

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



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

Histología, histoquímica y actividad enzimática del sistema digestivo de *Paralichthys californicus* durante su ontogenia y evaluación de probióticos como promotores de la maduración del sistema.

TESIS

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

Presenta:

MAGALI DEL ROSARIO ZACARIAS SOTO

Ensenada, Baja California, México, Marzo 2007.

RESUMEN de la tesis de **Magali del Rosario Zacarias Soto**, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de DOCTOR EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN ACUICULTURA. Ensenada, Baja California, México. Marzo 2007.

Histología, histoquímica y actividad enzimática del sistema digestivo de *Paralichthys californicus* durante su ontogenia y evaluación de probióticos como promotores de la maduración del sistema.

Resumen aprobado por:

Dr. Juan Pablo Lazo Corvera
Director

El cultivo de peces marinos es una práctica que se ha extendido en nuestro País en los últimos años. La producción y la supervivencia de larvas de alta calidad, representa uno de los principales problemas en la producción masiva de estos organismos, debido a que en la mayoría de los casos se desconoce tanto la anatomía de su sistema digestivo, como su fisiología digestiva, dificultando la formulación y el suministro de alimento adecuado a la capacidad digestiva de los organismos en cultivo. Las larvas de muchos peces marinos eclosionan con el sistema digestivo indiferenciado, incrementando su capacidad digestiva con el desarrollo de los órganos digestivos, así como por la secreción de las enzimas digestivas. En este trabajo se evaluó como primer objetivo, la capacidad digestiva de las larvas del lenguado de California (*Paralichthys californicus*) durante su ontogenia, utilizando análisis histológicos, histoquímicos y de actividad enzimática. Las larvas fueron cultivadas en estanques con un sistema de recirculación semi cerrado y alimentadas con rotíferos enriquecidos con ácidos grasos altamente insaturados (HUFA'S). La alimentación con los rotíferos inició el segundo día después de la eclosión (DDE) y hasta los 17 DDE; posteriormente, las larvas fueron alimentadas con nauplios de *Artemia* enriquecidos. Se cuantificó la actividad de la tripsina, leucina aminopeptidasa (LAP) y la actividad proteolítica total ácida y alcalina, durante la ontogenia, usando técnicas espectrofotométricas. Las larvas de *P. californicus* eclosionaron con la boca y el ano cerrados y su sistema digestivo consistió de un intestino recto, sin glándulas anexas. A partir de los 3 DDE, comenzaron a diferenciarse el hígado y el páncreas, y no fue sino hasta los 36 DDE que inició la diferenciación del estómago. La actividad específica de la tripsina y la LAP se detectó desde el primer DDE, con dos picos de máxima actividad. El primero a los 8 DDE y el segundo a los 20 DDE, este último coincidiendo con el cambio en el tipo de alimento. La actividad proteolítica alcalina

no pudo ser cuantificada con la técnica utilizada, en tanto que la actividad proteolítica ácida total y específica solo pudieron detectarse una vez que el estómago terminó su diferenciación. El análisis histoquímico de la fosfatasa alcalina reveló que, previo a la metamorfosis, la parte posterior del intestino es la zona de mayor absorción de nutrientes, dada la alta actividad de esta enzima en esa región. Posteriormente, la zona de mayor absorción se ubicó en la parte anterior del intestino, proceso que coincide con el inicio de la formación del estómago. Previo a la metamorfosis, la actividad de la fosfatasa ácida se mantiene sin diferencias entre regiones; sin embargo, una vez que inicia el proceso metamórfico, la región anterior del intestino concentra la mayor actividad de esta enzima. Un segundo objetivo del trabajo consistió en suministrar probióticos a las larvas en cultivo, con el propósito de acelerar el proceso de maduración de su sistema digestivo. Los probióticos LEVUCCELL[®] Y BACTOCELL[®] fueron suministrados en una concentración de 50 mg/L, utilizando como vehículos a los rotíferos y los nauplios de *Artemia*, enriquecidos con HUFA'S. El desarrollo morfológico del sistema digestivo de las larvas mantuvo el mismo patrón que el observado en la primera parte del trabajo, a excepción de que en este bioensayo, los primeros esbozos de las glándulas gástricas se observaron a los 26 DDE. A pesar de que durante los diferentes muestreos se observaron diferencias significativas, en la actividad de algunas de las enzimas, las actividades total y específica de la tripsina y la LAP mantuvieron el mismo patrón que el descrito en la primera parte del trabajo, sin observarse ningún efecto significativo producido por el suministro de los probióticos. La actividad total de la quimiotripsina, al igual que la actividad proteolítica ácida total, presentaron un incremento significativo a los 46 DDE, con el suministro de BACTOCELL, en comparación con los otros tratamientos experimentales. La fosfatasa alcalina presentó la misma distribución a lo largo del intestino, observada en la primera parte del trabajo, no encontrándose diferencias por efecto de los probióticos. Las larvas del lenguado de California poseen actividad proteolítica alcalina desde el momento de la eclosión y solo se detecta actividad proteolítica ácida, hasta la completa formación del estómago. Basándonos en la capacidad digestiva evaluada en este trabajo, se propone que el tiempo adecuado para realizar el destete en esta especie se encuentra entre los 36 y 40 DDE. Los probióticos suministrados no modificaron los patrones de desarrollo morfológico o de actividad enzimática de las larvas durante el período experimental. Sin embargo, el aumento en la actividad de algunas de las enzimas estudiadas se observó a los 46 DDE, por lo que se propone la evaluación de estos probióticos como estimuladores de la secreción de las enzimas digestivas, en etapas posteriores a la completa formación del estómago.

Palabras clave: Enzimas digestivas, *Paralichthys californicus*, ontogenia del sistema digestivo destete.

