
- FAO, 2006. State of World aquaculture 2006. FAO fisheries technical paper 500. Roma.
- Feng, S., Li, W. y Lin, H., 2008. Characterization and expression of the pepsinogen C gene and determination of pepsin-like enzyme activity from orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*). Comp. Biochem. Physiol., 149 B: 275-284.
- García-Gasca, A., Galaviz, M.A., Gutiérrez y J.N., 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: 366-376.
- García-Ortega, A. y Lazo, J. 2004. Marine fish larviculture in Mexico: Advances and challenges in nutrition and feeding. In: Cruz Suárez, L.E., Ricque Marie, D., Nieto-López, M.G., Villarreal, D., Scholz, V. y González, M. 2004. Avances en Nutrición Acuicola VII. Memorias del VII Simosium Internacional de Nutrición Acuicola. 16-19 Noviembre, 2004. Hermosillo, Sonora, México.

Gawlicka, A., Leggiadro, C.T., Gallant, J.W. y Douglas, S.E. 2001. Cellular expression of the pepsinogen and gastric proton pump genes in the stomach of winter flounder as determined by *in situ* hybridization. *J. Fish Biol.* 58: 529-536.

Gawlicka, A., Parent, B., Horn, M.H., Ross, N., Opstad, I. y Torrissen, O.J., 2000. Activity of digestive enzymes in yolk-sac larvae of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*): indication of readiness for first feeding. *Aquaculture* 184: 303-314.

Gildberg, A., Olsen, R.L., Bjarnason, J.B. 1990. Catalytic properties and chemical composition of pepsin from Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Comp. Biochem. Physiol.* 96B (2):323-330.

Gisbert, E., Piedrahita, R.H. y Conklin, D.E. 2003. Ontogenetic development of the digestive system in California halibut (*Paralichthys californicus*) with notes on feeding practices. *Aquaculture*. 232, 1-4. 455-470.

Hall, B.G. 2004. *Phylogenetic trees made easy: a How-to manual*. Sinauer Associates, Inc. Publishers, 2da. Ed. Sunderland, Massachusetts. USA 221pp.

Howell, B.R. y Yamashita Y.L. (2005). *Aquaculture and stock enhancement*. En: Gibson R.N. (ed). *Flatfishes Biology and Exploitation*. Blackwell Science. Oxford OX4 2DQ. UK. 391 pp.

Jaillon, O., Aury, J.M., Brunet, F., Petit, J.L., Stange-Thomann, N., Mauceli, E., Bouneau, L., Fischer, C., Ozouf-Costaz, C., Bernot, A., Nicaud, S., Jaffe, D., Fisher, S., Lutfalla, G., Dossat, C., Segurens, B., Dasilva, C., Salanoubat, M., Levy, M., Boudet, N., Castellano, S., Anthouard, V., Jubin, C., Castelli, V., Katinka, M., Vacherie, B., Biemont, C., Skalli, Z., Cattolico, L., Poulain, J., De Berardinis, V., Cruaud, C., Duprat, S., Brottier, P., Coutanceau, J.P., Gouzy, J., Parra, G., Lardier, G., Chapple, C., McKernan, K.J., McEwan, P., Bosak, S., Kellis, M., Volff, J.N., Guigo, R., Zody, M.C., Mesirov, J., Lindblad-Toh, K., Birren, B., Nusbaum, C., Kahn, D., Robinson-Rechavi, M., Laudet, V., Schachter, V., Quetier, F., Saurin, W., Scarpelli, C., Wincker, P., Lander, E.S., Weissenbach, J. y Roest Crolius, H. 2004. Genome duplication in the teleost fish *Tetraodon nigroviridis* reveals the early vertebrate proto-karyotype. *Nature* 431 (7011): 946-957.

Kageyama, T. 2002. Pepsinogen, progastricsina, and prochymosins: structure, function, evolution, and development. *CMLS, Cell. Mol. Life. Sci.* 59: 288-306.

Kolkovski, S. y Sakakura Y. 2007. Yellowtail kingfish culture-Opportunities and problems. *World Aquacult.* 38 (3): 44-48.

Kurokawa, T., Uji, S., y Suzuki, T. 2005. Identification of pepsinogen gene in the genome of stomachless fish, *Takifugu rubripes*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 140 B: 133-140.

Kvåle, A., Mangor-Jense, A., Moren, M., Espe, M. y Hamre, K. 2007. Development and characterization of some intestinal enzymes in Atlantic cod (*Hippoglossus hippoglossus*) larvae. *Aquaculture* 264: 457-468.

Lazo J.P. 2000. Conocimiento actual y nuevas perspectivas en el desarrollo de dietas para larvas de peces marinos. In: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Olivera-Novoa, M.A. y Civera-Cerecedo, R., (Eds.). *Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*. 19-22 Noviembre, 2000. Mérida, Yucatan, México.

Lazo J.P. y Barón B. 2005. Desarrollo del cultivo de lenguado de California. 2do. Foro Internacional de Acuicultura. Hermosillo Sonora. Diciembre 2005 1-3.

Lazo, J.P., Mendoza, R., Holt, G.J., Aguilera, C. y Arnold C.R. 2007. Characterization of digestive enzymes during larval development of red drum (*Sciaenops ocellatus*). *Aquaculture* 265 (1-4): 194-205.

Lodish, Berk, Matsudaira, Kaiser, Krieger, Scott, Lipursky y Darnell. 2005. *Molecular Cell Biology*. 5ta Ed. 961 pp.

Montes, M.R.A. 2007. Caracterización de la actividad enzimática de las larvas del jurel cola amarilla del pacífico (*Seriola lalandi dorsalis*). Tesis de Maestría en Ciencias. CICESE. Ensenada. B.C. México. 64 pp.

Moyano-López, F.J. 2006. Bioquímica digestiva en especies acuicultivadas: Aplicaciones en Nutrición. En: Editores: L. Elizabeth Cruz Siárez, Denis Ricque Marie, Mireya Taia Salazar, Martha G. Nieto López, Davido A. Villarreal Cavazos, Ana C. uello Cruz y Armando García Ortega. *Avances en Nutrición Acuícola VIII. VIII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*. 15-17 Noviembre. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, México. ISBN 970-694-333-5.

