

**Centro de Investigación Científica y de Educación  
Superior de Ensenada, Baja California**



---

**Programa de Posgrado en Ciencias  
en Acuicultura**

---

**Ontogenia del sistema digestivo y caracterización de la  
actividad enzimática de las larvas de chita *Anisotremus  
scapularis* (Tschudi, 1846)**

Tesis

para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de  
Maestro en Ciencias

Presenta:

**Noemí Jackelith Cota Mamani**

Ensenada, Baja California, México  
2016

Tesis defendida por

**Noemí Jackelith Cota Mamani**

y aprobada por el siguiente Comité

---

**Dr. Juan Pablo Lazo Corvera**  
Codirector de tesis

---

**Dr. Benjamín Barón Sevilla**  
Codirector de tesis

**Dra. Fabiola Lafarga De la Cruz**

**Dr. Roger Sean Cudney Bueno**



---

**Dr. Benjamín Barón Sevilla**  
Coordinador del Posgrado en Acuicultura

---

**Dra. Rufina Hernández Martínez**  
Directora de Estudios de Posgrado

*Noemí Jackelith Cota Mamani © 2016*

*Queda prohibida la reproducción parcial o total de esta obra sin el permiso formal y explícito del autor y directores de tesis*

Resumen de la tesis que presenta **Noemí Jackelith Cota Mamani** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Acuicultura.

**Ontogenia del sistema digestivo y caracterización de la actividad enzimática de las larvas de chita *Anisotremus scapularis* (Tschudi, 1846)**

Resumen aprobado por:

---

Dr. Juan Pablo Lazo Corvera  
Codirector de tesis

---

Dr. Benjamín Barón Sevilla  
Codirector de tesis

La chita *Anisotremus scapularis* es un pez marino que habita las costas de Perú, es muy valorado para el consumo humano directo, y, es considerada una especie con potencial acuícola. El cultivo larval en muchas especies de peces marinos se considera como uno de los cuellos de botella para el desarrollo de la tecnología de cultivo a escala comercial, este es el caso de la chita. Como primer alimento y durante los primeros días de vida de las larvas se les suministra presas vivas, y posteriormente, cuando poseen un sistema digestivo más desarrollado, se les suministra alimento balanceado. Sin embargo, los alimentos vivos más empleados no satisfacen los requerimientos nutricionales de las larvas convirtiéndose en un punto crítico. Es por ello, que en los últimos años diversas investigaciones han concentrado sus esfuerzos en la sustitución del alimento vivo por alimento balanceado; no obstante, esto exige un buen conocimiento de la organización y funcionalidad del sistema digestivo. En este sentido, en el presente trabajo se investigan algunos aspectos de la fisiología nutricional de las larvas de chita durante los primeros 30 días de vida. Las larvas fueron cultivadas a partir de huevos obtenidos de desoves naturales de un lote de reproductores mantenidos en cautiverio en el Laboratorio de Cultivo de Peces del Instituto del Mar del Perú (IMARPE). El estudio del crecimiento en longitud, los análisis histológicos y la caracterización enzimática se realizaron a partir de muestras de larvas colectadas a los 0, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 14, 18, 22, 26 y 30 días después de la eclosión (DDE). Para los análisis histológicos, las larvas fueron sometidas a un proceso de deshidratación e inclusión en parafina, y teñidos utilizando la técnica de hematoxilina-eosina. La cuantificación de las enzimas digestivas de la chita, proteasas totales (ácidas y alcalinas), tripsina, leucina aminopeptidasa, lipasas dependientes de sales biliares y alfa-amilasa se llevó a cabo con técnicas espectrofotométricas. Al momento de la eclosión, las larvas poseen un tubo digestivo recto e histológicamente indiferenciado ubicado dorsalmente con respecto al saco vitelino, que se caracteriza por poseer una gota de aceite. Entre los 2 y 4 DDE, se observaron los mayores cambios en el desarrollo del sistema digestivo, entre los más importantes están la diferenciación de la bucofaringe, esófago e intestino, plegamiento de la mucosa intestinal, la formación de las microvellosidades en los enterocitos y el desarrollo de sus glándulas anexas, hígado y páncreas, los cuales permitieron la ingestión, digestión y absorción de los primeros alimentos exógenos ingeridos por las larvas. El mayor cambio que se observó en días posteriores fue la observación de un estómago en desarrollo, con la diferenciación de las glándulas gástricas (26 DDE). Las enzimas digestivas analizadas, fueron detectadas desde el momento de la eclosión de las larvas, antes de la apertura de la boca, y se incrementaron con la edad de los organismos. En general, se observó incrementos en

la actividad total de las enzimas digestivas a partir de los 8 y 10 DDE o a los 4 mm de longitud total (LT), particularmente con aumentos más marcados en la actividad de las lipasas y de la leucina aminopeptidasa. Para la actividad de proteasas alcalinas totales, tripsina y alfa-amilasa, los aumentos fueron evidentes a partir de los 22 DDE o entre 6 y 7 mm de LT. La actividad de las proteasas ácidas se evidenció e incrementó a partir del 26 DDE o a los 9 mm de LT. En cuanto los patrones de actividad específica, en general, se observaron incrementos súbitos de la actividad que se relacionan con los periodos de transición de la alimentación endógena a exógena (3-6 DDE), y con el cambio de alimentación de rotíferos a metanauplios de *Artemia* (26 DDE). También, exceptuando la actividad de la leucina aminopeptidasa, se observaron estos incrementos súbitos antes de la primera alimentación. Con base al análisis histológico y bioquímico de las larvas de chita, se recomienda iniciar el destete a los 26 DDE.

**Palabras clave:** *Anisotremus scapularis*, larvas, sistema digestivo, enzimas digestivas, destete.

Abstract of the thesis presented by **Noemí Jackelith Cota Mamani** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Aquaculture.

**Ontogeny of the digestive system and characterization of the enzyme activity in peruvian grunt *Anisotremus scapularis* (Tschudi, 1846) larvae**

Abstract approved by:

---

Dr. Juan Pablo Lazo Corvera  
Co-Director Thesis

---

Dr. Benjamín Barón Sevilla  
Co-Director Thesis

Peruvian grunt *Anisotremus scapularis* is a marine fish that inhabits the coasts of Peru, highly valued for direct human consumption, and considered a species with high aquaculture potential. Successful larval culture of many marine fish species is considered one of the main bottlenecks for the development of culture technology on a commercial scale; this is the case of the peruvian grunt. Under culture conditions, larvae are fed with live prey during the first days of life. Eventually, when larvae have a more developed digestive system, they are weaned to formulated microdiets. However, the commonly used live food does not meet the nutritional requirements of the larvae, production is unreliable and is expensive to produce which makes it a critical point for successful culture. In recent years research has concentrated its efforts on developing adequate protocols for live food replacement with formulated microdiets; however, this requires a good knowledge of the organization and function of the digestive system. Thus, the aim of this study was to characterize the development of the digestive system in the peruvian grunt larvae during the first 30 days of life. Larvae were grown from eggs obtained from natural spawning of broodstock kept in captivity at the Laboratory of Fish Culture of Institute del Mar del Peru (IMARPE). Growth in terms of total length (TL) and weight, histological analyses and digestive enzyme activity were performed on samples of larvae collected on 0, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 14, 18, 22, 26 and 30 days after hatching (DAH). For histological analysis, larvae were subjected to a dehydration process, embedded paraffin and stained using hematoxylin-eosin. Quantification of digestive enzymes activity in peruvian grunt larvae; total acid and alkaline proteases, trypsin, leucine aminopeptidase, lipase and alpha-amylase were performed with spectrophotometric techniques. Upon hatching, the larvae have a straight and histologically undifferentiated gut located dorsally to the yolk sac, which is characterized by one oil drop. Between 2 and 4 DPH, the greatest changes were observed in terms of the development of the digestive system. Among the most important were the differentiation of the buccopharynx, oesophagus and intestine, the folding of the intestinal mucosa, the development of microvilli on enterocytes and development of accessory glands, liver and pancreas, which allowed the ingestion, digestion and absorption of the first exogenous food ingested by the larvae. Thereafter, the next important change was observed with the development of a functional stomach, with differentiation of the gastric glands (26 DPH). Digestive enzymes evaluated were detected from hatching, before the opening of the mouth, and increased with age. In general, total activity of the digestive enzymes increased around 8 and 10 DPH or 4 mm TL, in particular in the activity of lipases and leucine aminopeptidase. Total activity of alkaline proteases; trypsin and alpha-amylase, significantly increased at 22 DPH or

between 6 and 7 mm TL. Acid protease activity was evident until 26 DPH or 9 mm TL and increased thereafter. In general, specific activity of the digestive enzymes was high during the periods of transition from endogenous to exogenous feeding (3-6 DPH), and in the change from rotifers to *Artemia* (26 DDE). In addition, except for the leucine aminopeptidase activity, this high activity was observed before first feeding. Based on histological and biochemical analysis of the peruvian grunt larvae, it is recommended to start weaning around day 26 DPH.

**Keywords:** *Anisotremus scapularis*, larvae, digestive system, digestive enzymes, weaning.

## Dedicatoria

*A mis papás, Willy Cota y Gladys Mamani, por siempre confiar en mí y apoyarme y alentarme a cumplir las metas que emprendo. En este tiempo lejos de ustedes los he aprendido a valorar más y no tengo más que agradecerles por todas las cosas que me han inculcado, las cuales me han servido para llegar a este momento de mi desarrollo profesional y personal.*

*A mi prometido, Edgar Argumedo, por ser mi mejor amigo, mi colega, mi profesor, mi confidente, por haber cuidado a las personas que amo y por luchar conmigo para que esta relación siga funcionando a pesar de la distancia.*

*Y a toda mi linda familia y a mis grandes amigos, por tenerme en sus pensamientos y desearme lo mejor mientras estuve lejos de mi querido país, Perú.*

## Agradecimientos

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California (CICESE) por brindarme la oportunidad de estudiar en su programa de maestría, Ciencias en Acuicultura.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por brindarme el apoyo financiero para cursar mis estudios de posgrado.

A mis asesores, Dr. Benjamín Barón y Dr. Juan Pablo Lazo, por su apoyo tanto en lo profesional como en lo personal, gracias por todas sus valiosas enseñanzas y el aliento para seguir adelante en mi desarrollo profesional.

A los miembros de mi comité, Dra. Fabiola Lafarga y Dr. Roger Cudney, por la revisión y aportes en el desarrollo de este trabajo.

Al Instituto del Mar del Perú (IMARPE), por brindar las muestras de larvas de chita para la realización de este trabajo. Un agradecimiento especial a Lili Carrera, directora de la Dirección de Investigaciones en Acuicultura, por permitirme seguir aportando en el desarrollo del cultivo de esta especie y sobre todo por su amistad, consejos y apoyo por tantos años y en etapas importantes de mi desarrollo profesional, desde mis prácticas pre-profesionales hasta ahora mi tesis de maestría.

A los integrantes del Laboratorio de Cultivo de Peces, Melissa Montes, Angélica Castro y Joel Linares, por la colecta de las muestras y brindarme todos los datos necesarios para que pueda realizar de la mejor manera este trabajo. A los integrantes del Laboratorio de Alimento Vivo, Gheraldine Ynga y Wilmer Gaspar, por apoyarme con consultas sobre la alimentación de las larvas. A todos ustedes muchas gracias por su colaboración y por su gran amistad.

A los doctores del departamento de acuicultura, Dra. Beatriz Cordero, Dra. Mónica Hernández, Dra. Pilar Sánchez, Dr. Miguel Ángel del Río, Dra. Fabiola Lafarga, Dr. Eugenio Díaz, Dra. Carmen Paniagua, Dr. Manuel Segovia, por el apoyo brindado en el préstamo de equipos, por sus enseñanzas en los diferentes cursos del posgrado y por toda la hospitalidad que me mostraron durante mi estadía.

A la M. en C. Yanet Guerrero, técnico del Laboratorio de Biología y Patología de Organismos Acuáticos del CICESE, por el entrenamiento técnico en la inclusión y tinción de las láminas histológicas, así como también por su apoyo en el procesado y elaboración de las mismas.

A Uvinai Salgado, técnico del Laboratorio de Cultivo de Peces, por sus enseñanzas sobre el cultivo de alimento vivo; y, al M. en C. Abelardo Campos, por su apoyo en los análisis espectrofotométricos en el lector de placas.

A los integrantes del Laboratorio de Alimentación y Nutrición de Organismos Marinos, Denisse Chávez, Sara Enciso, Pablo Fuentes y Jorge Madrid por sus consejos en los análisis enzimáticos, manejo de equipos y sobre todo por su amistad.

A mis compañeros de generación Laura, Omar, Jonathan, Ana, Lili, Sergio, Lalo, Erick, Bety, Enrique, Gabo, Benito, Josue, César, Juan, por compartir sus conocimientos y momentos de alegría en clase, y, por brindarme toda su hospitalidad.

A mis grandes amigos Laura Rangel, Omar García y Jonathan Pinto, por brindarme su amistad y compañía, por enseñarme las costumbres y cultura de su lindo país, por preocuparse por mí en mis momentos de nostalgia y sobre todo por no dejarme sola y hacerme sentir como en casa. Les estaré eternamente agradecida y los espero con los brazos abiertos en mi país.

A México, por haberme abierto las puertas y permitir seguir desarrollándome profesionalmente. Muchas gracias a todos.

## Tabla de contenido

	Página
<b>Resumen en español</b> .....	ii
<b>Resumen en inglés</b> .....	iv
<b>Dedicatoria</b> .....	vi
<b>Agradecimientos</b> .....	vii
<b>Lista de figuras</b> .....	xi
<b>Lista de tablas</b> .....	xv
<b>Capítulo 1. Introducción</b>	
1.1 Antecedentes.....	3
1.1.1 <i>Anisotremus scapularis</i> “chita”.....	3
1.1.2 Cultivo larval en peces marinos.....	6
1.1.3 Limitaciones del alimento vivo y balanceado.....	7
1.1.4 El sistema digestivo de las larvas.....	9
1.1.5 Análisis histológico del sistema digestivo en larvas.....	11
1.1.6 Enzimas digestivas en larvas.....	13
1.2 Justificación.....	17
1.3 Hipótesis.....	17
1.4 Objetivos.....	18
1.4.1 Objetivo general.....	18
1.4.2 Objetivos específicos.....	18
<b>Capítulo 2. Materiales y métodos</b>	
2.1 Sistema de cultivo.....	19
2.2 Protocolo de alimentación.....	19
2.3 Muestreo de larvas.....	20
2.4 Crecimiento larvario.....	21
2.5 Análisis histológico.....	21
2.6 Actividad enzimática.....	22
2.7 Análisis estadístico.....	26
<b>Capítulo 3. Resultados</b>	
3.1 Crecimiento larvario.....	27
3.2 Análisis histológico.....	28
3.2.1 Bucofaringe.....	36
3.2.2 Esófago.....	38
3.2.3 Estómago.....	38
3.2.4 Intestino.....	40
3.2.4.1 Inclusiones lipídicas.....	41
3.2.4.2 Vacuolas supranucleares.....	41

3.2.5 Glándulas anexas.....	43
3.2.5.1 Páncreas.....	44
3.2.5.2 Hígado.....	44
3.3 Actividad enzimática.....	47
3.3.1 Proteasas.....	47
3.3.1.1 Proteasas alcalinas totales.....	47
3.3.1.2 Tripsina.....	49
3.3.1.3 Leucina aminopeptidasa.....	51
3.3.1.4 Proteasas ácidas totales.....	51
3.3.2 Lipasas dependientes de sales biliares.....	54
3.3.3 Alfa-amilasa.....	56
<b>Capítulo 4. Discusión</b>	
4.1 Análisis histológico.....	58
4.1.1 Sistema digestivo.....	58
4.1.2 Bucofaringe.....	60
4.1.3 Esófago.....	60
4.1.4 Estómago.....	62
4.1.5 Intestino.....	63
4.1.6 Glándulas anexas.....	66
4.1.6.1 Páncreas.....	67
4.1.6.2 Hígado.....	68
4.2 Actividad enzimática.....	69
4.2.1 Proteasas.....	71
4.2.1.1 Proteasas alcalinas totales.....	71
4.2.1.2 Tripsina.....	72
4.2.1.3 Leucina aminopeptidasa.....	74
4.2.1.4 Proteasas ácidas totales.....	75
4.2.2 Lipasas dependientes de sales biliares.....	76
4.2.3 Alfa-amilasa.....	77
4.3 Sugerencias para el destete.....	78
<b>Capítulo 5. Conclusiones.....</b>	<b>80</b>
<b>Capítulo 6. Recomendaciones.....</b>	<b>82</b>
<b>Lista de referencias bibliográficas.....</b>	<b>83</b>
<b>Apéndices.....</b>	<b>95</b>

## Lista de figuras

Figura		Página
1	Chita <i>Anisotremus scapularis</i> .....	4
2	Procesos básicos en el sistema digestivo de larvas en desarrollo, sin un estómago. (A) Ingestión de los alimentos, (B) Secreción de las enzimas digestivas y sales biliares, (C) Digestión, (D, E) Absorción, y, motilidad (incluyendo la evacuación, F) (Modificado de Conceição <i>et al.</i> , 2011).....	10
3	Crecimiento en longitud total de las larvas de chita <i>Anisotremus scapularis</i> , durante los Ensayos 1 y 2, de 0 a 30 días después de la eclosión. Las líneas horizontales indican el tipo de alimento y la flecha señala el momento de la apertura de la boca.....	27
4	Crecimiento en peso seco de las larvas de chita <i>Anisotremus scapularis</i> , durante los Ensayos 1 y 2, de 0 a 30 días después de la eclosión. Las líneas horizontales indican el tipo de alimento y la flecha señala el momento de la apertura de la boca. El asterisco (*) señala diferencias significativas en los DDE entre ensayos.....	28
5	Características morfológicas de las larvas de chita <i>Anisotremus scapularis</i> de diferentes edades. (a) Larva de 1 DDE (contraste de fase). (b) Larva de 6 DDE. (c) Larva de 18 DDE. (d) Larva de 30 DDE. A, ano; B, boca; BF, bucofaringe; E, esófago; Est, estómago; G, gota de aceite; H, hígado; VI, válvula intestinal; IA, intestino anterior; IM, intestino medio; IP, intestino posterior; O, ojo; SV, saco vitelino; VG, vejiga gaseosa.....	29
6	Corte histológico de una larva de chita <i>Anisotremus scapularis</i> recién eclosionada. El rectángulo señala el tubo digestivo (TD) y las flechas (→) las inclusiones lipídicas del saco vitelino (SV). G, gota de aceite.....	30
7	Corte histológico de una larva de chita <i>Anisotremus scapularis</i> de 1 día después de la eclosión. El rectángulo señala el tubo digestivo (TD). O, ojo; SV, saco vitelino; V, vejiga urinaria .....	31
8	Corte histológico de una larva de chita <i>Anisotremus scapularis</i> de 2 días después de la eclosión. El rectángulo señala el tubo digestivo (TD). G, gota de aceite; H, hígado; O, ojo; P, páncreas; SV, saco vitelino.....	31
9	Corte histológico de una larva de chita <i>Anisotremus scapularis</i> de 3 días después de la eclosión, el asterisco (*) de la figura (a) señala la vesícula biliar y la vejiga gaseosa (VG) se observa en la figura (b). AB, arcos branquiales; BF, bucofaringe; E, esófago; H, hígado; O, ojo; P, páncreas; Pre, región pre-valvular; Post, región post-valvular;	

	R, riñón; VI, válvula intestinal.....	33
10	Corte histológico de una larva de chita <i>Anisotremus scapularis</i> de 6 días después de la eclosión, la vejiga gaseosa (VG) se observa en la figura (b). A, ano; BF, bucofaringe; E, esófago; H, hígado; IA, intestino anterior; IM; intestino medio; IP, intestino posterior; P, páncreas; R, riñón; V, vejiga urinaria; VB, vesícula biliar.....	34
11	Corte histológico de una larva de chita <i>Anisotremus scapularis</i> de 30 días después de la eclosión. AB, arcos branquiales; A, ano; BF, bucofaringe; E, esófago; FB, filamentos branquiales; H, hígado; IA, intestino anterior; IM; intestino medio; IP, intestino posterior; O, ojo; P, páncreas; VG, vejiga gaseosa.....	35
12	Corte histológico de la bucofaringe de las larvas de chita <i>Anisotremus scapularis</i> de diferentes edades. (a) Larva de 3 DDE. (b) Larva de 26 DDE, el rectángulo señala la lengua. (c) Lengua de la larva a 26 DDE. (d) Larva de 30 DDE. Las flechas (→) señalan las células mucosas y los asteriscos (*) las papilas gustativas. AB, arco branquial; BF, bucofaringe; D, diente; E, esófago; L, lengua; O, ojo....	37
13	Corte histológico del esófago de las larvas de chita <i>Anisotremus scapularis</i> de diferentes edades. (a) Larva de 4 DDE, las flechas (→) señalan las células mucosas. (b) Larva de 26 DDE, los asteriscos (*) señalan las células mucosas. (c) Larva de 6 DDE, región anterior (EA) y posterior (EP). (d) Larva de 18 DDE, los asteriscos (*) señalan los pliegues longitudinales. C, corazón; E, esófago; H, hígado; P; páncreas; Pi, esfínter pilórico en desarrollo; RSV, restos del saco vitelino.....	39
14	Corte histológico de una larva de chita <i>Anisotremus scapularis</i> . (a) Larva de 30 DDE. (b) Detalle de las glándulas gástricas, señaladas por flechas (→). A, ano; AB, arco branquial; BF, bucofaringe; E, esófago; FB, filamento branquial; H, hígado; IA, intestino anterior; IP, intestino posterior; O, ojo; P, páncreas; VG, vejiga gaseosa.....	40
15	Corte histológico del intestino de las larvas de chita <i>Anisotremus scapularis</i> de diferentes edades. (a) Larva de 3 DDE, el círculo señala la válvula intestinal. (b) Microvellosidades, larva de 3 DDE, señaladas por flechas (→). (c) Pliegues intestinales, larva de 4 DDE, señalados por asteriscos (*). (d) Pliegues intestinales, larva de 22 DDE, señalados por flechas (→). (e) Células mucosas, larva de 8 DDE, señaladas por flechas (→). (f) Células mucosas, larva a 14 DDE, señaladas por flechas (→). AB; arco branquial; BF, bucofaringe; C, corazón; E, esófago; H, hígado; IA, intestino anterior; IM, intestino medio; IP, intestino posterior; P, páncreas; Pre, región pre-valvular; Post, región post-valvular; R, riñón; VG, vejiga gaseosa; VI, válvula intestinal.....	42

- 16 Corte histológico del intestino de las larvas de chita *Anisotremus scapularis* de diferentes edades. (a) Región pre-valvular, larva de 4 DDE, las flechas (→) señalan las inclusiones lipídicas. (b) Intestino medio, larva de 26 DDE, las flechas (→) señalan las inclusiones lipídicas. (c) Región post-valvular, larva de 4 DDE, las flechas (→) señalan las vacuolas supranucleares. (d) Intestino posterior, larva de 26 DDE, las flechas (→) señalan las vacuolas supranucleares. DR, ductos renales; IM, intestino medio; IP, intestino posterior; Pre, región pre-valvular; Post, región post-valvular..... 43
- 17 Corte histológico del páncreas de las larvas de chita *Anisotremus scapularis* de diferentes edades. (a) Primordios de páncreas e hígado, larva de 2 DDE. (b) Páncreas en desarrollo, larva de 3 DDE, las flechas (→) señalan los pocos gránulos de zimógeno. (c) Islote de Langerhans (IL), larva de 22 DDE, los asteriscos (\*) señalan los abundantes gránulos de zimógeno. (d) Extensión del páncreas, larva de 22 DDE. AB, arco branquial; E, esófago; FB, filamento branquial; H, hígado; IA, intestino anterior; IM, intestino medio; IP, intestino posterior; P, páncreas; Pre, región pre-valvular; R, riñón; SV, saco vitelino; V, vejiga urinaria; VB, vesícula biliar..... 45
- 18 Corte histológico del hígado de las larvas de chita *Anisotremus scapularis* de diferentes edades. (a) Hígado en desarrollo, larva de 3 DDE. (b) Hígado, larva de 6 DDE, los asteriscos (\*) señalan la ubicación de sinusoide hepático. (c) Conducto pancreático (CP) y hepático (CH), larva de 22 DDE. (d) Extensión del hígado, larva de 26 DDE. Abreviaciones: A, ano; C, corazón; E, esófago; H, hígado; IA, intestino anterior; IM, intestino medio; IP, intestino posterior; P, páncreas; Pi, esfínter pilórico; R, riñón; V, vejiga urinaria; VB, vesícula biliar..... 46
- 19 Actividad de las proteasas alcalinas de la chita *Anisotremus scapularis*, para los Ensayos 1 y 2, durante el desarrollo larval. (a) Actividad total en función de la edad (DDE), el asterisco (\*) señala diferencias significativas en los DDE entre ensayos. (b) Actividad total en función del crecimiento (longitud total). (c) Actividad específica en función de la edad (DDE). Las barras de error representan el error estándar de la media (n=3)..... 48
- 20 Actividad de la tripsina de la chita *Anisotremus scapularis*, para los Ensayos 1 y 2, durante el desarrollo larval. (a) Actividad total en función de la edad (DDE), el asterisco (\*) señala diferencias significativas en los DDE entre ensayos. (b) Actividad total en función del crecimiento (longitud total). (c) Actividad específica en función de la edad (DDE). Las barras de error representan el error estándar de la media (n=3)..... 50
- 21 Actividad de la leucina aminopeptidasa de la chita *Anisotremus scapularis*, para los Ensayos 1 y 2, durante el desarrollo larval. (a)

	Actividad total en función de la edad (DDE), los asteriscos (*) señalan diferencias significativas en los DDE entre ensayos. (b) Actividad total en función del crecimiento (longitud total). (c) Actividad específica en función de la edad (DDE). Las barras de error representan el error estándar de la media (n=3).....	52
22	Actividad de las proteasas ácidas de la chita <i>Anisotremus scapularis</i> , para los Ensayos 1 y 2, durante el desarrollo larval. (a) Actividad total en función de la edad (DDE). (b) Actividad total en función del crecimiento (longitud total). (c) Actividad específica en función de la edad (DDE). Las barras de error representan el error estándar de la media (n=3).....	53
23	Actividad de las lipasas dependientes de sales biliares de la chita <i>Anisotremus scapularis</i> , para los Ensayos 1 y 2, durante el desarrollo larval. (a) Actividad total en función de la edad (DDE), los asteriscos (*) señalan diferencias significativas en los DDE entre ensayos. (b) Actividad total en función del crecimiento (longitud total). (c) Actividad específica en función de la edad (DDE). Las barras de error representan el error estándar de la media (n=3).....	55
24	Actividad de la alfa-amilasa de la chita <i>Anisotremus scapularis</i> , para los Ensayos 1 y 2, durante el desarrollo larval. (a) Actividad total en función de la edad (DDE). (b) Actividad total en función del crecimiento (longitud total). (c) Actividad específica en función de la edad (DDE). Las barras de error representan el error estándar de la media (n=3).....	57

## Lista de tablas

Tabla		Página
1	Resumen de los principales eventos en el desarrollo de los componentes del sistema digestivo de larvas de chita <i>Anisotremus scapularis</i> .....	36

## Capítulo 1. Introducción

---

La acuicultura en el Perú viene creciendo como una importante actividad productiva y económica; en los últimos años, la tasa de crecimiento anual fue del 20% y el desarrollo se orientará a la acuicultura amazónica y la piscicultura marina (Ministerio de la Producción, 2013). La producción acuícola peruana se encuentra orientada principalmente al cultivo de camarón blanco del Pacífico (*Litopenaneus vannamei*), concha de abanico (*Argopecten purpuratus*), trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) y diferentes especies de tilapia (*Oreochromis* spp.) y algunos peces amazónicos como la gamitana (*Colossoma macropomun*) y el paco (*Piaractus brachypomus*). Sin embargo, el Perú cuenta con una gran variedad de especies con potencial acuícola, como es la chita (*Anisotremus scapularis*), que ya se encuentra dentro de los objetivos de diferentes programas nacionales para el desarrollo de su tecnología de cultivo (Ministerio de la Producción, 2010).

La chita es un pez marino que habita las costas de Perú, es muy valorado para el consumo humano directo, por la calidad de su carne y gran rendimiento (30% del peso total); sin embargo, en los últimos años, su gran demanda y la poca regulación de su pesquería ha ocasionado una disminución considerable en sus poblaciones. En este sentido, el Instituto del Mar del Perú (IMARPE), entidad especializada del Ministerio de la Producción, está realizando investigaciones para desarrollar su cultivo en condiciones de laboratorio y así incentivar el desarrollo de la acuicultura de esta especie (IMARPE, 2015).

En el Perú y en otros países de la región, las investigaciones de *A. scapularis* se han orientado al estudio de su parasitofauna, ecología trófica y análisis filogenéticos (Angel and Ojeda, 2001; Bernardi *et al.*, 2008; Berrios y Vargas, 2004; Castro-Romero and Baeza-Kuroki, 1985a, 1985b, 1989; Chero *et al.*, 2014; Iannacone y Alvarino, 2009, 2012; Medina *et al.*, 2004; Oliva, 1987; Oliva and Carvajal, 1984; Oliva and Luque, 1989; Oliva *et al.*, 2009; Paschoal *et al.*, 2015; Tavera *et al.*, 2012; Vargas *et al.*, 1999). Sin embargo, la información disponible sobre la biología y fisiología de sus diferentes etapas de vida, como base para desarrollar su tecnología de cultivo, es todavía escasa.

En la acuicultura de peces marinos, la reproducción y el desarrollo de las larvas son las etapas donde se presentan las mayores problemáticas (Dhert *et al.*, 1998), es por ello, que la gran mayoría de las investigaciones con especies de interés acuícola como la chita, se centran en el estudio de estas dos etapas.

Al momento de la eclosión, las larvas de muchos peces marinos poseen un gran saco vitelino del cual obtienen sus reservas endógenas, una vez que estas reservas se agotan, deben obtener su alimento de una fuente exógena (Peña *et al.*, 2003). Bajo condiciones de cultivo, el primer alimento y durante los primeros días de vida, generalmente se les suministran a las larvas presas vivas, como rotíferos, nauplios y metanauplios de *Artemia* sp. (los más empleados), y posteriormente, cuando poseen un sistema digestivo más desarrollado, se les suministra alimento balanceado particulado.

Sin embargo, estos tipos de alimento vivo no satisfacen los requerimientos nutricionales de las larvas convirtiéndose en un punto crítico, ya que se producen los mayores porcentajes de mortalidad en esta etapa de cultivo (Lazo *et al.*, 2007). Adicionalmente, la producción de alimento vivo representa una gran inversión de infraestructura, trabajo y energía (Person Le Ruyet *et al.*, 1993).

Es por ello, que en los últimos años diversas investigaciones han concentrado sus esfuerzos en la sustitución del alimento vivo por alimento balanceado desde el inicio de la alimentación exógena de las larvas o pocos días después de su eclosión; no obstante, esto exige un buen conocimiento de la organización y funcionalidad del sistema digestivo, de los requerimientos nutricionales y del comportamiento de las larvas en sus diferentes estadios de desarrollo (Lazo *et al.*, 2011; Moyano *et al.*, 1996).

Las técnicas histológicas y bioquímicas son las más utilizadas en los estudios de fisiología digestiva, y han permitido describir los mayores cambios morfológicos y funcionales que ocurren en el sistema digestivo durante el período larval en diversas especies de peces marinos de interés comercial, como en *Seriola lalandi* (Chen *et al.*, 2006a, 2006b), *Lutjanus guttatus* (Galaviz *et al.*, 2012), *Lutjanus peru* (Zavala-Leal *et al.*, 2013), *Paralichthys californicus* (Alvarez-González *et al.*, 2006; Gisbert *et al.*, 2004; Zacarias-Soto *et al.*, 2006), *Paralichthys dentatus* (Bisbal and Bengtson, 1995),

*Pleuronectes ferruginea* (Baglole *et al.*, 1997), *Sciaenops ocellatus* (Lazo, 1999; Lazo *et al.*, 2000a; Lazo *et al.*, 2007), *Atractoscion nobilis* (Galaviz *et al.*, 2011), *Pseudosciaena crocea* (Ma *et al.*, 2005; Mai *et al.*, 2005), *Scophthalmus rhombus* (Hachero-Cruzado *et al.*, 2009), *Scophthalmus maximus* (Segner *et al.*, 1994), *Paralabrax maculatofasciatus* (Alvarez-González *et al.*, 2008; Peña *et al.*, 2003), *Dicentrarchus labrax* (García-Hernández *et al.*, 2001; Zambonino-Infante and Cahu, 1994); *Solea senegalensis* (Martínez *et al.*, 1999; Ribeiro *et al.*, 1999a, 1999b; Sarasquete *et al.*, 1996); *Sparus aurata* (Calzada *et al.*, 1998; Cataldi *et al.*, 1987; Elbal *et al.*, 2004; Moyano *et al.*, 1996; Sarasquete *et al.*, 1995; Sarasquete *et al.*, 1993), *Diplodus sargus* (Cara *et al.*, 2003; Ortiz-Delgado *et al.*, 2003), *Pagrus auriga* (Darias *et al.*, 2007; Moyano *et al.*, 2005; Sánchez-Amaya *et al.*, 2007), entre otros.

De estos estudios se puede concluir que la organogénesis del sistema digestivo de los teleósteos sigue un patrón general común, aunque hay diferencias considerables respecto al momento de la ontogenia en que se desarrollan los órganos, que a su vez es afectada por la historia de vida de cada especie y por factores bióticos y abióticos, como la temperatura del agua o la disponibilidad de alimento (Falk-Petersen, 2005).

En este sentido, en el presente trabajo se investigan algunos aspectos de la fisiología nutricional de las larvas de *A. scapularis* durante los primeros 30 días de vida, mediante la descripción histológica de los cambios que suceden durante el desarrollo de su sistema digestivo y de las glándulas anexas, así como del análisis de la presencia y actividad de sus principales enzimas digestivas.

## 1.1 Antecedentes

### 1.1.1 *Anisotremus scapularis* “chita”

La chita *Anisotremus scapularis* (Tschudi, 1846) es un pez marino que habita en las regiones templadas del Pacífico oriental en el hemisferio sur (Reitz, 2001), y que se distribuye desde Manta, Ecuador hasta Antofagasta, Chile, incluyendo las Islas Galápagos (Chirichigno y Vélez, 1998). Pertenece a la clase Actinopterygii, orden

Perciformes y familia Haemulidae. Los adultos se caracterizan por poseer un cuerpo alto y robusto, perfil de la cabeza fuertemente convexa y boca pequeña, baja y terminal. Las escamas son grandes con manchas oscuras en sus márgenes anteriores, las cuales le dan una apariencia de bandas oblicuas. El color de la región dorsal y lateral del cuerpo es plateado; la región ventral es de color blanco o plomo claro. Las espinas anteriores de las aletas dorsal y anal son más largas que las espinas posteriores, lo que da a estas aletas una forma triangular. La aleta anal posee espinas gruesas, la segunda espina es más larga y fuerte que la tercera. Las aletas pélvicas se encuentran un poco posterior a la base de las aletas pectorales, que son puntiagudas. La aleta caudal posee el lóbulo superior ligeramente más grande que el inferior (Figura 1) (Kong-Urbina y Castro-Fuentes, 2002).