ABSTRACT of the thesis presented by **Magali del Rosario Zacarias Soto** as a partial requirement to obtain the DOCTOR OF SCIENCE degree with orientation in AQUACULTURE. Ensenada, Baja California, Mexico. Marzo 2007.

ASSESSING THE ONTOGENY OF THE DIGESTIVE SYSTEM IN PARALICHTHYS CALIFORNICUS USING HISTOLOGY, HISTOCHEMISTRY AND ENZYME ACTIVITY AND EVALUATION OF PROBIOTICS AS PROMOTORS OF ITS MATURATION

The culture of marine fish is a new technology currently developing in our Country with a very promising future. The production of sufficient number of juveniles from eggs, to stock grow-out systems, represents one of the main problems curbing the successful development of most commercial production systems. Increasing our knowledge of the ontogeny of the digestive system and larval digestive physiology will aid in formulating weaning microdiets to successfully replace live feed and increase survival during the larval period. Most marine fish larvae hatch with an undifferentiated digestive system, and increase their digestive capacity with the development of digestive organs concomitant with an increase production of digestive enzymes. The objectives of this study were first to assess the digestive capacity of the California halibut larvae (*Paralichthys californicus*) during ontogeny using histological, histochemical, and biochemical techniques and second to evaluate the use of probiotics as promoters of the maturation of the digestive system. Newly hatched larvae were reared in a semiclosed recirculating system with adequate replication and fed highly unsaturated fatty acid (HUFA)-enriched rotifers and Artemia. Feeding protocol consisted of rotifers from 2 days post hatch (DPH) until 18 DPH. Thereafter, larvae were fed HUFA-enriched *Artemia* nauplii. Total and specific of trypsin, leucine-aminopeptidase (LAP) and alkaline and acid protease activities were assessed throughout development using spectrophotometric techniques. California halibut larvae hatched with closed mouth and anus, and the digestive system consisted of a simple straight intestine without any apparent associated glands. Differentiation of the liver and pancreas was first observed 3 DPH, while the formation of the gastric glands was first observed 36 DPH. Specific trypsin and LAP activities were detected 1 DPH, with two peaks of activity, 8 and 20 DPH. The former peak coincided with the change in the type of food from rotifers to Artemia. Significant acid proteolytic activity was measured around 36-40 DPH, indicative of a functional stomach. Based on histochemical analyses of alkaline phosphatase, it appears that prior to metamorphosis, the posterior intestine is the region with greater nutrient absorption. Thereafter, nutrient absorption is greater in the anterior intestine, coinciding with the beginning of the formation of the stomach. Before metamorphosis, no significant differences in acid phosphatase activity were detected between regions of the intestine. Although, once the metamorphosis process began, the anterior intestine concentrated the highest activity of this enzyme. For the second objective of this study, two

probiotics LEVUCCELL® and BACTOCELL® were supplied at a concentration of 50 mg/L, using HUFA-enriched-rotifers and *Artemia* nauplii as vehicles. In general, the morphological development of the digestive system was very similar to the first part of this study, except that gastric glands were first observed as early as 26 DPH. Similarly, digestive enzyme activities displayed the same trend as the previous trial without any significant effect from the probiotics, except for chymotrypsin and acid proteases. Total chymotrypsin and acid proteolytic activity, were only significantly higher 46 DPH in larvae supplied with BACTOCELL. Lastly, no significant differences among treatments were observed in alkaline phosphatase activity and distribution throughout the intestinal regions assessed. Based on the results from this study, California halibut larvae seemed to have adequate alkaline proteolytic activity at first feeding and acid proteolytic activity was not detected until the complete formation of a functional stomach. Thus, considering the digestive capacity of the larvae evaluated in this study, it is recommended to perform weaning onto microdiets in California halibut around 36 to 40 DPH. The probiotics evaluated in this study did not significantly change the patterns of morphological development of the digestive system or the digestive enzyme activity. Nevertheless, the increase in activity of some digestive enzymes observed 46 DPH, suggest to potential use of these probiotics once metamorphosis is completed and warrants further evaluation.

Keywords: Digestive enzymes, *Paralichthys californicus*, ontogeny of the digestive system, weaning.

DEDICATORIA

A MIS PADRES, Evangelina y Conrado

Por todo el cariño y la comprensión que siempre me han brindado y por enseñarme a perseverar para alcanzar mis metas.

A MIS HERMANOS, Isabel, Gabriel, Javier, David y Mayra

Por apoyarme en todas y cada una de las decisiones que he tomado en mi vida.

A KARLA, REBEKA Y RENATA

Las futuras científicas de la familia

A LUIS

Por ser un gran motivo en mi vida para seguir adelante.

AGRADECIMIENTOS

Gracias:

A mis sinodales, el Dr. Juan Pablo Lazo Corvera, el Dr. Benjamín Barón Sevilla, la Dra. Ma. Teresa Viana Castrillón y la Dra. Patricia Rivas Manzano, por todas sus valiosas recomendaciones, correcciones y comentarios, que hicieron posible la culminación de este trabajo.

A la Dra. Graciela Guerra, la M. en C. Claudia Gómez y la Oc. Gabriela Alarcón, por todo el apoyo que me brindaron para realizar parte de este trabajo, pero ante todo, gracias por la amistad que me brindaron.

Al Dr. Josué Álvarez Borrego, por su apoyo y apreciable ayuda en el análisis de las imágenes.

A la Dra. Idalia Sandoval Muy, le agradezco la ayuda que me brindó durante la realización de este trabajo, pero sobre todo gracias por los consejos y palabras de aliento, en los momentos “críticos” del doctorado.