Muguet, A.J.B. 2004. Ontogeny of proteolytic digestive enzymes and evaluation of weaning performance of California halibut. Thesis of Master of Science. University of California, Davis. EUA. 76 pp.

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: 394-408.

Murray, H.M., Gallant, J.W., Pérez-Casanova, J.C., Johnson, S.C. y Douglas, S.E. 2003. Ontogeny of lipase expression in winter flounder. *J. Fish Biol.* 62: 816-833.

Murray, H.M., Pérez-Casanova, J.C., Gallant, J.W., Johnson, S.C. y Douglas, S.E. 2004. Tripsinogen expression during the development of the exocrine pancreas in winter flounder (*Pleuronectes americanus*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 138 A: 53-59.

Péres, A., Zambonino-Infante, J.L. y Cahu, C. 1998. Dietary regulation of activities and mRNA levels of trypsin and amylase in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Fish Physiol. Biochem.* 19: 145-152.

Pérez-Casanova, J.C. Murray, H.M., Gallant, J.W., Ross, N.W., Douglas, S.E. y Johnson, S.C. 2004. Bile salt-activated lipase expression during larval development in the haddock (*Melanogrammus aeglefinus*). *Aquaculture* 235: 601-617.

Pérez-Casanova, J.C. Murray, H.M., Gallant, J.W., Ross, N.W., Douglas, S.E. y Johnson, S.C. 2006. Development of the digestive capacity in larvae of haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) and Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Aquaculture* 251: 377-401.

Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural Pesca y Alimentación. 2006. Carta Nacional Pesquera. Segunda sección. Diario Oficial. 25 de Agosto de 2006.

Srivastava, A.S., Kurokawa, T. y Suzuki, T. 2002. mRNA expression of pancreatic enzyme precursors and estimation of protein digestibility in first feeding larvae of the Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 132 A: 629-635.

Suzuki, T., Srivastava, A.S. y Kurokawa, T. 2002. cDNA cloning and phylogenetic analysis of pancreatic serine protease from Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 131 B: 63-70.

Taji, M., Yakabe, E., Kubota, K., Kageyama, T., Ichinose, M., Miki, K., Itott y Takahashi, K. 2009. Structural and phylogenetic comparison of three pepsinogens from Pacific bluefin tuna: Molecular evolution of fish pepsinogens. *Com. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 152 (1): 9-19.

Tapia-Salazar, M., Olivera-Novoa, M.A. y Civera-Cerecedo, R. (Eds.). Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias del V SINA. 19-22 Noviembre, 2000. Mérida, Yucatán, Mexico. 12 pp.

Valverde-Chavarría, S.E. 2002. Desarrollo del sistema digestivo de larvas de corvina blanca, *Atractoscion nobilis* (Ayres, 1860) (Sciaenidae), y selección de fuentes proteicas adecuadas para su alimentación. Tesis de Maestría en Ciencias. CICESE. Ensenada B.C. México 90 pp.

Vargas-Carreño. 2005. Evaluación de tres microdietas compuestas para el destete de lenguado de California, *Paralichthys californicus* (Ayers, 1859). Tesis de Licenciatura, Universidad del Mar. Puerto Ángel, Oaxaca, México. 62pp.

Wang, C.S. y Hartsuck, J.A. 1993. Bile salt-activated lipase. A multiple function lipolytic enzyme. *Biochim. et Biophys. Acta*, 1166: 1-19.

Zacarias-Soto, M., Muguet, J.B. y Lazo, J.P., 2006. Proteolytic Activity in California Halibut Larvae (*Paralichthys californicus*). *J. World Aquacul. Soc.* 37 (2): 175-185.

Zacarias-Soto, M., 2007. Histología, histoquímica y actividad enzimática del sistema digestivo de *Paralichthys californicus* durante su ontogenia y evaluación de probióticos como promotores de la maduración del sistema. Tesis de Doctorado. CICESE. Ensenada B.C. México. 158 pp.

Zambonino-Infante, J.L. y Cahu, C.L., 1994. Influence of diet in pepsin and some pancreatic enzymes in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Comp. Biochem. Physiol.*, 109 A.(2): 209-212.

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

Zhou, Q., Fu, X.P., Zhang, L.J., Su, W.J. y Cao, M.J., 2007. Purification and characterization of sea bream (*Sparus latus*Houttuyn) pepsinogen and pepsins. *Food Chem.* 103: 795-801.