Figura 1. Chita *Anisotremus scapularis* ([www.discoverlife.org](http://www.discoverlife.org)).

Es un organismo costero, habita en zonas rocosas y arenosas, desde los 3 hasta 30 m (Humann and Deloach, 1993) formando cardúmenes. Sus hábitos corresponden a los de un depredador nocturno y su alimento consiste de invertebrados del fondo, que busca entre la rompiente de las olas. Es una especie eurifágica, consume preferentemente moluscos poliplacóforos como *Chiton cumingsi*, bivalvos como

*Semimytilus algosus*, anfípodos, echiuridos, peces y algas verdes y rojas. Los hábitos alimenticios cambian de omnívoros en juveniles (macroalgas e invertebrados menores, destacando los copépodos) a mayormente carnívoros en adultos (Angel and Ojeda, 2001; Berrios y Vargas, 2004; Medina *et al.*, 2004; Vargas *et al.*, 1999).

La chita es una de las principales especies que sustentan la pesquería costera artesanal del Perú, se captura con redes de cerco y de enmalle (Mendo and Wosnitza-Mendo, 2014). No hay grandes amenazas conocidas para esta especie y por ello está clasificada como de menor preocupación (Least concern) en la lista de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN). Sin embargo, su gran demanda para el consumo humano directo y la escasa regulación de su pesquería han ocasionado que en los últimos años se observe una disminución de sus capturas, de 271 TM en el 2004 a 96 TM en el 2013 (Ministerio de la Producción, 2015). En este sentido, en el mes de abril del 2016, se estableció la talla mínima de captura en 24 cm de longitud total, con una tolerancia máxima de 25% del número de ejemplares capturados por debajo de la talla mínima, de esta manera se prohibió la extracción, recepción, transporte, almacenamiento, procesamiento y comercialización de chitas de tallas inferiores (Resolución Ministerial N° 156-2016-PRODUCE).

Los mayoría de los estudios de la chita se han orientado a la descripción de su parasitofauna, donde se ha registrado como hospedero de cinco monogeneos: *Neobivagina chita*, *Intracotyle neghmei*, *Choricotyle anisotremi*, *Choricotyle scapularis* y *Mexicana* sp.; diez trematodos: *Lobatostoma anisotremum*, *Stephanostomum anisotremi*, *Leurodera pacifica*, *Monorchis latus*, *Helicometrina nimia*, *Gonocercella* sp., *Diphtherostomum* sp., *Proctoeces lintoni*, *Proctoeces* sp., *Lasiotocus longicaecum*; tres larvas de cestodos: *Diphyllobothrium pacificum*, *Scolex pleuronectis* y *Lacistorhynchus tenuis*; dos acantocéfalos: *Profilicollis altmani* y *Corynosoma* sp.; siete copépodos *Clavella caudata*, *Clavella applicata*, *Metapeniculus antofagastiensis*, *Lernanthropus antofagastensis*, *Neobrachiella anisotremi*, *Colobomus quaadrifarius*, *Encotyllabe antofagastensis*; y, un isópodo *Cymothoa* sp. (Castro-Romero and Baeza-Kuroki, 1985a, 1985b, 1989; Chero *et al.*, 2014; Iannacone y Alvariño, 2009, 2012; Oliva and Carvajal, 1984; Oliva *et al.*, 2009; Oliva and Luque, 1989; Oliva, 1987; Paschoal *et al.*, 2015).

La utilización de la chita como recurso pesquero se remonta a los antiguos pobladores del Perú y Chile, es por ello que también se han realizado investigaciones que muestran su importancia como bioindicador en la arqueología de culturas preincaicas que habitaron la región costera (Llagostera *et al.*, 1999) y en la etnobiología en el Sur del Perú (Béarez *et al.*, 2003).

Estudios filogenéticos describen a la familia Haemulidae, estrechamente relacionada con las familias Lutjanidae (pargos) y Sparidae (sargos y doradas) (Orrell *et al.*, 2002; Tavera *et al.*, 2012). En relación a su género, *Anisotremus* comprende 10 especies neotropicales y su estudio provee una oportunidad para la investigación de aspectos únicos de la especiación simpátrica y alopátrica (Bernardi *et al.*, 2008).

Adicionalmente, en *A. scapularis* se han realizado estudios tróficos y bioecológicos (Angel and Ojeda, 2001; Berrios y Vargas, 2004; Medina *et al.*, 2004; Vargas *et al.*, 1999). Se ha catalogado como una especie que resiste grandes cambios ambientales, particularmente de temperatura, ya que se ha encontrado en abundancia durante y después del fenómeno El Niño de 1997-98 (Gárate y Pacheco, 2004).

Sin embargo, entre los trabajos citados anteriormente se puede observar que son escasos los relacionados con la biología de esta especie en sus diferentes etapas de vida y nulos los orientados a su cultivo.

### **1.1.2 Cultivo larval en peces marinos**

El cultivo larval en muchas especies de peces marinos se considera como uno de los cuellos de botella para el desarrollo de la tecnología de cultivo a escala comercial, este es el caso de la chita (Dhert *et al.*, 1998). Según Verreth (1994), las dificultades más sobresalientes para este desarrollo, son la falta de conocimiento de las condiciones ambientales óptimas, del comportamiento de alimentación, de los requerimientos nutricionales específicos, asociados a los cambios ontogénicos y al crecimiento, así como el pequeño tamaño de las larvas y la necesidad de alimentos de tamaños de

partícula adecuados, lo que plantea problemas específicos para la producción de alimentos (Planas and Cunha, 1999).

En relación con la alimentación, bajo condiciones de cultivo, las larvas requieren diferentes tipos de alimento durante su desarrollo. Al eclosionar, obtienen los nutrientes a partir de las reservas del saco vitelino y del glóbulo de aceite, una vez que las reservas endógenas se agotan, las larvas comienzan a alimentarse con microorganismos planctónicos como los rotíferos y/o copépodos y posteriormente con presas cada vez más grandes como nauplios y metanauplios de *Artemia* sp. A medida que las larvas se desarrollan, ocurre la metamorfosis y se transforman en organismos juveniles, entonces, las dietas nuevamente cambian y se les suministra alimento balanceado particulado (Kolkovski *et al.*, 1993).

El comienzo de la alimentación exógena (alimento vivo o formulado) es un momento crucial en el desarrollo de las larvas y se asocia con las mayores mortalidades, tanto en el medio natural como en cultivo. En cultivo, una adecuada ingestión, digestión y asimilación de los alimentos que contengan los nutrientes esenciales es uno de los principales factores que influyen en la supervivencia larval (Lazo *et al.*, 2007; Sorgeloos *et al.*, 1991).

### **1.1.3 Limitaciones del alimento vivo y balanceado**

En la larvicultura de peces marinos, generalmente se suministra alimento vivo durante dos o varias semanas después del inicio de la alimentación exógena, debido a que en diversas investigaciones se han observado bajas tasas de crecimiento y supervivencia cuando se suministra alimento balanceado, lo cual se puede atribuir a que las larvas tienen un sistema digestivo poco desarrollado y una limitada actividad enzimática digestiva (Holt, 1993). Sin embargo, el cultivo del alimento vivo implica una gran inversión de infraestructura, trabajo y energía que representan hasta el 79% del total de los costos de producción (Person Le Ruyet *et al.*, 1993). Por otro lado, diversas investigaciones han demostrado que las dietas vivas tradicionales (rotíferos, nauplios y

metanauplios de *Artemia* sp.) no cubren las necesidades nutricionales de las larvas (Sorgeloos *et al.*, 1991).

Uno de los insumos más utilizados para el cultivo larval de diferentes especies de organismos acuáticos (peces y crustáceos) son los quistes de *Artemia* sp., que se recolectan en mares y lagos en diferentes localidades del mundo. La inmensa demanda mundial de estos organismos, sumada a los efectos climáticos, como el fenómeno El Niño, que afectó la producción natural y la recolección de quistes, han tenido un impacto en su comercio internacional, lo que se ha traducido en una reducción del abastecimiento de la demanda mundial, convirtiéndose en uno de los aspectos más críticos de este tipo de alimento (Kolkovski, 2001).

En este sentido, la sustitución de las dietas vivas por alimento balanceado desde el inicio de la alimentación exógena o pocos días después de la eclosión de las larvas de peces marinos, es crucial para reducir los costos de producción y para asegurar una producción suficiente y constante de organismos juveniles (semilla) para la industria del cultivo de peces (Cahu and Zambonino Infante, 2001).

Las larvas tienen un nivel suficiente de enzimas digestivas durante su desarrollo. En la mayoría de los estudios que evalúan la actividad enzimática, no se han encontrado diferencias significativas entre las larvas alimentadas con alimento vivo o balanceado (Cahu *et al.*, 1995). No obstante, las enzimas digestivas de las larvas parecen no ser secretadas adecuadamente para la digestión de los alimentos balanceados cuando las larvas son alimentadas con este tipo de alimento (Lazo *et al.*, 2000a). Así mismo, este tipo de alimento contienen un mayor porcentaje de materia seca (60-90%), en comparación con el alimento vivo (10%), lo cual puede explicar su baja digestibilidad, ya que es más difícil romper las partículas secas y duras debido a que las enzimas digestivas son hidrolíticas (requieren que el sustrato este disuelto en agua); además, las partículas del alimento balanceado pueden contener aglutinantes, polímeros sintéticos, proteínas y otros ingredientes que las larvas no pueden digerir, así como otros factores anti-nutricionales (Kolkovski, 2001; Rust *et al.*, 2012).

Con el fin de producir dietas balanceadas adecuadas para la alimentación de larvas de peces, las investigaciones se deben orientar a garantizar la palatabilidad, estabilidad, digestión, absorción y una composición que satisfaga los requerimientos nutricionales esenciales de los organismos (Lazo *et al.*, 2000a). Para ello, el conocimiento de la morfología y funcionalidad del sistema digestivo durante el desarrollo de las larvas es un primer paso para conocer la capacidad digestiva en esta etapa de vida de los peces.

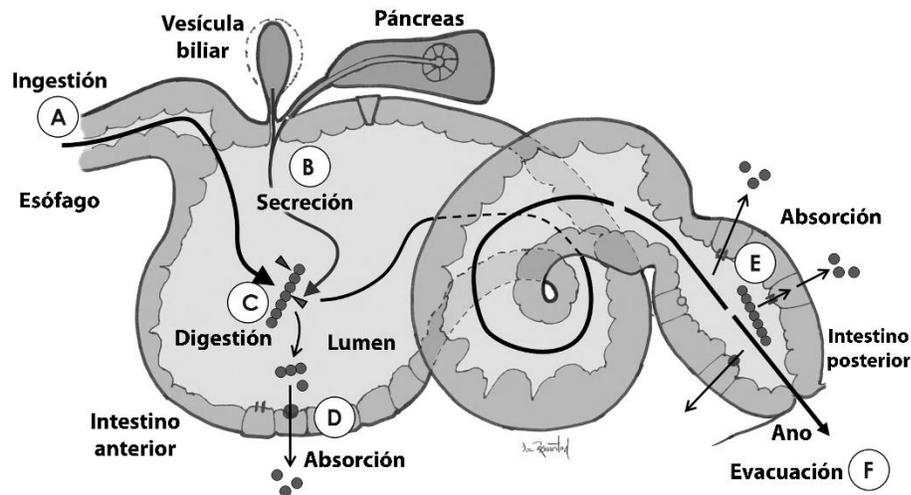
#### **1.1.4 El sistema digestivo de las larvas**

La mayoría de larvas de peces marinos poseen un sistema digestivo morfológica y fisiológicamente menos elaborado que el de los peces adultos. Al eclosionar, las larvas tienen un tubo digestivo indiferenciado y sin ninguna apertura al exterior. Así, al momento de la primera alimentación exógena, el sistema digestivo se diferencia y el tubo digestivo rudimentario se segmenta en tres regiones anatómicas: bucofaringe, esófago e intestino; mientras que el estómago se desarrolla días después del inicio de la alimentación exógena y depende de las especies. A diferencia del cambio gradual de otros sistemas de órganos, el sistema digestivo se desarrolla por cambios periódicos rápidos (Govoni *et al.*, 1986; Zambonino-Infante *et al.*, 2008).

Las principales glándulas asociadas al sistema digestivo de los peces, el hígado y páncreas, se desarrollan entre el momento de la eclosión y la primera alimentación, cuando por lo general ya son funcionales (Kolkovski, 2001). La formación de un estómago funcional con glándulas gástricas, y de los ciegos pilóricos, se ha sido asociado con la transición de las larvas a estadios juveniles (Tanaka, 1973).

Durante la transición de la alimentación endógena a exógena, las larvas experimentan una serie de cambios morfológicos y funcionales, es en esta etapa que se registran las mayores mortalidades, particularmente en los peces marinos (Calzada *et al.*, 1998; Sarasquete *et al.*, 1993). Un óptimo desarrollo del sistema digestivo permite a las larvas la captura, ingesta, digestión y absorción de su alimento (Figura 2), asegurando su crecimiento y supervivencia (Kjorsvik *et al.*, 2004).

El desarrollo ontogenético del sistema digestivo en la mayoría de teleósteos generalmente se divide en tres fases mayores, la primera comienza con la eclosión de las larvas y comprende la etapa en que las larvas se alimentan de las reservas de su saco vitelino y gota de aceite; la segunda comprende desde la apertura de la boca e inicio de la alimentación exógena hasta el momento anterior a la formación de las glándulas gástricas en el estómago, en esta etapa, el principal órgano encargado de la secreción de enzimas es el páncreas exocrino y en el intestino se absorben los nutrientes a través de difusión simple, intercambio iónico (en el caso de algunos minerales), transporte activo y pinocitosis (Rust, 2002). En la tercera fase, con el desarrollo de las glándulas gástricas y los ciegos pilóricos, el sistema digestivo está funcionalmente maduro y anatómica y fisiológicamente listo para aceptar alimento balanceado (Tanaka, 1973; Bisbal and Bengtson, 1995; Chen *et al.*, 2006b).



**Figura 2. Procesos básicos en el sistema digestivo de larvas en desarrollo, sin un estómago. (A) Ingestión de los alimentos, (B) Secreción de las enzimas digestivas y sales biliares, (C) Digestión, (D, E) Absorción, y, motilidad (incluyendo la evacuación, F) (Modificado de Conceição *et al.*, 2011).**

La formación, desarrollo y funcionalidad de los órganos que conforman el sistema digestivo, varía entre los teleósteos y se ve afectado por una serie de factores abióticos y bióticos (Falk-Petersen, 2005). Es por ello, que el conocimiento de la ontogenia de este sistema en cada especie es crucial para adecuar las condiciones de alimentación y

así optimizar las técnicas de cultivo larval de especies de importancia económica (Gisbert *et al.*, 2008; Zambonino-Infante *et al.*, 2008).

Las diferencias entre el sistema digestivo de las larvas y el de los peces adultos, no implican deficiencias fisiológicas o digestivas, ya que las larvas poseen la capacidad de digerir y asimilar su alimento; en este sentido, la etapa larvaria no se debe considerar como primitiva, sino como un periodo de transición, en el que tanto la ontogenia y el crecimiento producen cambios sustanciales en la estructura, fisiología, tamaño y la forma del cuerpo (Fuiman and Higgs, 1997; Zambonino-Infante *et al.*, 2008).

En los últimos años, muchas investigaciones se han orientado al estudio de la capacidad digestiva y los requerimientos nutricionales específicos de las larvas de peces con énfasis en los de origen marino, ya que estos estudios son el paso inicial para la formulación de dietas específicas para cada estadio de desarrollo larval y para la identificación e implementación de nuevas alternativas de alimento (Sarasquete *et al.*, 1995).

Para cuantificar y establecer la capacidad del sistema digestivo de las larvas es necesario caracterizarlo mediante el desarrollo de ensayos bioquímicos de la actividad de sus enzimas digestivas, en combinación con estudios *in vivo* e *in vitro* de la digestibilidad de los alimentos. También complementarlos con el estudio de la morfogénesis de los diferentes órganos que componen este sistema (Lazo *et al.*, 2007).

Los diferentes enfoques analíticos para el estudio de la ontogenia del sistema digestivo, desde la histología clásica y las investigaciones bioquímicas hasta las aproximaciones moleculares, han demostrado que las larvas de peces marinos constituyen un modelo animal útil para el estudio de las interacciones entre los nutrientes y los procesos de desarrollo de los órganos (Zambonino-Infante *et al.*, 2008).

### 1.1.5 Análisis histológico del sistema digestivo en larvas

La descripción histológica del sistema digestivo de las larvas se considera un primer paso para conocer la fisiología digestiva de las primeras etapas de vida de cada especie, ya que la mayoría de las funciones fisiológicas se relacionan con el desarrollo y aparición de nuevas estructuras de los órganos (Chen *et al.*, 2006b).

Esta técnica se ha utilizado en diversos estudios de larvas de especies marinas de las familias Carangidae (Chen *et al.*, 2006b); Lutjanidae (Galaviz *et al.*, 2012; Zavala-Leal *et al.*, 2013), Paralichthyidae (Bisbal and Bengtson, 1995; Gisbert *et al.*, 2004; Zacarias-Soto *et al.*, 2006); Pleuronectidae (Baglolle *et al.*, 1997); Sciaenidae (Galaviz *et al.*, 2011; Lazo, 1999; Mai *et al.*, 2005); Scopthalmidae (Hachero-Cruzado *et al.*, 2009; Segner *et al.*, 1994); Serranidae (García-Hernández *et al.*, 2001; Peña *et al.*, 2003); Soleidae (Ribeiro *et al.*, 1999a; Sarasquete *et al.*, 1996), y Sparidae (Calzada *et al.*, 1998; Darias *et al.*, 2007; Elbal *et al.*, 2004; Ortiz-Delgado *et al.*, 2003; Sánchez-Amaya *et al.*, 2007; Sarasquete *et al.*, 1995). La mayoría de las especies estudiadas exhiben un patrón general con pequeñas variaciones, principalmente en la secuencia temporal en la que se desarrollan las diferentes estructuras (Yúfera and Darias, 2007). La diferencia más relevante es probablemente el momento en que se desarrolla el estómago, que se caracteriza por el desarrollo de las primeras glándulas gástricas, y varía desde pocos días hasta varios meses después de la primera alimentación, incluso entre especies de la misma familia (Ronnestad *et al.*, 2012).

Las observaciones histológicas también se han utilizado para analizar el estado nutricional de las larvas a nivel tisular, principalmente mediante la observación de la estructura del hígado, páncreas y epitelio intestinal. Por ejemplo, se ha sugerido que los peces responden a la falta de alimento o a una dieta inadecuada por disfunciones biliares, alteraciones mitocondriales, agotamiento de las reservas de glucógeno, colestasis hepática, y en general, degeneración de los hepatocitos y de las células pancreáticas. Un epitelio intestinal delgado, sin inclusiones de proteínas y lípidos son síntomas asociados a una absorción deficiente de los nutrientes, entre otras características (Gisbert *et al.*, 2008; Sarasquete *et al.*, 1995, 1993; Yúfera *et al.*, 2000).

### 1.1.6 Enzimas digestivas en larvas

El pequeño tamaño de las larvas dificulta el desarrollo de estudios convencionales de digestibilidad de los alimentos, por lo que se han desarrollado técnicas bioquímicas que permiten identificar la presencia y la actividad de las enzimas que actúan en la digestión de los alimentos ingeridos (Alvarez-González *et al.*, 2008).

El estudio de las enzimas digestivas durante la ontogenia de las larvas brindan información de su capacidad digestiva para optimizar los protocolos de alimentación, para el diseño de dietas adecuadas a la etapa particular del desarrollo de las larvas e información sobre su estado nutricional (Díaz *et al.*, 1997).

La función de las enzimas digestivas es la descomposición molecular de los alimentos ingeridos por las larvas, permitiendo al organismo obtener los nutrientes necesarios para su posterior absorción en el intestino. Las enzimas pueden actuar a nivel luminal (digestión extracelular), ligadas a la membrana e intracelularmente; la importancia fisiológica de estos tipos de digestión varía durante la ontogenia de las larvas. La clasificación de las enzimas es en función de los nutrientes sobre los que actúan (Alarcón, 1997; Alvarez-González, 2003; Rust, 2002):

- Proteasas, enzimas que catalizan la hidrólisis de los enlaces peptídicos que forman la estructura primaria de las proteínas. Dentro de ellas existen dos subgrupos: endopeptidasas o proteinasas las que hidrolizan enlaces peptídicos internos; y exopeptidasas o peptidasas las que hidrolizan enlaces peptídicos entre aminoácidos terminales (extremo amino o carboxilo de la proteína). Las proteasas también se clasifican de acuerdo con su mecanismo de acción, el cual depende en buena medida de los residuos de aminoácidos que constituye su centro activo: serina proteasas (por lo general endopeptidasas) con un grupo serina en su centro activo; cisteína proteasas se caracterizan por la presencia del grupo cisteína en su centro catalítico; proteasas ácidas o aspártica se caracterizan por la presencia de ácido aspártico en el centro activo y poseen máxima actividad a pH ácido; metal proteasas poseen un resto de ácido glutámico en el centro activo y requieren de un catión divalente (Zn, Ca o Mg) para catalizar la hidrólisis del enlace peptídico. Las

proteasas son importantes para activar los zimógenos liberados de un gran número de enzimas digestivas en su forma inactiva, por ejemplo, la tripsina activa los zimógenos de quimotripsina, elastasa, colagenasa, y lipasa.

- Lipasas, se denominan según los sustratos donde trabajan, triacilglicerol lipasa rompe los ácidos grasos de los triglicéridos, las fosfolipasas actúan sobre los ácidos grasos de los fosfolípidos, las estererasas actúan sobre ésteres simples de ácidos grasos con bajo peso molecular, entre otros. Los lípidos más importantes que se encuentran en las dietas de peces son los triglicéridos, ceras, colesterol y fosfolípidos. Estos sustratos se hidrolizan a ácidos grasos, monoacilglicerol, esterese, los que son absorbidos a través de la membrana de las microvellosidades de las células intestinales y una vez dentro de las células se reesterifican y se agrupan con las proteínas para formar agregados llamados quilomicrones y ser transportados hacia el hígado. La acción de la lipasa sobre su sustrato se ve enormemente favorecida por la existencia de la interfase agua-lípido, la cual es formada en el intestino gracias a la acción emulsificante de las sales biliares o sus análogos.
- Carbohidrasas, la principal enzima es la alfa-amilasa que actúa sobre el enlace  $\alpha$ -1,4 del almidón y glucógeno, liberando moléculas de glucosa y maltosa. Se han identificado otras carbohidrasas como glucosidasas, maltasas, sacarasas.

Entre las metodologías más utilizadas para caracterizar las enzimas digestivas se encuentran técnicas bioquímicas basadas en la utilización de sustratos específicos o generales y de inhibidores específicos, técnicas electroforéticas, entre otras.

El estómago, el páncreas exocrino y el intestino, son los principales productores de las diferentes enzimas para la digestión de los nutrientes. Las proteasas ácidas se encuentra principalmente en el estómago; esta actividad se debe a la activación de pepsinógeno en pepsina y actúan a pH ácido. El páncreas exocrino sintetiza y secreta en el lumen intestinal un gran número de enzimas (proteasas, lipasas y amilasas), las cuales funcionan en un pH alcalino. Las células intestinales, también llamadas enterocitos, tienen dos tipos de enzimas: las enzimas citosólicas (varias peptidasas) que se encuentran en el citoplasma de la célula, y las enzimas vinculadas a la membrana celular (aminopeptidasas, carboxipeptidasas) ubicadas en sus microvellosidades (proyecciones hacia el lumen de los enterocitos). Las diferentes

enzimas presentes en el tracto digestivo son a menudo complementarias y permiten la digestión total de los alimentos ingeridos por los organismos y su absorción o el transporte por los enterocitos (Zambonino-Infante and Cahu, 2001).

En la etapa larvaria se producen los mayores requerimientos de proteínas, debido a las altas tasas de crecimiento. Al inicio del desarrollo del sistema digestivo, la hidrólisis de las proteínas depende principalmente de las proteasas alcalinas, de origen pancreático e intestinal, debido a la falta de un estómago funcional en donde se producen proteasas ácidas (como pepsina). En este sentido, los estudios de la ontogenia de las enzimas digestivas se han centrado principalmente en las proteasas pancreáticas (como la tripsina), proteasas de la membrana de las microvellosidades (como leucina aminopeptidasa) y proteasas citoplasmáticas (como leucina-alanina peptidasa) de los enterocitos (Cahu and Zambonino-Infante, 1995; Govoni *et al.*, 1986).

Los lípidos son el segundo componente más abundante en el alimento natural de las larvas, además, los requerimientos esenciales por algunos lípidos han centrado los estudios en la detección de lipasas y estererasas en los estadios tempranos de peces marinos (Lazo *et al.*, 2007).

Las amilasas se han estudiado menos, debido a que en las presas naturales no se encuentran carbohidratos en cantidades importantes, sin embargo, su importancia radica en su utilización como fuente de energía, para minimizar los costos en la producción del alimento balanceado (Lazo *et al.*, 2007).

En organismos con un adecuado desarrollo nutricional, se observa un incremento en la actividad de las proteasas de la membrana de los enterocitos (leucina aminopeptidasa), lo cual ocurre en sentido inverso a la disminución de la actividad de las enzimas citoplasmáticas, por lo tanto, la razón de estas dos enzimas se ha utilizado como un indicador de la maduración normal del sistema digestivo. Adicionalmente, la presencia o ausencia de enzimas como la tripsina, se utiliza para interpretar el estado funcional de los órganos implicados en la digestión, como el desarrollo del páncreas (Zambonino-Infante and Cahu, 2001).

La deficiencia de enzimas digestivas en estadios temprano del desarrollo de los peces se ha atribuido a resultados poco exitosos de la alimentación con dietas balanceadas. No obstante, las larvas de los peces no tienen deficiencia de enzimas, sino que su producción y secreción sigue una cronología secuencial y está asociada a las transformaciones morfológicas del sistema digestivo. En este sentido, las enzimas para la digestión de proteínas en el lumen del intestino (tripsina, quimiotripsina, elastasa, entre otras), lípidos (lipasas y fosfolipasas), y carbohidratos (amilasas y maltasas) están presentes en las larvas antes que comience la alimentación exógena o poco después. Su actividad se incrementa con la edad y longitud, aunque hay algunas excepciones. Las larvas de peces marinos poseen una amplia gama de enzimas digestivas que digieren en forma eficiente los nutrientes, siempre que se proporcionen los alimentos adecuados que estimulen la secreción de estas enzimas al lumen intestinal de las larvas (Cahu and Zambonino-Infante, 2001; Lazo *et al.*, 2011).

La caracterización enzimática durante el desarrollo larval se ha realizado en especies de las familias Carangidae (Chen *et al.*, 2006a), Lutjanidae (Galaviz *et al.*, 2012), Paralichthyidae (Alvarez-González *et al.*, 2006; Zacarias-Soto *et al.*, 2006); Sciaenidae (Galaviz *et al.*, 2011; Lazo *et al.*, 2000a; Lazo *et al.*, 2007; Ma *et al.*, 2005); Serranidae (Alvarez-González *et al.*, 2008; Zambonino-Infante and Cahu, 1994); Soleidae (Martínez *et al.*, 1999; Ribeiro *et al.*, 1999b); y Sparidae (Cara *et al.*, 2003; Moyano *et al.*, 1996; Moyano *et al.*, 2005).

En general se consideran como cruciales tres procesos en la maduración de las funciones digestivas de las larvas de peces, la secreción de enzimas pancreáticas; el inicio de la actividad de las enzimas de la membrana del intestino; y el desarrollo de la digestión ácida, producto de las secreciones de las glándulas gástricas del estómago, hacia el final del periodo larval (Gisbert *et al.*, 2009).

## 1.2 Justificación

La chita *Anisotremus scapularis* es considerada una especie con potencial acuícola para el Perú, debido a que su carne se considera de alta calidad, hay un gran demanda para el consumo humano directo y porque los desembarques de esta especie han disminuido considerablemente en los últimos años.

Las investigaciones sobre la biología y fisiología de *A. scapularis*, como base para el desarrollo de su tecnología de cultivo, son escasas. Especialmente las relacionadas con la etapa larval, que es la etapa más crítica para el desarrollo de su producción acuícola.

En este sentido, el conocimiento de la capacidad digestiva de larvas de chita, derivado de los estudios de las características morfológicas y funcionales de la ontogenia de su sistema digestivo, permitirán optimizar los protocolos de alimentación (incluyendo el mejor momento para iniciar la alimentación con una dieta balanceada) que aseguren el desarrollo y crecimiento óptimos en condiciones de cultivo; además, de proporcionar bases para futuros estudios nutricionales de la chita.

## 1.3 Hipótesis

La descripción morfológica (histología) y funcional (actividad enzimática) del sistema digestivo, durante el desarrollo larvario de la chita (*Anisotremus scapularis*), permitirá hacer inferencias sobre su capacidad digestiva y ayudarán a proponer el momento adecuado para realizar el destete y reducir el uso de alimento vivo durante el cultivo larvario.

## 1.4 Objetivos

### 1.4.1 Objetivo general

Caracterizar la capacidad digestiva de las larvas de chita bajo cultivo a través de la descripción histológica de su sistema digestivo y de la actividad de sus principales enzimas digestivas.

### 1.4.2 Objetivos específicos

- Describir histológicamente la morfogénesis del sistema digestivo durante la ontogenia de las larvas de *A. scapularis*.
- Caracterizar la actividad proteolítica total (ácida y alcalina), tripsina, leucina aminopeptidasa, lipasas dependientes de sales biliares y alfa-amilasa durante la ontogenia del sistema digestivo de las larvas de *A. scapularis*.

## Capítulo 2. Materiales y métodos

---

Las larvas fueron cultivadas a partir de huevos obtenidos de desoves naturales de un lote de reproductores que se mantienen en cautiverio en el Laboratorio de Cultivo de Peces del Instituto del Mar del Perú (IMARPE). Los reproductores se encuentran acondicionados en tanques de 2500 L de capacidad, acoplados a sistemas de recirculación de agua de mar, los cuales constan de equipos separados para la filtración mecánica, filtración biológica, esterilización con luz ultravioleta (UV) y bombas de calor para regular la temperatura; además, de contar con un sistema de iluminación para simular el fotoperiodo durante el acondicionamiento.

### 2.1 Sistema de cultivo

Las larvas recién eclosionadas se sembraron en tanques de 100 a 300 L de capacidad, con agua de mar filtrada y esterilizada por radiación UV a una densidad de 10 a 15 larvas L<sup>-1</sup>. Inicialmente, las larvas se cultivaron en forma estática (sin flujo de agua), posteriormente, a medida que se desarrollaron, la tasa recambio diaria se incrementó en forma gradual hasta el 100%.

La temperatura, oxígeno y pH, se midieron diariamente con un analizador multi-parámetro portátil (Thermo Scientific), los valores promedio fueron  $20.77 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$ ,  $6.77 \pm 0.14 \text{ mg L}^{-1}$ , y  $7.94 \pm 0.04$ , respectivamente.

### 2.2 Protocolo de alimentación

La alimentación exógena inició a partir del segundo día después de la eclosión (DDE) con rotíferos enriquecidos (rot), a una densidad promedio de 1 rot ml<sup>-1</sup>, posteriormente se incrementó en forma gradual hasta llegar a 10 rot ml<sup>-1</sup>. A los 21 DDE se inició el

cambio gradual de los rotíferos por metanauplios de *Artemia* sp. enriquecidos (art), comenzando con una densidad de 1 art ml<sup>-1</sup> e incrementándola hasta 5 art ml<sup>-1</sup>.

Los rotíferos y metanauplios de *Artemia* sp. fueron suministrados por el Laboratorio de Alimento Vivo del IMARPE. Los rotíferos se cultivaron en tanques cónicos de 210 L de capacidad, mantenidos a 25°C, con una salinidad de 27 ppm e iluminados continuamente con lámparas fluorescentes. Se alimentaron con *Nannochloropsis oceánica* y levadura, esta última a una concentración de 1 g por cada millón de rotíferos.

Para la producción de metanauplios, los quistes de *Artemia* (INVE Aquaculture) fueron hidratados en agua dulce por una hora con aireación constante, para posteriormente ser decapsulados con una solución de hipoclorito de sodio al 5% e hidróxido de sodio y se lavaron con agua corriente. La eclosión se realizó en tanques cilíndricos de 25 L, a una temperatura de 28°C, con luz y aireación constante.

Los rotíferos y metanauplios de *Artemia* sp. fueron enriquecidos con un producto comercial (Super SELCO®, INVE Aquaculture) siguiendo las recomendaciones del proveedor, por un periodo de 12 horas antes de ser suministrados a las larvas.

### **2.3 Muestreo de las larvas**

La cuantificación del crecimiento en longitud, los análisis histológicos y la caracterización enzimática se realizaron a partir de muestras de larvas colectadas diariamente desde la eclosión hasta los 4 DDE, cada dos días de los 6 a los 10 DDE y por último, cada 4 días de los 14 a los 30 DDE. Se realizaron 2 colectas, en los meses de febrero y abril del 2015, a los cuales se les denominó Ensayo 1 y 2, respectivamente. Cada ensayo provino de un mismo desove, excepto por las larvas colectadas a los 26 y 30 DDE del Ensayo 1; sin embargo, fueron cultivadas en condiciones muy similares.

## **2.4 Crecimiento larvario**

Se seleccionaron al azar 5 larvas de los tanques de cultivo y se midió su longitud total (mm) en un microscopio estereoscópico (Leica), con una cámara digital incorporada y el programa de imágenes Leica Application Suite Vision 4.3 (LAS Vision 4.3).

Adicionalmente, se evaluó el crecimiento en peso (peso seco) de las larvas al inicio, mitad y final de las colectas. Este fue determinado a través de la medición de una muestra de larvas, previamente secadas a 65°C por 24 h (Pepin, 1995), utilizando una balanza analítica (precisión 0.0001 g; Sartorius).

## **2.5 Análisis histológico**

Los muestreos se realizaron antes de la primera alimentación del día, en las fechas señaladas anteriormente, se colectaron en total 15 larvas por día, las cuales fueron fijadas en formol al 10% amortiguado. El tiempo de fijación fue de 24 a 96 h de acuerdo con el tamaño de las larvas, una vez transcurrido este tiempo se transfirieron a una solución de alcohol al 70% para eliminar el exceso de fijador.

Posteriormente en el Laboratorio de Biología y Patología de Organismos Acuáticos del CICESE, las larvas fueron sometidas a un proceso de deshidratación, aclaración en benceno e inclusión en parafina. Se realizaron cortes sagitales de 5  $\mu\text{m}$  de espesor utilizando un micrótopo de rotación (Leica), los cuales fueron colocados en serie en portaobjetos recubiertos de gelatina y teñidos utilizando la técnica de tinción hematoxilina-eosina (Humason, 1979). Todas las series de láminas de las larvas procesadas fueron analizadas y fotografiadas empleando un microscopio óptico (Leica) con una cámara digital incorporada y el programa de imágenes LAS Vision 4.3.