A la estimadísima Dra. Rebeca Vásquez Yeomans, por su asistencia en los análisis bacteriológicos y por compartir conmigo su forma tan positiva de ver la vida.

A Ruth Montes y Emmanuel Martínez, porque sin su apoyo, no hubiera sido posible alcanzar las metas propuestas en este trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por el otorgamiento de la beca para realizar mis estudios de doctorado.

A la empresa LALLEMAND, por la donación de los probióticos LEVUCCELL® Y BACTOCELL®, utilizados en este trabajo.

A todos los investigadores con los que tuve el honor de tomar clases, gracias por compartir conmigo sus conocimientos, por su ayuda y amistad incondicional.

Al personal del CICESE, investigadores, técnicos, secretarías, administrativos, etc. que directa o indirectamente, participaron en la realización de este trabajo, en especial a la Quím. Ivonne Best Guzmán por estar siempre al pendiente de los problemas de los estudiantes.

Un agradecimiento especial a todos los **compañeros y amigos** con los que tuve el gusto de compartir gratos momentos y que hicieron que mi estancia en Ensenada fuera una de las etapas más apreciadas de mi vida.

CONTENIDO	
	Página
LISTA DE FIGURAS	I
LISTA DE TABLAS	VII
1. CAPITULO I.	1
<i>I.1 Introducción general</i>	1
2. CAPITULO II. Ontogenia del sistema digestivo de <i>Paralichthys californicus</i> .	5
<i>II.1 Introducción</i>	5
<i>II.1.1 Cultivo de lenguados</i>	5
<i>II.2 Antecedentes</i>	9
<i>II.2.1 Lenguado de California (Paralichthys californicus)</i>	9
<i>II.2.2 Ontogénesis del sistema digestivo</i>	10
<i>II.2.2.1 Actividad enzimática</i>	12
<i>II.2.2.2 Histoquímica</i>	15
<i>II.3 Hipótesis</i>	20
<i>II.4 Objetivos</i>	21
<i>II.4.1 Objetivo general</i>	21
<i>II.4.2 Objetivos específicos</i>	21
<i>II.5 Materiales y métodos</i>	22
<i>II.5.1 Sistema de cultivo</i>	22
<i>II.5.2 Protocolo de alimentación</i>	22
<i>II.5.2.1 Suministro de alimento vivo a las larvas</i>	22
<i>II.5.2.2 Cultivo y enriquecimiento de rotíferos</i>	23
<i>II.5.2.3 Cultivo y enriquecimiento de Artemia</i>	24
<i>II.5.3 Crecimiento larvario de Paralichthys californicus</i>	24
<i>II.5.4 Histología</i>	25
<i>II.5.5 Actividad enzimática</i>	25
<i>II.5.6 Histoquímica</i>	30
<i>II.6 Resultados</i>	34

Contenido (continuación)	
<i>II.6.1 Crecimiento larvario</i>	34
<i>II.6.2 Histología</i>	35
<i>II.6.3 Actividad enzimática</i>	51
<i>II.6 4 Histoquímica</i>	57
<i>II.6.4.1 Fosfatasa alcalina</i>	57
<i>II.6.4.2 Fosfatasa ácida</i>	63
II.7 Discusión	67
3. CAPITULO III. Evaluación de probióticos como promotores de maduración del tracto digestivo de <i>Paralichthys californicus</i>.	81
III.1 Introducción	81
<i>III.1.1 Uso de probióticos en acuicultura</i>	81
III.2 Antecedentes	86
<i>III.2.1 Efecto de los probióticos sobre la capacidad digestiva de las larvas de peces.</i>	86
III.3 Hipótesis	91
III.4 Objetivos	92
<i>III.4.1 Objetivo general</i>	92
<i>III.4.2 Objetivos específicos</i>	92
III.5 Materiales y métodos	93
<i>III.5.1 Sistema de cultivo</i>	93
<i>III.5.2 Diseño experimental</i>	93
<i>III.5.3 Protocolo de alimentación</i>	94
<i>III.5.3.1 Suministro de alimento vivo a las larvas</i>	94
<i>III.5.3.2 Enriquecimiento de rotíferos</i>	95
<i>III.5.3.3 Enriquecimiento de Artemia</i>	96
<i>III.5.4 Crecimiento larvario de <i>Paralichthys californicus</i></i>	96
<i>III.5.5 Histología</i>	98
<i>III.5.6 Actividad enzimática</i>	98
<i>III.5 7 Histoquímica</i>	99
<i>III.5.7.1 Fosfatasa alcalina</i>	99
<i>III.5.8 Análisis estadístico</i>	100
III.6 Resultados	101

Contenido (continuación)	
<i>III.6.1 Crecimiento larvario</i>	101
<i>III.6.2 Supervivencia y pigmentación</i>	102
<i>III.6.3 Histología</i>	102
<i>III.6.4 Actividad enzimática</i>	111
<i>III.6.5 Histoquímica</i>	124
<i>III.6.5.1 Fosfatasa alcalina</i>	124
III.7 Discusión	126
4. CAPITULO IV	139
<i>IV.1 Conclusiones generales</i>	139
<i>IV.2 Recomendaciones</i>	141
5. ANEXO	143
6. LITERATURA CITADA	147