---

## Apéndices

---

### Apéndice A

#### Resultado de BLASTN de la secuencia de la TRY 1a

Clave de acceso	Description	<u>Puntos Máx.</u>	Puntaje Total	% cobertura	Valor E	Máx. similitud
<a href="#">AB029751</a>	Paralichthys olivaceus mRNA for trypsinogen 2, partial cds	<a href="#">701</a>	701	100%	0.0	98%
<a href="#">EU007656</a>	Paralichthys olivaceus trypsinogen 2 precursor (TRP2) mRNA, complete cds	<a href="#">695</a>	695	100%	0.0	98%
<a href="#">AB029750</a>	Paralichthys olivaceus mRNA for trypsinogen 1, complete cds	<a href="#">580</a>	580	100%	1e-162	93%
<a href="#">EU412468</a>	TSA: Hippoglossus hippoglossus all_halibut.1442.C1 mRNA sequence	<a href="#">536</a>	536	100%	3e-149	91%
<a href="#">EU007657</a>	Platichthys bicoloratus trypsinogen 2 precursor (TRP2) mRNA, complete cds	<a href="#">520</a>	520	100%	3e-144	90%
<a href="#">BT047303</a>	Salmo salar clone ssal-rgb2-517-082 Trypsin-1 precursor putative mRNA, complete cds	<a href="#">497</a>	497	100%	1e-137	89%
<a href="#">JFJ426120</a>	Epinephelus coioides trypsinogen 1a mRNA, partial cds	<a href="#">492</a>	492	100%	6e-136	89%
<a href="#">AB449357</a>	Oncorhynchus keta mRNA for anionic trypsin isoform 1, partial cds	<a href="#">492</a>	492	100%	6e-136	89%
<a href="#">AB359190</a>	Solea senegalensis TRP1b mRNA for trypsinogen 1b, complete cds	<a href="#">492</a>	492	100%	6e-136	89%
<a href="#">EU688996</a>	Siniperca chuatsi trypsinogen 1 (TRS-A) mRNA, complete cds	<a href="#">486</a>	486	100%	3e-134	88%
<a href="#">AB359189</a>	Solea senegalensis TRP1a mRNA for trypsinogen 1a, complete cds	<a href="#">486</a>	486	100%	3e-134	88%
<a href="#">AF012463</a>	Pleuronectes americanus trypsinogen 2 precursor (TRP2) mRNA, complete cds	<a href="#">486</a>	486	100%	3e-134	88%
<a href="#">AB091439</a>	Oncorhynchus keta mRNA for anionic trypsin, partial cds	<a href="#">486</a>	486	100%	3e-134	88%
<a href="#">BT049396</a>	Salmo salar clone ssal-rgb2-520-316 Trypsin-1 precursor putative mRNA, complete cds	<a href="#">481</a>	481	100%	1e-132	88%
<a href="#">AB449359</a>	Oncorhynchus keta mRNA for anionic trypsin isoform 3, partial cds	<a href="#">481</a>	481	100%	1e-132	88%
<a href="#">AJ344566</a>	Paralabrax maculatofasciatus partial mRNA for trypsin	<a href="#">481</a>	481	100%	1e-132	88%
<a href="#">AJ006882</a>	Dicentrarchus labrax mRNA for trypsin, partial	<a href="#">481</a>	481	100%	1e-132	88%
<a href="#">X70072</a>	Salmo salar partial mRNA for trypsin IB	<a href="#">481</a>	481	100%	1e-132	88%
<a href="#">X70071</a>	Salmo salar mRNA for trypsin IA	<a href="#">481</a>	481	100%	1e-132	88%
<a href="#">X70075</a>	Salmo salar mRNA for trypsin I	<a href="#">481</a>	481	100%	1e-132	88%



<b>Clave de acceso</b>	<b>Description</b>	<b>Puntos Máx.</b>	<b>Puntaje Total</b>	<b>% cobertura</b>	<b>Valor E</b>	<b>Máx. similitud</b>
<a href="#">AB449358</a>	Oncorhynchus keta mRNA for anionic trypsin isoform 2, partial cds	<a href="#">475</a>	475	100%	6e-131	88%
<a href="#">FM995227</a>	Thunnus thynnus partial mRNA for trypsin (trp gene)	<a href="#">473</a>	473	100%	2e-130	88%
<a href="#">U25747</a>	Takifugu rubripes trypsinogen mRNA, partial cds	<a href="#">470</a>	470	100%	3e-129	88%
<a href="#">BT047452</a>	Salmo salar clone ssal-rgb2-651-298 Trypsin-1 precursor putative mRNA, complete cds	<a href="#">464</a>	464	100%	1e-127	87%
<a href="#">AB359191</a>	Solea senegalensis TRP1c mRNA for trypsinogen 1c, complete cds	<a href="#">453</a>	453	100%	3e-124	87%
<a href="#">DQ062459</a>	Dissostichus mawsoni clone 25 trypsinogen precursor (AFGP) mRNA, complete cds	<a href="#">453</a>	453	100%	3e-124	87%
<a href="#">X82223</a>	P.magellanica mRNA for trypsin	<a href="#">453</a>	453	100%	3e-124	87%
<a href="#">EU163287</a>	Sparus aurata trypsinogen mRNA, complete cds	<a href="#">451</a>	451	100%	1e-123	87%
<a href="#">DQ443543</a>	Sparus aurata trypsinogen II precursor (TRPII) mRNA, complete cds	<a href="#">451</a>	451	100%	1e-123	87%
<a href="#">AY550948</a>	Sparus aurata trypsinogen 1-like protein mRNA, complete cds	<a href="#">451</a>	451	100%	1e-123	87%
<a href="#">AY496969</a>	Tautogolabrus adspersus pretrypsinogen mRNA, complete cds	<a href="#">448</a>	448	100%	1e-122	87%
<a href="#">AY550954</a>	Sparus aurata trypsinogen-like protein mRNA, complete cds	<a href="#">435</a>	435	100%	1e-118	86%
<a href="#">DQ849726</a>	Lithognathus mormyrus clone lithmor96 mRNA sequence	<a href="#">414</a>	414	100%	1e-112	85%
<a href="#">DQ000644</a>	Melanogrammus aeglefinus trypsinogen mRNA, partial cds	<a href="#">403</a>	403	100%	3e-109	85%
<a href="#">AB205408</a>	Seriola quinqueradiata mRNA for trypsinogen, complete cds	<a href="#">398</a>	398	100%	1e-107	85%
<a href="#">AB041929</a>	Engraulis japonicus mRNA for trypsinogen, complete cds	<a href="#">379</a>	379	100%	5e-102	84%
<a href="#">FJ665432</a>	Gadus morhua trypsinogen I mRNA, partial cds	<a href="#">370</a>	370	100%	3e-99	83%
<a href="#">U47819</a>	Gadus morhua trypsinogen I mRNA, partial cds	<a href="#">370</a>	370	100%	3e-99	83%
<a href="#">EU688997</a>	Siniperca chuatsi trypsinogen 2 (TRS-B) mRNA, complete cds	<a href="#">364</a>	364	100%	1e-97	83%
<a href="#">AB041930</a>	Engraulis japonicus aTryII mRNA for trypsinogen II, complete cds	<a href="#">363</a>	363	100%	5e-97	83%
<a href="#">X76886</a>	G.morhua mRNA for trypsinogen I	<a href="#">337</a>	337	100%	3e-89	82%
<a href="#">BC055625</a>	Danio rerio zgc:66382, mRNA (cDNA clone MGC:66382 IMAGE:5777109), complete cds	<a href="#">298</a>	298	100%	1e-77	80%
<a href="#">AB359192</a>	Solea senegalensis Tryp2 mRNA for trypsinogen 2, complete cds	<a href="#">158</a>	158	100%	3e-35	75%
<a href="#">X70074</a>	Salmo salar partial mRNA for trypsin III	<a href="#">158</a>	158	100%	3e-35	75%
<a href="#">BT075381</a>	Osmerus mordax clone omor-eva-518-021 Trypsin-3 precursor putative mRNA, complete cds	<a href="#">141</a>	141	100%	3e-30	74%
<a href="#">CR647041</a>	Tetraodon nigroviridis full-length cDNA	<a href="#">135</a>	135	100%	1e-28	74%
<a href="#">CR639363</a>	Tetraodon nigroviridis full-length cDNA	<a href="#">135</a>	135	100%	1e-28	74%