## 2.6 Actividad enzimática

Los muestreos para caracterizar la actividad enzimática se realizaron antes de la primera alimentación, en las fechas señaladas anteriormente, se muestrearon en total 30 larvas por día. Las larvas se mantuvieron aisladas en un recipiente con agua de mar filtrada, por un período mínimo de 1 hora para vaciar el intestino, con la intención de minimizar el efecto de la actividad enzimática de las presas ingeridas por las larvas en las mediciones de actividad enzimática (Lazo *et al.*, 2000a). Posteriormente, las larvas se sacrificaron con la exposición a una sobredosis de anestésico (Metasulfonato de tricaína – MS 222). Finalmente, las larvas se lavaron con agua destilada, se secaron en papel filtro y se liofilizaron y almacenaron a -80°C.

En el Laboratorio de Alimentación y Nutrición de Organismos Marinos del CICESE, las larvas fueron disecadas sobre un portaobjetos previamente enfriado con hielo seco bajo un microscopio estereoscópico (Olympus) para eliminar la región caudal y la cabeza, intentando disecar solamente el sistema digestivo; este procedimiento se realizó en las larvas mayores a 10 DDE, debido a que las larvas de 0 a 8 DDE son muy pequeñas para aplicar este procedimiento.

Las larvas y/o sistemas digestivos fueron concentrados en microtubos de centrifuga, en grupos de 10 (0-22 DDE) y 5 (26-30 DDE). Posteriormente cada grupo se homogenizó en 1000 µL de buffer Tris base-HCl 20 mM (pH 7.5) empleando un homogenizador de tejidos manual (Kontes). Excepto para la medición de leucina aminopeptidasa, los homogenizados fueron centrifugados (centrífuga Eppendorf 5417R) a 1700 g durante 30 min y a una temperatura de 4°C (Lazo *et al.*, 2000a). Las muestras fueron almacenados a -80°C hasta que se hicieron los análisis enzimáticos.

La evaluación de las enzimas digestivas de la chita, proteasas, lipasas dependientes de sales biliares y alfa-amilasa fue realizada empleando sustratos específicos y generales, en los cuales se midió espectrofotométricamente los productos de la hidrólisis de los sustratos por parte de las enzimas. En relación a las proteasas, se evaluó la actividad proteolítica alcalina y ácida total, la actividad de tripsina y leucina aminopeptidasa (enzima indicadora de la hidrólisis de proteínas a nivel intestinal).

La actividad proteolítica alcalina y ácida total se cuantificó empleando el método sugerido por Sarath *et al.* (2001). Para la actividad alcalina se utilizó como sustrato azocaseína al 2% disuelta en buffer Tris base-HCl 50 mM con 10 mM CaCl<sub>2</sub> (pH 9). La reacción inició con 105 µl de sustrato y 70 µl de extracto enzimático, la incubación se realizó por 30 min (larvas de 10 a 22 DDE) o 60 min (larvas de 0 a 8 DDE) a 37°C y se paró con 525 µl de ácido tricloroacético al 10%. Se eliminó la proteína precipitada por centrifugación a 19000 g durante 5 min a 4°C. La absorbancia del sobrenadante se leyó a 366 nm.

Para la actividad proteolítica ácida se utilizó como sustrato una solución de hemoglobina al 1% disuelta en agua destilada y urea (1:1) y ajustada a un pH de 2 con buffer KCl-HCl 0.2 M. El extracto enzimático (50 µl) se incubó por 10 min a 37°C con 150 µl de sustrato y se paró la reacción con 300 µl de ácido tricloroacético al 5%. La proteína precipitada se eliminó por centrifugación a 19000 g durante 5 min a 4°C. La absorbancia del sobrenadante se leyó a 280 nm.

La actividad de la tripsina se cuantificó según el método sugerido por Erlanger *et al.* (1961), el cual emplea como sustrato BAPNA (N $\alpha$ -Benzoyl-DL-arginine 4-nitroanilide) 1 mM disuelto en DMSO (dimetil sulfóxido) a un pH de 8.2, ajustado con un buffer 50 mM Tris base-HCl conteniendo 20 mM CaCl<sub>2</sub>. La reacción inició con 490 µl de sustrato y 70 µl de extracto enzimático, se incubó de 30 a 60 minutos a 37°C y se paró la reacción con 140 µl de ácido acético al 30%. La absorbancia se leyó a 410 nm.

Para la cuantificación de la actividad de leucina aminopeptidasa se empleó el protocolo de Appel (1974), utilizando como sustrato L-Leucine-p-nitroanilide 1.2 mM disuelto en DMSO y buffer Tris base-HCl 50 mM (pH 8.0). El extracto enzimático (60 µl) reaccionó en 540 µl de sustrato, durante 30 minutos de incubación a 37°C. La reacción se paró con 150 µl de ácido acético al 30%. La absorbancia fue leída a 405 nm.

La cuantificación de la actividad de las lipasas dependientes de sales biliares se realizó con base en el método descrito por Gjellesvik *et al.* (1992), utilizando como sustrato 4-Nitrophenyl myristate 0.56 mM disuelto en DMSO a un pH de 8.5, con un buffer Tris base-HCl 0.15 M y taurocolato de sodio 15 mM. La reacción se realizó con 630 µl de

sustrato y 48  $\mu\text{l}$  de extracto enzimático, se leyó la absorbancia inicial a 405 nm (tiempo 0) y se monitoreó durante 1 h con lecturas cada 5 min. La temperatura de reacción fue de 37°C.

Para cuantificar la actividad de alfa-amilasa se utilizó la metodología descrita en el Manual de Análisis Enzimáticos de la Worthington Biochemical Corporation (1993), utilizando almidón al 1% como sustrato, disuelto en buffer fosfato 0.02 M con 6 mM NaCl y ajustado a un pH de 6.9. El producto de la reacción fue visualizado por tinción con una solución compuesta de 3,5 ácido dinitrosalicílico al 1%, tartrato potásico sódico tetrahidratado al 30% y NaOH 2 N. La reacción se realizó con 50  $\mu\text{l}$  de sustrato y 50  $\mu\text{l}$  de extracto enzimático, se incubó por 3 minutos a 25°C y se adicionaron 100  $\mu\text{l}$  de la solución de tinción, posteriormente se realizó otra incubación por 5 minutos a 100°C, finalmente se adicionó 1 ml de agua destilada y realizaron lecturas de absorbancia a 540 nm.

Adicionalmente a los análisis enzimáticos, se cuantificó la concentración de proteínas solubles a cada homogenizado con base en el método de Bradford (1976), desarrollando el procedimiento del microensayo de Bio-Rad (Catálogo #500-0205). Se utilizó suero de albúmina bovina (2 mg  $\text{ml}^{-1}$ ) como estándar y se elaboró una curva de calibración con concentraciones de 0 a 25  $\mu\text{g ml}^{-1}$ . Para ajustar la concentración de los extractos, se aplicaron factores de dilución de 2, 10 y 20 utilizando agua destilada, para las larvas de 8 a 10 DDE, 14 a 18 DDE, y de 22 a 30 DDE respectivamente.

Los blancos se prepararon sustituyendo el extracto enzimático por el buffer correspondiente a cada análisis. Se prepararon curvas con tripsina, pepsina, lipasa y alfa-amilasa comercial a concentraciones de 90 a 450  $\mu\text{g ml}^{-1}$  y leucina aminopeptidasa comercial a concentraciones de 18 a 90  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , como controles internos.

Los ensayos de proteasas, lipasas y alfa-amilasa se realizaron por triplicado y los resultados se expresaron como la actividad total y específica. La actividad total (U/larva) expresa la actividad enzimática por larva, una unidad (U) fue definida como el incremento en absorbancia que produce el sustrato formado por unidad de tiempo durante la reacción catalizada por la enzima. La actividad específica (U/ $\mu\text{g}$  proteína)

expresa la actividad enzimática en relación a la cantidad de proteínas solubles totales de las larvas. Las fórmulas utilizadas fueron las siguientes:

$$\text{Actividad total (U/larva)} = \frac{\left(\frac{\text{Abs}}{\text{tiempo}}\right) \times \text{FD} \times \text{VH}}{E \times V} \\ \text{N}^\circ \text{ larvas en el homogenizado}$$

$$\text{Actividad específica (U/}\mu\text{g proteína)} = \frac{\text{Actividad total}}{\text{Microgramos de proteína soluble por larva}}$$

Donde:

Abs: Absorbancia de la muestra – absorbancia del blanco.

tiempo: Tiempo de incubación.

FD: Factor de dilución.

VH: Volumen del homogenizado (1000  $\mu\text{l}$ ).

V: Volumen del extracto enzimático utilizado en la reacción.

E: Coeficiente de extinción (0.01 proteasas ácidas y alcalinas totales y tripsina, 0.1 leucina aminopeptidasa, lipasas y alfa-amilasa).

U: incremento de 0.01 unidades de absorbancia por minuto (0.1 unidades en leucina aminopeptidasa, lipasas y alfa-amilasa).

$\mu\text{g}$  proteína: Microgramos de proteína soluble por larva.

## 2.7 Análisis estadístico

Los resultados de los análisis enzimáticos de proteasas, lipasas y alfa-amilasa se expresaron como media  $\pm$  error estándar de tres réplicas. Se hicieron comparaciones estadísticas de la actividad total de las enzimas evaluadas y del crecimiento entre los dos ensayos. La actividad total y el crecimiento presentaron una distribución no lineal (prueba de Kolmogorov-Smirnov), por ello se utilizó el análisis de varianza (ANOVA) de dos vías con el procedimiento GLM (Modelo General Linearizado), una alternativa a la transformación de la variable de respuesta y a la falta de normalidad. Luego de establecer diferencias significativas, se utilizó la prueba a posteriori de Tukey para comparar las medias entre los diferentes días después de la eclosión de los dos ensayos. El nivel de significancia establecido fue de 0.05 y todos los análisis fueron realizados con el programa estadístico R (R Core Team, 2014).

## Capítulo 3. Resultados

### 3.1 Crecimiento larvario

Las larvas recién eclosionadas tuvieron una longitud total promedio de  $2.73 \pm 0.03$  mm (Ensayo 1) y  $2.45 \pm 0.02$  mm (Ensayo 2) y crecieron exponencialmente hasta alcanzar una longitud de  $11.91 \pm 0.36$  mm (Ensayo 1) y  $10.43 \pm 0.53$  mm (Ensayo 2) a los 30 DDE (Figura 3). No se observaron diferencias significativas en el crecimiento en longitud entre los dos ensayos; sin embargo, se presentó una mayor tasa de crecimiento específico en el Ensayo 1 ( $4.91\%$  día<sup>-1</sup>) que en el Ensayo 2 ( $4.83\%$  día<sup>-1</sup>).

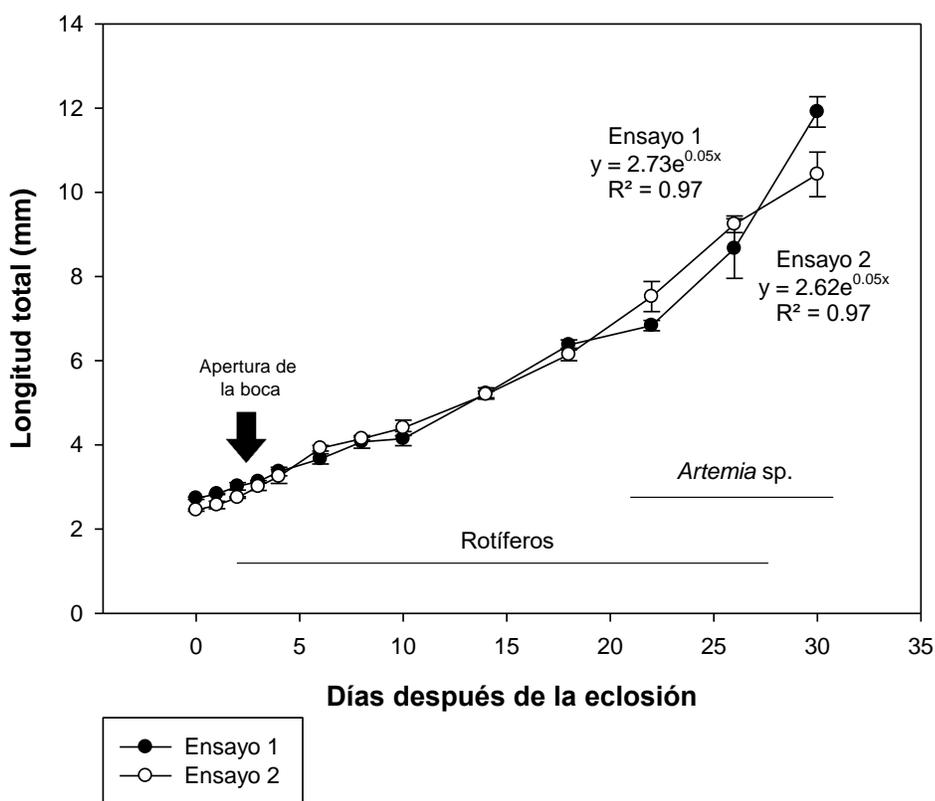
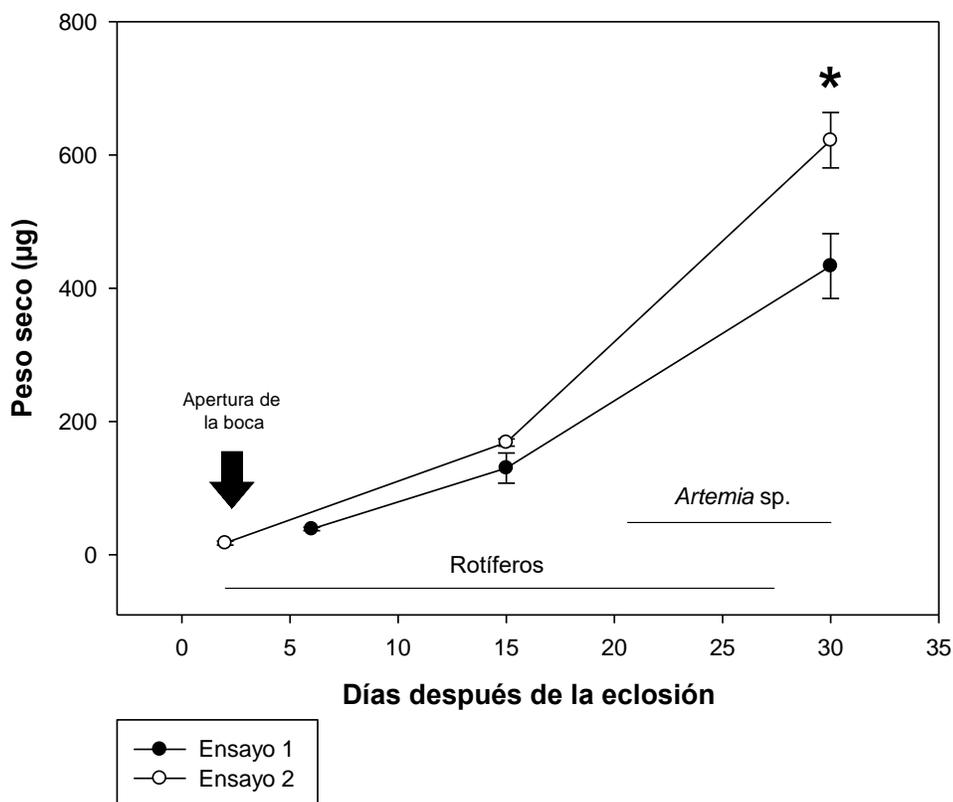


Figura 3. Crecimiento en longitud total de las larvas de chita *Anisotremus scapularis*, durante los Ensayos 1 y 2, de 0 a 30 días después de la eclosión. Las líneas horizontales indican el tipo de alimento y la flecha señala el momento de la apertura de la boca.

En relación con peso seco (Figura 4), se observó que a los 30 DDE las larvas del Ensayo 2 tuvieron un peso mayor.



**Figura 4.** Crecimiento en peso seco de las larvas de chita *Anisotremus scapularis*, durante los Ensayos 1 y 2, de 0 a 30 días después de la eclosión. Las líneas horizontales indican el tipo de alimento y la flecha señala el momento de la apertura de la boca. El asterisco (\*) señala diferencias significativas en los DDE entre ensayos.

### 3.2 Análisis histológico

Las características morfológicas del sistema digestivo durante el desarrollo de las larvas de chita se muestran en la Figura 5 y se resumen en la Tabla 1. Al momento de la eclosión las larvas tienen una longitud total (LT) de  $2.59 \pm 0.05$  mm, poseen un tubo digestivo recto, con un lumen estrecho, sin segmentación, ni aberturas al exterior (boca y ano cerrados) y ubicado dorsalmente con respecto al saco vitelino, de coloración eosinófila, que se caracteriza por poseer una gota de aceite y varias inclusiones lipídicas en su periferia (Figura 6).

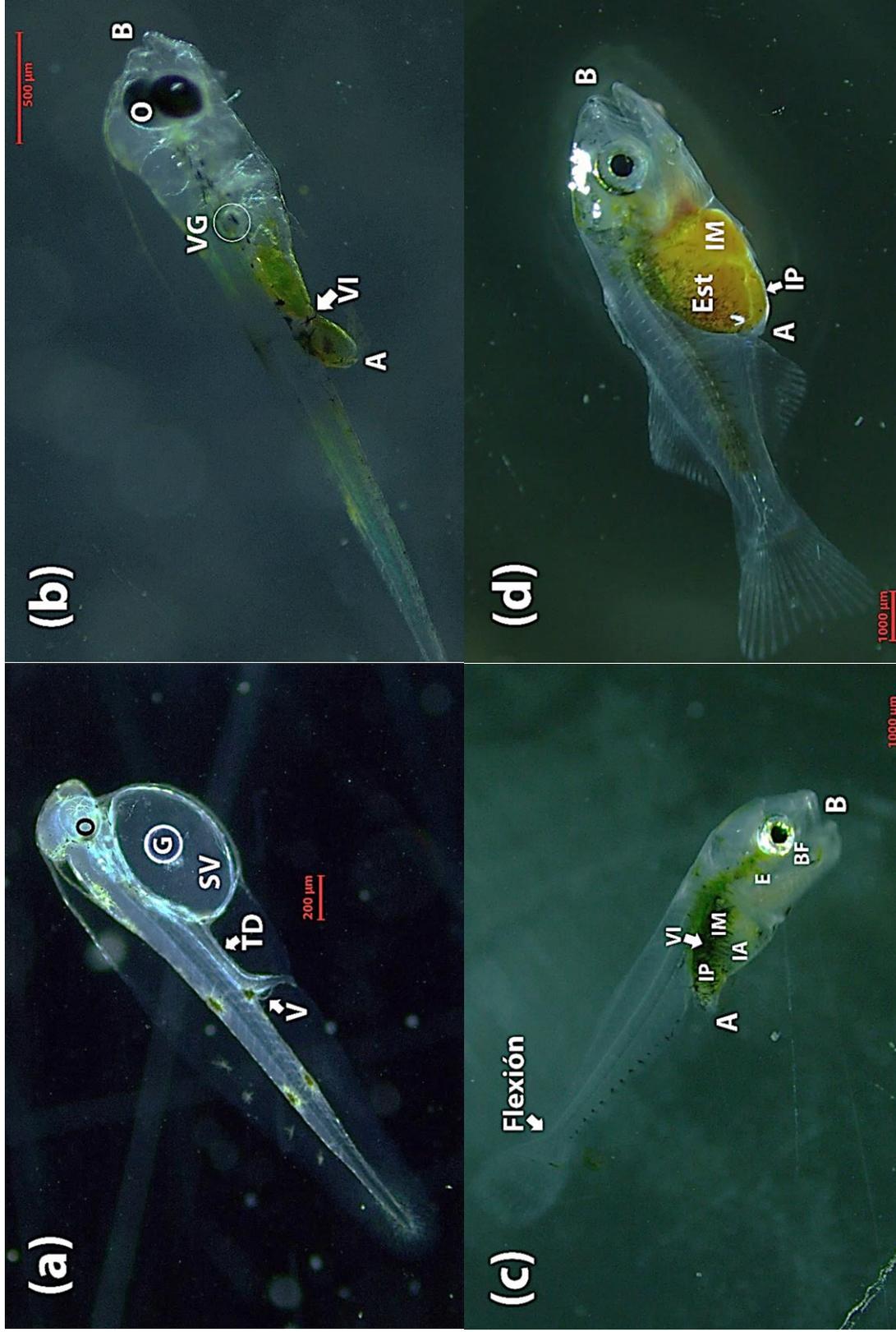
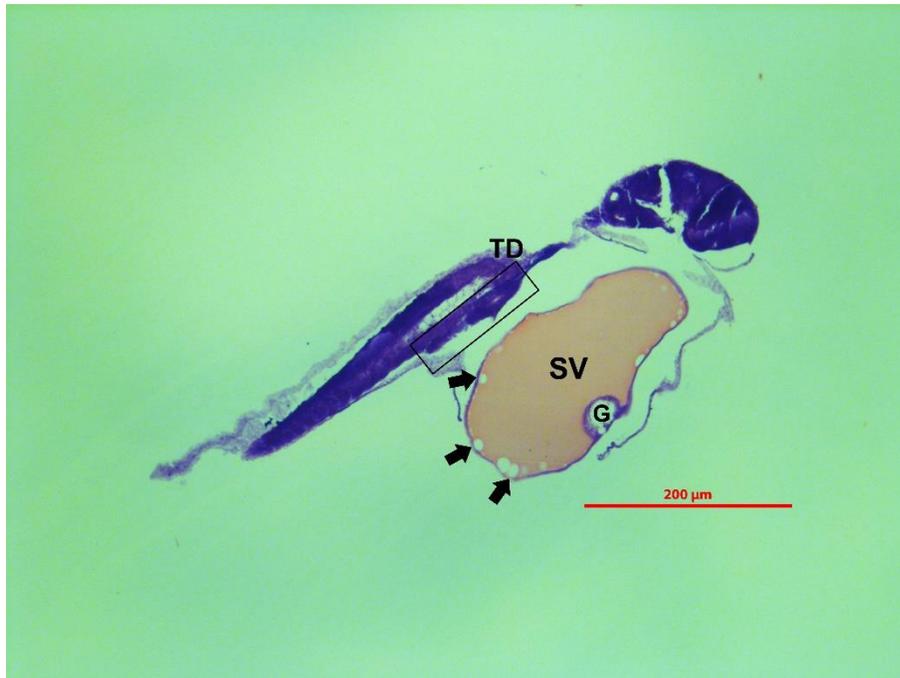


Figura 5. Características morfológicas de las larvas de chita *Anisotremus scapularis* de diferentes edades. (a) Larva de 6 DDE (contraste de fase). (b) Larva de 18 DDE. (c) Larva de 30 DDE. (d) Larva de 30 DDE. A, ano; B, boca; BF, bucofaringe; E, esfago; Est, estómago; G, gota de aceite; H, hígado; VI, válvula intestinal; IA, intestino anterior; IM, intestino medio; IP, intestino posterior; O, ojo; SV, saco vitelino; VG, vejiga gaseosa.



**Figura 6.** Corte histológico de una larva de chita *Anisotremus scapularis* recién eclosionada. El rectángulo señala el tubo digestivo (TD) y las flechas (→) las inclusiones lipídicas del saco vitelino (SV). G, gota de aceite.

Al primer DDE ( $2.70 \pm 0.06$  mm de LT) se observaron los ojos en desarrollo, el tubo digestivo más largo, con el lumen más amplio (comparado con las larvas recién eclosionadas), y el primordio de la vejiga urinaria adyacente a la parte posterior del tubo digestivo (Figura 7). A partir de los 2 DDE ( $2.88 \pm 0.06$  mm de LT) el tubo digestivo comienza a curvarse ventralmente hacia la región posterior y el saco vitelino toma una apariencia granular con una coloración fuertemente eosinófila, su tamaño se ha reducido por la absorción de los nutrientes como parte de la alimentación endógena de la larva (Figura 8). Algunas larvas abrieron la boca; sin embargo, esta característica fue más evidente a los 3 DDE.

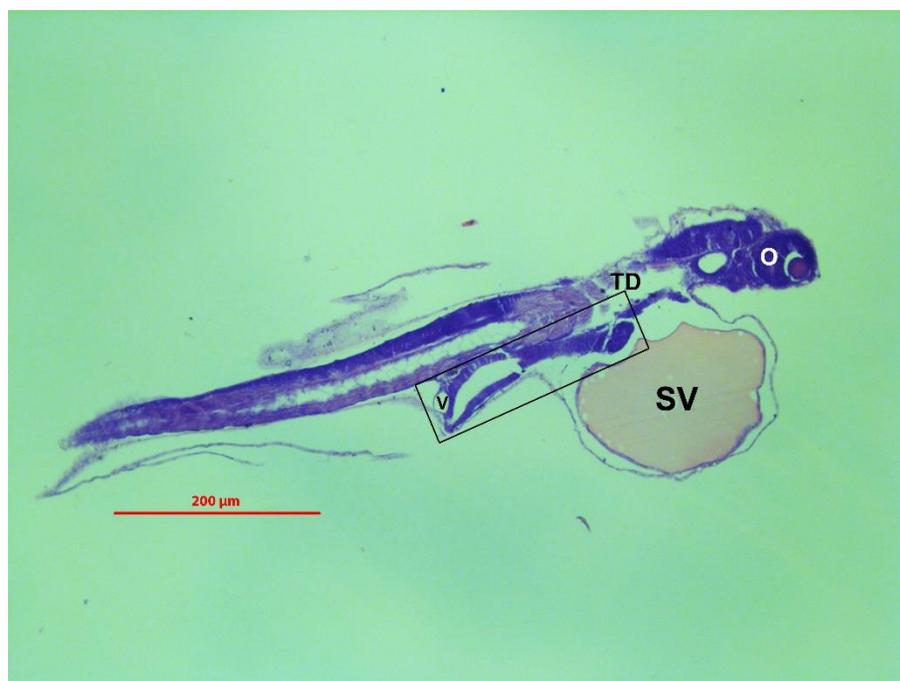


Figura 7. Corte histológico de una larva de chita *Anisotremus scapularis* de 1 día después de la eclosión. El rectángulo señala el tubo digestivo (TD). O, ojo; SV, saco vitelino; V, vejiga urinaria.



Figura 8. Corte histológico de una larva de chita *Anisotremus scapularis* de 2 días después de la eclosión. El rectángulo señala el tubo digestivo (TD). G, gota de aceite; H, hígado; O, ojo; P, páncreas; SV, saco vitelino.

A partir de los 3 DDE ( $3.07 \pm 0.05$  mm de LT) el tubo digestivo de las larvas de chita comenzó su diferenciación en tres regiones histológicas: bucofaringe, esófago e intestino. Los ojos se observaron con una mayor estratificación de su retina y más pigmentados. Se observó el primordio de la vejiga gaseosa en la región dorsal anterior del tubo digestivo y el riñón en desarrollo, con sus conductos renales que desembocaban en la vejiga urinaria. En relación al sistema respiratorio, a partir de este día se observaron los arcos branquiales (Figura 9).

A los 6 DDE ( $3.79 \pm 0.08$  mm de LT) no se observaron restos del saco vitelino y la gota de aceite, lo que indica su total absorción. La vejiga gaseosa se observó más diferenciada, con la glándula del gas en su región anterior y la rete mirabilis en su región posterior (Figura 10).

A medida que las larvas se desarrollaron, los órganos que conforman el sistema digestivo y sus glándulas anexas incrementaron su tamaño y no se observaron mayores cambios, hasta el comienzo del desarrollo del estómago a los 26 DDE ( $8.95 \pm 0.36$  mm de LT). En el último día de muestreo, a los 30 DDE ( $11.17 \pm 0.39$  mm de LT), la vejiga gaseosa se observó completamente inflada, el riñón con un mayor grado de desarrollo y los arcos branquiales con la formación de filamentos y lamelas branquiales (Figura 11).

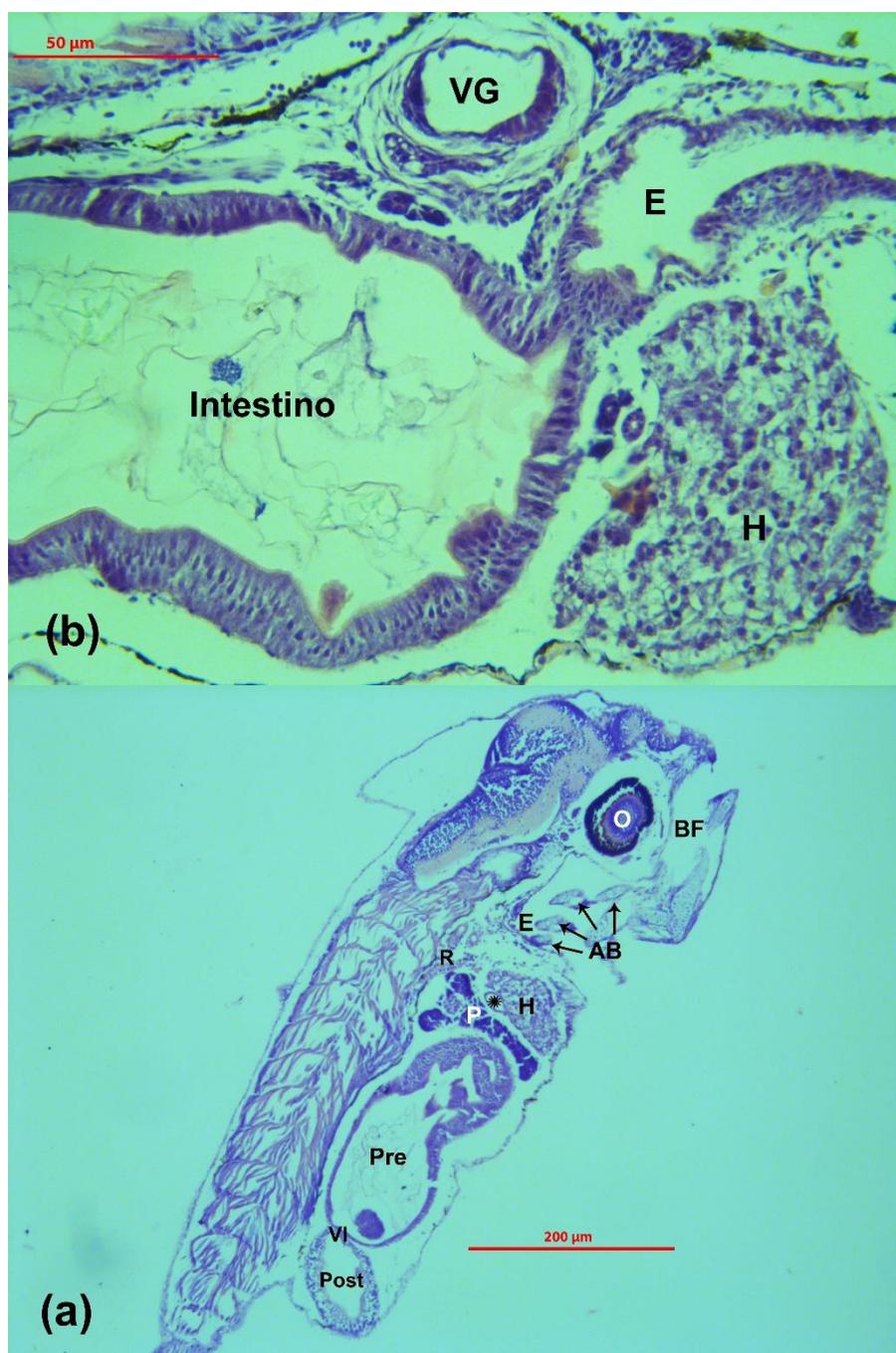


Figura 9. Corte histológico de una larva de chita *Anisotremus scapularis* de 3 días después de la eclosión, el asterisco (\*) de la figura (a) señala la vesícula biliar y la vejiga gaseosa (VG) se observa en la figura (b). AB, arcos branquiales; BF, bucofaringe; E, esófago; H, hígado; O, ojo; P, páncreas; Pre, región pre-valvular; Post, región post-valvular; R, riñón; VI, válvula intestinal.

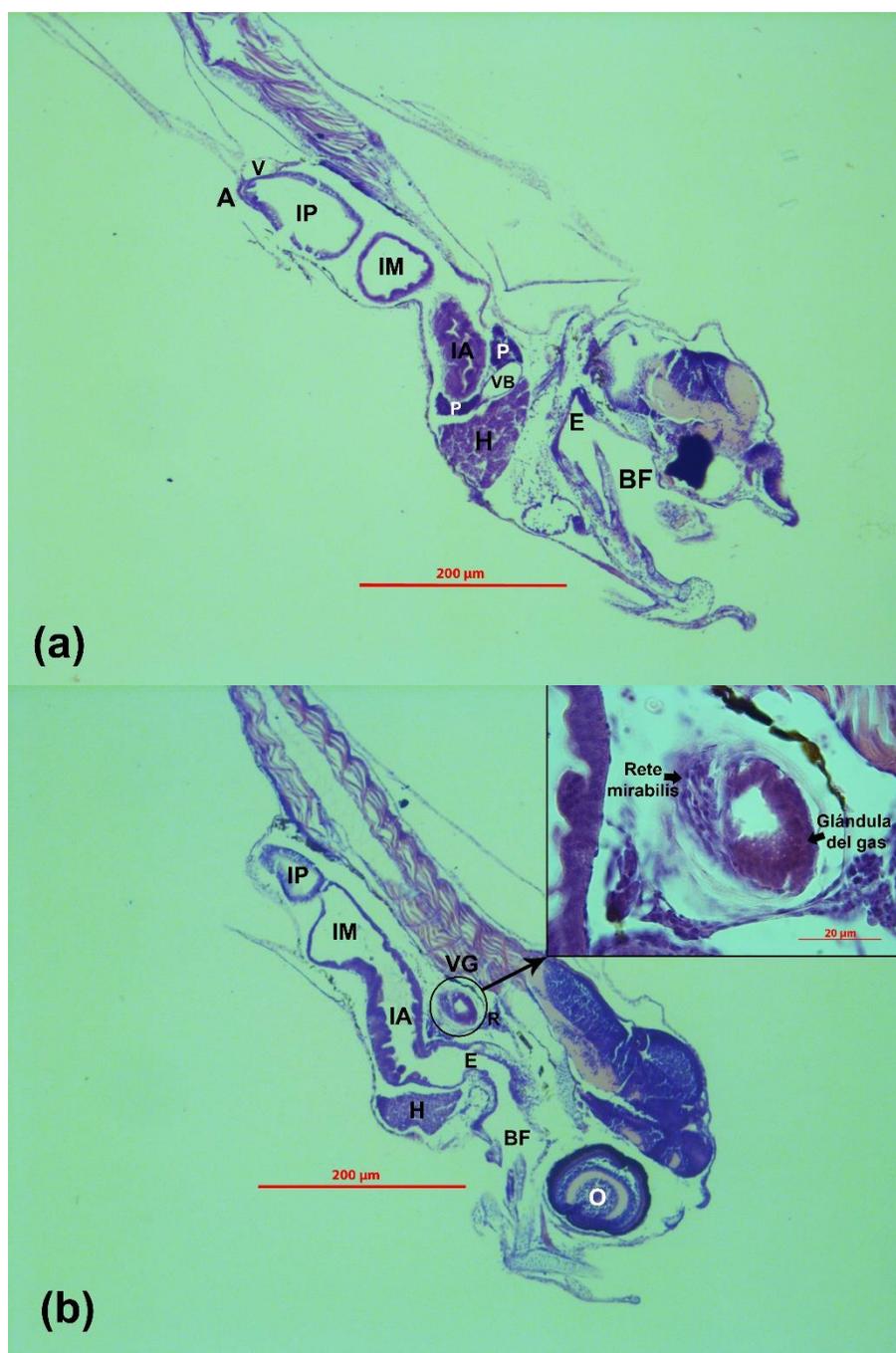


Figura 10. Corte histológico de una larva de chita *Anisotremus scapularis* de 6 días después de la eclosión, la vejiga gaseosa (VG) se observa en la figura (b). A, ano; BF, bucofaringe; E, esófago; H, hígado; IA, intestino anterior; IM; intestino medio; IP, intestino posterior; P, páncreas; R, riñón; V, vejiga urinaria; VB, vesícula biliar.