LISTA DE FIGURAS		
FIGURA	DESCRIPCIÓN	PÁGINA
Figura 1	Crecimiento en términos de longitud estándar de <i>P. californicus</i> durante el periodo experimental. Media $\pm$ D.E. (n=30).	34
Figura 2	Corte sagital de <i>P. californicus</i> , 2 DDE. Intestino tubular (it), saco vitelino (s), ojo (o); H-E. Barra 300 μ m.	35
Figura 3	Imagen en vivo de <i>P. californicus</i> , 3 DDE. Zona prevalvular (pr), zona postvalvular (po), gota de aceite (*), ángulo de constricción ($\rightarrow$).	36
Figura 4	Corte sagital del intestino de <i>P. californicus</i> , 2 DDE. Epitelio cilíndrico con microvellosidades eosinófilas formando el borde en cepillo (ep), serosa ($\rightarrow$); H-E. Barra 25 μ m.	37
Figura 5	Corte sagital del hígado y páncreas de <i>P. californicus</i> , 3 DDE. Gránulos de zimógeno (z), esófago (e), hígado (h), intestino (i); H-E. Barra 50 μ m.	38
Figura 6	Corte sagital del esófago e intestino de <i>P. californicus</i> , 6 DDE. Esófago anterior (a), esófago posterior (p), células globosas (*), páncreas (pa), hígado (h); H-E. Barra 50 μ m.	39
Figura 7	A) Corte sagital del hígado y páncreas de <i>P. californicus</i> , 7 DDE. Hepatocitos en cordón (h), conducto biliar ($\rightarrow$), páncreas (p), esófago (e); H-E. Barra 100 μ m. B) Corte sagital a nivel de la glándula tiroides ($\uparrow$) de <i>P. californicus</i> , 7 DDE; H-E. Barra 200 μ m.	40
Figura 8	Corte sagital de <i>P. californicus</i> , 9 DDE. Intestino (i), submucosa (sm), páncreas (p), hígado (h), esófago (e); H-E. Barra 50 μ m.	41
Figura 9	Corte sagital del páncreas de <i>P. californicus</i> , 10 DDE. Islote de Langerhans (L); H-E. Barra 75 μ m.	42
Figura 10	Imagen en vivo de <i>P. californicus</i> , 13 DDE. Asa intestinal ($\rightarrow$).	43
Figura 11	Corte sagital de <i>P. californicus</i> , 14 DDE. Asa intestinal (*), páncreas (p), hígado (h), intestino (i); H-E. Barra 200 μ m.	43

Lista de figuras (continuación)		
Figura 12	Imagen en vivo de <i>P. californicus</i> a los 16 DDE. Flexión de la notocorda (→).	44
Figura 13	Corte sagital del sistema digestivo de <i>P. californicus</i> , 18 DDE. Vacuolas (→), intestino (i), páncreas (p), hígado (h); H-E. Barra 200 µm.	45
Figura 14	Corte sagital de la zona bucal de <i>P. californicus</i> , 32 DDE. Diente canino (d), corpúsculos gustativos (cg); H-E. Barra 50 µm.	46
Figura 15	Corte sagital de <i>P. californicus</i> , 32 DDE. Glándula tiroides (→), intestino (i), hígado (h), branquias (b), corazón (c), páncreas (p); H-E. Barra 500 µm.	47
Figura 16	Corte sagital de <i>P. californicus</i> , 32 DDE. Epitelio (ep), submucosa (sm), páncreas (p); H-E. Barra 100 µm.	48
Figura 17	Corte sagital del estómago de <i>P. californicus</i> , 40 DDE. Esbozos de las glándulas gástricas (gg), epitelio cilíndrico ciliado (e), submucosa (sb); H-E. Barra 25 µm.	49
Figura 18	Corte sagital de la región fúndica del estómago de <i>P. californicus</i> , 44 DDE. Glándulas gástricas (gg), epitelio (e), submucosa (sb); H-E. 25 µm.	50
Figura 19	Corte sagital del estómago de <i>P. californicus</i> , 44 DDE. Región cardiaca (rc), región fúndica (rf), región pilórica (rp), hígado (h), páncreas (p), corazón (c), esófago (e), intestino (i), esfínter pilórico (ep); H-E. Barra 100 µm.	50
Figura 20	A) Actividad total de tripsina, B) Actividad específica de tripsina, durante el desarrollo de <i>P. californicus</i> . Media ± D.E. (n = 3).	52
Figura 21	A) Actividad total de leucina aminopeptidasa, B) Actividad específica de leucina-aminopeptidasa, durante el desarrollo de <i>P. californicus</i> . Media ± D.E. (n = 3).	54
Figura 22	A) Actividad proteolítica ácida total, B) Actividad proteolítica ácida específica, durante el desarrollo de <i>P. californicus</i> . Media ± D.E. (n = 3).	55
Figura 23	Fosfatasa alcalina en cortes sagitales de <i>P. californicus</i> a los 6 DDE. A) Intestino (i); Fast green. Barra 300 µm. B) Fosfatasa alcalina en el epitelio de los enterocitos (→); Fast green. Barra 100 µm.	57