<b>Clave de acceso</b>	<b>Description</b>	<b>Puntos Máx.</b>	<b>Puntaje Total</b>	<b>% cobertura</b>	<b>Valor E</b>	<b>Máx. similitud</b>
<a href="#">CR646532</a>	Tetraodon nigroviridis full-length cDNA	<u>130</u>	130	100%	6e-27	73%
<a href="#">CR734929</a>	Tetraodon nigroviridis full-length cDNA	<u>124</u>	124	100%	3e-25	73%
<a href="#">AY860207</a>	Hippoglossus hippoglossus trypsinogen mRNA, partial cds	<u>632</u>	632	99%	3e-178	95%
<a href="#">X70073</a>	Salmo salar partial mRNA for trypsin II	<u>479</u>	479	99%	5e-132	88%
<a href="#">AY737395</a>	Oreochromis aureus trypsin mRNA, partial cds	<u>363</u>	363	99%	5e-97	83%
<a href="#">EU163288</a>	Diplodus sargus trypsinogen mRNA, complete cds	<u>409</u>	409	99%	6e-111	85%
<a href="#">AY973822</a>	Cebidichthys violaceus trypsin mRNA, partial cds	<u>525</u>	525	99%	6e-146	90%
<a href="#">AB441709</a>	Pleurogrammus azonus mRNA for trypsin, complete cds	<u>497</u>	497	99%	1e-137	89%
<a href="#">AY986479</a>	Xiphister atropurpureus trypsin mRNA, partial cds	<u>497</u>	497	99%	1e-137	89%
<a href="#">BT082757</a>	Anoplopoma fimbria clone afim-evh-528-172 Trypsin-1 precursor putative mRNA, complete cds	<u>475</u>	475	99%	6e-131	88%
<a href="#">CR650772</a>	Tetraodon nigroviridis full-length cDNA	<u>124</u>	124	98%	3e-25	73%
<a href="#">CR645522</a>	Tetraodon nigroviridis full-length cDNA	<u>124</u>	124	98%	3e-25	73%
<a href="#">CR634995</a>	Tetraodon nigroviridis full-length cDNA	<u>124</u>	124	98%	3e-25	73%
<a href="#">CR712292</a>	Tetraodon nigroviridis full-length cDNA	<u>119</u>	119	98%	1e-23	73%
<a href="#">AY737394</a>	Oreochromis niloticus trypsin mRNA, partial cds	<u>368</u>	368	96%	1e-98	84%
<a href="#">AB447372</a>	Salvelinus leucomaenis mRNA for trypsin, partial cds	<u>457</u>	457	95%	2e-125	88%
<a href="#">AB470274</a>	Oncorhynchus masou tryp mRNA for trypsin, partial cds	<u>433</u>	433	94%	4e-118	87%
<a href="#">EU400606</a>	Coregonus clupeaformis anionic trypsin II precursor, mRNA, partial cds	<u>433</u>	433	93%	4e-118	87%
<a href="#">AY862987</a>	Hippoglossus hippoglossus trypsinogen Flou2 gene, partial cds	<u>350</u>	537	92%	4e-93	94%
<a href="#">AY835386</a>	Pagrus pagrus trypsinogen mRNA, partial cds	<u>418</u>	418	84%	1e-113	89%
<a href="#">AY179347</a>	Sphoeroides annulatus trypsin precursor, mRNA, partial cds	<u>364</u>	364	69%	1e-97	90%
<a href="#">DQ400850</a>	Salmo salar trypsin I-like protein gene, partial cds	<u>300</u>	300	64%	4e-78	87%
<a href="#">AY513877</a>	Oreochromis mossambicus trypsinogen mRNA, partial cds	<u>296</u>	296	62%	5e-77	88%
<a href="#">DQ850491</a>	Lithognathus mormyrus clone lithmor861 mRNA sequence	<u>278</u>	278	62%	2e-71	86%
<a href="#">AY909490</a>	Siniperca chuatsi clone C268 trypsinogen mRNA, partial cds	<u>148</u>	148	30%	2e-32	88%
<a href="#">BC086847</a>	Danio rerio zgc:103710, mRNA (cDNA clone IMAGE:7264844)	<u>134</u>	134	27%	4e-28	88%
<a href="#">DQ847635</a>	Cherax quadricarinatus clone cherax_111 mRNA sequence	<u>75.0</u>	75.0	13%	3e-10	92%