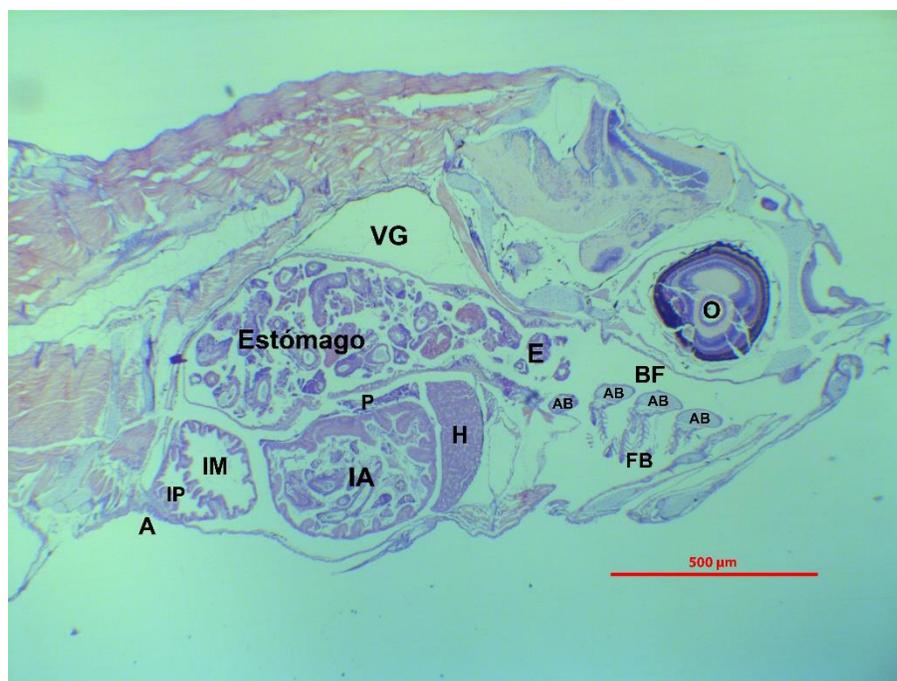


Figura 11. Corte histológico de una larva de chita *Anisotremus scapularis* de 30 días después de la eclosión. AB, arcos branquiales; A, ano; BF, bucofaringe; E, esófago; FB, filamentos branquiales; H, hígado; IA, intestino anterior; IM; intestino medio; IP, intestino posterior; O, ojo; P, páncreas; VG, vejiga gaseosa.

**Tabla 1. Resumen de los principales eventos en el desarrollo de los componentes del sistema digestivo de larvas de chita *Anisotremus scapularis*.**

Componente	Eventos	Día después de la eclosión (DDE)	Longitud total (mm)
<b>Bucofaringe</b>	Apertura de la boca	2-3	2.88 ± 0.06
	Células mucosas	8	4.11 ± 0.07
	Papilas gustativas	8	4.11 ± 0.07
	Lengua	8	4.11 ± 0.07
	Dientes faríngeos	14	5.21 ± 0.07
	Dientes mandibulares	26	8.95 ± 0.36
<b>Esófago</b>	Células mucosas	4	3.31 ± 0.09
	Regionalización	6	3.79 ± 0.08
	Pliegues longitudinales	18	6.26 ± 0.10
<b>Estómago</b>	Glándulas gástricas	26	8.95 ± 0.36
<b>Intestino</b>	Válvula intestinal	3	3.07 ± 0.05
	Microvellosidades	3	3.07 ± 0.05
	Pliegues intestinales	4	3.31 ± 0.09
	Torsión	6	3.79 ± 0.08
	Células mucosas	6	3.79 ± 0.08
	Vacuolas supranucleares	4	3.31 ± 0.09
	Inclusiones lipídicas	22	7.18 ± 0.21
	En desarrollo	2-3	2.88 ± 0.06
<b>Hígado</b>	Conducto hepático	4	3.31 ± 0.09
	Sinusoides	6	3.79 ± 0.08
	Inclusiones lipídicas	22	7.18 ± 0.21
	Vesícula biliar	3	3.07 ± 0.05
	En desarrollo	2-3	2.88 ± 0.06
<b>Páncreas</b>	Islote de Langerhans	3	3.07 ± 0.05
	Conducto pancreático	4	3.31 ± 0.09

### 3.2.1 Bucofaringe

Con la apertura de la boca, entre 2 y 3 DDE, se observó una bucofaringe corta revestida por epitelio plano o escamoso. A partir de los 8 DDE (4.11 ± 0.07 mm de LT), células mucosas o caliciformes, cuyas secreciones facilitan el paso de los alimentos por el tubo digestivo, se evidenciaron en el epitelio de la bucofaringe. En este mismo periodo se observó un engrosamiento del piso oral, estructura parecida a una lengua pero no muscularizada.

A partir de esta edad, se observaron las papilas gustativas (células sensoriales) que fueron más evidentes a los 18 DDE ( $6.26 \pm 0.10$  mm de LT). A los 14 DDE ( $5.21 \pm 0.07$  mm de LT), inicia el desarrollo de los dientes en la faringe y posteriormente en la mandíbula (26 DDE,  $8.95 \pm 0.36$  mm de LT).

Con el desarrollo de las larvas, la bucofaringe aumentó su extensión y el epitelio se estratificó; además, las células mucosas, papilas gustativas y dientes se incrementaron en número en la mucosa de este órgano (Figura 12).

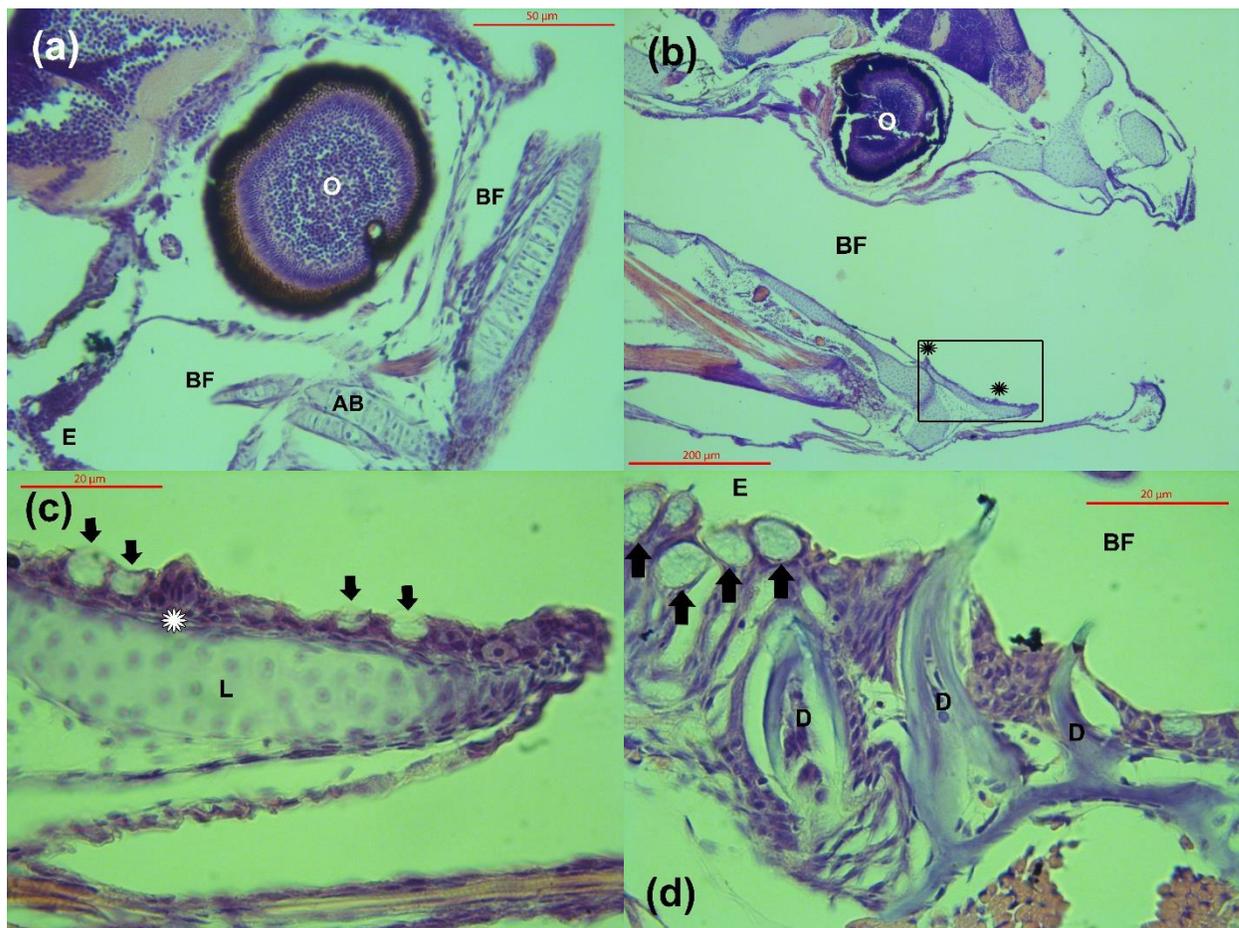


Figura 12. Corte histológico de la bucofaringe de las larvas de chita *Anisotremus scapularis* de diferentes edades. (a) Larva de 3 DDE. (b) Larva de 26 DDE, el rectángulo señala la lengua. (c) Lengua de la larva a 26 DDE. (d) Larva de 30 DDE. Las flechas ( $\rightarrow$ ) señalan las células mucosas y los asteriscos (\*) las papilas gustativas. AB, arco branquial; BF, bucofaringe; D, diente; E, esófago; L, lengua; O, ojo.

### 3.2.2 Esófago

El esófago se observó un día después del inicio de la alimentación exógena y a partir del 4 DDE ( $3.31 \pm 0.09$  mm de LT) se caracterizó por las células caliciformes, que aumentaron en número a medida que se desarrollaron las larvas.

A partir de los 6 DDE ( $3.79 \pm 0.08$  mm de LT), el esófago se regionalizó en dos secciones, anterior y posterior, la primera está revestida por un epitelio estratificado y una mayor abundancia de células caliciformes; y, la segunda, tiene un epitelio simple sin células caliciformes. En la región posterior del esófago se desarrollará el estómago.

No se observaron mayores cambios en el esófago hasta los 18 DDE ( $6.26 \pm 0.10$  mm de LT), cuando la mucosa desarrolló pliegues longitudinales que, aumentaron su superficie y el número de células caliciformes. Adicionalmente, con el desarrollo de las larvas, la capa muscular que rodea a este órgano aumentó de grosor y se evidenció un esfínter pilórico, que separará al estómago del intestino anterior (Figura 13).

### 3.2.3 Estómago

El estómago se observó por primera vez a los 26 DDE ( $8.95 \pm 0.36$  mm de LT), como una dilatación de la parte posterior del esófago, en su mucosa se desarrollan los primordios de las glándulas gástricas, como pequeños grupos de células cúbicas en disposición acinar.

El estómago está cubierto por un epitelio simple cúbico que forma pliegues cortos transversales. La capa muscular se observó con un mayor grosor que la del intestino. A los 30 DDE ( $11.17 \pm 0.39$  mm de LT), las glándulas gástricas se observaron dispuestas en un mayor número en la mucosa de la región anterior del estómago (Figura 14); además, la capa muscular aumentó en grosor y el esfínter pilórico se observó más desarrollado.

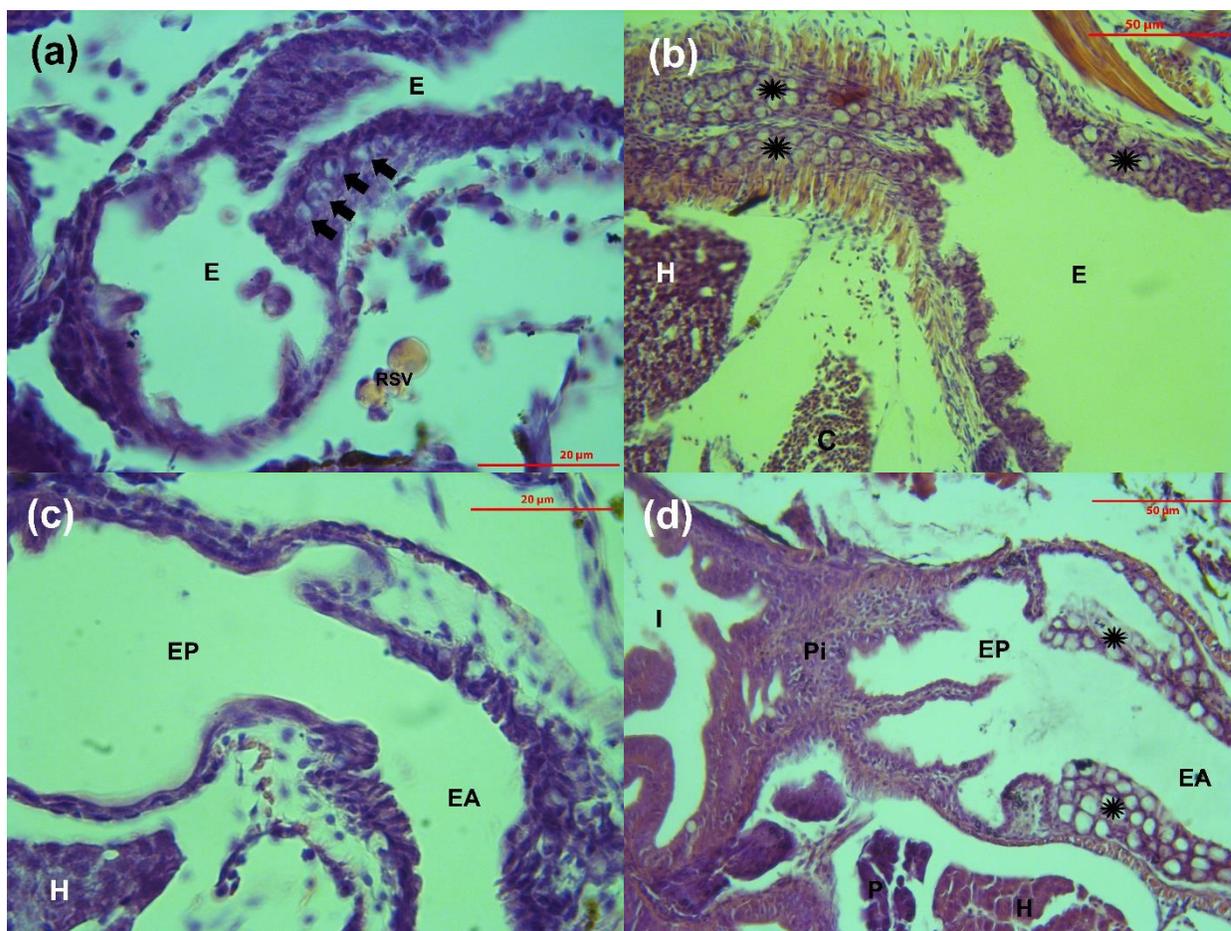


Figura 13. Corte histológico del esófago de las larvas de chita *Anisotremus scapularis* de diferentes edades. (a) Larva de 4 DDE, las flechas (→) señalan las células mucosas. (b) Larva de 26 DDE, los asteriscos (\*) señalan las células mucosas. (c) Larva de 6 DDE, región anterior (EA) y posterior (EP). (d) Larva de 18 DDE, los asteriscos (\*) señalan los pliegues longitudinales. C, corazón; E, esófago; H, hígado; P, páncreas; Pi, esfínter pilórico en desarrollo; RSV, restos del saco vitelino.

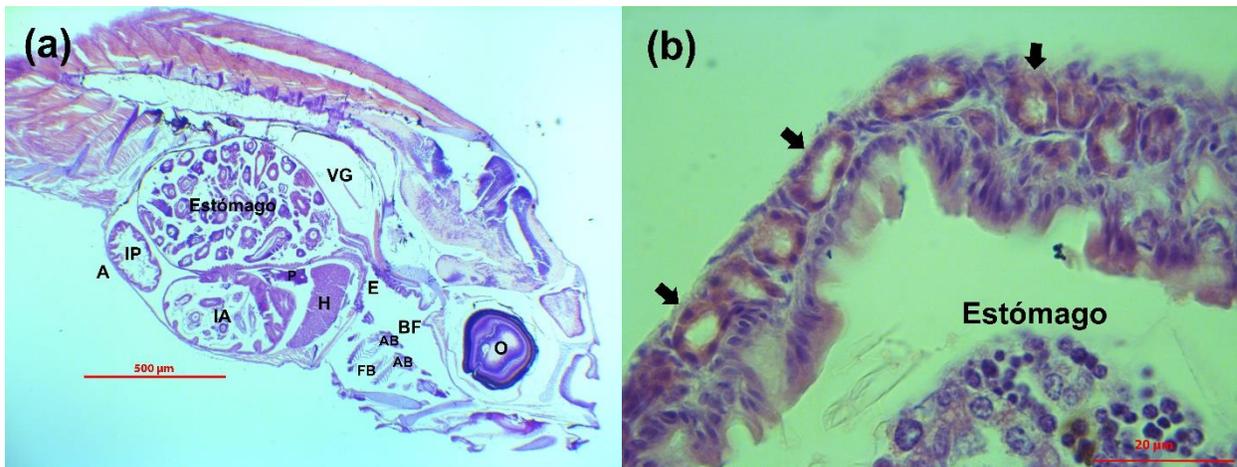


Figura 14. Corte histológico de una larva de chita *Anisotremus scapularis*. (a) Larva de 30 DDE. (b) Detalle de las glándulas gástricas, señaladas por flechas (→). A, ano; AB, arco branquial; BF, bucofaringe; E, esófago; FB, filamento branquial; H, hígado; IA, intestino anterior; IP, intestino posterior; O, ojo; P, páncreas; VG, vejiga gaseosa.

### 3.2.4 Intestino

El intestino se observó como un tubo recto indiferenciado en las larvas recién eclosionadas, con un lumen estrecho y cubierto por epitelio columnar simple. A partir de los 3 DDE ( $3.07 \pm 0.05$  mm de LT) se observó la válvula intestinal, que forma una constricción en el tercio posterior del intestino, dividiéndolo en dos regiones: región anterior o pre-valvular y región posterior o post-valvular, la cual termina en el ano. No se observaron diferencias histológicas entre estas regiones, que tienen microvellosidades (proyecciones citoplasmáticas de las células epiteliales del intestino), las cuales se caracterizan por su coloración eosinófila y porque sus células se disponen muy juntas, formando un borde en cepillo alrededor del lumen del intestino.

La formación de pliegues intestinales en la etapa posterior al inicio de la alimentación exógena (4 DDE,  $3.31 \pm 0.09$  mm de LT), aumentó la superficie de absorción del intestino, estos pliegues se incrementaron en número y extensión a medida que se desarrollaron las larvas. Adicionalmente, a partir del 6 DDE ( $3.79 \pm 0.08$  mm de LT), con el plegamiento de la mucosa del intestino, se diferenciaron las células caliciformes (secretoras de mucus), se detectaron primero en el intestino anterior y posteriormente en todo el intestino (14 DDE,  $5.21 \pm 0.07$  mm de LT).

La torsión del intestino, a partir del 6 DDE ( $3.79 \pm 0.08$  mm de LT), permitió diferenciarlo en tres regiones histológicas: anterior, medio y posterior. El intestino anterior y medio tienen un lumen más amplio, el primero con mayor número y longitud de pliegues, los cuales se van acortando hacia el ano; también se observaron zonas de absorción de nutrientes, para los lípidos (intestino medio) y para las proteínas por pinocitosis (intestino posterior), caracterizadas por la observación de inclusiones lipídicas y vacuolas supranucleares respectivamente (Figura 15).

#### **3.2.4.1 Inclusiones lipídicas**

A los 4 DDE ( $3.31 \pm 0.09$  mm de LT) se observaron las primeras evidencias de absorción de lípidos con la detección de pequeñas inclusiones lipídicas en la parte posterior de la región pre-valvular; sin embargo, fueron más evidentes en el intestino medio, un día después del inicio de la alimentación con metanauplios de *Artemia* sp. (22 DDE,  $7.18 \pm 0.21$  mm de LT). Las inclusiones lipídicas se observaron en una mayor proporción en las larvas del Ensayo 2 y aumentaron en los últimos días de muestreo (Figura 16).

#### **3.2.4.2 Vacuolas supranucleares**

La observación de vacuolas supranucleares, también dos días después del inicio de la alimentación exógena (4 DDE), indicó la absorción de macromoléculas proteicas por pinocitosis. Estas vacuolas se caracterizan por su coloración eosinófila y por ubicarse en el intestino posterior, adicionalmente, su número y tamaño disminuyó con el desarrollo de las larvas (Figura 16).

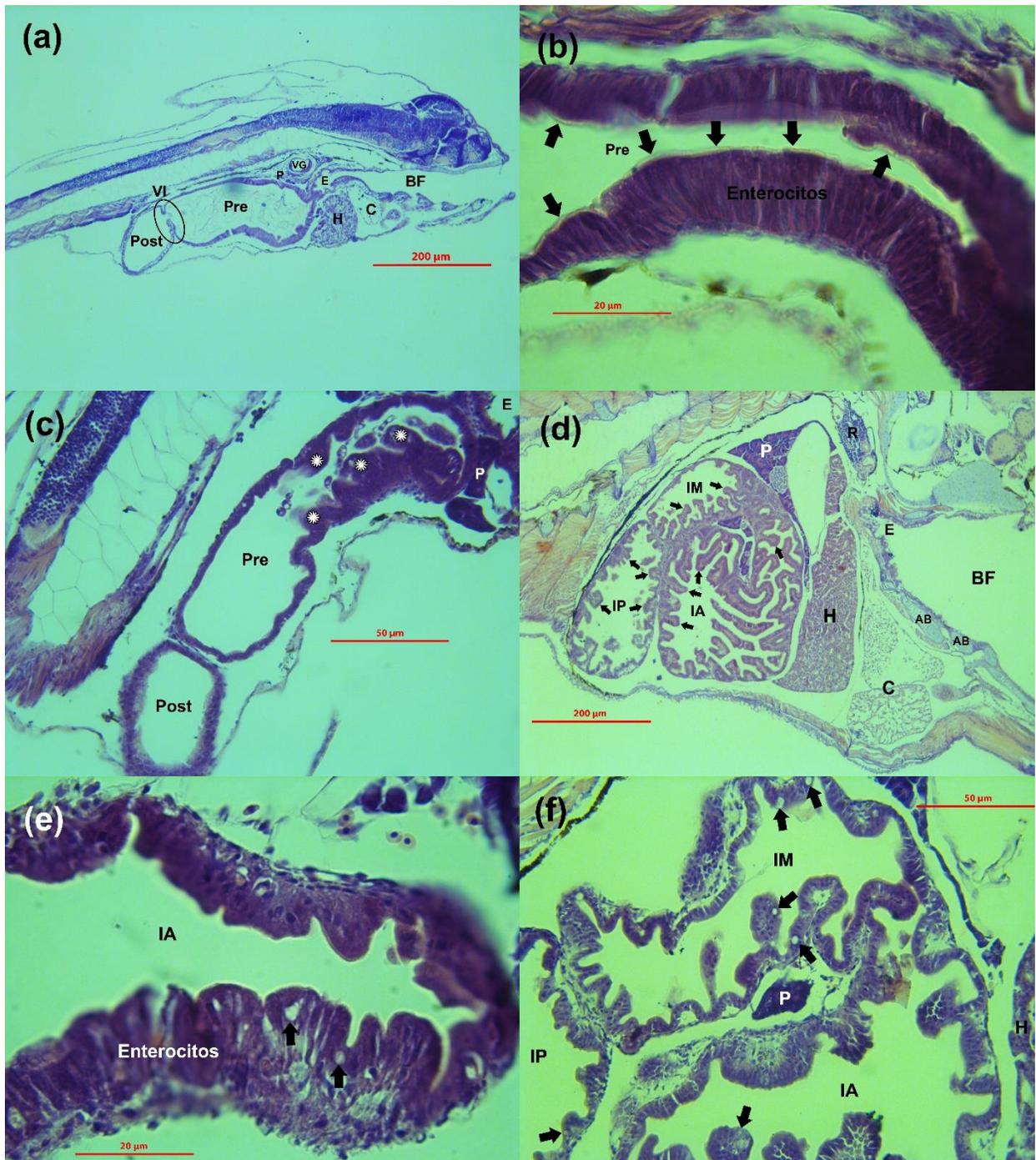


Figura 15. Corte histológico del intestino de las larvas de chita *Anisotremus scapularis* de diferentes edades. (a) Larva de 3 DDE, el círculo señala la válvula intestinal. (b) Microvellosidades, larva de 3 DDE, señaladas por flechas (→). (c) Pliegues intestinales, larva de 4 DDE, señalados por asteriscos (\*). (d) Pliegues intestinales, larva de 22 DDE, señalados por flechas (→). (e) Células mucosas, larva de 8 DDE, señaladas por flechas (→). (f) Células mucosas, larva a 14 DDE, señaladas por flechas (→). AB; arco branquial; BF, bucofaringe; C, corazón; E, esófago; H, hígado; IA, intestino anterior; IM, intestino medio; IP, intestino posterior; P, páncreas; Pre, región pre-valvular; Post, región post-valvular; R, riñón; VG, vejiga gaseosa; VI, válvula intestinal.

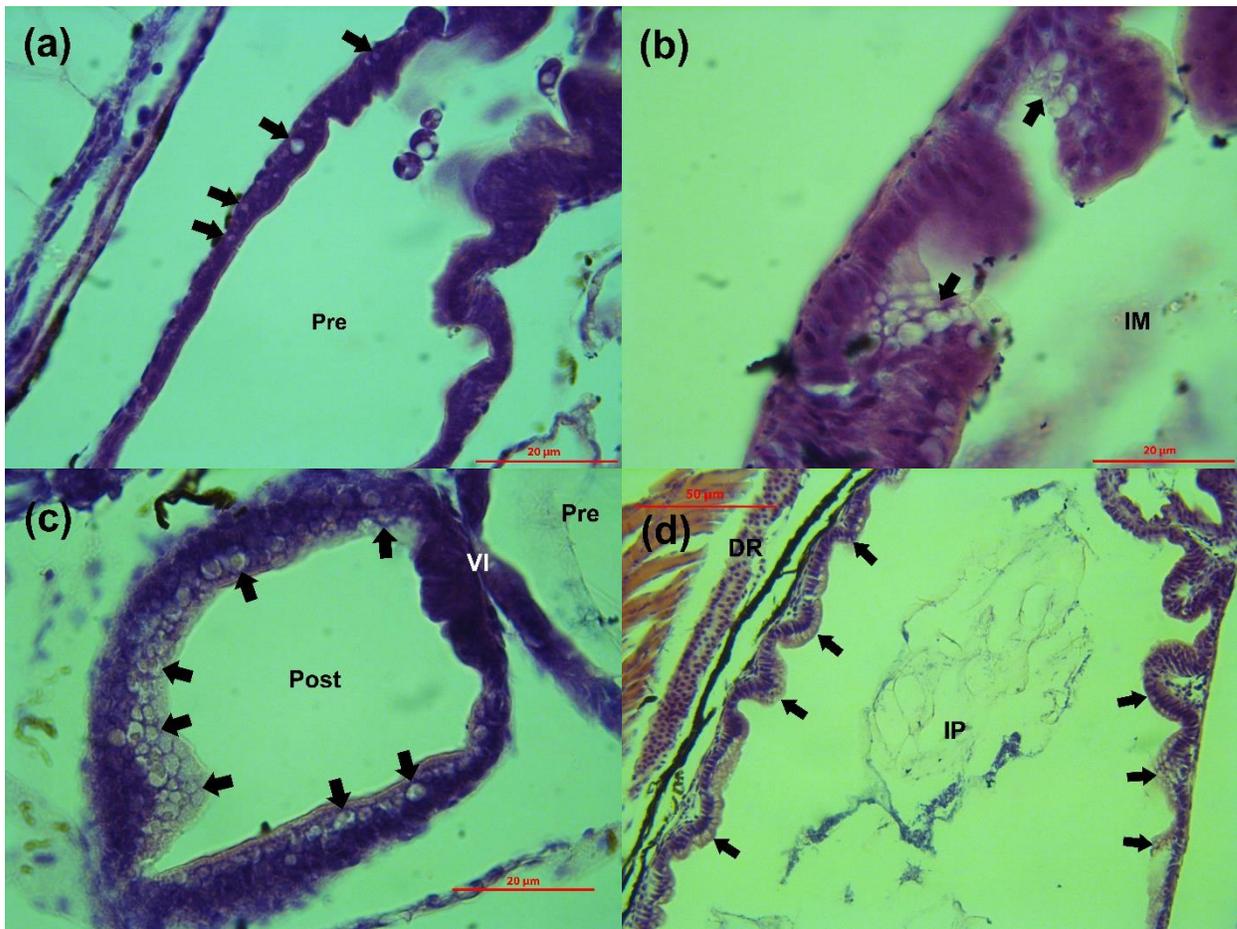


Figura 16. Corte histológico del intestino de las larvas de chita *Anisotremus scapularis* de diferentes edades. (a) Región pre-valvular, larva de 4 DDE, las flechas (→) señalan las inclusiones lipídicas. (b) Intestino medio, larva de 26 DDE, las flechas (→) señalan las inclusiones lipídicas. (c) Región post-valvular, larva de 4 DDE, las flechas (→) señalan las vacuolas supranucleares. (d) Intestino posterior, larva de 26 DDE, las flechas (→) señalan las vacuolas supranucleares. DR, ductos renales; IM, intestino medio; IP, intestino posterior; Pre, región pre-valvular; Post, región post-valvular.

### 3.2.5 Glándulas anexas

En los peces, el páncreas e hígado son las principales glándulas asociadas al sistema digestivo. En las larvas de chita, se observaron los primordios de estos dos órganos a partir de los 2 DDE ( $2.88 \pm 0.06$  mm de LT), y se caracterizaron por la observación de grupos de células de coloración basófila en disposición acinar.

### 3.2.5.1 Páncreas

El páncreas exocrino se ubicó alrededor del intestino, formado por la agrupación de células alargadas de coloración fuertemente basófila en disposición acinar con un lumen central, en la región apical de estas células se observaron gránulos eosinófilos que corresponden a los zimógenos o proenzimas. A partir de los 3 DDE ( $3.07 \pm 0.05$  mm de LT), se observó la región endocrina del páncreas, con células fusiformes, poco teñidas y ubicadas en forma de islas entre las células exocrinas del páncreas (denominadas Islotes de Langerhans), su función está más relacionada con la regulación del metabolismo de las larvas, al producir diferentes hormonas como la insulina y el glucagón. El conducto pancreático, que vierte las proenzimas al intestino anterior, se observó a partir de los 4 DDE ( $3.31 \pm 0.09$  mm de LT) (Figura 17). Con el desarrollo de las larvas, el páncreas aumentó su extensión alrededor del intestino y se observó una mayor producción de proenzimas.

### 3.2.5.2 Hígado

El hígado se ubicó posterior al corazón, al inicio de su desarrollo se observó una agrupación de células esféricas y basófilas (hepatocitos); posteriormente (6 DDE,  $3.79 \pm 0.08$  mm de LT), se formaron cordones de vasos sanguíneos entre los hepatocitos, formando sinusoides. A partir de los 10 DDE ( $4.28 \pm 0.12$  mm de LT) se observó mayor número de células sanguíneas en los sinusoides y los hepatocitos tenían un núcleo central y un citoplasma ligeramente eosinófilo. A medida que las larvas se desarrollaron, el hígado aumentó de tamaño, ocupando un mayor espacio en la cavidad abdominal. Un día posterior al inicio de la alimentación con metanauplios de *Artemia* sp. (22 DDE,  $7.18 \pm 0.21$  mm de LT), se observaron inclusiones lipídicas en los hepatocitos, que ocuparon una mayor proporción de su citoplasma y desplazaron al núcleo a la región periférica. Las inclusiones lipídicas se observaron en mayor proporción en los cortes histológicos de las larvas del Ensayo 2.

A partir de los 3 DDE ( $3.07 \pm 0.05$  mm de LT), se observó la vesícula biliar de forma oval, entre el hígado y páncreas. Este órgano incrementó su tamaño con el desarrollo de las glándulas anexas. El conducto hepático que conduce las secreciones del hígado y la vesícula biliar al intestino anterior, se observó a partir de los 4 DDE ( $3.31 \pm 0.09$  mm de LT) (Figura 18).