Lista de figuras (continuación)		
Figura 24	Actividad de la fosfatasa alcalina en el intestino de <i>P. californicus</i> , durante su desarrollo larvario. Media $\pm$ D.E. (n=3). Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre DDE en el intestino anterior (IA). Letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas entre DDE en el intestino posterior (IP).	58
Figura 25	Fosfatasa alcalina en cortes sagitales de <i>P. californicus</i> a los 11 DDE. A) Fast green. Barra 300 μ m. B) Fast green. Barra 100 μ m. Intestino anterior (ia), intestino posterior (ip) esófago (e).	59
Figura 26	Fosfatasa alcalina en cortes sagitales de <i>P. californicus</i> a los 31 DDE. Intestino anterior (ia), intestino posterior (ip), hígado (h); Fast green. Barra 300 μ m.	60
Figura 27	Fosfatasa alcalina en cortes sagitales de <i>P. californicus</i> a los 36 DDE. Intestino anterior (ia), intestino posterior (ip), esófago (e), estómago (es), hígado (h), corazón (c), glándulas gástricas (*), submucosa ($\uparrow$); Fast green. Barra 500 μ m.	61
Figura 28	Fosfatasa alcalina en cortes sagitales de <i>P. californicus</i> . A) Cuarenta y un DDE. Fast green. Barra 600 μ m. B) Cuarenta y seis DDE. Fast green. Barra 300 μ m. Intestino anterior (ia), intestino posterior (ip), región cardiaca (rc), región fúndica (rf), región pilórica (rp), capa muscular (m), membrana basal (*).	62
Figura 29	Fosfatasa ácida en cortes sagitales de <i>P. californicus</i> . A) Un día después de la eclosión. Actividad enzimática en el saco vitelino ($\rightarrow$); Fast green. Barra 300 μ m. B) Once DDE. Intestino anterior (ia), intestino posterior (ip), actividad enzimática ($\rightarrow$); Fast green. Barra 100 μ m.	63
Figura 30	Actividad de la fosfatasa ácida en el intestino de <i>P. californicus</i> , durante su desarrollo larvario. Media $\pm$ D.E. (n=3). Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre DDE en el intestino anterior (IA). Letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas entre DDE en el intestino posterior (IP).	64
Figura 31	Fosfatasa ácida en cortes sagitales de <i>P. californicus</i> a los 26 DDE. Intestino anterior (ia), intestino posterior (ip), hígado (h), páncreas (p), esófago (e); Fast green. Barra 500 μ m.	65

Lista de figuras (continuación)		
Figura 32	Fosfatasa ácida en cortes sagitales de <i>P. californicus</i> a los 36 DDE. Intestino anterior (ia), intestino posterior (ip), corazón (c), región cardiaca (rc), región fúndica (rf), esófago (e); Fast green. Barra 600 μ m.	66
Figura 33	Fosfatasa ácida en cortes sagitales de <i>P. californicus</i> a los 46 DDE. Intestino anterior (ia), intestino posterior (ip), región cardiaca (rc), estómago (es), páncreas (p), hígado (h), submucosa ($\downarrow$); Fast green. Barra 600 μ m.	66
Figura 34	Patrones de pigmentación en <i>P. californicus</i> .	97
Figura 35	Crecimiento en términos de longitud estándar de <i>P. californicus</i> mantenidas en cultivos experimentales con el suministro de probióticos. Media $\pm$ D.E. (n=30).	101
Figura 36	Corte sagital de <i>P. californicus</i> a los 6 DDE (control). Sistema digestivo en forma de tubo con una constricción en la parte posterior. Intestino posterior (ip), intestino anterior (ia), hígado (h), esófago (e), ojo (o). H-E, 100X. Barra 300 μ m.	103
Figura 37	Corte sagital de <i>P. californicus</i> a los 6 DDE (control). Intestino posterior (lp), intestino anterior (la), vacuolas (*). H-E, 100X. Barra 200 μ m.	104
Figura 38	Corte sagital a nivel de hígado y páncreas de <i>P. californicus</i> a los 11 DDE. A) LEVUCCELL; B) Control. Intestino anterior (la), esófago (e), islote de Langerhans (L), hígado (h), páncreas (p). H-E, 400X. Barra 100 μ m.	105
Figura 39	Corte sagital de <i>P. californicus</i> a los 11 DDE A) BACTOCELL. Folículos tiroideos (f). H-E; Barra 100 μ m. B) Control. Tiroides ($\rightarrow$). H-E; Barra 50 μ m.	105
Figura 40	Corte sagital del sistema digestivo de <i>P. californicus</i> a los 16 DDE (control). Intestino anterior (la), intestino posterior (lp), páncreas (p), hígado (h), riñón (r). H-E; Barra 300 μ m.	106
Figura 41	Corte sagital de <i>P. californicus</i> a los 21 DDE. A) Control. Corpúsculos gustativos ($\rightarrow$). B) C. levadura. Corpúsculos gustativos (c), diente ($\rightarrow$). H-E; Barra 100 μ m.	107

Lista de figuras (continuación)		
Figura 42	Corte sagital de <i>P. californicus</i> a los 21 DDE (control). A) Control. B) Control levadura. Folículos tiroideos (→). H-E; Barra 100 μ m.	107
Figura 43	Corte sagital de <i>P. californicus</i> a los 26 DDE. A) Control. B) Control levadura. Primeros esbozos de las glándulas digestivas (→), epitelio (e). H-E; Barra 100 μ m.	108
Figura 44	Corte sagital de <i>P. californicus</i> a los 31 DDE en los organismos con suministro de BACTOCELL. Primeros esbozos de las glándulas digestivas (→). H-E; Barra 100 μ m.	109
Figura 45	Corte sagital del sistema digestivo de <i>P. californicus</i> a los 36 DDE A) Control. B) Control levadura, C) LEVUCELL, D) BACTOCELL. Regionalización completa del estómago. Esófago (e), hígado (h), corazón (c), páncreas (p), intestino anterior (ia), intestino posterior (ip), región cardiaca (rc), región fúndica (rf), región pilórica (rp), riñón (r). H-E; Barra 600 μ m.	110
Figura 46	Actividad enzimática en los probióticos (U/ μ g de probiótico).	111
Figura 47	A) Actividad total de tripsina y B) Actividad específica de tripsina durante el desarrollo de <i>P. californicus</i> , con el suministro de diferentes probióticos. Media $\pm$ D.E. (n = 3).	114
Figura 48	A) Actividad total de quimotripsina y B) Actividad específica de quimotripsina durante el desarrollo de <i>P. californicus</i> , con el suministro de diferentes probióticos. Media $\pm$ D.E. (n = 3).	117
Figura 49	A) Actividad total de leucina aminopeptidasa y B) Actividad específica de leucina aminopeptidasa durante el desarrollo de <i>P. californicus</i> , con el suministro de diferentes probióticos. Media $\pm$ D.E. (n = 3).	119
Figura 50	A) Actividad proteolítica ácida total y B) Actividad proteolítica ácida específica, durante el desarrollo de <i>P. californicus</i> , con el suministro de diferentes probióticos. Media $\pm$ D.E. (n = 3).	121