## Apéndice B

### Resultado de BLASTN de la secuencia de la TRY 1b

Clave de acceso	Description	<u>Puntaje</u> <u>Máx.</u>	Puntaje Total	% cobertura	Valor E	Máx. similitud
<a href="#">EU007656</a>	Paralichthys olivaceus trypsinogen 2 precursor (TRP2) mRNA, complete cds	<u>701</u>	701	100%	0.0	98%
<a href="#">AB029751</a>	Paralichthys olivaceus mRNA for trypsinogen 2, partial cds	<u>695</u>	695	100%	0.0	98%
<a href="#">AB029750</a>	Paralichthys olivaceus mRNA for trypsinogen 1, complete cds	<u>586</u>	586	100%	3e-164	93%
<a href="#">EU412468</a>	TSA: Hippoglossus hippoglossus all_halibut.1442.C1 mRNA sequence	<u>536</u>	536	100%	3e-149	91%
<a href="#">EU007657</a>	Platichthys bicoloratus trypsinogen 2 precursor (TRP2) mRNA, complete cds	<u>536</u>	536	100%	3e-149	91%
<a href="#">AB359190</a>	Solea senegalensis TRP1b mRNA for trypsinogen 1b, complete cds	<u>508</u>	508	100%	6e-141	89%
<a href="#">BT047303</a>	Salmo salar clone ssal-rgb2-517-082 Trypsin-1 precursor putative mRNA, complete cds	<u>503</u>	503	100%	3e-139	89%
<a href="#">AB359189</a>	Solea senegalensis TRP1a mRNA for trypsinogen 1a, complete cds	<u>503</u>	503	100%	3e-139	89%
<a href="#">FJ426120</a>	Epinephelus coioides trypsinogen 1a mRNA, partial cds	<u>497</u>	497	100%	1e-137	89%
<a href="#">AB449357</a>	Oncorhynchus keta mRNA for anionic trypsin isoform 1, partial cds	<u>497</u>	497	100%	1e-137	89%
<a href="#">AF012463</a>	Pleuronectes americanus trypsinogen 2 precursor (TRP2) mRNA, complete cds	<u>497</u>	497	100%	1e-137	89%
<a href="#">AJ344566</a>	Paralabrax maculatofasciatus partial mRNA for trypsin	<u>497</u>	497	100%	1e-137	89%
<a href="#">EU688996</a>	Siniperca chuatsi trypsinogen 1 (TRS-A) mRNA, complete cds	<u>492</u>	492	100%	6e-136	89%
<a href="#">AB091439</a>	Oncorhynchus keta mRNA for anionic trypsin, partial cds	<u>492</u>	492	100%	6e-136	89%
<a href="#">BT049396</a>	Salmo salar clone ssal-rgb2-520-316 Trypsin-1 precursor putative mRNA, complete cds	<u>486</u>	486	100%	3e-134	88%
<a href="#">AB449359</a>	Oncorhynchus keta mRNA for anionic trypsin isoform 3, partial cds	<u>486</u>	486	100%	3e-134	88%
<a href="#">AJ006882</a>	Dicentrarchus labrax mRNA for trypsin, partial	<u>486</u>	486	100%	3e-134	88%
<a href="#">X70072</a>	Salmo salar partial mRNA for trypsin IB	<u>486</u>	486	100%	3e-134	88%
<a href="#">X70071</a>	Salmo salar mRNA for trypsin IA	<u>486</u>	486	100%	3e-134	88%
<a href="#">X70075</a>	Salmo salar mRNA for trypsin I	<u>486</u>	486	100%	3e-134	88%
<a href="#">FM995227</a>	Thunnus thynnus partial mRNA for trypsin (trp gene)	<u>479</u>	479	100%	5e-132	88%
<a href="#">AB449358</a>	Oncorhynchus keta mRNA for anionic trypsin isoform 2, partial cds	<u>475</u>	475	100%	6e-131	88%
<a href="#">U25747</a>	Takifugu rubripes trypsinogen mRNA, partial cds	<u>475</u>	475	100%	6e-131	88%
<a href="#">BT047452</a>	Salmo salar clone ssal-rgb2-651-298 Trypsin-1 precursor putative mRNA, complete cds	<u>470</u>	470	100%	3e-129	88%
<a href="#">AB359191</a>	Solea senegalensis TRP1c mRNA for	<u>470</u>	470	100%	3e-129	88%

Clave de acceso	Description	<u>Puntaje Máx.</u>	Puntaje Total	% cobertura	Valor E	Máx. similitud
	trypsinogen 1c, complete cds					
<a href="#">AY496969</a>	Tautogolabrus adpersus pretrypsinogen mRNA, complete cds	<u>464</u>	464	100%	1e-127	87%
<a href="#">DQ062459</a>	Dissostichus mawsoni clone 25 trypsinogen precursor (AFGP) mRNA, complete cds	<u>459</u>	459	100%	6e-126	87%
<a href="#">X82223</a>	P.magellanica mRNA for trypsin	<u>459</u>	459	100%	6e-126	87%
<a href="#">EU163287</a>	Sparus aurata trypsinogen mRNA, complete cds	<u>451</u>	451	100%	1e-123	87%
<a href="#">DQ443543</a>	Sparus aurata trypsinogen II precursor (TRPII) mRNA, complete cds	<u>451</u>	451	100%	1e-123	87%
<a href="#">AY550948</a>	Sparus aurata trypsinogen 1-like protein mRNA, complete cds	<u>451</u>	451	100%	1e-123	87%
<a href="#">AY550954</a>	Sparus aurata trypsinogen-like protein mRNA, complete cds	<u>435</u>	435	100%	1e-118	86%
<a href="#">DQ849726</a>	Lithognathus mormyrus clone lithmor96 mRNA sequence	<u>414</u>	414	100%	1e-112	85%
<a href="#">AB205408</a>	Seriola quinqueradiata mRNA for trypsinogen, complete cds	<u>403</u>	403	100%	3e-109	85%
<a href="#">DQ000644</a>	Melanogrammus aeglefinus trypsinogen mRNA, partial cds	<u>403</u>	403	100%	3e-109	85%
<a href="#">AB041929</a>	Engraulis japonicus mRNA for trypsinogen, complete cds	<u>379</u>	379	100%	5e-102	84%
<a href="#">FJ665432</a>	Gadus morhua trypsinogen I mRNA, partial cds	<u>375</u>	375	100%	6e-101	83%
<a href="#">U47819</a>	Gadus morhua trypsinogen I mRNA, partial cds	<u>375</u>	375	100%	6e-101	83%
<a href="#">EU688997</a>	Siniperca chuatsi trypsinogen 2 (TRS-B) mRNA, complete cds	<u>370</u>	370	100%	3e-99	83%
<a href="#">AB041930</a>	Engraulis japonicus aTryII mRNA for trypsinogen II, complete cds	<u>363</u>	363	100%	5e-97	83%
<a href="#">X76886</a>	G.morhua mRNA for trypsinogen I	<u>342</u>	342	100%	7e-91	82%
<a href="#">BC055625</a>	Danio rerio zgc:66382, mRNA (cDNA clone MGC:66382 IMAGE:5777109), complete cds	<u>303</u>	303	100%	3e-79	80%
<a href="#">X70074</a>	Salmo salar partial mRNA for trypsin III	<u>169</u>	169	100%	1e-38	75%
<a href="#">AB359192</a>	Solea senegalensis Tryp2 mRNA for trypsinogen 2, complete cds	<u>158</u>	158	100%	3e-35	75%
<a href="#">BT075381</a>	Osmerus mordax clone omor-eva-518-021 Trypsin-3 precursor putative mRNA, complete cds	<u>141</u>	141	100%	3e-30	74%
<a href="#">CR647041</a>	Tetraodon nigroviridis full-length cDNA	<u>141</u>	141	100%	3e-30	74%
<a href="#">CR639363</a>	Tetraodon nigroviridis full-length cDNA	<u>141</u>	141	100%	3e-30	74%
<a href="#">CR646532</a>	Tetraodon nigroviridis full-length cDNA	<u>135</u>	135	100%	1e-28	74%
<a href="#">CR734929</a>	Tetraodon nigroviridis full-length cDNA	<u>130</u>	130	100%	6e-27	73%
<a href="#">AY860207</a>	Hippoglossus hippoglossus trypsinogen mRNA, partial cds	<u>638</u>	638	99%	7e-180	95%
<a href="#">X70073</a>	Salmo salar partial mRNA for trypsin II	<u>484</u>	484	99%	1e-133	88%
<a href="#">AY737395</a>	Oreochromis aureus trypsin mRNA, partial cds	<u>363</u>	363	99%	5e-97	83%
<a href="#">EU163288</a>	Diplodus sargus trypsinogen mRNA, complete cds	<u>409</u>	409	99%	6e-111	85%
<a href="#">AY973822</a>	Cebidichthys violaceus trypsin mRNA, partial cds	<u>542</u>	542	99%	6e-151	91%