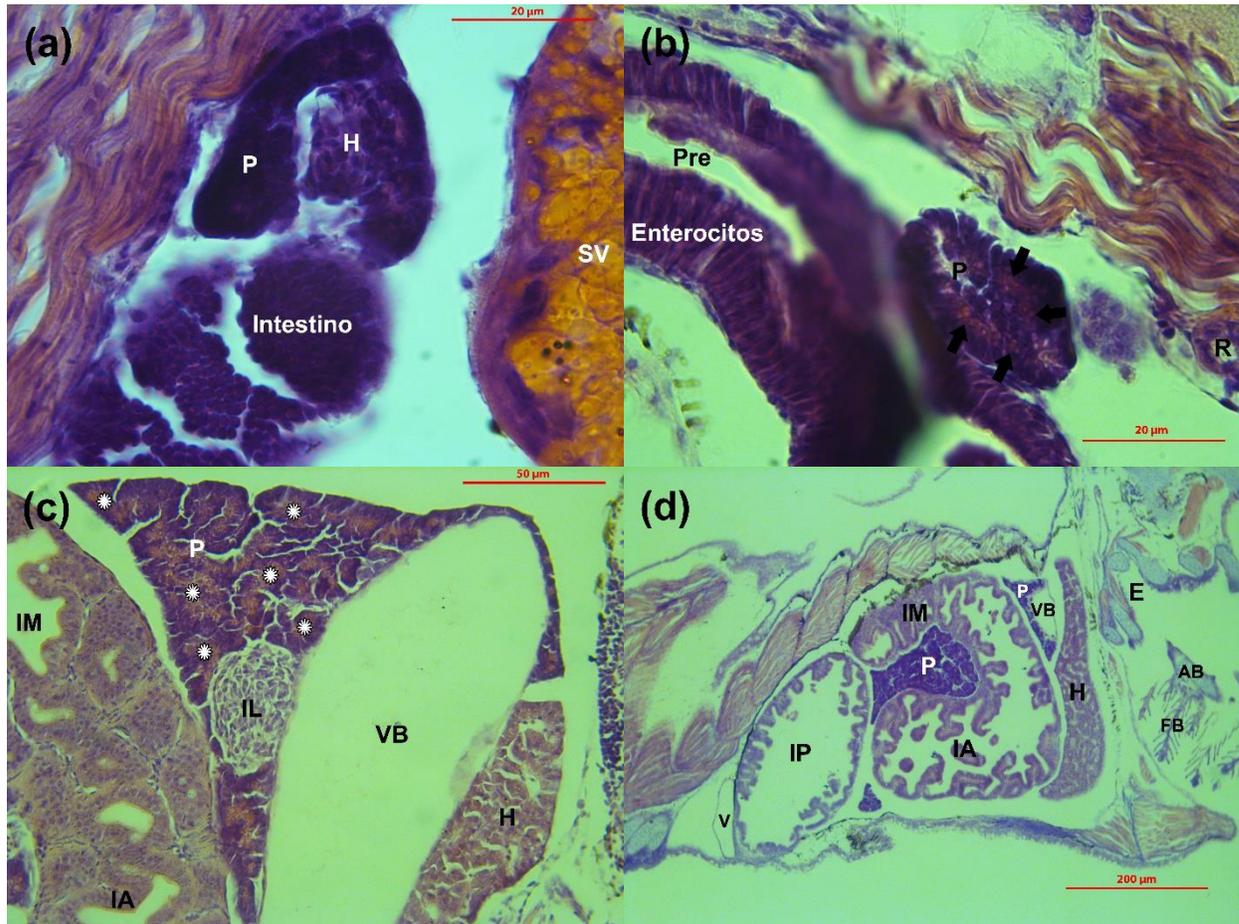


Figura 17. Corte histológico del páncreas de las larvas de chita *Anisotremus scapularis* de diferentes edades. (a) Primordios de páncreas e hígado, larva de 2 DDE. (b) Páncreas en desarrollo, larva de 3 DDE, las flechas ( $\rightarrow$ ) señalan los pocos gránulos de zimógeno. (c) Islote de Langerhans (IL), larva de 22 DDE, los asteriscos (\*) señalan los abundantes gránulos de zimógeno. (d) Extensión del páncreas, larva de 22 DDE. AB, arco branquial; E, esófago; FB, filamento branquial; H, hígado; IA, intestino anterior; IM, intestino medio; IP, intestino posterior; P, páncreas; Pre, región pre-valvular; R, riñón; SV, saco vitelino; V, vejiga urinaria; VB, vesícula biliar.

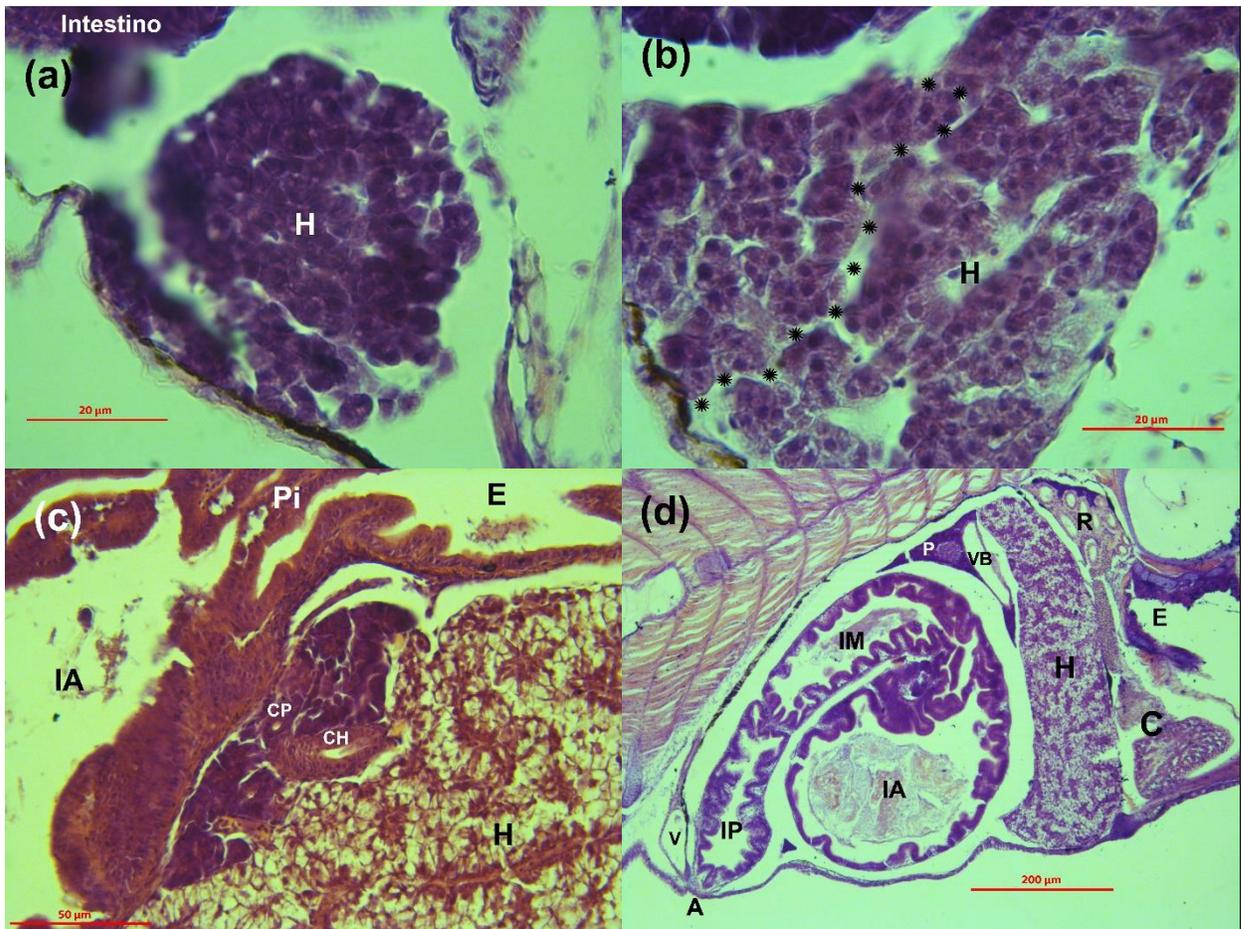


Figura 18. Corte histológico del hígado de las larvas de chita *Anisotremus scapularis* de diferentes edades. (a) Hígado en desarrollo, larva de 3 DDE. (b) Hígado, larva de 6 DDE, los asteriscos (\*) señalan la ubicación de sinusoide hepático. (c) Conducto pancreático (CP) y hepático (CH), larva de 22 DDE. (d) Extensión del hígado, larva de 26 DDE. Abreviaciones: A, ano; C, corazón; E, esófago; H, hígado; IA, intestino anterior; IM, intestino medio; IP, intestino posterior; P, páncreas; Pi, esfínter pilórico; R, riñón; V, vejiga urinaria; VB, vesícula biliar.

### 3.3 Actividad enzimática

#### 3.3.1 Proteasas

##### 3.3.1.1 Proteasas alcalinas totales

La actividad total de las proteasas alcalinas se detectó desde el momento de la eclosión y fue mayor en el Ensayo 1 ( $1.17 \pm 0.35$  U/larva), en comparación con el Ensayo 2 ( $0.04 \pm 0.01$  U/larva). Posteriormente la actividad se incrementó en relación directa con el desarrollo de las larvas (edad o crecimiento en longitud), hasta alcanzar sus valores máximos a los 26 DDE para el Ensayo 1 ( $35.81 \pm 4.55$  U/larva) y a los 30 DDE para el Ensayo 2 ( $43.35 \pm 5.63$  U/larva). La comparación de la actividad total entre los ensayos, mostró diferencias significativas en el último día de muestreo (Figura 19a).

El análisis de la actividad total en función del crecimiento, indicó que los valores aumentaron a partir de los 7 mm de LT y fueron mayores en las larvas del Ensayo 1, indicando que fueron más precoces. Sin embargo, a partir de los 9.5 mm de LT, la actividad total disminuyó y fue mayor en las larvas del Ensayo 2 (Figura 19b).

En general, la actividad específica para los dos ensayos fue mayor en los primeros días después de la eclosión. Se observó un incremento de la actividad en el primer DDE (Ensayo 1:  $1.60$  U/ $\mu$ g proteína y Ensayo 2:  $0.24$  U/ $\mu$ g proteína) y otros incrementos después del inicio de la alimentación exógena, en 3 DDE ( $0.86$  U/ $\mu$ g proteína) y 6 DDE ( $1.03$  U/ $\mu$ g proteína) en el Ensayo 1, y, 6 DDE ( $0.58$  U/ $\mu$ g proteína) en el Ensayo 2. Posteriormente, se observó una disminución de la actividad entre los días 14 y 22, y un aumento el día 26 DDE (Ensayo 1:  $0.39$  U/ $\mu$ g proteína y Ensayo 2:  $0.38$  U/ $\mu$ g proteína), que podría relacionarse con el cambio gradual de rotíferos a metanauplios de *Artemia* sp. (Figura 19c).

PROTEASAS ALCALINAS TOTALES

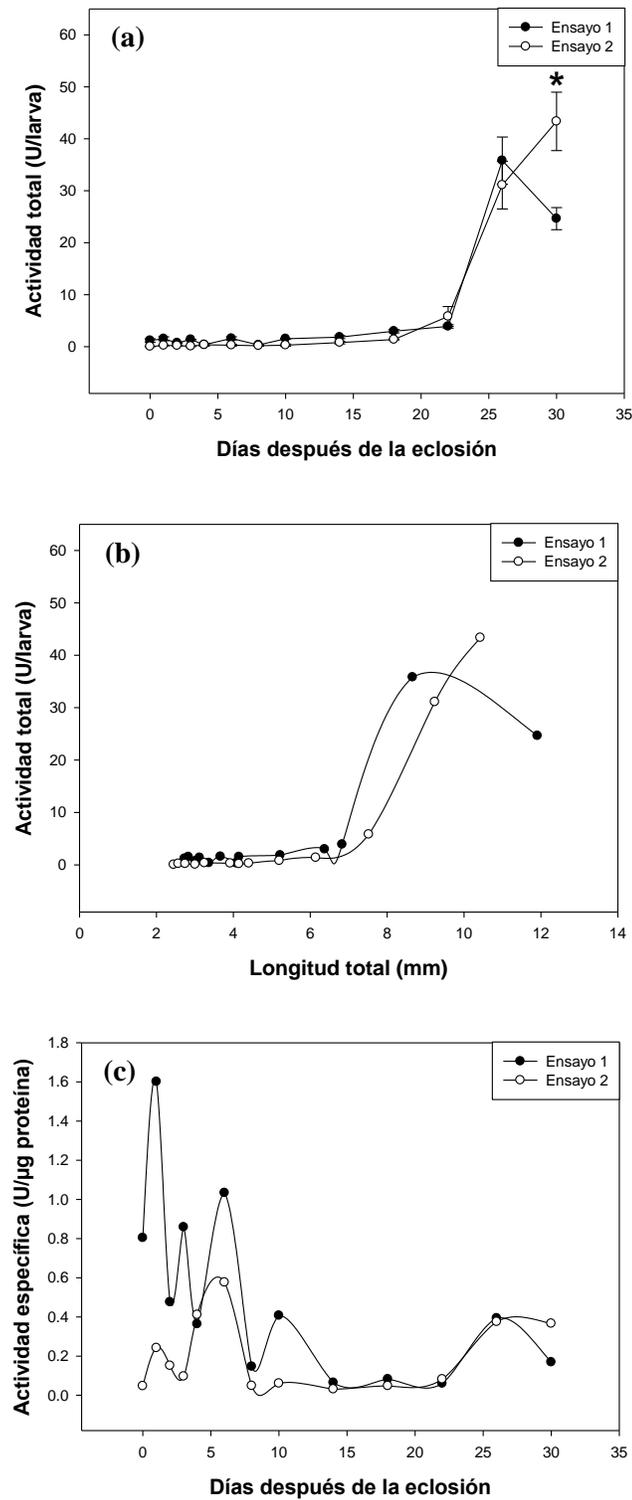


Figura 19. Actividad de las proteasas alcalinas de la chita *Anisotremus scapularis*, para los Ensayos 1 y 2, durante el desarrollo larval. (a) Actividad total en función de la edad (DDE), el asterisco (\*) señala diferencias significativas en los DDE entre ensayos. (b) Actividad total en función del crecimiento (longitud total). (c) Actividad específica en función de la edad (DDE). Las barras de error representan el error estándar de la media (n=3).

### 3.3.1.2 Tripsina

La actividad de la tripsina presentó un patrón similar al de la actividad de las proteasas alcalinas. La actividad total de tripsina se detectó en larvas recién eclosionadas en los dos ensayos; sin embargo, fue mayor en el Ensayo 1 ( $0.51 \pm 0.02$  U/larva) con respecto al Ensayo 2 ( $0.07 \pm 0.02$  U/larva). Posteriormente, a los 22 DDE (7 mm de LT), la actividad total aumentó hasta alcanzar el máximo a los 26 DDE ( $42.68 \pm 8.08$  U/larva) para el Ensayo 1 y a los 30 DDE para el Ensayo 2 ( $62.94 \pm 9.89$  U/larva). A los 30 DDE la actividad total de tripsina fue significativamente mayor para las larvas del Ensayo 2 (Figura 20a).

En el análisis de la actividad total en función del crecimiento, se observó que las larvas del Ensayo 1 fueron más precoces y que a partir de los 9.5 mm de LT la actividad fue mayor en las larvas del Ensayo 2 (Figura 20b).

En relación a la actividad específica para los dos ensayos, se observó un incremento al primer DDE (Ensayo 1:  $0.55$  U/ $\mu$ g proteína y Ensayo 2:  $0.15$  U/ $\mu$ g proteína) y los días posteriores al inicio de la alimentación exógena, a los 4 DDE en el Ensayo 1 ( $0.38$  U/ $\mu$ g proteína) y a los 6 DDE en el Ensayo 2 ( $0.97$  U/ $\mu$ g proteína). Entre los días 14 y 22 la actividad disminuye y a los 26 DDE la actividad se incrementa a  $0.47$  U/ $\mu$ g proteína en el Ensayo 1 y  $0.45$  U/ $\mu$ g proteína en el Ensayo 2, lo cual podría relacionarse con el cambio de alimento, de rotíferos a metanauplios de *Artemia* sp. (Figura 20c).

## TRIPSINA

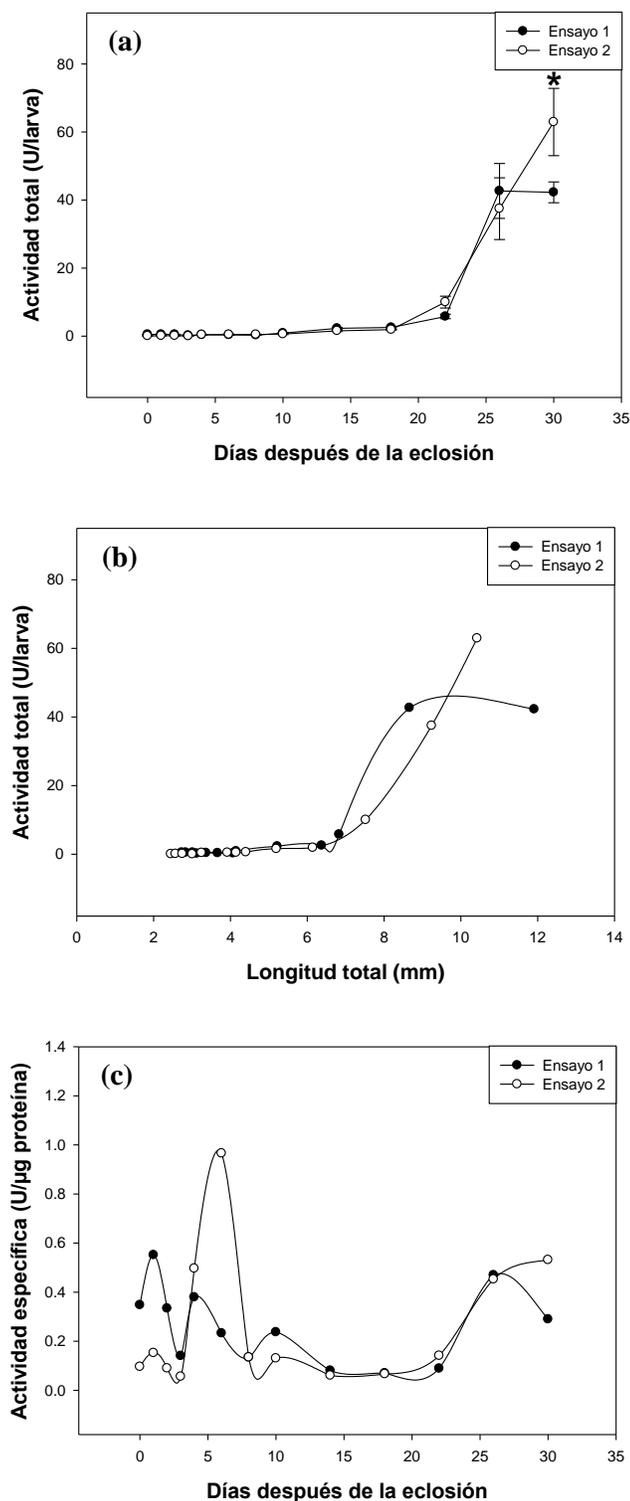


Figura 20. Actividad de la tripsina de la chita *Anisotremus scapularis*, para los Ensayos 1 y 2, durante el desarrollo larval. (a) Actividad total en función de la edad (DDE), el asterisco (\*) señala diferencias significativas en los DDE entre ensayos. (b) Actividad total en función del crecimiento (longitud total). (c) Actividad específica en función de la edad (DDE). Las barras de error representan el error estándar de la media (n=3).

### 3.3.1.3 Leucina aminopeptidasa

La actividad total de la leucina aminopeptidasa se detectó en las larvas recién eclosionadas, con valores más altos en el Ensayo 1 ( $0.09 \pm 0.02$  U/larva) con respecto al Ensayo 2 ( $0.01 \pm 0.002$  U/larva). La actividad aumentó con el desarrollo de las larvas, hasta alcanzar los mayores valores a los 30 DDE,  $17.25 \pm 0.92$  U/larva en el Ensayo 1 y  $9.05 \pm 1.93$  U/larva en el Ensayo 2. Al comparar la actividad total entre los dos ensayos, la actividad de las larvas del Ensayo 1 fue significativamente mayor en el 18, 22 y 30 DDE (Figura 21a).

Al considerar la actividad en relación con el crecimiento de las larvas, se observó que no se incrementó hasta después de los 4 mm de LT, entonces aumentó y alcanzó mayores valores en las larvas del Ensayo 1, que tuvieron un desarrollo precoz (Figura 21b). Se podría inferir que cuando las larvas del Ensayo 2 alcancen la longitud equivalente de las larvas del Ensayo 1, tendrán la misma actividad que las del primer ensayo en esa misma longitud.

La actividad específica aumentó a partir del 4 DDE, con máximos de  $0.31$  U/ $\mu$ g proteína (Ensayo 1) y  $0.23$  U U/ $\mu$ g proteína (Ensayo 2) y posteriormente disminuyó de manera fluctuante, a los 30 DDE se detectó una actividad de  $0.12$  U/ $\mu$ g proteína para el Ensayo 1 y a los 26 DDE, de  $0.09$  U/ $\mu$ g proteína para el Ensayo 2 (Figura 21c).

### 3.3.1.4 Proteasas ácidas totales

La actividad total de las proteasas ácidas se incrementó en el Ensayo 2 a los 26 DDE ( $11.73 \pm 11.73$  U/larva) y 30 DDE ( $23.73 \pm 17.21$  U/larva) (Figura 22a). En relación con el crecimiento, la actividad total se detectó a partir de los 9.24 mm de LT (Figura 22b). La actividad específica mostró valores ascendentes de los 26 DDE ( $0.14$  U/ $\mu$ g proteína) a los 30 DDE ( $0.20$  U/ $\mu$ g proteína) (Figura 22c).

## LEUCINA AMINOPEPTIDASA

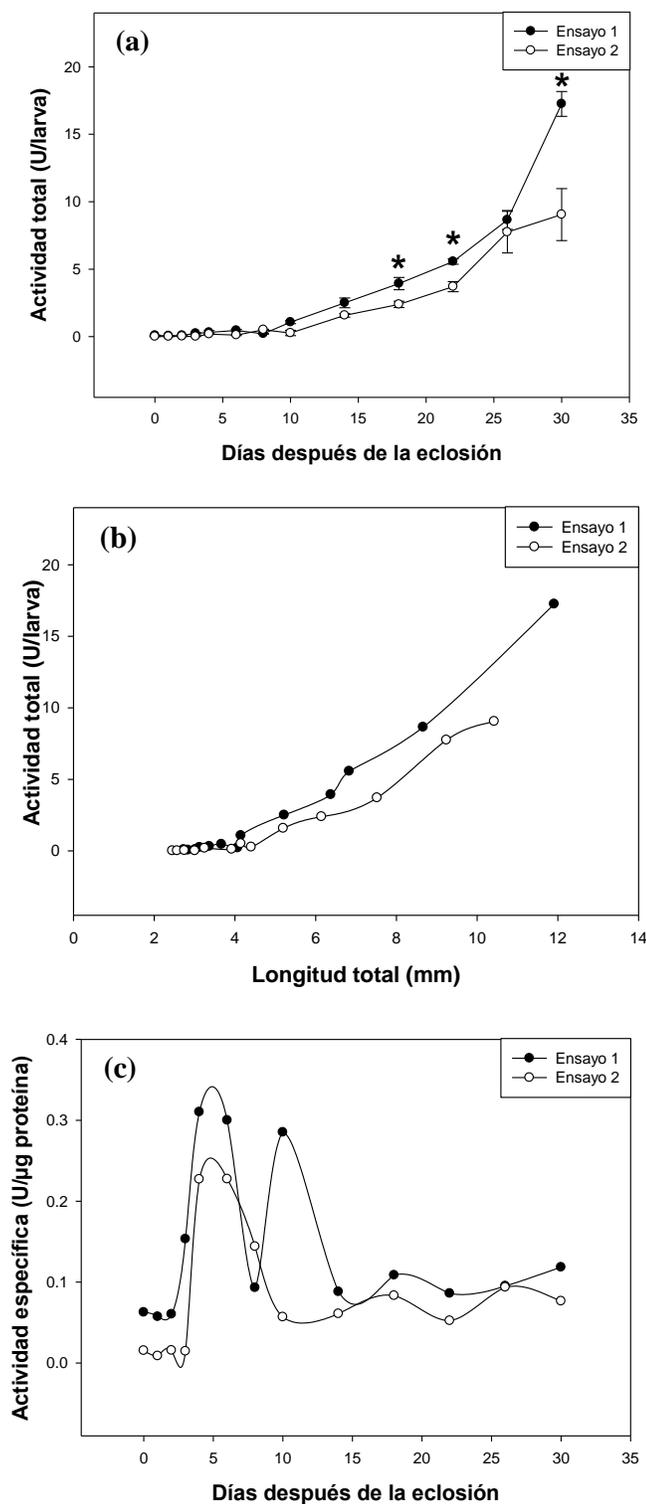


Figura 21. Actividad de la leucina aminopeptidasa de la chita *Anisotremus scapularis*, para los Ensayos 1 y 2, durante el desarrollo larval. (a) Actividad total en función de la edad (DDE), los asteriscos (\*) señalan diferencias significativas en los DDE entre ensayos. (b) Actividad total en función del crecimiento (longitud total). (c) Actividad específica en función de la edad (DDE). Las barras de error representan el error estándar de la media (n=3).

PROTEASAS ÁCIDAS TOTALES

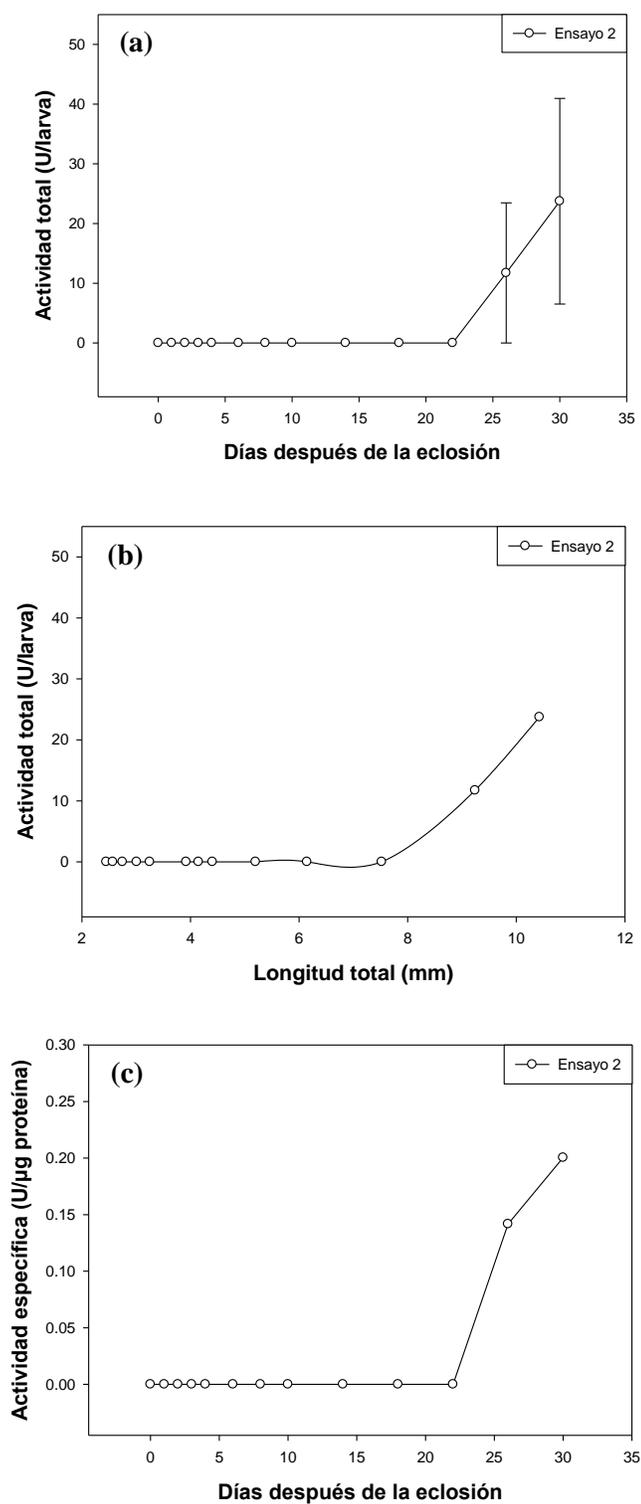


Figura 22. Actividad de las proteasas ácidas de la chita *Anisotremus scapularis*, para los Ensayos 1 y 2, durante el desarrollo larval. (a) Actividad total en función de la edad (DDE). (b) Actividad total en función del crecimiento (longitud total). (c) Actividad específica en función de la edad (DDE). Las barras de error representan el error estándar de la media (n=3).

### 3.3.2 Lipasas dependientes de sales biliares

La actividad total de las lipasas se detectó en las larvas recién eclosionadas ( $1.33 \pm 0.33$  U/larva y  $0.27 \pm 0.05$  U/larva para los Ensayos 1 y 2 respectivamente). En el Ensayo 1, la actividad total disminuyó hasta alcanzar su punto más bajo a los 4 DDE ( $0.16 \pm 0.16$  U/larva), posteriormente aumentó en forma un poco fluctuante hasta un máximo de  $9.40 \pm 0.45$  U/larva a los 30 DDE. En el Ensayo 2 se observó un patrón similar, la actividad disminuyó hasta alcanzar su punto más bajo a los 3 DDE ( $0.15 \pm 0.06$  U/larva) y aumentó, sin fluctuaciones tan marcadas como en el Ensayo 1, hasta su valor máximo  $3.75 \pm 0.54$  U/larva a los 30 DDE. Se observaron diferencias significativas entre ensayos a partir de los 18 DDE, con mayores valores de actividad en el Ensayo 1 (Figura 23a).

En relación con el crecimiento, a partir de los 4 mm de LT se observó un mayor aumento en la actividad total de las lipasas en las larvas, más evidente en las del Ensayo 1 (Figura 23b).

La actividad específica de esta enzima en larvas recién eclosionadas fue alta en el Ensayo 2 ( $0.35$  U/ $\mu$ g proteína) y un día después de la eclosión en el Ensayo 1 ( $0.96$  U/ $\mu$ g proteína). Con el desarrollo de las larvas, la actividad disminuyó en forma fluctuante, hasta alcanzar el mínimo a los 30 DDE ( $0.07$  U/ $\mu$ g proteína y  $0.03$  U/ $\mu$ g proteína para los Ensayos 1 y 2 respectivamente) (Figura 23c).

## LIPASAS

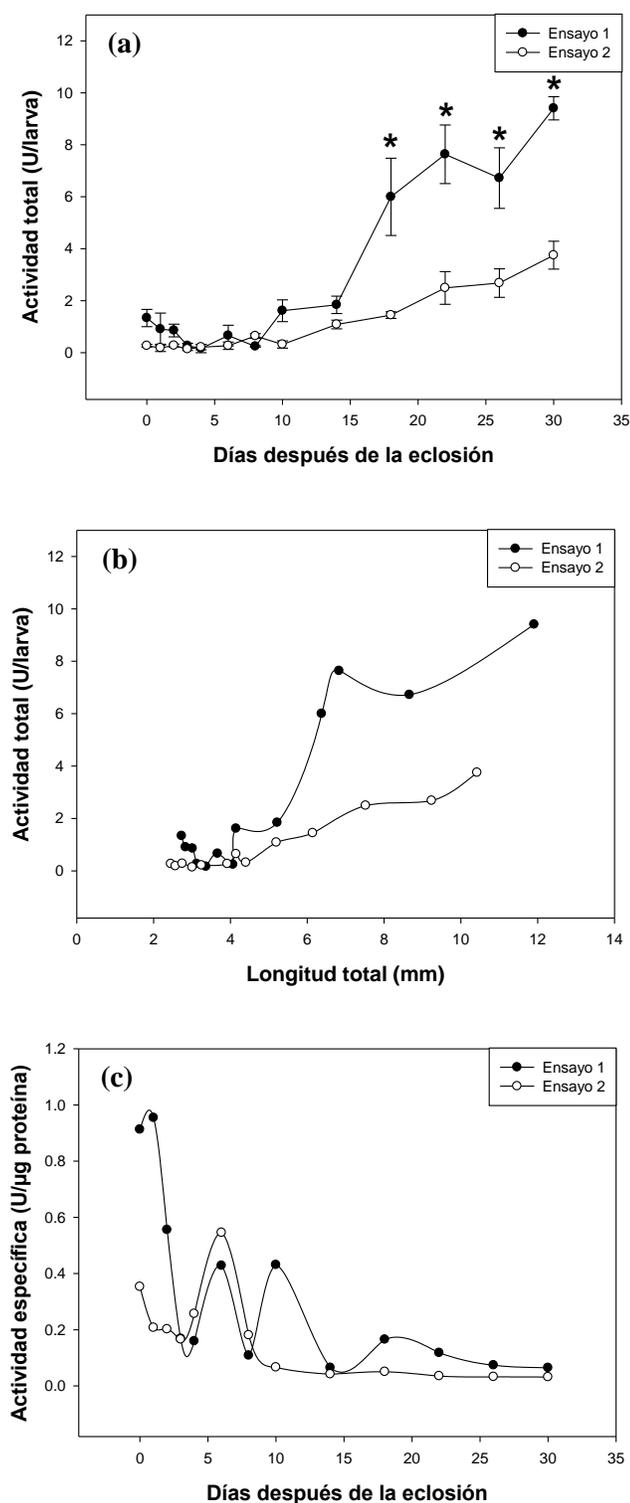


Figura 23. Actividad de las lipasas dependientes de sales biliares de la chita *Anisotremus scapularis*, para los Ensayos 1 y 2, durante el desarrollo larval. (a) Actividad total en función de la edad (DDE), los asteriscos (\*) señalan diferencias significativas en los DDE entre ensayos. (b) Actividad total en función del crecimiento (longitud total). (c) Actividad específica en función de la edad (DDE). Las barras de error representan el error estándar de la media (n=3).

### 3.3.3 Alfa-amilasa

La actividad total de alfa-amilasa se detectó en las larvas recién eclosionadas en los dos ensayos, con un valor mayor en el Ensayo 2 ( $1.17 \pm 0.11$  U/larva) que en el Ensayo 1 ( $0.38 \pm 0.10$  U/larva). La actividad aumentó con el desarrollo de las larvas, hasta alcanzar sus valores máximos al día 30, en este día las larvas del Ensayo 2 tuvieron menores niveles de actividad ( $9.43 \pm 2.71$  U/larva) que las del Ensayo 1 ( $11 \pm 1.54$  U/larva). La actividad total de alfa-amilasa no presentó diferencias significativas entre ensayos (Figura 24a).

En relación con el crecimiento, la actividad total fue similar en los dos ensayos, al inicio fue baja y a partir de los 7 y 6 mm de LT en los Ensayos 1 y 2 respectivamente, se incrementó (Figura 24b).

La actividad específica presentó los mayores valores en larvas recién eclosionadas en el Ensayo 2 ( $1.55$  U/ $\mu$ g proteína) y un día después de la eclosión en el Ensayo 1 ( $0.63$  U/ $\mu$ g proteína). Posteriormente la actividad disminuyó en forma fluctuante, con valores altos a los 6 y 10 DDE ( $0.29$  y  $0.27$  U/ $\mu$ g proteína, respectivamente) en el Ensayo 1; y, en el Ensayo 2, valores altos se observaron a los 3 y 6 DDE ( $0.47$  U/ $\mu$ g proteína y  $0.35$  U/ $\mu$ g proteína respectivamente). Hacia el final de la colecta, 26 DDE (Ensayo 1:  $0.08$  U/ $\mu$ g proteína y Ensayo 2:  $0.11$  U/ $\mu$ g proteína) se observó un ligero aumento en la actividad específica de la alfa-amilasa (Figura 24c).