Lista de figuras (continuación)		
Figura 51	A) Actividad total de lipasa y B) Actividad específica de lipasa durante el desarrollo de <i>P. californicus</i> , con el suministro de diferentes probióticos. Media $\pm$ D.E. (n = 3).	123
Figura 52	Actividad de la fosfatasa alcalina en el intestino anterior (I.A.) y posterior (I.P.) de <i>P. californicus</i> a los 41 y 46 DDE, con el suministro de probióticos. (n = 3).	124
Figura 53	Actividad de la fosfatasa alcalina en cortes sagitales de <i>P. californicus</i> a los 41 DDE, con suministro de probióticos. A) Control, B) Control levadura, C) LEVUCCELL, D) BACTOCELL. Esófago (e), región cardíaca (rc), región fúndica (rf), región pilórica (rp), intestino anterior (ia), intestino posterior (ip), corazón (c). Fast green. Barra 600 μ m.	125

LISTA DE TABLAS		
TABLA	DESCRIPCIÓN	PÁGINA
Tabla I	Pigmentación y supervivencia (%) en las larvas de <i>P. californicus</i> mantenidas en cultivos experimentales con el suministro de probióticos (Media $\pm$ D.E.).	102

1. CAPITULO I

1.1 Introducción general

El estudio del cultivo de los peces marinos reviste un gran interés económico. Sobre todo en un país como el nuestro, en donde la mayor parte de los productos marinos que se consumen provienen de la pesca inmoderada en las áreas costeras, es imprescindible profundizar en el conocimiento de las mejores técnicas acuaculturales. En las condiciones actuales y previsibles de la oferta y la demanda mundial de alimentos de origen marino es fundamental la consolidación del desarrollo pesquero en nuestro País, para incrementar la disponibilidad de recursos pesqueros y disminuir las capturas oceánicas, además de orientar esfuerzos hacia el cultivo de especies marinas así como el mejoramiento de los productos generados de éste.

Según estimaciones preliminares de la FAO (2004), la producción pesquera mundial disminuyó en 1% respecto al 2002. Sin embargo, la cantidad total de pescado para el consumo humano aumentó de 100.7 millones de toneladas en el 2002 a 103 millones de toneladas en el 2003. En lo que respecta a la producción de pescado por prácticas acuaculturales, la cifra se elevó 6.1 % en el 2002, respecto a lo producido en el año 2000. La producción acuícola de pescado para el consumo humano es, en mayor proporción, de origen dulce acuícola (57.7%).

En México se realizan diversas actividades acuaculturales enfocadas principalmente a la producción de crustáceos, moluscos y peces, tanto dulceacuícolas como marinos, estos últimos a menor escala. En el año 2002 México se ubicó en el séptimo lugar mundial de los países con mayor crecimiento

en acuicultura, pasando de 53,900 TM en el año 2000 a 73,700 TM en el 2002 (FAO, 2004).

En la región Noroeste del País se localizan la mayor parte de los centros de investigación que se dedican a trabajar y desarrollar técnicas de cultivo y reproducción de diferentes especies de peces, crustáceos y moluscos del País. Entre los centros más importantes se pueden mencionar el Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas (CICIMAR-IPN), el Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C. (CIB-NOR), el Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE), la Universidad de Sonora (UNISON), la Universidad Autónoma de Baja California Sur (UABCS) y la Universidad Autónoma de Baja California (UABC) (Avilés Quevedo et al. 1995).

En cuanto a la producción de peces marinos, pocas son las especies en las que actualmente se trabaja para desarrollar la tecnología adecuada para su cultivo. En Sonora se inició la investigación enfocada al desarrollo de la biotecnología para el cultivo de la totoaba (Barrera-Guevara et al. 1994). Actualmente la UABC posee un laboratorio para la reproducción y cultivo larvario de esta especie con fines de repoblación. En Baja California Sur, una de las especies más estudiadas es la cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*), especie en la que ya se cuenta con buenos resultados en desoves, eclosión, cultivo larvario y producción de juveniles (Cadena Roa y Roldán, 1994). En Sinaloa recientemente se han desarrollado diferentes protocolos para la producción de especies como el botete (*Sphoeroides annulatus*), el pargo

(*Lutjanus guttatus*), el huachinango (*Lutjanus peru*) y el pargo prieto (*Lutjanus novemfasciatus*) contándose con buenos resultados en sus respectivas producciones.

Uno de los principales problemas en el cultivo de peces marinos es la obtención y cría de larvas, esto se debe principalmente al desconocimiento de las condiciones ambientales óptimas de cultivo, así como a la falta de información acerca de los hábitos alimentarios, los requerimientos nutricionales y a los cambios ontogenéticos y del crecimiento, durante las primeras etapas de desarrollo (Planas y Cunha, 1999).

Conforme las larvas se desarrollan se presenta el reacomodo de diversos órganos internos, así como la aparición y el crecimiento de nuevas estructuras, transformaciones que influyen en el proceso de asimilación del alimento. Por todo esto, resulta primordial conocer la morfogénesis del sistema digestivo, relacionándola con su capacidad funcional y así intentar dilucidar el tipo de alimento debe ser ofrecido a la larva (Dinis et al. 1997 e Izquierdo et al. 2000); utilizando para esto, estudios histológicos, histoquímicos y de actividad enzimática que permitan integrar el conocimiento de la fisiología digestiva de las larvas y por lo tanto sus requerimientos nutricionales durante cada etapa del desarrollo larvario.