<b>Clave de acceso</b>	<b>Description</b>	<b><u>Puntaje</u> <u>Máx.</u></b>	<b>Puntaje Total</b>	<b>% cobertura</b>	<b>Valor E</b>	<b>Máx. similitud</b>
<a href="#"><u>AB441709</u></a>	Pleurogrammus azonus mRNA for trypsin, complete cds	<u>503</u>	503	99%	3e-139	89%
<a href="#"><u>AY986479</u></a>	Xiphister atropurpureus trypsin mRNA, partial cds	<u>503</u>	503	99%	3e-139	89%
<a href="#"><u>BT082757</u></a>	Anoplopoma fimbria clone afim-evh-528-172 Trypsin-1 precursor putative mRNA, complete cds	<u>492</u>	492	99%	6e-136	89%
<a href="#"><u>CR650772</u></a>	Tetraodon nigroviridis full-length cDNA	<u>130</u>	130	98%	6e-27	73%
<a href="#"><u>CR645522</u></a>	Tetraodon nigroviridis full-length cDNA	<u>130</u>	130	98%	6e-27	73%
<a href="#"><u>CR634995</u></a>	Tetraodon nigroviridis full-length cDNA	<u>130</u>	130	98%	6e-27	73%
<a href="#"><u>CR712292</u></a>	Tetraodon nigroviridis full-length cDNA	<u>124</u>	124	98%	3e-25	73%
<a href="#"><u>AY737394</u></a>	Oreochromis niloticus trypsin mRNA, partial cds	<u>368</u>	368	96%	1e-98	84%
<a href="#"><u>AB447372</u></a>	Salvelinus leucomaenis mRNA for trypsin, partial cds	<u>462</u>	462	95%	5e-127	88%
<a href="#"><u>AB470274</u></a>	Oncorhynchus masou tryp mRNA for trypsin, partial cds	<u>433</u>	433	94%	4e-118	87%
<a href="#"><u>AY862987</u></a>	Hippoglossus hippoglossus trypsinogen Flou2 gene, partial cds	<u>344</u>	534	93%	2e-91	93%
<a href="#"><u>EU400606</u></a>	Coregonus clupeaformis anionic trypsin II precursor, mRNA, partial cds	<u>438</u>	438	93%	8e-120	88%
<a href="#"><u>AY835386</u></a>	Pagrus pagrus trypsinsinogen mRNA, partial cds	<u>418</u>	418	84%	1e-113	89%
<a href="#"><u>AY179347</u></a>	Sphoeroides annulatus trypsin precursor, mRNA, partial cds	<u>370</u>	370	69%	3e-99	91%
<a href="#"><u>DQ400850</u></a>	Salmo salar trypsin I-like protein gene, partial cds	<u>300</u>	300	64%	4e-78	87%
<a href="#"><u>AY513877</u></a>	Oreochromis mossambicus trypsinogen mRNA, partial cds	<u>296</u>	296	62%	5e-77	88%
<a href="#"><u>DQ850491</u></a>	Lithognathus mormyrus clone lithmor861 mRNA sequence	<u>278</u>	278	62%	2e-71	86%
<a href="#"><u>AY909490</u></a>	Siniperca chuatsi clone C268 trypsinogen mRNA, partial cds	<u>148</u>	148	30%	2e-32	88%
<a href="#"><u>BC086847</u></a>	Danio rerio zgc:103710, mRNA (cDNA clone IMAGE:7264844)	<u>134</u>	134	27%	4e-28	88%
<a href="#"><u>DQ847635</u></a>	Cherax quadricarinatus clone cherax_111 mRNA sequence	<u>75.0</u>	75.0	13%	3e-10	92%