## ALFA AMILASA

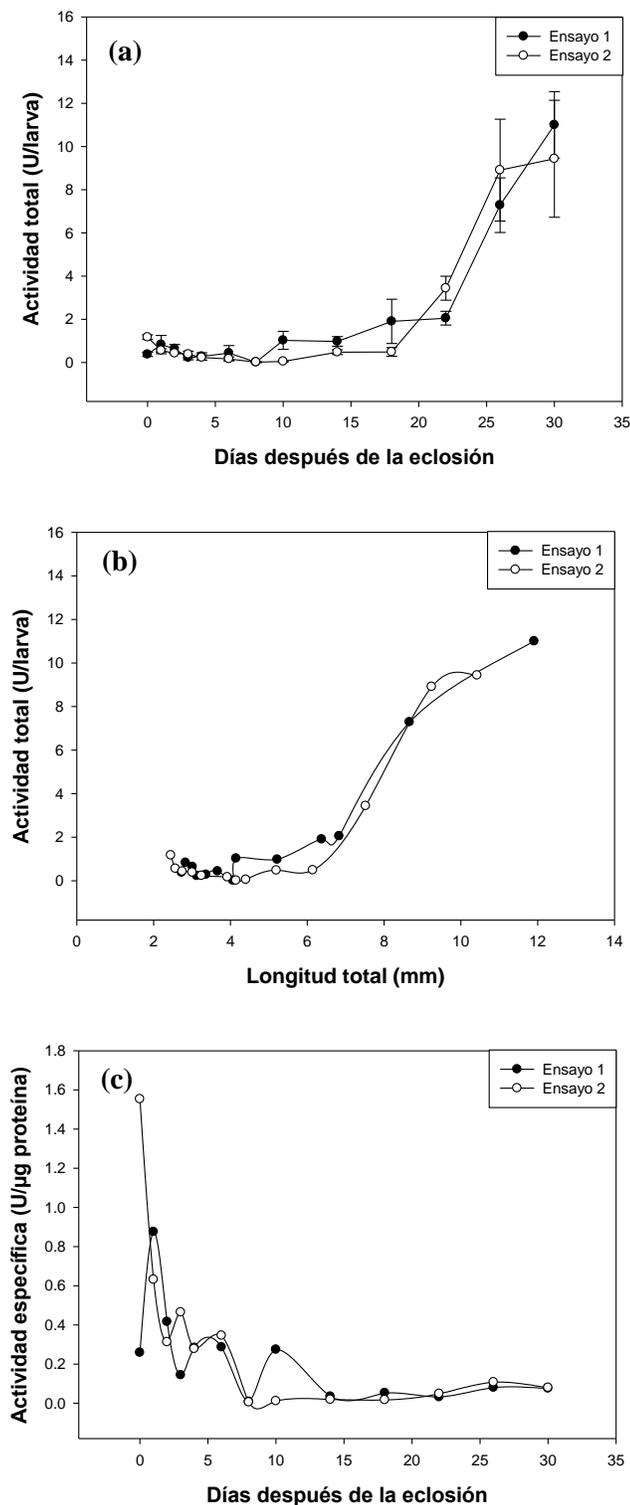


Figura 24. Actividad de la alfa-amilasa de la chita *Anisotremus scapularis*, para los Ensayos 1 y 2, durante el desarrollo larval. (a) Actividad total en función de la edad (DDE). (b) Actividad total en función del crecimiento (longitud total). (c) Actividad específica en función de la edad (DDE). Las barras de error representan el error estándar de la media (n=3).

## Capítulo 4. Discusión

---

### 4.1 Análisis histológico

#### 4.1.1 Sistema digestivo

Los eventos del desarrollo del sistema digestivo de *Anisotremus scapularis* fueron similares a los observados en otras especies, incluidas las familias Lutjanidae y Sparidae, relacionadas filogenéticamente con la familia Haemulidae (Apéndice 1). Sin embargo, las edades a las que se observaron estos eventos fueron diferentes, particularmente con variaciones más marcadas en la edad en que se desarrollaron las glándulas gástricas (Yúfera and Darias, 2007). Cuando se desarrollan protocolos de alimentación con alimento vivo o balanceado para el cultivo de larvas, se deben tomar en consideración las diferencias ontogenéticas entre las especies, para adecuarlos al grado de madurez del sistema digestivo, especialmente para evitar las bajas tasas de crecimiento y supervivencia (Hachero-Cruzado *et al.*, 2009).

Al eclosionar, las larvas de chita tienen un tracto digestivo recto e histológicamente indiferenciado, que es típico de las larvas de muchos peces marinos de importancia acuícola. El tracto se mantiene sin cambios mayores hasta que la larva consume su saco vitelino y la gota de aceite, es entonces cuando se observa la segmentación por válvulas musculares (Govoni *et al.*, 1986).

Entre los 2 y 4 DDE, se observaron los mayores cambios en el desarrollo del sistema digestivo de *A. scapularis*, entre los más importantes están la diferenciación de la bucofaringe, esófago e intestino, plegamiento de la mucosa intestinal, la formación de las microvellosidades en los enterocitos y el desarrollo de sus glándulas anexas, hígado y páncreas. Estos cambios se relacionan con el inicio de la alimentación exógena, ya que aseguran los procesos de digestión y absorción de los alimentos que la larva ingerirá (Galaviz *et al.*, 2011; Govoni *et al.*, 1986; Sánchez-Amaya *et al.*, 2007). El mayor cambio que se observó en los días posteriores hasta el final del muestreo fue la observación de un estómago en desarrollo, con la diferenciación de las glándulas

gástricas (26 DDE), lo cual indica que las larvas se están acercándose al final de la etapa larval (Tanaka, 1973).

El desarrollo del sistema digestivo de las larvas depende de las condiciones ambientales de cultivo, en particular la temperatura (son organismos poiquiloterms), por esta razón, además de considerar la edad, se relacionó con el crecimiento, ya que de esta forma se pueden hacer mejores predicciones del estado de desarrollo de los órganos que lo conforman. La longitud es la medida típica para describir el crecimiento, por ello se utilizó en este trabajo (Fuiman and Higgs, 1997; Fuiman, 1994; Lazo *et al.*, 2000a).

Los ojos y la vejiga gaseosa son estructuras importantes para la detección y captura del alimento de las larvas. La visión juega el papel más importante en la detección de las presas de la mayoría de las larvas de peces. En *A. scapularis* los ojos se observaron con una mayor estratificación de la retina y pigmentación entre los 2 y 3 DDE, coincidiendo con la apertura de la boca y el inicio de la alimentación exógena. A medida que progresa el desarrollo larval, el diámetro de los ojos se incrementa, proporcionando un ángulo de visión más amplio y una mayor distancia de percepción (Ronnestad *et al.*, 2012; Yúfera and Darias, 2007).

La función irregular de la vejiga gaseosa afecta la capacidad de las larvas para mantenerse en la columna de agua, lo que conlleva a un mayor gasto energético e interfiere con la alimentación. En muchos teleósteos, la inflación de la vejiga gaseosa normalmente tiene lugar en el periodo en que se agota el saco vitelino e inicia la alimentación exógena. El proceso de inflación se desarrolla en dos pasos, primero inicia el llenado de aire, y en segundo término, ocurre la total extensión de la vejiga gaseosa, durante este proceso la rete mirabilis incrementa la presión en la vejiga para su total inflación (Summerfelt, 1996). En las larvas de chita, se observó la vejiga gaseosa diferenciada a partir de los 6 DDE en dos regiones, la glándula del gas en su región anterior y la rete mirabilis en su región posterior; posteriormente, a partir de los 22 DDE, la vejiga ocupó una mayor extensión en la cavidad abdominal.

Durante el desarrollo larval, también ocurre la reorganización de la musculatura del cuerpo, la diferenciación de las branquias (transición de la respiración cutánea a branquial), del tejido esquelético, y el completo desarrollo de los sistemas excretores y de la tiroides (Gisbert *et al.*, 2008).

#### 4.1.2 Bucofaringe

El desarrollo de la bucofaringe se observó en las larvas de chita entre los 2 y 3 DDE, con la apertura de la boca, a pesar de que esta estructura no está directamente relacionada con la digestión y absorción de los nutrientes, es fundamental para la ingestión, procesamiento mecánico y transporte de los alimentos ingeridos por la larva (Govoni *et al.*, 1986).

En la bucofaringe se observó que el número de células mucosas o caliciformes y papilas gustativas se incrementó con el crecimiento de las larvas. En algunas especies de peces marinos, como en *Paralichthys californicus* (Gisbert *et al.*, 2004), *Paralichthys dentatus* (Bisbal and Bengtson, 1995), *Pseudosciaena crocea* (Mai *et al.*, 2005) las papilas gustativas se observan en el momento de la primera alimentación, pero usualmente aparecen después (Yúfera and Darías, 2007). La aparición de las papilas gustativas indica la capacidad de las larvas para seleccionar sus presas de manera organoléptica (Hachero-Cruzado *et al.*, 2009).

Los dientes se desarrollaron en los días posteriores a la eclosión de las larvas, primero se observaron los dientes faríngeos (14 DDE) y posteriormente los mandibulares (26 DDE). Los dientes faríngeos son comunes en los peces que se alimentan de moluscos (Genten *et al.*, 2009), lo que concuerda con los hábitos alimenticios de la chita. La presencia de estas estructuras durante los últimos días de desarrollo de las larvas, pueden indicar un cambio en la dieta de la chita (Bisbal and Bengtson, 1995).

### 4.1.3 Esófago

El esófago está relacionado con la digestión pre-gástrica, a través de la secreción de sus células mucosas, que cooperan con la digestión enzimática de los alimentos y en la conformación del quimo (Baglolle *et al.*, 1997; Sarasquete *et al.*, 2001). Las células mucosas se observaron inicialmente en el esófago y después en el intestino al igual que otras especies de peces (Falk-Petersen, 2005). Se identificaron a partir de los 4 DDE, poco después del inicio de la alimentación exógena, tal como ocurre en *Seriola lalandi* (Chen *et al.*, 2006b), *Pseudosciaena crocea* (Mai *et al.*, 2005), *Scophthalmus rhombus* (Hachero-Cruzado *et al.*, 2009), *Solea senegalensis* (Ribeiro *et al.*, 1999a) y *Pagrus auriga* (Sánchez-Amaya *et al.*, 2007). El desarrollo de las células mucosas también puede ocurrir más tarde en el desarrollo, como por ejemplo en especies como *Lutjanus guttatus* (Galaviz *et al.*, 2012), *Paralichthys californicus* (Gisbert *et al.*, 2004), *Pleuronectes ferruginea* (Baglolle *et al.*, 1997) y *Sparus aurata* (Elbal *et al.*, 2004; Sarasquete *et al.*, 1995), donde se observaron hasta los 7 y 10 DDE. Las diferencias en el patrón de desarrollo pueden estar relacionadas con la ecología, hábitos alimenticios y posición taxonómica de las especies (Mai *et al.*, 2005).

Las células mucosas del esófago compensan la falta de glándulas salivales en los peces. Tienen una función importante para la lubricación y protección de la mucosa digestiva, ya que la producción de diferentes mucosustancias neutrales, ácidas y/o glicoproteínas (Sarasquete *et al.*, 2001), previenen la abrasión que pueden ocasionar las partículas de alimento ingeridas (Scocco *et al.*, 1998). Además, según Zimmer *et al.* (1992), la presencia de residuos de ácido siálico en las secreciones de las células mucosas, evita las infecciones virales, al prevenir el reconocimiento del receptor determinante, y también protege a la mucosa del ataque enzimático de la sialidasa producida por las bacterias. En el cultivo de larvas, se debe tener especial atención a la aparición de células mucosas funcionales, ya que el daño de la mucosa del esófago, puede causar mortalidades significantes de las larvas (Gisbert *et al.*, 2004).

La diferenciación histológica del esófago en una región anterior, con células mucosas y epitelio estratificado, y en otra posterior, sin células mucosas y con epitelio simple; se ha observado en diversas especies de peces marinos (Apéndice 1). La región anterior

se relaciona con la secreción de mucus y la región posterior, con funciones de transporte del alimento y posteriormente, será la región donde se desarrollará el estómago, por ello algunos autores la denominan estómago, incluso antes de la formación de las glándulas gástricas (Bisbal and Bengtson, 1995; Chen *et al.*, 2006b; Darias *et al.*, 2007; Elbal *et al.*, 2004; Hachero-Cruzado *et al.*, 2009; Ortiz-Delgado *et al.*, 2003; Peña *et al.*, 2003; Ribeiro *et al.*, 1999a; Sánchez-Amaya *et al.*, 2007; Zavala-Leal *et al.*, 2013).

#### 4.1.4 Estómago

La presencia de las glándulas gástricas es indicativa de un estómago funcional, ya que mejora la digestión enzimática de los alimentos. Las células oxintopépticas o células secretoras de las glándulas, son responsables de la producción de pepsinógeno y HCl (Zambonino-Infante *et al.*, 2008). En las larvas de chita se observó su presencia a partir de los 26 DDE. En diversas especies de peces marinos se ha observado el desarrollo de este órgano en los días posteriores a la eclosión (Apéndice 1). Entre las especies donde las glándulas gástricas se desarrollaron en forma precoz (15-21 DDE) se encuentran *Lutjanus guttatus* (Galaviz *et al.*, 2012), *Seriola lalandi* (Chen *et al.*, 2006b), *Paralabrax maculatofasciatus* (Peña *et al.*, 2003), *Pseudosciaena crocea* (Mai *et al.*, 2005), cuya temperatura de cultivo fue mayor o igual que 24°C. En especies como *Solea senegalensis* (Sarasquete *et al.*, 1996) y *Paralichthys dentatus* (Bisbal and Bengtson, 1995), cuya temperatura de cultivo fue similar a la de chita (20-21°C), el desarrollo de las glándulas gástricas se observó entre los 25 y 33 DDE. En *Sparus aurata* (Elbal *et al.*, 2004), cuya temperatura de cultivo fue entre 18 y 19°C, las glándulas gástricas se observaron en una etapa más avanzada del desarrollo (60 DDE).

La diferencia más notable entre el sistema digestivo de los juveniles y las larvas es la presencia de un estómago bien diferenciado y de los ciegos pilóricos en el intestino anterior, los cuales aseguran la digestión ácida de las proteínas (pepsina) e incrementan la superficie intestinal, respectivamente (Tanaka, 1973, Govoni *et al.*, 1986). Usualmente, el estómago se considera totalmente desarrollado cuando las

glándulas gástricas están presentes y se distinguen histológica y anatómicamente tres regiones: cardiaca, fúndica y pilórica (Zambonino-Infante *et al.*, 2008). Por otro lado, la diferenciación del estómago puede ser el marcador más evidente de cambios profundos en la fisiología digestiva de las larvas, la “metamorfosis”, los cuales incluyen cambios en la calidad y cantidad de los requerimientos de los nutrientes y energía y del metabolismo intermediario, entre otros (Segner *et al.*, 1993). En las larvas de *A. scapularis*, a los 30 DDE no se observó una diferenciación total del estómago, pero sí se observaron un mayor número de glándulas gástricas disponiéndose en la región anterior de este órgano.

#### 4.1.5 Intestino

Durante la etapa previa a la formación del estómago funcional en las larvas de chita (26 DDE), la digestión de los alimentos ingeridos tiene lugar en el intestino, donde el pH se mantiene alcalino y la principal actividad enzimática proteolítica corresponde a la tripsina (Kolkovski, 2001).

La diferenciación del intestino en tres regiones se identificó a partir de los 6 DDE, con la aparición del esfínter pilórico primordial, una constricción correspondiente a la válvula intestinal y la torsión del intestino, que resulta de su reacomodo en la cavidad abdominal a medida que crece junto con los demás órganos que conforman el sistema digestivo (Yúfera and Darías, 2007). La torsión es un proceso común en las larvas de las especies que pertenecen a los superordenes Paracanthopterygii y Acanthopterygii (Govoni, 1980). En este trabajo, se adoptó la clasificación de las regiones descritas por diversos autores como anterior, media y posterior (Bisbal and Bengtson, 1995; Chen *et al.*, 2006b; Hachero-Cruzado *et al.*, 2009; Ortiz-Delgado *et al.*, 2003; Sánchez-Amaya *et al.*, 2007; Sarasquete *et al.*, 1996); sin embargo, otros autores consideran sólo dos regiones ya que una válvula que separe el intestino anterior y medio, no es evidente (Lazo, 1999; Sarasquete *et al.*, 1995; Segner *et al.*, 1994).

Las tres regiones del intestino son histológicamente y funcionalmente distintas (Govoni *et al.*, 1986). La principal diferencia está relacionada con su especialización en la digestión y absorción de los nutrientes. El intestino anterior se ha descrito como el principal sitio para la digestión proteolítica extracelular, debido al mayor plegamiento de su mucosa, su gran lumen, que sirve como un reservorio para las partículas de alimento, además, por ser la región donde desemboca el conducto pancreático y hepático, que vierte las proenzimas digestivas desde el páncreas exocrino y las sales biliares desde el hígado y la vesícula biliar (Walford and Lam, 1993; Zambonino-Infante and Cahu, 2001).

Los enterocitos del intestino medio están relacionados con la absorción de lípidos y los del intestino posterior, con la absorción de macromoléculas proteicas por pinocitosis (Falk-Petersen, 2005). Histológicamente, estas actividades de absorción producen la acumulación de inclusiones densas incoloras y vacuolas supranucleares acidófilas, respectivamente, que se observan después del inicio de la alimentación exógena, en este estudio a los 4 DDE. En las larvas que se mantienen en inanición no son evidentes (Yúfera *et al.*, 1993).

Las inclusiones densas o lipídicas se observaron en el intestino medio de las larvas de chita, al igual que en otras larvas de peces marinos como *Paralichthys dentatus* (Bisbal and Bengtson, 1995) y *Scophthalmus maximus* (Hachero-Cruzado *et al.*, 2009). Por otro lado, se han observado en el intestino anterior en *Sparus aurata* (Calzada *et al.*, 1998; Elbal *et al.*, 2004) y *Pagrus auriga* (Sánchez-Amaya *et al.*, 2007); y en el intestino posterior de *Dicentrarchus labrax* (García-Hernández *et al.*, 2001). En contraste, en las larvas de *Paralichthys californicus* (Gisbert *et al.*, 2004) y *Pseudosciaena crocea* (Mai *et al.*, 2005), no se han observado este tipo de inclusiones. Las diferencias en la absorción y acumulación de lípidos en las diferentes regiones del intestino podría ser el resultado de las diferentes clases de lípidos en las dietas de las larvas, como se ha observado recientemente en *Dicentrarchus labrax* (Gisbert *et al.*, 2005).

La digestión de los lípidos de los alimentos ingeridos por las larvas libera ácidos grasos y monoglicéridos en el lumen intestinal, que son incorporados en las células epiteliales del intestino por difusión de una forma micelar de monoglicéridos y ácidos grasos libres,

formando grandes inclusiones lipídicas en la zona apical de los enterocitos, desde donde son transportados al retículo endoplasmático, para sintetizar lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL - Very Low Density Lipoproteins) ó quilomicrones, que son liberados en la submucosa (Izquierdo *et al.*, 2000).

A los 4 DDE se observaron las primeras evidencias de absorción de lípidos en las larvas de chita, con la detección de pequeñas inclusiones lipídicas; no obstante, a partir de los 22 DDE se observaron grandes inclusiones, sobre todo en las larvas del Ensayo 2. En este sentido, las inclusiones lipídicas en los enterocitos de *A. scapularis* en estadios muy tempranos de su desarrollo larval, son evidencia de su capacidad enzimática y de la digestión y absorción de lípidos. Su acumulación temporal en estas células podría estar relacionado con la incapacidad de movilizar estos nutrientes hacia otros tejidos. La ocurrencia de grandes inclusiones se ha atribuido al enriquecimiento lipídico de las dietas de las larvas (Elbal *et al.*, 2004; Morais *et al.*, 2007; Ortiz-Delgado *et al.*, 2003), cabe destacar que las larvas de chita se alimentaron con metanauplios de *Artemia sp.* enriquecidos con lípidos a partir del 21 DDE.

En los dos ensayos se mantuvieron condiciones de cultivo y protocolo de alimentación similares; sin embargo, se observó una mayor mortalidad en las larvas del Ensayo 1. En este sentido, las diferencias en la acumulación de inclusiones lipídicas en el intestino se podría relacionar con una mayor capacidad de absorción de lípidos de las larvas del Ensayo 2, lo que promovió una mayor supervivencia (resultados no reportados). Es posible que en las larvas del Ensayo 1, la menor cantidad de inclusiones lipídicas indique un déficit en sus requerimientos lipídicos, que resultó en mayores mortalidades (Deplano *et al.*, 1991). Esta última hipótesis se corrobora con la observación de una menor cantidad de inclusiones lipídicas en los hepatocitos de las larvas del Ensayo 1, en comparación con las del Ensayo 2. Adicionalmente, las larvas del Ensayo 2 alcanzaron un mayor peso, lo que también indica su mejor estado nutricional.

Las inclusiones lipídicas aumentaron a partir de los 22 DDE; sin embargo, hasta el último día de muestreo no se observaron grandes acumulaciones de las inclusiones. En algunos casos, las grandes acumulaciones de lípidos en los enterocitos, produce esteatosis, que puede causar algunos daños patológicos, como abrasión del epitelio,

necrosis celular y/o reacciones inflamatorias a lo largo de la mucosa intestinal, como se ha observado en *Dicentrarchus labrax* (Deplano *et al.*, 1991). La deficiencia en fosfolípidos en la dieta para un transporte adecuado de los lípidos absorbidos, también puede generar esteatosis (Lazo *et al.*, 2011).

Las vacuolas supranucleares se han descrito en las larvas de diversas especies (Apéndice 1), contienen una sustancia homogénea electro-densa de coloración acidófila (Walford and Lam, 1993) y representan un mecanismo primitivo de absorción (pinocitosis) y digestión intracelular de macromoléculas proteicas que no han sido degradadas en el lumen, debido a la falta o poca producción de enzimas por las glándulas gástricas del estómago (Moyano *et al.*, 1996). En este sentido, se ha propuesto a la pinocitosis de los enterocitos del intestino posterior como un mecanismo complementario para la absorción de proteínas en las larvas, durante la ausencia de un estómago funcional (Govoni *et al.*, 1986).

En las larvas de *A. scapularis*, las vacuolas supranucleares disminuyeron con el desarrollo de las glándulas gástricas, de manera similar a lo que ocurrió en *Paralichthys californicus* (Gisbert *et al.*, 2004), *Pseudosciaena crocea* (Mai *et al.*, 2005) y *Scophthalmus rhombus* (Hachero-Cruzado *et al.*, 2009). La capacidad de absorber macromoléculas proteicas por pinocitosis es una característica general del intestino posterior de los teleósteos; sin embargo, su función puede diferir entre larvas y adultos, en larvas el alimento llega al intestino posterior muy rápidamente y la absorción de macromoléculas podría ser de importancia cuantitativa, mientras que en los adultos, pasan muchas horas antes que el alimento llegue al intestino posterior y la digestión de proteínas puede estar en una fase avanzada (Walford and Lam, 1993).

Las inclusiones lipídicas y vacuolas supranucleares en los enterocitos se han utilizado como un biomarcador del estado de la nutrición larval en estudios de fisiología digestiva en peces (Gisbert *et al.*, 2008). La reducción de la cantidad de alimento o la inanición resultan en una clara reducción o ausencia de las vacuolas supranucleares (Segner *et al.*, 1993). Las vacuolas supranucleares se observaron en los dos ensayos, lo cual podría indicar un buen estado nutricional de las larvas de chita.

Las células caliciformes (productoras de moco) del intestino de las larvas de chita se observaron a partir de los 6 DDE y su número se incrementó en relación directa con la diferenciación del epitelio intestinal, en un patrón similar al observado en *Paralichthys californicus* (Gisbert *et al.*, 2004). La función de las células caliciformes se relaciona con la producción de mucosustancias, que pueden servir como un lubricante para el paso de la masa fecal por el intestino posterior, mientras que en otras regiones del tracto digestivo protegen la mucosa y facilitan la absorción de nutrientes (Baglole *et al.*, 1997; Zambonino-Infante *et al.*, 2008).

#### **4.1.6 Glándulas anexas**

El inicio del desarrollo del páncreas, hígado y vesícula biliar en las larvas de chita se observó entre los 2 y 3 DDE y coincidió con la apertura de la boca; no obstante, en *Paralichthys dentatus* (Bisbal and Bengtson, 1995) y *Solea senegalensis* (Ribeiro *et al.*, 1999a) estos órganos están presentes al momento de la eclosión.

##### **4.1.6.1 Páncreas**

El páncreas exocrino es la principal fuente de enzimas para la digestión en el lumen intestinal de las macromoléculas que constituyen los alimentos (Zambonino-Infante *et al.*, 2008). En las larvas de chita, se observaron gránulos de zimógeno en la región apical de las células pancreáticas desde los 2 DDE, lo cual puede indicar la producción de precursores de enzimas, que serán secretadas al intestino anterior a través del conducto pancreático (Govoni *et al.*, 1986), que en esta especie se observó a partir de los 4 DDE. A medida que transcurre el desarrollo de las larvas, la extensión del páncreas y el número de gránulos de zimógeno se incrementan. No obstante, ningún elemento estructural nuevo se desarrolló en este órgano después de la diferenciación de sus regiones exocrina y endocrina y del conducto pancreático.

En las larvas que se mantienen en inanición, el páncreas muestra degeneración tisular y pérdida de su estructura acinar. Adicionalmente, se observan grandes acumulaciones de gránulos de zimógeno, lo cual podría ser el resultado de la falta del estímulo con el que el alimento induce su liberación (Yúfera *et al.*, 1993). Las características histológicas del páncreas de las larvas de *A. scapularis* no mostraron estas características, lo cual podría indicar un adecuado protocolo de alimentación. Durante la ontogenia, las larvas son especialmente sensibles a las condiciones sub-óptimas de alimentación o al estrés nutricional, debido a que la mayoría de los tejidos y órganos están bajo una progresiva e intensa diferenciación y desarrollo. En este sentido, diversos autores han utilizado el estado del intestino, del páncreas y del hígado como biomarcadores del estado nutricional y fisiológico en peces (Gisbert *et al.*, 2008; Yúfera *et al.*, 1993).

#### 4.1.6.2 Hígado

El hígado es vital para la nutrición y homeostasis de los peces. Es esencial para el metabolismo de los nutrientes, con una función predominante en el metabolismo intermediario, e importantes funciones de almacenamiento de lípidos y glucógeno, así como la producción de bilis para la emulsificación de los lípidos en el intestino para una digestión adecuada, y procesos de detoxificación (Zambonino-Infante *et al.*, 2008). El hígado generalmente está ausente cuando las larvas eclosionan, y se diferencia entre 1 y 3 DDE en diversos peces marinos (Apéndice 1). En las larvas de chita se observó desde los 2 DDE, coincidiendo con la apertura de la boca y la primera alimentación exógena.

Los hepatocitos se encontraron distribuidos entre sinusoides de vasos sanguíneos y se observaron con un citoplasma homogéneo; sin embargo, en los días posteriores al inicio de la alimentación con metanauplios de *Artemia sp.* enriquecidos, se observaron grandes inclusiones no coloreadas en el citoplasma de los hepatocitos, que hicieron migrar su núcleo a una posición periférica, indicando la acumulación de lípidos. La posición del núcleo en el citoplasma de los hepatocitos depende del grado de

acumulación de las reservas de nutrientes. Un gran núcleo central se observa en hígados que contienen pocas inclusiones lipídicas, mientras que los núcleos periféricos se observan en hígados con una gran deposición de lípidos (Zambonino-Infante *et al.*, 2008). La vacuolización hepática observada en larvas de peces es un indicativo de la absorción adecuada de nutrientes y del metabolismo de los lípidos (Gisbert *et al.*, 2008). Con el desarrollo de las larvas de chita, las inclusiones lipídicas se incrementaron al igual que el tamaño del hígado, que ocupó la mayor parte de la cavidad abdominal.

Se observaron diferencias en la cantidad de inclusiones lipídicas en el hígado de las larvas de los dos ensayos evaluados, que fue mayor en las del Ensayo 2. El estado del hígado es un buen indicador de los efectos nutricionales de dietas de diferente composición y de los regímenes de alimentación, debido a que la energía almacenada en los hepatocitos responde con sensibilidad y rapidez al estado nutricional de las larvas de peces. El glucógeno y los lípidos del hígado son la primera fuente de energía para el metabolismo de las larvas (Gisbert *et al.*, 2008). En este sentido, ya que el protocolo de cultivo y alimentación fue similar en los dos ensayos, la menor proporción de inclusiones lipídicas en las larvas del Ensayo 1, podría indicar que estas larvas tuvieron un mayor requerimiento de lípidos, lo que provocó su movilización y la disminución de sus reservas energéticas, y también podría explicar la mayor mortalidad observada en este ensayo.

Sin embargo, las características histológicas, como las inclusiones lipídicas del intestino medio y del hígado, utilizadas en este trabajo para comparar la condición nutricional de las larvas, requiere de un proceso de estandarización en esta especie, para lo cual, las larvas se pueden someter a diferentes condiciones de cultivo, como inanición, y relacionarlas con las características histológicas como el indicador principal y en forma adicional, con las tasas de mortalidad (Lazo *et al.*, 2011).

Se observó que las larvas del Ensayo 2 alcanzaron un mayor peso que las del Ensayo 1, lo cual se podría relacionar con las diferencias histológicas de las inclusiones lipídicas y la supervivencia, lo que lleva a discutir la utilización del peso como un índice para la evaluación del desarrollo del sistema digestivo y de la condición de las larvas de

esta especie; sin embargo, se recomienda profundizar en el análisis para su utilización en futuros estudios.

La vesícula biliar se observó desde los 3 DDE, ubicado entre el hígado y el páncreas. Este órgano almacena la bilis producida en el hígado a través del metabolismo del colesterol, de otros esteroides y de la hemoglobina (Lazo, 1999). La bilis es entregada al intestino anterior a través del conducto hepático, que se observó a partir de los 4 DDE, lo que indica la funcionalidad de la vesícula y del hígado.

## 4.2 Actividad enzimática

Las enzimas digestivas analizadas en las larvas de *Anisotremus scapularis* (proteasas alcalinas y ácidas totales, tripsina, leucina aminopeptidasa, lipasas dependientes de sales biliares y alfa-amilasa) fueron detectadas desde el momento de la eclosión de las larvas, antes de la apertura de la boca, lo cual podría indicar que su síntesis no es inducida por la ingestión del alimento, sino más bien programada genéticamente. Resultados similares resultados se han obtenido en diversas especies de peces marinos, en las que se detectan las enzimas entre los 0 y 3 DDE, antes del inicio de la alimentación exógena (Alvarez-González *et al.*, 2006, 2008; Cahu and Zambonino-Infante, 2001; Cara *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2006a; Galaviz *et al.*, 2011, 2012; Ma *et al.*, 2005; Martínez *et al.*, 1999; Moyano *et al.*, 1996; Moyano *et al.*, 2005; Ribeiro *et al.*, 1999b; Zacarias-Soto *et al.*, 2006; Zambonino-Infante and Cahu, 1994).

El nivel de las enzimas digestivas analizado en la chita, se incrementó con la edad, lo que confirma el patrón observado en otras especies (Cahu and Zambonino-Infante, 2001). La actividad de las enzimas en las larvas recién eclosionadas y en sus primeros días de desarrollo, puede estar relacionada con la digestión, absorción y transporte de las proteínas, lípidos y carbohidratos del saco vitelino y de la gota de aceite (Lazo *et al.*, 2007). Posteriormente, el aumento de la actividad de las enzimas fue principalmente afectada por la aparición progresiva de los órganos del sistema digestivo (Cara *et al.*, 2003).

La culminación del proceso de secreción de las enzimas pancreáticas, es decir cuando se produce un aumento abrupto de la actividad enzimática, se observó entre los 22 y 26 DDE en larvas de *A. scapularis*, un poco posterior con respecto a la edad en que se observó en *Sciaenops ocellatus* (día 18), *Pseudosciaena crocea* (día 20), *Solea senegalensis* (día 21) y *Dicentrarchus labrax* (día 25) (Ma *et al.*, 2005; Zambonino-Infante and Cahu, 2001). El incremento en la actividad de la mayoría de las enzimas puede ser el reflejo del inicio de la digestión ácida, que provee e incrementa los sustratos disponibles para otras enzimas digestivas. En este sentido, el nivel de secreción a esta edad se puede considerar como una referencia para estudiar el efecto de dietas balanceadas en las larvas de chita (Cara *et al.*, 2003; Ma *et al.*, 2005).

En los patrones de actividad específica de las enzimas digestivas analizadas, en general, se observaron incrementos súbitos de la actividad que se relacionan con los periodos de transición de la alimentación endógena a exógena (3-6 DDE), y con el cambio de alimentación de rotíferos a metanauplios de *Artemia sp.* (26 DDE). También, exceptuando la actividad de leucina aminopeptidasa, se observaron estos incrementos súbitos antes de la primera alimentación.

Las larvas de los peces marinos exhiben un patrón similar de actividad específica durante las tres primeras semanas de vida; en general, un incremento inicial, seguido de un descenso agudo, el cual depende de la especie (Zambonino-Infante and Cahu, 2001): alrededor de las tres semanas de vida en *Dicentrarchus labrax* (Zambonino-Infante and Cahu, 1994), a los 12 DDE en *Seriola lalandi* (Chen *et al.*, 2006a), a los 10 DDE en *Solea senegalensis* (Martínez *et al.*, 1999; Ribeiro *et al.*, 1999b), a los 5 DDE en *Pseudosciaena crocea* (Ma *et al.*, 2005) y entre los 6 y 10 DDE en la chita.

El incremento de la actividad específica en los primeros días de vida de las larvas se puede relacionar con el periodo de mayor diferenciación morfológica del tracto digestivo y de las glándulas asociadas (2-4 DDE). En contraste, la disminución aguda de la actividad se puede asociar con el incremento de proteínas estructurales en las larvas a medida que van creciendo, o con la reducción de la síntesis de enzimas digestivas que se relaciona con cambios en el metabolismo durante el desarrollo de las larvas, como la

absorción del saco vitelino y el desarrollo del estómago (Cahu and Zambonino-Infante, 1995; Zambonino-Infante and Cahu, 2001).

Seguido de este descenso agudo de la actividad, las enzimas pancreáticas continúan en el mismo nivel hasta el final de la etapa larval; sin embargo, se observan ligeros incrementos (22-26 DDE), generalmente relacionados con el cambio de alimento, de rotíferos a metanauplios de *Artemia* sp., y que pueden ser inducidos por la diferente composición nutricional de estos dos tipos de presas (Morais *et al.*, 2004; Moyano *et al.*, 1996). En *Dicentrarchus labrax* se comprobó que los mecanismos moleculares que controlan la actividad enzimática (tripsina y amilasa) son dependientes de la edad; sin embargo, pueden ser influenciados por la composición y cantidad del alimento (Cahu and Zambonino-Infante, 2001; Péres *et al.*, 1998).

#### **4.2.1 Proteasas**

##### **4.2.1.1 Proteasas alcalinas totales**

Durante los primeros días de desarrollo, la actividad de las proteasas alcalinas representó toda la actividad proteolítica observada en las larvas de *A. scapularis*. A partir de los 26 DDE se detectó la secreción ácida, producida por el desarrollo de las glándulas gástricas en el estómago.

Las proteasas alcalinas se detectaron en las larvas de chita recién eclosionadas, a diferencia de otras especies de peces marinos, como *Paralabrax maculatofasciatus*, en la que se detectó a los 2 DDE (Alvarez-González *et al.*, 2008). En las larvas de chita, posteriormente los valores aumentaron con el desarrollo hasta alcanzar puntos máximos entre 26 y 30 DDE.