Otro problema al que se enfrentan las granjas piscícolas durante el período del cultivo larvario, es el suministro del alimento vivo por un tiempo prolongado, etapa en la que se pueden llegar a invertir grandes cantidades de dinero. En este trabajo, además de describir la capacidad digestiva de las larvas de *Paralichthys*

californicus, herramienta básica para la elaboración de una dieta adecuada a las necesidades nutricionales de la especie, se emplearon probióticos como promotores de la maduración del sistema digestivo. El suministro de los probióticos tuvo como objetivo general, reducir el período de dependencia del alimento vivo, tratando de abreviar la formación y desarrollo de los órganos digestivos, así como el estimular la secreción de las enzimas digestivas, permitiendo la digestión del alimento de una manera más eficiente.

2. CAPITULO II. Ontogenia del sistema digestivo de *Paralichthys californicus*

II.1 Introducción

II.1.1 Cultivo de lenguados

En los últimos años el cultivo de lenguados o peces planos comenzó a desarrollarse como una buena alternativa de producción acuacultural, dada la excelente calidad de la carne, el alto precio y su creciente demanda (Lobos et al. 1992).

Una buena parte de la información del cultivo de los lenguados se ha generado en Noruega con el lenguado del Atlántico (*Hippoglossus hippoglossus*). Estas investigaciones iniciaron en los años 70's, pero no fue hasta 1986 cuando se obtuvieron los primeros organismos en que se logró completar el proceso de la metamorfosis y obtener juveniles (Stickney y Liu, 1991). En 1988 se inició la producción experimental de la especie en sistemas semiintensivos, empleando encierros flotantes y alimentándolos con zooplancton natural vivo (Berg, 1997). Actualmente el lenguado del Atlántico tiene un excelente potencial para su cultivo tanto en jaulas marinas como en estanques de tierra. Son animales de manejo apacible, poseen buenos registros sanitarios y se consideran como peces de alta calidad por su carne y sabor (Brancker, 2000).

En Francia el cultivo de las especies *Solea vulgaris* (sole) y *Scophthalmus maximus* (rodaballo) se inició en los años 70's, al mismo tiempo que en la Gran Bretaña, desarrollándose las técnicas para el mantenimiento de los "stocks" de reproductores en cautiverio, obtención de huevos con desoves controlados y continuos, así como el mejoramiento en la calidad de los embriones. A principio de

los años 80's la producción de estos organismos ya alcanzaba las 100,000 larvas por semana, 50,000 rodaballos juveniles y hasta 25,000 soles en etapa juvenil (Person-Le-Ruyet, 1986).

En España el rodaballo o turbot (*S. maximus*) se considera una especie con alto potencial comercial, en particular, en Galicia que se ha convertido en el centro principal de la industria acuícola, con una producción estimada de alrededor de 1,500 TM en 1991 (Soutar, 2000). En el 2004 el rodaballo alcanzó un precio de 8.89 euros/kg, con un valor anual de 54 millones de euros (Panorama Acuícola, 2006). Pero al igual que las otras especies de lenguados, el cultivo larvario es la parte más difícil de controlar y ésta es la principal limitante en el desarrollo de los cultivos.

Otra especie de lenguado ampliamente estudiada en cuanto a su desarrollo y producción es el lenguado japonés (*Paralichthys olivaceus*), cultivado en Japón desde 1975. Esta especie tiene gran valor comercial debido a su carne blanca y succulenta. Desde 1989 Japón contaba con una producción total de 4,283 toneladas, con un valor comercial de \$92.38 millones de dólares (Ikenove y Kafuku, 1992). De la misma manera el lenguado del Pacífico (*Hippoglossus stenolepsis*), especie nativa del Pacífico Norte, es altamente apreciada por su importancia comercial y deportiva, tanto en Estados Unidos como en Canadá (Stickney y Liu, 1991).

En el continente americano una de las especies con mayor importancia en la pesca deportiva y comercial es *P. dentatus* (lenguado del verano); esta especie tiene una amplia distribución, se le puede encontrar en la costa atlántica de los

Estados Unidos, desde Maine hasta Florida. En Norteamérica el cultivo del lenguado del verano se inició desde los años 70's, pero fue hasta los 90's cuando se incrementó su interés comercial (Bengtson, 1999). A pesar de que esta especie ha sido ampliamente comercializada, se cuenta con muy poca información sobre su desarrollo durante las primeras etapas de vida, en particular su desarrollo morfológico interno (Bisbal y Bengtson, 1995). Actualmente se cultiva en sistemas con recirculación de agua marina y se estudia, principalmente, el efecto de dietas y regímenes alimentarios sobre el crecimiento y supervivencia (Carroll et al. 2005).

En Chile, actualmente se trabaja en la reproducción y manutención en cautiverio de diferentes especies de lenguados: *Paralichthys microps*, *P. adspersus* (lenguado de Chile) (Lobos et al. 1992), *S. maximus* (rodaballo), *P. olivaceus* (lenguado japonés) e *H. hippoglossus* (lenguado del Atlántico). La producción anual de rodaballo es de 650,000 juveniles, cultivados en dos granjas. De la misma manera, cuentan también con dos unidades de engorda, las cuales pueden producir hasta 540 T de rodaballo por año, de diferente peso y tamaño (Alvial y Manríquez, 1999).

P. lethostigma y *P. woolmani* son dos especies en las que se ha logrado inducir el desove en cautiverio. Desafortunadamente el cultivo de ambas ha sido limitado, ya que el porcentaje de supervivencia hasta la metamorfosis es muy bajo (Benetti, 1997).