## Apéndice C

### Resultado de BLASTN de la secuencia de la PEP 1a

Clave de acceso	Descripción	Puntaje Máx.	Puntaje total	% Cobertura	Valor E	Máxima similitud
EU413439	TSA: Hippoglossus hippoglossus all_halibut.2378.C1 mRNA sequence	<u>603</u>	603	100%	3e-169	95%
<u>AY860205</u>	Hippoglossus hippoglossus pepsinogen A2 precursor, mRNA, partial cds	<u>603</u>	603	100%	3e-169	95%
<u>AY860204</u>	Hippoglossus hippoglossus pepsinogen A1 precursor, mRNA, partial cds	<u>597</u>	597	100%	1e-167	95%
<u>AF156788</u>	Pleuronectes americanus pepsinogen A form IIb precursor (pep2b) mRNA, complete cds	<u>597</u>	597	100%	1e-167	95%
<u>AB120129</u>	Paralichthys olivaceus pep mRNA for pepsinogen, complete cds	<u>645</u>	645	99%	0.0	98%
<u>AB440201</u>	Thunnus orientalis PGA mRNA for pepsinogen 2, complete cds	<u>473</u>	473	99%	2e-130	89%
<u>EU807927</u>	Siniperca scherzeri pepsinogen A2 precursor, mRNA, complete cds	<u>503</u>	503	99%	3e-139	91%
<u>AF156791</u>	Pleuronectes americanus pepsinogen A form IIb precursor (pep2b) gene, partial cds	<u>246</u>	601	98%	5e-62	97%
<u>EU163284</u>	Sparus aurata pepsinogen mRNA, complete cds	<u>505</u>	505	96%	7e-140	92%
<u>DQ001975</u>	Gadus morhua pepsinogen A mRNA, partial cds	<u>315</u>	315	95%	1e-82	82%
<u>AJ550950</u>	Trematomus bernacchii partial mRNA for pepsin A2	<u>496</u>	496	95%	4e-137	91%
<u>AJ550949</u>	Trematomus bernacchii mRNA for pepsin A1	<u>484</u>	484	95%	1e-133	91%
<u>EU259063</u>	Epinephelus coioides pepsinogen A1 mRNA, complete cds	<u>451</u>	451	95%	1e-123	89%
<u>AY513876</u>	Oreochromis mossambicus pepsinogen mRNA, partial cds	<u>444</u>	444	95%	2e-121	89%
<u>DQ073424</u>	Pagrus pagrus pepsinogen mRNA, partial cds	<u>470</u>	470	89%	3e-129	92%
<u>FJ438489</u>	Epinephelus coioides pepsinogen mRNA, partial cds	<u>366</u>	366	79%	4e-98	89%
<u>DQ000645</u>	Melanogrammus aeglefinus pepsinogen A mRNA, partial cds	<u>285</u>	285	78%	1e-73	84%
<u>EU259065</u>	Epinephelus coioides pepsinogen A1 gene, complete cds	<u>191</u>	334	68%	2e-45	90%
<u>XM_002193673</u>	PREDICTED: Taeniopygia guttata pepsinogen (LOC100225946), mRNA	<u>54.7</u>	54.7	7%	3e-04	100%

## Apéndice D

### Resultado de BLASTN de la secuencia de la PEP 1b

Clave de acceso	Descripción	Puntaje máximo	Puntaje total	% Cobertura	Valor E	Máxima similitud
<a href="#">AY860205</a>	Hippoglossus hippoglossus pepsinogen A2 precursor, mRNA, partial cds	<a href="#">377</a>	377	100%	1e-101	96%
<a href="#">EU413439</a>	TSA: Hippoglossus hippoglossus all_halibut.2378.C1 mRNA sequence	<a href="#">372</a>	372	100%	5e-100	95%
<a href="#">AB440201</a>	Thunnus orientalis PGA mRNA for pepsinogen 2, complete cds	<a href="#">261</a>	261	100%	1e-66	87%
<a href="#">AB120129</a>	Paralichthys olivaceus pep mRNA for pepsinogen, complete cds	<a href="#">375</a>	375	99%	4e-101	96%
<a href="#">AY860204</a>	Hippoglossus hippoglossus pepsinogen A1 precursor, mRNA, partial cds	<a href="#">353</a>	353	99%	2e-94	94%
<a href="#">AF156788</a>	Pleuronectes americanus pepsinogen A form IIb precursor (pep2b) mRNA, complete cds	<a href="#">353</a>	353	99%	2e-94	94%
<a href="#">AF156791</a>	Pleuronectes americanus pepsinogen A form IIb precursor (pep2b) gene, partial cds	<a href="#">191</a>	358	98%	1e-45	97%
<a href="#">FJ438489</a>	Epinephelus coioides pepsinogen mRNA, partial cds	<a href="#">248</a>	248	94%	8e-63	87%
<a href="#">EU259063</a>	Epinephelus coioides pepsinogen A1 mRNA, complete cds	<a href="#">248</a>	248	94%	8e-63	87%
<a href="#">AY513876</a>	Oreochromis mossambicus pepsinogen mRNA, partial cds	<a href="#">272</a>	272	93%	5e-70	89%
<a href="#">DQ001975</a>	Gadus morhua pepsinogen A mRNA, partial cds	<a href="#">196</a>	196	75%	3e-47	87%
<a href="#">DQ000645</a>	Melanogrammus aeglefinus pepsinogen A mRNA, partial cds	<a href="#">176</a>	176	67%	4e-41	87%
<a href="#">EU259065</a>	Epinephelus coioides pepsinogen A1 gene, complete cds	<a href="#">132</a>	132	46%	8e-28	88%
XM_002193673	PREDICTED: Taeniopygia guttata pepsinogen (LOC100225946), mRNA	<a href="#">54.7</a>	54.7	12%	2e-04	100%