Al comparar la actividad total de las proteasas alcalinas entre los dos ensayos, se observaron diferencias significativas a los 30 DDE, con la disminución de la actividad en las larvas del Ensayo 1. Al evaluar la actividad en función del crecimiento (longitud total), se observó que las larvas del Ensayo 1 alcanzaron un mayor tamaño en el último

día de muestreo; en este sentido, se podría relacionar la disminución de la actividad alcalina con un mayor desarrollo de las larvas, es decir, con una mayor diferenciación del estómago y por lo tanto con un aumento de la actividad proteolítica ácida. Diversos autores reportan para diferentes especies de peces un descenso en la actividad de proteasas alcalinas, principalmente tripsina, cuando el estómago se vuelve funcional y la actividad proteolítica ácida se va haciendo cargo del proceso de digestión de las proteínas (Chen *et al.*, 2006a).

#### **4.2.1.2 Tripsina**

Los patrones de actividad de las proteasas alcalinas totales y tripsina fueron similares, lo cual indica que gran parte de las proteasas presentes en las larvas de chita fueron de tipo tripsina. La actividad de tripsina, se ha descrito en casi todas las especies de larvas de teleósteos, aunque es baja al inicio de la alimentación exógena, se incrementa durante el desarrollo (Sarasquete *et al.*, 1993).

La tripsina participa de manera importante en la activación de otras proteasas alcalinas. Además, es la principal enzima que compensa las deficiencias de la actividad de las proteasas ácidas durante las primeras etapas de desarrollo de las larvas de muchos peces marinos (Moyano *et al.*, 1996; Zacarias-Soto *et al.*, 2006).

La actividad de la tripsina detectada en las larvas recién eclosionadas se puede relacionar con la digestión de las proteínas contenidas en el saco vitelino, así como con las enzimas de las glándulas de la eclosión de los peces, que generalmente son del tipo serina (Babaei *et al.*, 2011).

Cuando se hacen ensayos enzimáticos en larvas de peces, es común que se homogenice todo el organismo, esto puede ocasionar que los inhibidores de proteasas contenidos en el músculo reduzcan la actividad tipo tripsina. En este trabajo, se utilizaron larvas completas de 0 a 8 DDE; sin embargo, Munilla-Moran and Stark (1989) mostraron que con excepción de la actividad proteasa ácida, casi toda la actividad

proteolítica medida en los homogenizados de *Scophthalmus maximus* se debe a la actividad del sistema digestivo y no se ve reducida por inhibidores de proteasas de otros tejidos (Walford and Lam, 1993).

De manera similar a lo observado en las proteasas alcalinas, se encontraron diferencias significativas en la actividad de la tripsina entre los dos ensayos a los 30 DDE. Esto se podría atribuir a que las larvas del Ensayo 1 tenían un mayor tamaño y por lo tanto una mayor actividad proteolítica ácida y una menor actividad proteolítica alcalina. Este patrón se ha observado en diversas especies después de la diferenciación de las glándulas gástricas (Chen *et al.*, 2006a), que en la chita se registró a los 26 DDE.

El incremento de la actividad de tripsina asociado con el desarrollo de las larvas, se podría relacionar con la observación de un mayor número de gránulos de zimógeno (tripsinógeno) en su páncreas exocrino, los cuales serán secretados al intestino anterior a través del conducto pancreático y serán activados por las enzimas intestinales (enteroquinasa) en tripsina (Beccaria *et al.*, 1991; Zambonino-Infante and Cahu, 2001).

#### **4.2.1.3 Leucina aminopeptidasa**

La leucina aminopeptidasa es una enzima que se localiza en el borde en cepillo de las células intestinales. El incremento en su actividad caracteriza una maduración normal de los enterocitos (Zambonino-Infante and Cahu, 2001). En las larvas de chita se observó un aumento significativo de la actividad total a partir de los 4 DDE, lo cual concuerda con la observación histológica de las microvellosidades y el comienzo del plegamiento de la mucosa intestinal, que produce un aumento de la superficie para la acción de estas enzimas.

El establecimiento de la digestión a nivel de la membrana en los enterocitos, corresponde a la digestión de estas células en los adultos. La actividad de las enzimas citosólicas de las células intestinales desciende progresivamente con el desarrollo de las larvas, mientras que la actividad de las enzimas de sus membranas (como la leucina

aminopeptidasa) se incrementa (Cahu and Zambonino-Infante, 2001). La relación de estas dos actividades se utiliza para evaluar el desarrollo de las larvas; por ello, se recomienda analizar la actividad enzimática en el citosol de los enterocitos de la chita en estudios futuros.

El análisis de la actividad total y específica de la leucina aminopeptidasa hasta los 30 DDE indicó un patrón común entre ambos ensayos, aunque en las larvas del Ensayo 1 la actividad fue mayor. En el análisis de la actividad específica se observaron los valores mayores entre los primeros días y los 10 DDE, estos resultados se podrían asociar con la observación histológica de un mayor plegamiento de la mucosa intestinal en los primeros días en las larvas del Ensayo 1; sin embargo, en larvas más avanzadas no se evidenciaron las diferencias. Los incrementos en la actividad de leucina aminopeptidasa se han relacionado con una mayor supervivencia en los peces (Cahu and Zambonino-Infante, 1995); sin embargo, esta tendencia no se ha corroborado en esta especie, ya que en las larvas del Ensayo 1 se presentó un mayor porcentaje de mortalidad.

En diversas investigaciones se ha observado que la actividad específica de la leucina aminopeptidasa se incrementa abruptamente alrededor de la tercera semana de vida (Zambonino-Infante and Cahu, 2001). En *A. scapularis* se observó un incremento de esta actividad enzimática en los últimos días de muestreo (26 y 30 DDE); sin embargo, se esperaría que este incremento fuera más marcado en los días posteriores.

#### **4.2.1.4 Proteasas ácidas totales**

La actividad proteasa ácida es indicadora del inicio de la funcionalidad del estómago y se detectó a partir del 26 DDE, lo que coincidió con la observación histológica de las glándulas gástricas. Sin embargo, esta actividad sólo se detectó en las larvas del Ensayo 2, lo cual se puede atribuir a las diferencias entre los desoves de una misma especie, entre los organismos de un mismo desove o a las condiciones de las técnicas analíticas (Moyano *et al.*, 1996). Por ello, es importante corroborar la actividad de esta

enzima con técnicas histológicas, histoquímicas y/o moleculares, ya que muchos autores utilizan este momento del desarrollo del sistema digestivo como un primer criterio para iniciar el destete (Lazo *et al.*, 2007).

La detección de la actividad proteasa ácida y el comienzo de las glándulas gástricas coincide con lo que se ha observado en otras especies de peces marinos de aguas templadas, y normalmente ocurre alrededor de los 25 DDE (Zambonino-Infante and Cahu, 2001). Sin embargo, en especies precoces como *Lutjanus guttatus* (Galaviz *et al.*, 2012), *Atractoscion nobilis* (Galaviz *et al.*, 2011) y *Paralabrax maculatofasciatus* (Peña *et al.*, 2003), cultivadas en temperaturas iguales o mayores que 24°C, la actividad se detecta entre los 10 y 12 DDE.

En algunas larvas que fueron homogenizadas completas, se detectó la presencia de alguna actividad de proteasas ácidas antes de los 10 DDE. Sin embargo, esta actividad no se consideró en los resultados, ya que no está asociada con la formación del estómago y generalmente se debe a la actividad de las proteasas lisosomales de los enterocitos del intestino posterior, involucradas en la digestión intracelular de las proteínas, o a la actividad de otras proteasas ácidas presentes en el cuerpo de las larvas, como catepsinas lisosomales, ya que en estos días las larvas fueron homogenizadas *in toto* (Lazo *et al.*, 2007; Walford and Lam, 1993).

#### **4.2.2 Lipasas dependientes de sales biliares**

Los lípidos tienen múltiples funciones en la nutrición de las larvas, son la fuente principal de energía metabólica, y de ácidos grasos esenciales, que a su vez, son componentes de las membranas biológicas y también son precursores de moléculas de señalización importantes (eicosanoides, hormonas, entre otras) (Mollan *et al.*, 2008).

La presencia de enzimas lipolíticas en estadios larvales tempranos, se ha debatido por un largo tiempo (Cahu and Zambonino-Infante, 2001); sin embargo, diversos estudios en peces marinos reportan la actividad de lipasas en larvas recién eclosionadas o

pocos días después de la eclosión, como en *Seriola lalandi* (Chen *et al.*, 2006a), *Paralichthys californicus* (Alvarez-González *et al.*, 2006), *Sciaenops ocellatus* (Lazo *et al.*, 2000), *Pseudosciaena crocea* (Ma *et al.*, 2005b), *Paralabrax maculotofasciatus* (Alvarez-González *et al.*, 2008), *Solea senegalensis* (Martínez *et al.*, 1999; Ribeiro *et al.*, 1999), *Diplodus sargus* (Cara *et al.*, 2003), *Sparus aurata* (Moyano *et al.*, 1996), *Dicentrarchus labrax* (Zambonino-Infante and Cahu, 1994), y en *A. scapularis*. La digestión de lípidos en la chita se confirmó con la observación de inclusiones lipídicas en las células epiteliales del intestino desde los 4 DDE.

Oozeki and Bailey (1995) sugirieron que existen dos tipos de lipasas en las larvas de peces marinos, una relacionada a la absorción de las reservas endógenas, y la otra, cuya actividad se desarrolla después, y que se relaciona con la digestión de lípidos exógenos (Cara *et al.*, 2003). En las larvas de chita, la actividad de lipasas se observó a partir de la eclosión, posteriormente disminuyó y entre los 3 y 4 DDE aumentó. Este patrón de actividad se podría relacionar con los dos tipos de lipasas mencionados anteriormente, la primera para la absorción de los lípidos del saco vitelino y la gota de aceite, y, la segunda para la digestión de los alimentos ingeridos por las larvas a partir del 2 DDE.

La lipasa, en mayor proporción detectada en el tracto digestivo de peces, parece ser no específica y dependiente de sales biliares (BAL). Esta enzima cataliza la hidrólisis de acilglicéridos y de otras grasas menores, incluidas en las dietas como ésteres de colesterol y ésteres de vitaminas. La expresión genética de BAL se localiza específicamente en el páncreas exocrino y aumenta progresivamente con el desarrollo de las larvas (Gjellesvik *et al.*, 1992; Izquierdo *et al.*, 2000; Lazo *et al.*, 2011), tal como se observó en las larvas de chita.

La actividad de las lipasas es estimulada por el incremento de su sustrato en la dieta (Zambonino-Infante and Cahu, 2001). En las larvas de chita se observaron incrementos significativos de esta actividad desde los 14 a los 30 DDE, a diferencia de lo que se observó en las otras enzimas pancreáticas evaluadas (tripsina y amilasa) que mostraron incrementos significativos a partir de los 26 DDE. Estos resultados se podrían relacionar

con el suministro de dietas vivas, enriquecidas con ácidos grasos, que estimularon el incremento en la actividad de esta enzima.

Se observó que la actividad total de las lipasas en las larvas del Ensayo 1 fue significativamente mayor. En relación con la actividad específica, no se observaron diferencias tan marcadas. El protocolo de cultivo y de alimentación fueron similares entre ambos ensayos; por ello, las diferencias se podrían atribuir a las distintas características que en forma común se observan entre los desoves de una misma especie (Moyano *et al.*, 1996).

#### 4.2.3 Alfa-amilasa

La alfa-amilasa es la enzima responsable de la hidrólisis del enlace glucosídico  $\alpha$ -1,4 del glucógeno, almidón, polisacáridos y oligosacáridos relacionados que contienen tres o más unidades de glucosa. La función principal de los productos digeridos y absorbidos, es suministrar energía para el organismo (Lazo *et al.*, 2011). La actividad amilasa se ha reportado en larvas de varias especies de peces marinos, como *Seriola lalandi* (Chen *et al.*, 2006a), *Paralichthys californicus* (Alvarez-González *et al.*, 2006), *Sciaenops ocellatus* (Lazo *et al.*, 2000), *Pseudosciaena crocea* (Ma *et al.*, 2005), *Paralabrax maculotofasciatus* (Alvarez-González *et al.*, 2008), *Solea senegalensis* (Martínez *et al.*, 1999; Ribeiro *et al.*, 1999), *Diplodus sargus* (Cara *et al.*, 2003), *Sparus aurata* (Moyano *et al.*, 1996) y *Dicentrarchus labrax* (Zambonino-Infante and Cahu, 1994).

En la chita, se detectó la alfa-amilasa en las larvas recién eclosionadas, de manera similar a lo que se ha observado en *Seriola lalandi* y *Paralichthys californicus*. Posteriormente, la actividad total de amilasa se incrementó con la edad. De manera similar a lo que ocurre con la tripsina, la presencia de amilasa se considera como un indicador de la maduración del páncreas exocrino de las larvas de peces (Lazo *et al.*, 2011); en este sentido, la mayor extensión del páncreas y el incremento de sus gránulos de zimógeno se relaciona con la mayor actividad de esta enzima.

La actividad específica de la alfa-amilasa en las larvas de *A. scapularis* fue alta durante los primeros días después de la eclosión, posteriormente, disminuyó en forma abrupta. En diferentes estudios se ha observado que este descenso en la actividad específica, se relaciona con los niveles de mRNA de amilasa detectados en las larvas, así, en los primeros días después de la eclosión se observan altos niveles de mRNA en comparación con los estadios más avanzados. El descenso coordinado entre la actividad específica y los niveles de mRNA, sugieren una regulación transcripcional de la expresión de la amilasa durante el desarrollo larval; sin embargo, esta regulación puede ser modulada por la concentración de glúcidos en la dieta (Cahu and Zambonino-Infante, 2001). En las larvas de chita, la pequeña cantidad de carbohidratos en el alimento vivo podría ser la causa del descenso de la actividad de alfa-amilasa.

La actividad de alfa-amilasa no mostró diferencias significativas entre los ensayos, se observaron patrones muy similares en la actividad total y específica. El patrón particular de actividad de la amilasa, podría sugerir una predisposición natural de las larvas para el uso de carbohidratos de los alimentos durante las primeras semanas de vida (Zambonino-Infante *et al.*, 2008); por ello, la ontogenia de esta enzima se debe considerar en el diseño de dietas balanceadas para las larvas de chita.

### **4.3 Sugerencias para el destete**

De acuerdo con el protocolo de alimentación que actualmente se utiliza en el IMARPE, las larvas de *Anisotremus scapularis* se alimentaron con presas vivas hasta el último día de muestreo, ya que el destete (suministro de alimento balanceado), comienza a partir de los 40 DDE (IMARPE, 2015).

En organismos cultivados, el desarrollo progresivo de las glándulas gástricas se ha considerado en forma empírica como el periodo adecuado para el destete (Bisbal and Bengtson, 1995). Sin embargo, la presencia de estas glándulas no determina la completa funcionalidad del estómago, es también necesaria la actividad de pepsina (proteasa ácida) y la acidificación necesaria para que esta actividad tenga lugar (Yúfera

*et al.*, 2004). En las larvas de chita se observaron las glándulas gástricas y la actividad de proteasas ácidas desde los 26 DDE, por lo que se podría recomendar esta edad como la adecuada para iniciar el destete.

Es importante mencionar que otras especies de peces marinos, como *Sciaenops ocellatus* (Lazo *et al.*, 2000b) y *Dicentrarchus labrax* (Cahu *et al.*, 2003; Zambonino-Infante and Cahu, 2007), se han destetado antes de que culmine el desarrollo de las glándulas gástricas, estos resultados sugieren que no es indispensable que las larvas de estas especies cuenten con un estómago funcionalmente desarrollado. En este sentido, se recomienda relacionar los resultados de la actividad enzimática obtenidos en el presente estudio con la formulación de dietas balanceadas, adecuadas para las larvas de chita, antes del desarrollo total de su estómago. Adicionalmente, se sugiere que el estudio de la expresión y función de los genes asociados con las diferentes actividades enzimáticas, realizados en otras especies, sea una herramienta para la comprensión de las capacidades digestivas de las larvas de *A. scapularis* (Lazo *et al.*, 2011).

## Capítulo 5. Conclusiones

---

1. Los eventos del desarrollo del sistema digestivo de *Anisotremus scapularis* fueron similares a los observados en otras especies de la familia Lutjanidae y Sparidae, familias relacionadas filogenéticamente con la familia de la chita.
2. Entre los 2 y 4 DDE, se observaron los mayores cambios en el desarrollo del sistema digestivo, entre los más importantes están la diferenciación de la bucofaringe, esófago e intestino, plegamiento de la mucosa intestinal, la formación de las microvellosidades en los enterocitos, y el desarrollo de sus glándulas anexas, hígado y páncreas, los cuales permitieron la ingestión, digestión y absorción de los primeros alimentos exógenos ingeridos por las larvas de chita.
3. A partir de los 26 DDE se observó el desarrollo del estómago, con la diferenciación de las glándulas gástricas.
4. El intestino anterior, medio y posterior fueron histológicamente y funcionalmente distintos. En los enterocitos del intestino medio se observaron inclusiones lipídicas, que indicaron la absorción de lípidos y en los del intestino posterior, vacuolas supranucleares, que indicaron la absorción de macromoléculas proteicas por pinocitosis.
5. Las enzimas digestivas analizadas en las larvas de *A. scapularis* (proteasas alcalinas y ácidas totales, tripsina, leucina aminopeptidasa, lipasas dependientes de sales biliares y alfa-amilasa) se detectaron desde el momento de la eclosión de las larvas, antes de la apertura de la boca, e incrementaron su actividad con la edad de los organismos.
6. El aumento de la actividad de las enzimas se relacionó con la aparición progresiva de los órganos del sistema digestivo, principalmente el páncreas (proteasas alcalinas totales, tripsina, lipasas, alfa-amilasa), microvellosidades y plegamiento de la mucosa intestinal (leucina aminopeptidasa) y estómago (proteasas ácidas totales).
7. En general, en los dos ensayos se observaron incrementos de la actividad total de las enzimas entre los 8 y 10 DDE o a los 4 mm de longitud total (LT), particularmente con aumentos más marcados en la actividad de las lipasas y de la leucina aminopeptidasa. Para la actividad de proteasas alcalinas totales, tripsina y alfa-amilasa, los aumentos fueron evidentes a partir de los 22 DDE o entre 6 y 7 mm de

LT. La actividad proteasa ácida se evidenció e incrementó a partir del 26 DDE o a los 9 mm de LT.

8. En los patrones de actividad específica de las enzimas digestivas analizadas, en general, se observaron incrementos súbitos de la actividad que se relacionan con los periodos de transición de la alimentación endógena a exógena (3-6 DDE), y con el cambio de alimentación de rotíferos a metanauplios de *Artemia sp.* (26 DDE). También, exceptuando la actividad de leucina aminopeptidasa, se observaron estos incrementos súbitos antes de la primera alimentación.
9. Con base al análisis histológico y bioquímico de las larvas de chita, se recomienda iniciar el destete a los 26 DDE.

## Capítulo 6. Recomendaciones

---

1. Realizar el análisis histológico y bioquímico de las larvas de *Anisotremus scapularis* entre 30 y 50 DDE para observar cuando se produce la diferenciación total del estómago y de los ciegos pilóricos, e incrementos significativos de la actividad proteasa ácida.
2. Elaborar una guía de las características histológicas del intestino, hígado y páncreas para comparar la condición nutricional de las larvas, para lo cual, las larvas se pueden someter a diferentes condiciones de cultivo, como inanición, y relacionarlas con las características histológicas como el indicador principal y en forma adicional, con las tasas de mortalidad.
3. Desarrollar un índice integrativo para la evaluación del desarrollo del sistema digestivo y de la condición de las larvas en esta especie.
4. Complementar los análisis histológicos y bioquímicos con la aplicación de técnicas moleculares, para la comprensión de las capacidades digestivas de las larvas de *A. scapularis*.

## Lista de referencias bibliográficas

- Alarcón, F. J. (1997). *Procesos digestivos en peces marinos: Caracterización y aplicaciones prácticas*. Tesis doctoral. Universidad de Almería. 187 p.
- Alarcón, F. J., Diaz, M., Moyano, F. J. and Abellan, E. (1998). Characterization and functional properties of digestive proteases in two sparids; gilthead seabream (*Sparus aurata*) and common dentex (*Dentex dentex*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 19, 257–267. Recuperado de: <http://doi.org/10.1023/A:1007717708491>
- Alvarez-González, C. (2003). *Actividad enzimática digestiva y evaluación de dietas para el destete de larvas de la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus**. Tesis doctoral. Instituto Politécnico Nacional Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas. 179 p.
- Alvarez-González, C. A., Cervantes-Trujano, M., Tovar-Ramírez, D., Conklin, D. E., Nolasco, H., Gisbert, E. and Piedrahita, R. (2006). Development of digestive enzymes in California halibut *Paralichthys californicus* larvae. *Fish Physiology and Biochemistry*, 31, 83–93. Recuperado de: <http://doi.org/10.1007/s10695-006-0003-8>
- Alvarez-González, C. A., Moyano-López, F. J., Civera-Cerecedo, R., Carrasco-Chávez, V., Ortíz-Galindo, J. L. and Dumas, S. (2008). Development of digestive enzyme activity in larvae of spotted sand bass *Paralabrax maculatofasciatus* I: Biochemical analysis. *Fish Physiology and Biochemistry*, 34(4), 373–384.
- Angel, A. and Ojeda, P. (2001). Structure and trophic organization of subtidal fish assemblages on the northern chilean coast: The effect of habitat complexity. *Marine Ecology Progress Series*, 217, 81–91.
- Appel. (1974). Peptidasas. Leucina aminopeptidasa. In: H. U. Bergmeyer (Ed.), *Methods of enzymatic analysis*. (pp. 949-999). Academic Press..
- Babaei, S. S., Abedian Kenari, A., Nazari, R. and Gisbert, E. (2011). Developmental changes of digestive enzymes in Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) during larval ontogeny. *Aquaculture*, 318(1-2), 138–144. Recuperado de: <http://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.04.032>
- Baglolle, C., Murray, H., Goff, G. and Wright, G. (1997). Ontogeny of the digestive tract during larval development of yellowtail flounder: a light microscopic and mucous histochemical study. *Journal of Fish Biology*, 51, 120–134. Recuperado de: <http://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1997.tb02518.x>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.

- Béarez, P., Goriti, M. y Eeckhout, P. (2003). Primeras observaciones sobre el uso de invertebrados y peces marinos en Pachacamac (Perú) en el siglo XV (Periodo Intermedio Tardío). *Bulletin de l'Institut Français d'Études Andines*, 32(1), 51–67.
- Beccaria, C., Diaz, J. P., Connes, R. and Chatain, B. (1991). Organogenesis of the exocrine pancreas in the sea bass, *Dicentrarchus labrax* L., reared extensively and intensively. *Aquaculture*, 99, 339–354. Recuperado de: [http://doi.org/10.1016/0044-8486\(91\)90254-5](http://doi.org/10.1016/0044-8486(91)90254-5)
- Bernardi, G., Alva-Campbell, Y. R., Gasparini, J. L. and Floeter, S. R. (2008). Molecular ecology, speciation, and evolution of the reef fish genus *Anisotremus*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 48, 929–935. Recuperado de: <http://doi.org/10.1016/j.ympev.2008.05.011>
- Berrios, C. y Vargas, M. (2004). Estructura trófica de la asociación de peces intermareales de la costa rocosa del norte de Chile. *Rev. Biol. Trop.*, 52(1), 201–212. <http://doi.org/10.3989/scimar.2004.68s1215>
- Bisbal, G. A. and Bengtson, D. A. (1995). Development of the digestive tract in larval summer flounder. *Journal of Fish Biology*, 47, 277–291. Recuperado de: <http://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1995.tb01895.x>
- Cahu, C. L. and Zambonino-Infante, J. L. (1995). Maturation of the pancreatic and intestinal digestive functions in sea bass (*Dicentrarchus labrax*): Effect of weaning with different protein sources. *Fish Physiology and Biochemistry*, 14(6), 431–437. Recuperado de: <http://doi.org/10.1007/BF00004343>
- Cahu, C. L., Zambonino-Infante, J. L., Le Gall, M. M. and Quazugel, P. (1995) Early weaning of sea bass: are digestive enzymes limiting? In: P. Lavens, E. Jaspers and I. Puolants (Eds). *Larvi '95, Fish and Shellfish Larviculture Symposium*. (pp. 268–271).
- Cahu, C. and Zambonino-Infante, J. (2001). Substitution of live food by formulated diets in marine fish larvae. *Aquaculture*, 200, 161–180. Recuperado de: [http://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00699-8](http://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00699-8)
- Calzada, A., Medina, A. and González de Canales, M. L. (1998). Fine structure of the intestine development in cultured sea bream larvae. *Journal of Fish Biology*, 53, 340–365. Recuperado de: <http://doi.org/10.1006/jfbi.1998.0703>
- Cara, J. B., Moyano, F. J., Cárdenas, S., Fernández-Díaz, C. and Yúfera, M. (2003). Assessment of digestive enzyme activities during larval development of white bream. *Journal of Fish Biology*, 63, 48–58. Recuperado de: <http://doi.org/10.1046/j.1095-8649.2003.00120.x>
- Castro-Romero, R. and Baeza-Kuroki, H. (1985a). *Lernanthropus antofagastensis* sp. nov. (Copepoda: Lernanthropidae) parasitic on *Anisotremus scapularis* in Chilean waters, and new records of *Lernanthropus trachure* (Brian, 1903). *Journal of Natural*

*History*, 19(2), 407–414. Recuperado de: <http://doi.org/10.1080/00222938500770281>

- Castro-Romero, R. and Baeza-Kuroki, H. (1985b). Two new species and one new record of *Clavella* (Copepoda: Lernaepodidae) from inshore fishes of Antofagasta, Chile. *Systematic Parasitology*, 7, 103–110. Recuperado de: <http://doi.org/10.1007/BF00009813>
- Castro-Romero, R. and Baeza-Kuroki, H. (1989). *Neobrachiella anisotremi*, new species (Copepoda: Lernaepodidae), parasitic on an inshore fish, *Anisotremus scapularis*, off the Chilean coast. *Proceedings of the Biological Society of Washington*, 102(1): 106–108.
- Cataldi, E., Cataudella, S., Monaco, G., Rossi, A. and Tancioni, L. (1987). A study of the histology and morphology of the digestive tract of the sea bream, *Sparus aurata*. *Journal of Fish Biology*, 30, 135–145. Recuperado de: <http://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1987.tb05740.x>
- Chen, B. N., Qin, J. G., Kumar, M. S., Hutchinson, W. G. and Clarke, S. M. (2006a). Ontogenetic development of digestive enzymes in yellowtail kingfish *Seriola lalandi* larvae. *Aquaculture*, 260, 264–271. Recuperado de: <http://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.06.021>
- Chen, B. N., Qin, J. G., Kumar, M. S., Hutchinson, W. G., & Clarke, S. M. (2006b). Ontogenetic development of digestive system in yellowtail kingfish *Seriola lalandi* larvae. *Aquaculture*, 256, 489–501. Recuperado de: <http://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.06.021>
- Chero, J., Cruces, C., Iannacone, J., Saez, G. y Alvarino, L. (2014). Helminths parasites of *Anisotremus scapularis* (Tschudi, 1846) (Perciformes: Haemulidae) “chita” acquired in the terminal fishery of Villa María del Triunfo, Lima, Perú. *Neotrop. Helminthol.*, 8(2), 411-428.
- Chirichigno, N. and Velez, M. (1998). *Clave para identificar los peces marinos del Perú*. Publicación especial del Instituto del Mar del Perú. Lima. 500 p.
- Conceição, L., Aragão, C. and Ronnestad, I. (2011). Proteins. In: G. J. Holt (Ed.), *Larval Fish Nutrition*. (pp. 83-116). Wiley-Blackwell.
- Darias, M. J., Sarasquete, C. and Yúfera, M. (2007). Larval organogenesis of *Pagrus pagrus* L., 1758 with special attention to the digestive system development. *Histology and Histopathology*, 22, 753–768.
- Deplano, M., Diaz, J. P., Connes, R., Kentouri-Divanach, M. and Cavalier, F. (1991). Appearance of lipid-absorption capacities in larvae of the sea bass *Dicentrarchus labrax* during transition to the exotrophic phase. *Marine Biology*, 108, 361–371.
- Dhert, P., Divanach, P., Kentouri, M. and Sorgeloos, P. (1998). Rearing techniques for difficult marine fish larvae. *World Aquaculture*, 48–55.

- Diaz, M., Moyano, F. J., Garcia Carreno, F. L., Alarcon, F. J. and Sarasquete, M. C. (1997). Substrate-SDS-PAGE determination of protease activity through larval development in sea bream. *Aquaculture International*, 5, 461–471.
- Elbal, M. T., García Hernández, M. P., Lozano, M. T. and Agulleiro, B. (2004). Development of the digestive tract of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). Light and electron microscopic studies. *Aquaculture*, 234, 215–238. Recuperado de: <http://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2003.11.028>
- Erlanger, B. F., Kokowsky, N. and Cohen, W. (1961). The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Arch. Biochem. Biophys.*, (95), 271–278.
- Falk-Petersen, I. B. (2005). Comparative organ differentiation during early life stages of marine fish. *Fish and Shellfish Immunology*, 19(1050), 397–412. Recuperado de: <http://doi.org/10.1016/j.fsi.2005.03.006>
- Fuiman, L. A. (1994). The interplay of ontogeny and scaling in the interactions of fish larvae and their predators. *Journal of Fish Biology*, 45(Suplement A), 55-79. Recuperado de: <http://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1994.tb01084.x>
- Fuiman, L. A. and Higgs, D. M. (1997). Ontogeny, growth and the recruitment process. In: C. Chambers and E. A. Trippel (Eds.), *Early life History and Recruitment in Fish Populations*. (pp. 225–249). Chapman and Hall.
- Galaviz, M. A., García-Gasca, A., Drawbridge, M., Álvarez-González, C. A. and López, L. M. (2011). Ontogeny of the digestive tract and enzymatic activity in white seabass, *Atractoscion nobilis*, larvae. *Aquaculture*, 318(1-2), 162–168. Recuperado de: <http://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.05.014>
- Galaviz, M. A., García-Ortega, A., Gisbert, E., López, L. M. and Gasca, A. G. (2012). Expression and activity of trypsin and pepsin during larval development of the spotted rose snapper *Lutjanus guttatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, Part B, 161(1), 9–16. Recuperado de: <http://doi.org/10.1016/j.cbpb.2011.09.001>
- Gárate, A. y Pacheco, A. (2004). Cambios en la distribución y abundancia de la ictiofauna de aguas someras en San Bartolo (Lima, Perú) después del ENSO 1997-98. *Ecología Aplicada*, 3(1,2). Recuperado de: <http://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- García Hernández, M. P., Lozano, M. T., Elbal, M. T. and Agulleiro, B. (2001). Development of the digestive tract of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). Light and electron microscopic studies. *Anatomy and Embryology*, 204, 39–57.
- Genten, F., Terwinghe, E. and Danguy, A. (2009). *Atlas of Fish Histology*. Enfield, NH, Science Publishers.
- Gisbert, E., Giménez, G., Fernández, I., Kotzamanis, Y. and Estévez, A. (2009). Development of digestive enzymes in common dentex *Dentex dentex* during early

- ontogeny. *Aquaculture*, 287(3-4), 381–387. Recuperado de: <http://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.10.039>
- Gisbert, E., Ortiz-Delgado, J. B. and Sarasquete, C. (2008). Nutritional cellular biomarkers in early life stages of fish. *Histology and Histopathology*, 23, 1525–1539.
- Gisbert, E., Piedrahita, R. H. and Conklin, D. E. (2004). Ontogenetic development of the digestive system in California halibut (*Paralichthys californicus*) with notes on feeding practices. *Aquaculture*, 232, 455–470. Recuperado de: [http://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00457-5](http://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00457-5)
- Gisbert, E., Villeneuve, L., Zambonino-Infante, J. L., Quazuguel, P. and Cahu, C. L. (2005). Dietary phospholipids are more efficient than neutral lipids for long-chain polyunsaturated fatty acid supply in European sea bass *Dicentrarchus labrax* larval development. *Lipids*, 40(6), 609–618. Recuperado de: <http://doi.org/10.1007/s11745-005-1422-0>
- Gjellesvik, D. R., Lombardo, D. and Walther, B. T. (1992). Pancreatic bile-salt dependent lipase from cod (*Gadus morhua*): purification and Properties. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1124, 123–134. Recuperado de: [http://doi.org/10.1016/0005-2760\(92\)90088-D](http://doi.org/10.1016/0005-2760(92)90088-D)
- Govoni, J. J. (1980). Morphological, histological, and functional aspects of alimentary canal and associated organ development in larval *Leiosromus xanthurus*. *Rev. Can. Biol*, 39: 69-80.
- Govoni, J. J., Boehlert, G. W. and Watanabe, Y. (1986). The physiology of digestion in fish larvae. *Environmental Biology of Fishes*, 16(1-3), 59–77. Recuperado de: <http://doi.org/10.1007/BF00005160>
- Hachero-Cruzado, I., Ortiz-Delgado, J. B., Borrega, B., Herrera, M., Navas, J. I. and Sarasquete, C. (2009). Larval organogenesis of flatfish brill *Scophthalmus rhombus* L: Histological and histochemical aspects. *Aquaculture*, 286(1-2), 138–149. Recuperado de: <http://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.09.039>
- Holt, G. J. (1993). Feeding larval red drum on microparticulate diets in a closed recirculating water system. *Journal of the World Aquaculture Society*, 24(2), 225–230. Recuperado de: <http://doi.org/10.1111/j.1749-7345.1993.tb00011.x>
- Humann, P. and N. Deloach (Ed.), 1993. *Reef fish identification: Galápagos*. New York, New World Publications. 267 pp.
- Humason, G. L. (1979). *Animal tissue techniques*. (4th ed.), San Francisco, W. H. Freeman. 661 pp.
- Iannacone, J. y Alvarino, L. (2009). Aspectos cuantitativos de la parasitofauna de *Anisotremus scapularis* capturados por pesquería artesanal en Chorrillos, Lima, Perú. *Rev. Ibero-Latinoam, Parasitol.*, 1, 56–64.