## Apéndice E

### Resultado de BLASTN de la secuencia de la PEP 1c

Clave de acceso	Descripción	Puntaje máx.	Puntaje total	% cobertura	Valor E	Máxima similitud
<a href="#">AF156791</a>	Pleuronectes americanus pepsinogen A form IIb precursor (pep2b) gene, partial cds	<u>444</u>	444	97%	1e-121	92%
<a href="#">EU413439</a>	TSA: Hippoglossus hippoglossus all_halibut.2378.C1 mRNA sequence	<u>204</u>	325	61%	3e-49	99%
<a href="#">AY860205</a>	Hippoglossus hippoglossus pepsinogen A2 precursor, mRNA, partial cds	<u>198</u>	336	61%	1e-47	98%
<a href="#">AY860204</a>	Hippoglossus hippoglossus pepsinogen A1 precursor, mRNA, partial cds	<u>191</u>	312	61%	2e-45	97%
<a href="#">AF156788</a>	Pleuronectes americanus pepsinogen A form IIb precursor (pep2b) mRNA, complete cds	<u>191</u>	312	61%	2e-45	97%
<a href="#">AB120129</a>	Paralichthys olivaceus pep mRNA for pepsinogen, complete cds	<u>191</u>	340	61%	2e-45	97%
<a href="#">AB440201</a>	Thunnus orientalis PGA mRNA for pepsinogen 2, complete cds	<u>154</u>	154	34%	3e-34	91%
<a href="#">AY513876</a>	Oreochromis mossambicus pepsinogen mRNA, partial cds	<u>148</u>	148	34%	1e-32	90%
<a href="#">EU259065</a>	Epinephelus coioides pepsinogen A1 gene, complete cds	<u>115</u>	115	24%	1e-22	92%
<a href="#">FJ438489</a>	Epinephelus coioides pepsinogen mRNA, partial cds	<u>108</u>	108	21%	2e-20	94%
<a href="#">EU259063</a>	Epinephelus coioides pepsinogen A1 mRNA, complete cds	<u>108</u>	108	21%	2e-20	94%
<a href="#">XM_002193673</a>	PREDICTED: Taeniopygia guttata pepsinogen (LOC100225946), mRNA	<u>54.7</u>	54.7	8%	3e-04	100%



## Apéndice F

### Resultado de BLASTN de la secuencia de la LBAL 1a

Clave de acceso	Descripción	Puntaje máximo	Puntaje total	% Cobertura	Valor E	Máxima similitud
<a href="#">EU412430</a>	TSA: Hippoglossus hippoglossus all_halibut.1401.C1 mRNA sequence	<a href="#">832</a>	832	100%	0.0	94%
<a href="#">AY860206</a>	Hippoglossus hippoglossus bile salt-activated lipase mRNA, partial cds	<a href="#">832</a>	832	100%	0.0	94%
<a href="#">AF512561</a>	Pseudopleuronectes americanus bile salt-activated lipase (BAL) mRNA, partial cds	<a href="#">806</a>	806	100%	0.0	93%
<a href="#">CR654166</a>	Tetraodon nigroviridis full-length cDNA	<a href="#">431</a>	431	92%	2e-117	82%
<a href="#">CR636442</a>	Tetraodon nigroviridis full-length cDNA	<a href="#">429</a>	429	92%	7e-117	82%
<a href="#">CR672454</a>	Tetraodon nigroviridis full-length cDNA	<a href="#">427</a>	427	92%	2e-116	82%
<a href="#">CR647259</a>	Tetraodon nigroviridis full-length cDNA	<a href="#">425</a>	425	92%	9e-116	82%
<a href="#">CR640819</a>	Tetraodon nigroviridis full-length cDNA	<a href="#">425</a>	425	92%	9e-116	82%
<a href="#">CR675974</a>	Tetraodon nigroviridis full-length cDNA	<a href="#">424</a>	424	92%	3e-115	82%
<a href="#">CR635399</a>	Tetraodon nigroviridis full-length cDNA	<a href="#">424</a>	424	92%	3e-115	82%
<a href="#">CR648789</a>	Tetraodon nigroviridis full-length cDNA	<a href="#">424</a>	424	92%	3e-115	82%
<a href="#">CR725811</a>	Tetraodon nigroviridis full-length cDNA	<a href="#">422</a>	422	92%	1e-114	82%
<a href="#">CR649489</a>	Tetraodon nigroviridis full-length cDNA	<a href="#">420</a>	420	92%	4e-114	82%
<a href="#">CR645885</a>	Tetraodon nigroviridis full-length cDNA	<a href="#">420</a>	420	92%	4e-114	82%
<a href="#">CR644767</a>	Tetraodon nigroviridis full-length cDNA	<a href="#">418</a>	418	92%	1e-113	82%
<a href="#">CR634116</a>	Tetraodon nigroviridis full-length cDNA	<a href="#">418</a>	418	92%	1e-113	82%
<a href="#">EU647691</a>	Dicentrarchus labrax bile-salt activated lipase (bal) mRNA, partial cds	<a href="#">520</a>	520	85%	4e-144	87%
<a href="#">CR633847</a>	Tetraodon nigroviridis full-length cDNA	<a href="#">357</a>	357	81%	3e-95	81%
<a href="#">CR640375</a>	Tetraodon nigroviridis full-length cDNA	<a href="#">326</a>	326	74%	9e-86	81%
<a href="#">CR652507</a>	Tetraodon nigroviridis full-length cDNA	<a href="#">322</a>	322	74%	1e-84	81%
<a href="#">CR642241</a>	Tetraodon nigroviridis full-length cDNA	<a href="#">292</a>	292	63%	9e-76	82%

## Apéndice G

### Resultado de BLASTN de la secuencia de la LBAL 1b

Clave de acceso	Descripción	Puntaje máximo	Puntaje total	% cobertura	Valor E	Máxima similitud
<a href="#">EU412430</a>	TSA: Hippoglossus hippoglossus all_halibut.1401.C1 mRNA sequence	<u>833</u>	833	100%	0.0	94%
<a href="#">AY860206</a>	Hippoglossus hippoglossus bile salt-activated lipase mRNA, partial cds	<u>833</u>	833	100%	0.0	94%
<a href="#">AF512561</a>	Pseudopleuronectes americanus bile salt-activated lipase (BAL) mRNA, partial cds	<u>819</u>	819	100%	0.0	94%
<a href="#">EU647691</a>	Dicentrarchus labrax bile-salt activated lipase (bal) mRNA, partial cds	<u>520</u>	520	85%	4e-144	87%