- Iannacone, J. y Alvariño, L. (2012). Microecología del monogeneo *Mexicana* sp. en las branquias de *Anisotremus scapularis* (Tschudi, 1846) (Osteichthyes, Haemulidae) de la costa marina de Lima, Perú. *Neotrop. Helmonthol.*, 6(2), 277–285.
- IMARPE. (2015). Ciclo De Vida De La Chita *Anisotremus scapularis*. *Serie de Divulgación Científica*, 1(1). Lima. 24 pp.
- Izquierdo, M. S., J. Socorro, L. Arantzamendi y C. M. Hernández-Cruz. 2000. Digestión, absorción y utilización de lípidos en larvas de peces marinos. En: R. Civera-Cerecedo, C. J. Pérez-Estrada, D. Ricque-Marie y L. E. Cruz-Suárez (Eds.), *Avances en Nutrición Acuícola IV - Memorias del IV Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*. (pp 251-263).
- Jaime, M. and Wosnitza-Mendo, C. (2014). Reconstruction of total marine fisheries catches for Peru: 1950-2010. *Fishery Centre The University of British Columbia*, 21.
- Kjorsvik, E., Pittman, K. and Pavlov, D., 2004. From fertilisation to the end of metamorphosis - functional development. In: E. Moksness, E. Kjorsvik, Y. Olsen (Eds.). *Culture of Cold - Water Marine Fish*. (pp. 204–278). Blackwell Publishing.
- Kolkovski, S. (2001). Digestive enzymes in fish larvae and juveniles - implications and applications to formulated diets. *Aquaculture*, 200, 181–201. [http://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00700-1](http://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00700-1)
- Kong-Urbina, I. y Castro-Fuentes, H. (2002). Guia de Biodiversidad N° 3 Vol. I Macrofauna y Algas Marinas. *Centro Regional de Estudios y Educación Ambiental II Región de Antofagasta-Chile*, 1, 23.
- Koven, W. M., Kolkovski, S., Tandler, A., Kissil, G. W. and Sklan, D. (1993). The effect of dietary lecithin and lipase, as a function of age, on n-9 fatty acid incorporation in the tissue-lipids of *Sparus aurata* larvae. *Fish Physiology and Biochemistry*, 10(5), 327–334.
- Lazo, J. P. (1999). *Development of the digestive system in red drum (Sciaenops ocellatus) larvae*. PhD Thesis. The University of Texas at Austin. 212 p.
- Lazo, J. P., Darias, M. J. and Gisbert, E. (2011). Ontogeny of the digestive tract. In: G. J. Holt (Ed.), *Larval Fish Nutrition*. (pp. 5-46). Wiley-Blackwell.
- Lazo, J. P., Holt, G. J. and Arnold, C. R. (2000a). Ontogeny of pancreatic enzymes in larval red drum *Sciaenops ocellatus*. *Aquaculture Nutrition*, 6, 183–192.
- Lazo, J. P., Dinis, M. T., Holt, G. J., Faulk, C. and Arnold, C. R. (2000b). Co-feeding microparticulate diets with algae: Toward eliminating the need of zooplankton at first feeding in larval red drum (*Sciaenops ocellatus*). *Aquaculture*, 188, 339–351. Recuperado de: [http://doi.org/10.1016/S0044-8486\(00\)00339-2](http://doi.org/10.1016/S0044-8486(00)00339-2)
- Lazo, J. P., Mendoza, R., Holt, G. J., Aguilera, C. and Arnold, C. R. (2007). Characterization of digestive enzymes during larval development of red drum

(*Sciaenops ocellatus*). *Aquaculture*, 265, 194–205. Recuperado de: <http://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.01.043>

Llagostera, A., Kong, I. y Iratchet, P. (1999). Análisis ictioarquelógico del sitio La Chimba 13 (II Región, Chile). *Chungara*, 29(2), 163–179.

Ma, H., Cahu, C., Zambonino-Infante, J., Yu, H., Duan, Q., Le Gall, M. M. and Mai, K. (2005). Activities of selected digestive enzymes during larval development of large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*). *Aquaculture*, 245, 239–248. Recuperado de: <http://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.11.032>

Mai, K., Yu, H., Ma, H., Duan, Q., Gisbert, E., Zambonino-Infante, J. L. and Cahu, C. L. (2005). A histological study on the development of the digestive system of *Pseudosciaena crocea* larvae and juveniles. *Journal of Fish Biology*, 67, 1094–1106. Recuperado de: <http://doi.org/10.1111/j.0022-1112.2005.00812.x>

Martínez, I., Moyano, F. J., Fernández-Díaz, C. and Yúfera, M. (1999). Digestive enzyme activity during larval development of the Senegal sole (*Solea senegalensis*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 21, 317–323.

Medina, M., Araya, M. y Vega, C. (2004). Alimentación y relaciones tróficas de peces costeros de la zona norte de Chile. *Invest. Mar.*, 32(1), 33–47. Recuperado de: <http://doi.org/10.4067/S0717-71782004000100004>

Ministerio de la Producción. (2010). *Plan nacional de desarrollo acuícola*. Lima. 94 pp.

Ministerio de la Producción. (2013). *Programa nacional de ciencia, desarrollo tecnológico e innovación en acuicultura (C+DT+i) 2013-2021*. Lima. 46 pp.

Ministerio de la Producción. (2015). *Anuario Estadístico Pesquero y Acuícola 2014*. Lima. 196 pp.

Moguel-Hernández, I., Peña, R., Andree, K. B., Tovar-Ramirez, D., Bonacic, K., Dumas, S. and Gisbert, E. (2016). Ontogeny changes and weaning effects in gene expression patterns of digestive enzymes and regulatory digestive factors in spotted rose snapper (*Lutjanus guttatus*) larvae. *Fish Physiology and Biochemistry*, 1–16. Recuperado de: <http://doi.org/10.1007/s10695-016-0220-8>

Moguel-Hernández, I., Peña, R., Nolasco-Soria, H., Dumas, S. and Zavala-Leal, I. (2013). Development of digestive enzyme activity in spotted rose snapper, *Lutjanus guttatus* (Steindachner, 1869) larvae. *Fish Physiology and Biochemistry*, 40, 839–848. Recuperado de: <http://doi.org/10.1007/s10695-013-9890-7>

Mollan, T. A., Tonheim, S. K. and Hamre, K. (2008). Pre-hydrolysis improves absorption of neutral lipids in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*, L.) larvae. *Aquaculture*, 275, 217–224. Recuperado de: <http://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.12.009>

- Morais, S., Conceição, L. E. C., Rønnestad, I., Koven, W., Cahu, C., Zambonino-Infante, J. L. and Dinis, M. T. (2007). Dietary neutral lipid level and source in marine fish larvae: Effects on digestive physiology and food intake. *Aquaculture*, 268, 106–122. Recuperado de: <http://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.04.033>
- Morais, S., Lacuisse, M., Conceicao, L. E. C., Dinis, M. T. and Ronnestad, I. (2004). Ontogeny of the digestive capacity of Senegalese sole (*Solea senegalensis*), with respect to digestion, absorption and metabolism of amino acids from *Artemia*. *Marine Biology*, 145, 243–250. Recuperado de: <http://doi.org/10.1007/s00227-004-1326-6>
- Moyano, F. J., Barros, A. M., Prieto, A., Cañavate, J. P. and Cárdenas, S. (2005). Evaluación de la ontogenia de enzimas digestivas en larvas de hurta, *Pagrus auriga* (Pisces : Sparidae). *Revista AquaTIC*, 22, 39–47.
- Moyano, F. J., Díaz, M., Alarcón, F. J. and Sarasquete, M. C. (1996). Characterization of digestive enzyme activity during larval development of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 15(2), 121–130. Recuperado de: <http://doi.org/10.1007/BF01875591>
- Munilla-Moran, R. and Stark, J. R. (1989). Protein digestion in early turbot larvae, *Scophthalmus maximus* (L.). *Aquaculture*, 81, 315–327.
- Oliva, M. (1987). *Choricotyle anisotremi* n. sp. (Monogenea: Dicliphoridae) parasitic on *Anisotremus scapularis* (Tschudi) from the northern Chilean coast. *Systematic Parasitology*, 10, 129–133. Recuperado de: <http://doi.org/10.1007/BF00009618>
- Oliva, M. and Carvajal, J. (1984). *Lobatostoma anisotremum* new species, (Trematoda: Aspidogastrea), parasitic in the teleost fish *Anisotremus scapularis* from Chile. *Bulletin of Marine Science*, 35(2), 195–199.
- Oliva, M. E., González, M. T., Ruz, P. M. and Luque, J. L. (2009). Two new species of *Choricotyle* Van Beneden & Hesse (Monogenea: Dicliphoridae), parasites from *Anisotremus scapularis* and *Isacia conceptionis* (Haemulidae) from northern Chilean coast. *The Journal of Parasitology*, 95(5), 1108–1111. Recuperado de: <http://doi.org/10.1645/GE-2038.1>
- Oliva, M. and Luque, J. (1989). The genus *Lobatostoma* (Trematoda: Aspidocotylea) in the Pacific coast of South Smerica, with description of *Lobatostoma veranoi* new species, parasite of *Menticirrhus ophicephalus* (Teleostei: Scianidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 84(2), 167–170.
- Oozeki, Y. and Bailey, K. M. (1995). Ontogenetic development of digestive enzyme activities in larval walleye pollock, *Theragra chalcogramma*. *Marine Biology Berlin*, 122, 177–186.
- Orrell, T. M., Carpenter, K. E., Musick, J. A. and Graves, J. E. (2002). Phylogenetic and biogeographic analysis of the sparidae (Perciformes: Percoidei) from cytochrome b

- sequences. *Copeia*, 3, 618–631. Recuperado de: [http://doi.org/10.1643/0045-8511\(2002\)002\[0618:PABAOT\]2.0.CO;2](http://doi.org/10.1643/0045-8511(2002)002[0618:PABAOT]2.0.CO;2)
- Ortiz-Delgado, J. B., Darias, M. J., Cañavate, J. P., Yúfera, M. and Sarasquete, C. (2003). Organogenesis of the digestive tract in the white seabream, *Diplodus sargus*. Histological and histochemical approaches. *Histology and Histopathology*, 18, 1141–1154.
- Paschoal, F., Cezar, A. D. and Luque, J. L. (2015). Checklist of metazoan associated with grunts (Perciformes, Haemulidae) from the Nearctic and Neotropical regions. *Check List*, 11(1), 1501. Recuperado de: <http://doi.org/10.15560/11.1.1501>
- Peña, R., Dumas, S., Villalejo-Fuerte, M. and Ortíz-Galindo, J. L. (2003). Ontogenetic development of the digestive tract in reared spotted sand bass *Paralabrax maculatofasciatus* larvae. *Aquaculture*, 219, 633–644. Recuperado de: [http://doi.org/10.1016/S0044-8486\(02\)00352-6](http://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00352-6)
- Pepin, P. (1995). An analysis of the length-weight relationship of larval fish: Limitations of the general allometric model. *Fishery Bulletin*, 93(2), 419–426.
- Péres, A., Zambonino-Infante, J. L. and Cahu, C. (1998). Dietary regulation of activities and mRNA levels of trypsin and amylase in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Fish Physiology and Biochemistry*, 19, 145–152. Recuperado de: <http://doi.org/10.1023/A:1007775501340>
- Person Le Ruyet, J., Alexandre, J. C., Thébaud, L. and Mugnier, C. (1993). Marine fish larvae feeding: Formulated diets or live prey? *Journal of the World Aquaculture Society*, 24(2), 211–224. Recuperado de: <http://doi.org/10.1111/j.1749-7345.1993.tb00010.x>
- Planas, M. and Cunha, I. (1999). Larviculture of marine fish: Problems and perspectives. *Aquaculture*, 177, 171–190. Recuperado de: [http://doi.org/10.1016/S0044-8486\(99\)00079-4](http://doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00079-4)
- R Core Team. (2014). *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Recuperado de: <http://www.R-project.org/>.
- Reitz, E. J. (2001). Fishing in Peru between 10000 and 3750 BP. *International Journal of Osteoarchaeology*, 11, 163–171. Recuperado de: <http://doi.org/10.1002/oa.554>
- Ribeiro, L., Sarasquete, C. and Dinis, M. T. (1999a). Histological and histochemical development of the digestive system of *Solea senegalensis* (Kaup, 1858) larvae. *Aquaculture*, 171, 293–308. Recuperado de: [http://doi.org/10.1016/S0044-8486\(98\)00496-7](http://doi.org/10.1016/S0044-8486(98)00496-7)
- Ribeiro, L., Zambonino-Infante, J. L., Cahu, C. and Dinis, M. T. (1999b). Development of digestive enzymes in larvae of *Solea senegalensis*, Kaup 1858. *Aquaculture*, 179, 465–473. Recuperado de: [http://doi.org/10.1016/S0044-8486\(99\)00180-5](http://doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00180-5)

- Rønnestad, I., Yufera, M., Ueberschär, B., Ribeiro, L., Saele, O., Izquierdo, M. and Boglione, C. (2012). Feeding behaviour and digestion physiology in larval fish-current knowledge, and gaps and bottlenecks in research. *Reviews in Aquaculture*. Recuperado de: <http://doi.org/10.3837/tiis.0000.00.000>
- Rust, M. B. (2002). Nutritional Physiology. In: J. E. Halver and W. Hardy (Eds.), *Fish Nutrition*. (pp. 367-452). Academic Press.
- Sánchez-Amaya, M. I., Ortiz-Delgado, J. B., García-López, A., Cárdenas, S. and Sarasquete, C. (2007). Larval ontogeny of redbanded seabream *Pagrus auriga* Valenciennes, 1843 with special reference to the digestive system. A histological and histochemical approach. *Aquaculture*, 263, 259–279. Recuperado de: <http://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.10.036>
- Sarasquete, C., Gisbert, E., Ribeiro, L., Vieira, L. and Dinis, M. T. (2001). Glyconjugates in epidermal, branchial and digestive mucous cells and gastric glands of gilthead sea bream, *Sparus aurata*, Senegal sole, *Solea senegalensis* and Siberian sturgeon, *Acipenser baeri* development. *European Journal of Histochemistry*, 45, 267–278.
- Sarasquete, C., González de Canales, M. L., Arellano, J. M., Muñoz-Cueto, J. S., Ribeiro, L. and Dinis, M. T. (1996). Histochemical aspects of the yolk-sac and digestive tract of larvae of the Senegal sole, *Solea senegalensis* (Kaup, 1858). *Histology and Histopathology*, 11, 881–888.
- Sarasquete, M. C., Polo, A. and Yufera, M. (1995). Histology and histochemistry of the development of the digestive system of larval gilthead seabream, *Sparus aurata* L. *Aquaculture*, 130(94), 79–92. Recuperado de: [http://doi.org/10.1016/0044-8486\(94\)00175-N](http://doi.org/10.1016/0044-8486(94)00175-N)
- Sarasquete, M. C., Polo, A. and Gonzalez de Canales, M. L. (1993). A histochemical and immunohistochemical study of digestive enzymes and hormones during the larval development of the sea bream, *Sparus aurata* L. *Histochemical Journal*, 25, 430–437.
- Sarath, G., Zeece, M., & Penheiter, A. (2001). Protease Assay Methods. In: R. Beynon and J. S. Bond (Eds.). *Proteolytic Enzymes Second Edition*. (pp. 45-75). Oxford University Press. Recuperado de: <http://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Scocco, P., Accili, D., Menghi, G. and Ceccarelli, P. (1998). Unusual glycoconjugates in the oesophagus of a tilapine polyhybrid. *Journal of Fish Biology*, 53, 39–48. Recuperado de: <http://doi.org/10.1006/jfbi.1998.0681>
- Segner, H., Rosch, R., Verreth, J. and Witt, U. (1993). Larval Nutritional Physiology: Studies with *Clarias gariepinus*, *Coregonus lavaretus* and *Scophthalmus maximus*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 24(2), 121–134.
- Segner, H., Storch, V., Reinecke, M., Kloas, W. and Hanke, W. (1994). The development of functional digestive and metabolic organs in turbot, *Scophthalmus*

*maximus*. *Marine Biology*, 119, 471–486. Recuperado de: <http://doi.org/10.1007/BF00347544>

- Sorgeloos, P., Lavens, P., Léger, P. and Tackaert, W. (1991). State of the art in larviculture of fish and shellfish. In: P. Lavens, P. Sorgeloos, E. Jaspers, F. P. Ollevier (Eds.). *Larvi '91 - Fish & Crustacean Larviculture Symposium*. (pp. 484–486).
- Summerfelt, R. C. (1996). Intensive culture of walleye fry. *North Central Regional Aquaculture Center Publications Office*, 161–185.
- Tanaka, M. (1973). Studies on the structure and function of the digestive system of teleost larvae. PhD Thesis. Kyoto University. 136 p.
- Tavera, J. J., Acero, A., Balart, E. and Bernardi, G. (2012). Molecular phylogeny of grunts (Teleostei, Haemulidae), with an emphasis on the ecology, evolution, and speciation history of new world species. *BMC Evolutionary Biology*, 12, 57. Recuperado de: <http://doi.org/10.1186/1471-2148-12-57>
- Vargas, M., Fuentes, P., Hernández, P., Olivares, A. y Rojas, P. (1999). Relaciones tróficas de cinco peces costeros comunes en el área submareal del norte de Chile. *Rev. Biol. Trop*, 47(3), 601–604.
- Verreth, J. (1994). Nutrition and related ontogenetic aspects in larvae of the african catfish, *Clarias gariepinus*. PhD Thesis. Wageningen Agricultural University. 205 pp.
- Walford, J. and Lam, T. J. (1993). Development of digestive tract and proteolytic enzyme activity in seabass (*Lates calcarifer*) larvae and juveniles. *Aquaculture*, 109, 187–205.
- Worthington Biochemical Corporation (1993). Alpha amylase. In: V. Worthington, *Worthington Enzyme Manual: Enzymes and Related Biochemicals*.
- Yúfera, M. and Darias, M. J. (2007). The onset of exogenous feeding in marine fish larvae. *Aquaculture*, 268, 53–63. Recuperado de: <http://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.04.050>
- Yúfera, M., Fernández-Díaz, C., Pascual, E., Sarasquete, M. C., Moyano, F. J., Díaz, M., Alarcón, F. J., García-Gallego, M. and Parra, G. (2000). Towards an inert diet for first-feeding gilthead seabream *Sparus aurata* L. larvae. *Aquaculture Nutrition*, 6, 143–152. Recuperado de: <http://doi.org/10.1046/j.1365-2095.2000.00110.x>
- Yúfera, M., Fernández-Díaz, C., Vidaurreta, A., Cara, J. B. and Moyano, F. J. (2004). Gastrointestinal pH and development of the acid digestion in larvae and early juveniles of *Sparus aurata* (Pisces: Teleostei). *Marine Biology*, 144, 863–869. Recuperado de: <http://doi.org/10.1007/s00227-003-1255-9>
- Yúfera, M., Pascual, E., Polo, A. and Sarasquete, M. C. (1993). Effect of starvation on the feeding ability of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) larvae at first feeding.

*Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 169, 259–272. Recuperado de: [http://doi.org/10.1016/0022-0981\(93\)90196-U](http://doi.org/10.1016/0022-0981(93)90196-U)

Zacarias-Soto, M., Muguet, J. B. and Lazo, J. P. (2006). Proteolytic activity in california halibut larvae (*Paralichthys californicus*). *Journal of the World Aquaculture Society*, 37(2), 175–185. Recuperado de: <http://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2006.00024.x>

Zambonino-Infante, J. L. and Cahu, C. L. (2001). Ontogeny of the gastrointestinal tract of marine fish larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicology & Pharmacology*, 130, 477–487. Recuperado de: [http://doi.org/10.1016/S1532-0456\(01\)00274-5](http://doi.org/10.1016/S1532-0456(01)00274-5)

Zambonino-Infante, J. L. and Cahu, C. L. (1994). Influence of diet on pepsin and some pancreatic enzymes in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 109(5), 209–212. Recuperado de: [http://doi.org/10.1016/0300-9629\(94\)90122-8](http://doi.org/10.1016/0300-9629(94)90122-8)

Zambonino-Infante, J. L., Gisbert, E., Sarasquete, C., Navarro, I., Gutiérrez, J. and Cahu, C. (2008). Ontogeny and physiology of the digestive system of marine fish larvae. In: J. E. P. Cyrino, D. P. Bureau and B. G. Kapoor (Eds). *Feeding and Digestive Functions of Fishes*. (pp. 281-349). Science Publishers.

Zavala-Leal, I., Dumas, S., López-Villegas, E. O., Peña, R., Contreras-Olguín, M., Flores-Montijo, L. and De La Cruz-Agüero, J. (2013). Structural development of pacific red snapper *Lutjanus peru* from hatching to the onset of first feeding. *Aquaculture Research*, 46, 1162–1174. Recuperado de: <http://doi.org/10.1111/are.12272>

Zimmer, G., Reuter, G. and Schauer, R. (1992). Use of influenza C virus for detection of 9-O-acetylated sialic acids on immobilized glycoconjugates by esterase activity. *European Journal of Biochemistry*, 204, 209–215.

## Apéndices

**Apéndice 1. Desarrollo del sistema digestivo de peces marinos de las familias Haemulidae, Carangidae, Lutjanidae, Paralichthyidae, Pleuronectidae, Sciaenidae, Serranidae, Scophthalmidae, Soleidae, Sparidae.**

Familia	Especie	Autores	Año	Temperatura	Alimentación exógena	Artemia sp.	Alimento balanceado	Longitud larva eclosionada	Bucofaringe			Esófago			
									Apertura de la boca	Células mucosas	Dientes (faringeos y mandibulares)	Papilas gustativas	Lengua	Células mucosas	Pieques longitudinales
Haemulidae	<i>Anisotremus scapularis</i>	Cota	2016	20-21°C	2	21		2.6 mm	3	8	14 y 26	8	4	18	6, posterior
Carangidae	<i>Seriola lalandi</i>	Chen et al.	2006	24°C	2	10	18	4.3 mm	2	8	8	8-15	5	5	4, estómago
Lutjanidae	<i>Lutjanus guttatus</i>	Galaviz et al.	2012	29-30°C	2	18	28		3-4				10	18	
Paralichthyidae	<i>Paralichthys dentatus</i>	Bisbal and Bengtson	1995	20°C		18			3	3	20				3, estómago
	<i>Paralichthys californicus</i>	Gisbert et al.	2004	18°C	3	17	27	2.1 mm		7-9	13		7		4, posterior
Pleuronectidae	<i>Pleuronectes ferruginea</i>	Baglioni et al.	1997	8-10°C	3	29		2.8 mm	3-7	29	36-46		10		29, posterior
	<i>Sciaenops ocellatus</i>	Lazo	1999	28°C	3	12		2.4 mm	3						posterior
Sciaenidae	<i>Pseudosciaena crocea</i>	Mai et al.	2005	24°C	3	14		3.2 mm	3	3	5-6		4-5	21	7, posterior
	<i>Atractoscion nobilis</i>	Galaviz et al.	2011	18°C	4	4	16	1.3 mm	3						12, estómago
Scophthalmidae	<i>Scophthalmus rhombus</i>	Hachero-Cruzado et al.	2009	15-16°C	2	6	15	3.8 mm	2	8	8-13		4	3	7, estómago
	<i>Dicentrarchus labrax</i>	García-Hernández et al.	2001	18-19°C		25-30		3 mm	6-7						
Serranidae	<i>Paralabrax maculatofasciatus</i>	Peña et al.	2003	25°C	2	12	20	1.6 mm	2	10	10	10	6	6	4, estómago
	<i>Solea senegalensis</i>	Ribeiro et al.	1999	16.5-19°C	2	3		2.8 mm	2	5			3		2, estómago
Soleidae	<i>Solea senegalensis</i>	Sarasquete et al.	1996						2-3						estómago
	<i>Sparus aurata</i>	Sarasquete et al.	1995	19.5°C	3	15							7-8	7-8	
Sparidae	<i>Sparus aurata</i>	Calzada et al.	1998	19-20°C	3	15			3						
	<i>Sparus aurata</i>	Elbal et al.	2004	18-19°C	4	20		2.5 mm	2-3				8-10		2-3, estómago
	<i>Pagrus auriga</i>	Sánchez-Amaya et al.	2007	19-22°C	3	20			3	9	6-9	6	5		3, estómago
	<i>Pagrus auriga</i>	Darias et al.	2007	19.5°C	3	23			3		9 y 15		6	3-4	6, estómago
	<i>Diplodus sargus</i>	Ortiz-Delgado et al.	2003	17-20°C	3	12	31		3				6	3-4	6, estómago

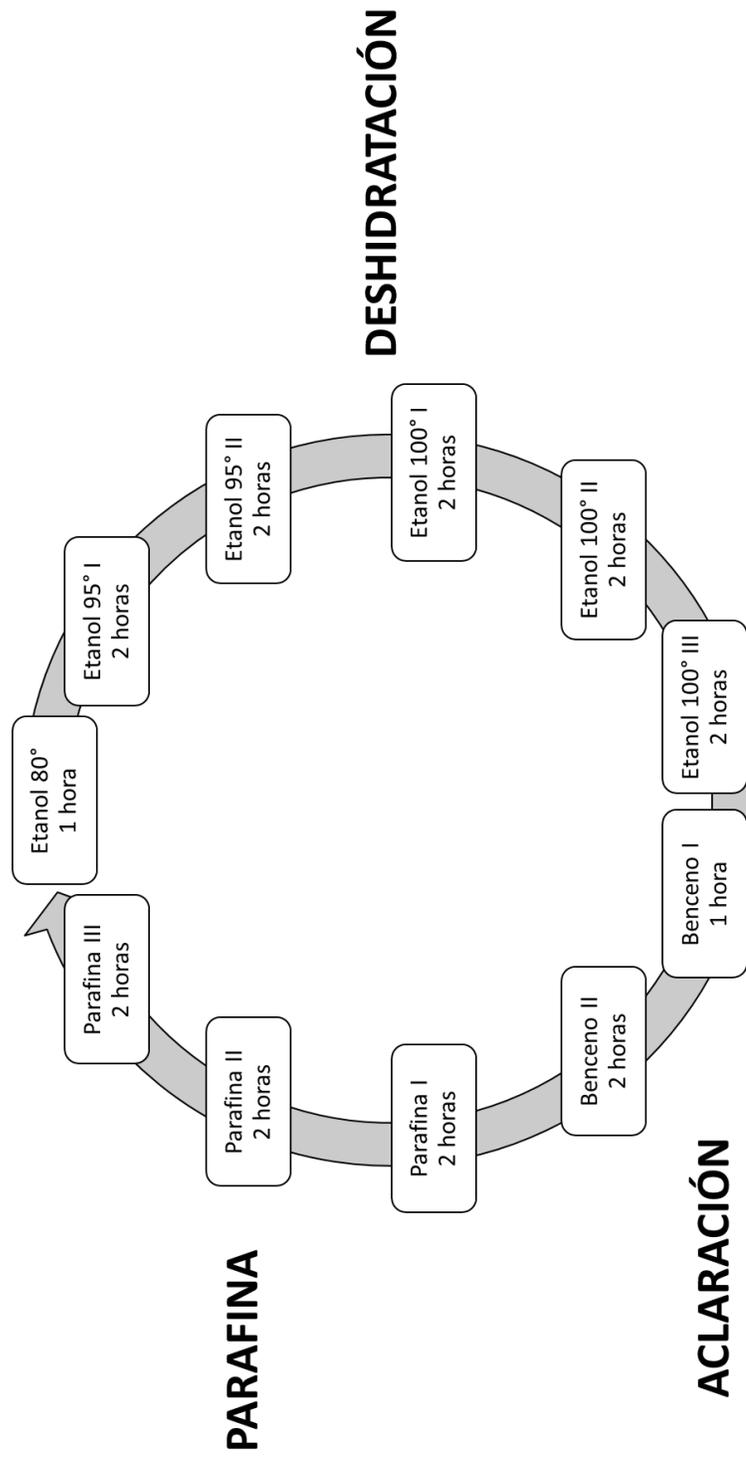
**Apéndice 1 (continuación). Desarrollo del sistema digestivo de peces marinos de las familias Haemulidae, Carangidae, Lutjanidae, Paralichthyidae, Pleuronectidae, Sciaenidae, Scophthalmidae, Serranidae, Soleidae, Sparidae.**

Familia	Especie	Autores	Año	Estómago			Intestino						
				Longitud larva con estómago	Glándulas gástricas	Regionalización	Válvula intestinal	Microvellosidades	Pliegues intestinales	Torsión	Células mucosas	Vacuolas supranucleares	Inclusiones lipídicas
Haemulidae	<i>Anisotremus scapularis</i>	Cota	2016	8,9 mm	26		3	3	4	6	4	4	22
Carangidae	<i>Seriola lalandi</i>	Chen et al.	2006		15	18	4	8		8	4	4	5-8
Lutjanidae	<i>Lutjanus guttatus</i>	Galavitz et al.	2012		20	25	3-4		10				
Paralichthyidae	<i>Paralichthys dentatus</i>	Bisbal and Bengtson	1995		31		3			11		4	
	<i>Paralichthys californicus</i>	Gisbert et al.	2004	7.2-7.5 mm	27-30	27-30	1-2			11		3	
Pleuronectidae	<i>Pleuronectes ferruginea</i>	Baglole et al.	1997		36		10			29		46	
	<i>Sciaenops ocellatus</i>	Lazo	1999	9-12 mm		20-24	3			3		2	
Sciaenidae	<i>Pseudosciaena crocea</i>	Mai et al.	2005	9.2 mm	21	21	2-3			5		7	6
	<i>Atractoscion nobilis</i>	Galavitz et al.	2011		16	32				24			
Scophthalmidae	<i>Scophthalmus rhombus</i>	Hachero-Cruzado et al.	2009		23	38	3		6	6		3-10	4
Serranidae	<i>Dicentrarchus labrax</i>	García-Hernández et al.	2001		55								
	<i>Paralabrax maculatofasciatus</i>	Peña et al.	2003	7.3 mm	16	22	2	2	2	5		5	4
Soleidae	<i>Solea senegalensis</i>	Ribeiro et al.	1999		24-27		2	2					2
	<i>Solea senegalensis</i>	Sarasquete et al.	1996				2-3					4	10-15
Sparidae	<i>Sparus aurata</i>	Sarasquete et al.	1995				3	3	3	3		14	6-7
	<i>Sparus aurata</i>	Calzada et al.	1998				3		4	4		4	4-15
Sparidae	<i>Sparus aurata</i>	Elbal et al.	2004	15-20 mm	60	69	4	4-7		4-7		4-7	23
	<i>Pagrus auriga</i>	Sánchez-Amaya et al.	2007		16	18	3	3	3	3		11-12	9-13
Sparidae	<i>Pagrus auriga</i>	Darias et al.	2007		19		3			3		6	6
	<i>Diplodus sargus</i>	Ortiz-Delgado et al.	2003		13-15	30-33	3	2-3	2	6		15	4-5

**Apéndice 1 (continuación). Desarrollo del sistema digestivo de peces marinos de las familias Haemulidae, Carangidae, Lutjanidae, Paralichthyidae, Pleuronectidae, Sciaenidae, Scophthalmidae, Serranidae, Soleidae, Sparidae.**

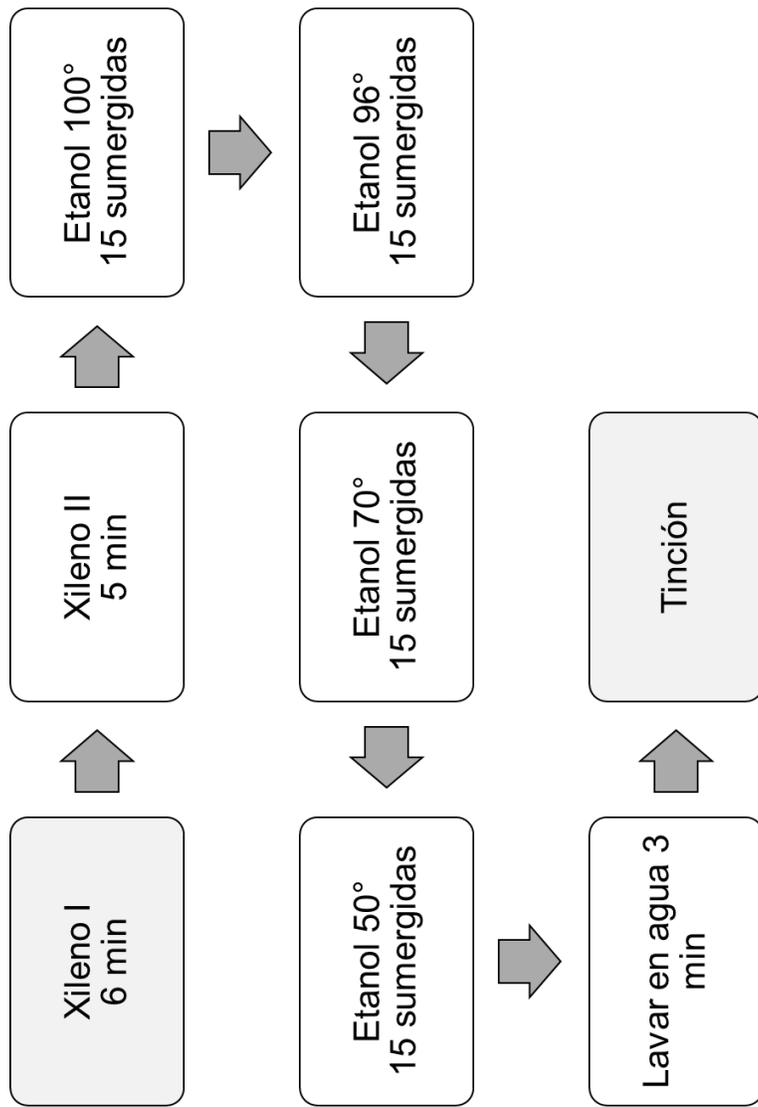
Familia	Especie	Autores	Año	Glándulas anexas	En desarrollo	Conducto hepático	Hígado		Vesícula biliar	En desarrollo	Páncreas		Año
							Sinusoides	Inclusiones lipídicas			Istote de Langerhans	Conducto pancreático	
Haemulidae	<i>Anisotremus scapularis</i>	Cota	2016	2	3	4	6		3	3	3	4	
Carangidae	<i>Seriola lalandi</i>	Chen et al.	2006	1	3		5	15		3		3	0
Lutjanidae	<i>Lutjanus guttatus</i>	Galavitz et al.	2012	2-3				20					
Paralichthyidae	<i>Paralichthys dentatus</i>	Bisbal and Bengtson	1995	0		4			3				
	<i>Paralichthys californicus</i>	Gisbert et al.	2004	1-2		5	5	17		1-2		3	
Pleuronectidae	<i>Pleuronectes ferruginea</i>	Baglione et al.	1997										
	<i>Sciaenops ocellatus</i>	Lazo	1999	2				14					
Sciaenidae	<i>Pseudosciaena ocellatus</i>	Mai et al.	2005	2-3	2-3		5	5	4-5	2-3			
	<i>Atractoscion crocea</i>	Galavitz et al.	2011		3	12				3			
	<i>Scophthalmus rhombus</i>	Hachero-Cruzado et al.	2009	1	2	3	2		3	2	2		2
Serranidae	<i>Dicentrarchus labrax</i>	García-Hernández et al.	2001										
	<i>Paralabrax maculatofasciatus</i>	Peña et al.	2003				6						2
Soleidae	<i>Solea senegalensis</i>	Ribeiro et al.	1999	0	1			9		1			2
	<i>Solea senegalensis</i>	Sarasquete et al.	1996										
	<i>Sparus aurata</i>	Sarasquete et al.	1995	2-3		7-9	4-5	4-6	4			10	1-2
Sparidae	<i>Sparus aurata</i>	Calzada et al.	1998			2-3						2-3	1
	<i>Sparus aurata</i>	Elbal et al.	2004										
	<i>Pagrus auriga</i>	Sánchez-Amaya et al.	2007	1	3	5	5	7-11	3	3	3	5	3
	<i>Pagrus auriga</i>	Darias et al.	2007		2-3		4-6	4-6		2-3			3
	<i>Diplodus sargus</i>	Ortiz-Delgado et al.	2003			3		4-6	3			3	3

**Apéndice 2. Pasos en el procesador automático de tejidos.**



### Apéndice 3. Técnica de tinción hematoxilina - eosina.

#### a) Desparafinación e hidratación.



**b) Tinción.**