Entre los países que actualmente se dedican a la producción de lenguados se encuentran Estados Unidos, Rusia, Canadá, Holanda, Japón, Islandia, Dinamarca, España, Inglaterra, Francia, Corea, Bélgica, Escocia, Noruega y

recientemente México, entre otros, siendo los países consumidores principales de estas especies Francia, España, EU, Japón, Reino Unido y Holanda. Sin embargo, las especies del género *Paralichthys* son las más solicitadas en el mercado europeo (Lobos et al. 1992). Los reportes de la producción mundial de lenguados, halibuts y las platijas han aumentado de 26,309 toneladas en el 2000 a 38,909 toneladas en el 2002 (FAO, 2004).

La alta demanda del mercado ha provocado que muchos de los esfuerzos en la investigación acuícola se estén enfocando en desarrollar las mejores técnicas de cultivo, especialmente durante la etapa larvaria, una de las más difíciles de controlar en la producción masiva de algunas especies de peces marinos. Recientemente, las investigaciones se han orientando principalmente a entender el desarrollo ontogenético de las larvas y sus necesidades nutricionales, así como su capacidad digestiva, y el desarrollo de los mejores protocolos de destete, todo esto con la finalidad de obtener semilla de alta calidad que pueda ser ofrecida al mercado nacional e internacional.

II.2 Antecedentes

II.2.1 Lenguado de California (Paralichthys californicus)

El lenguado de California (*Paralichthys californicus*) es una especie perteneciente a la familia Paralichthyidae que podría representar un recurso de gran importancia económica para el País, sobre todo en la costa del pacífico donde es considerada como una especie de gran valor comercial en la industria pesquera, así como en la pesca deportiva de California (Kucas y Hassler, 1986).

Esta especie tiene una amplia distribución, desde el río Quillayute, Canadá hasta Bahía Magdalena, Baja California, México (Hensley, 1995). Las características morfológicas más sobresalientes de la especie *P. californicus* son sus aletas pectorales generalmente de base corta, mandíbulas desarrolladas, dentición muy grande de tipo canina y la línea lateral sin rama supratemporal notable, formando un arco sobre la aleta pectoral. La aleta dorsal se origina arriba de la parte anterior del ojo y posee de 66 a 76 radios. La aleta anal tiene entre 49 y 59 radios y la aleta pectoral tiene entre 10 y 13, la aleta caudal es indentada. Sus ojos son pequeños, sinestrales o destraes; el cuerpo es elíptico y esbelto y la cabeza es pequeña con una boca grande. Las escamas son del tipo ctenoideas en el lado oculado y las del lado ciego son escamas cicloideas. El lado oculado es grisáceo o verdoso-café, algunas veces moteado con sombras claras y oscuras y pequeñas manchas blancas; el lado ciego es de color blanco o crema (Hacker, 1975; Ramírez- Hernández y González, 1976 y Kucas y Hassler, 1986).

II.2.2 Ontogénesis del sistema digestivo

Una de las principales razones por las cuales la supervivencia de las larvas es muy baja en condiciones de cultivo, es el desconocimiento de su capacidad digestiva, ya que en muchos de los casos, no se toma en cuenta que las transformaciones morfológicas internas más importantes ocurren durante el primer mes de edad. Por ejemplo, la formación y acomodamiento progresivo de los principales órganos y el incremento en su funcionalidad (Kurokawa et al. 1998).

Esta secuencia de cambios morfológicos y funcionales se han observado en muchas otras especies de peces marinos. Por ejemplo, en el rodaballo (*S. maximus*), la alimentación de la larva es exclusivamente endógena los dos primeros días de vida. La boca se abre entre 2 y 3 días después de la eclosión (DDE), comenzando el período de la alimentación exógena. Entre los 2 y 8 DDE el tubo digestivo se vuelve progresivamente funcional, posteriormente el estómago se transforma y la vejiga gaseosa se aísla del tubo digestivo (Person-Le-Ruyet, 1986). Así mismo, Bengtson (1999) menciona que las larvas de *Paralichthys dentatus* desarrollan rápidamente su tracto digestivo en el tercer DDE, cuando se inicia la alimentación exógena, posteriormente, la aparición del estómago y su desarrollo coinciden con el proceso de metamorfosis y el asentamiento (Bisbal y Bengtson, 1995). La corvina (*Leiostomus xanthurus*) presenta el mayor número de transformaciones morfológicas al ingerir el primer alimento exógeno y cambia muy poco durante el resto de la fase larval (Govoni, 1980). La anguila (*Anguilla japonica*), eclosiona solo con la faringe formada, y la parte posterior del tracto digestivo se diferencia durante el primer DDE y el tercer DDE se abren la boca y el

ano (Kurokawa et al. 1995). Esto mismo ocurre en el estadio larvario del sabalote (*Chanus chanus*), en donde la metamorfosis del estómago y del intestino se pueden distinguir en la porción anterior del tracto digestivo desde el tercer DDE (Ferraris et al. 1987). El pez plano *Pleuronectes ferroginea* comienza la diferenciación de su tracto digestivo a partir del tercer DDE y aproximadamente 10 DDE culmina la regionalización de todos sus órganos (Baglolle et al. 1997). En el sol (*Solea senegalensis*) la diferenciación de su tracto digestivo se inicia al segundo DDE (24 horas antes que las especies anteriormente descritas), en este momento el ano y la boca se encuentran abiertos y el tracto digestivo ya está regionalizado en cavidad buco-faríngea, esófago, estómago incipiente e intestino anterior y posterior (Ribeiro et al. 1999a). Por último, el lenguado de California eclosiona con un tubo digestivo recto, el cual se encuentra bien diferenciado a los 3 DDE. En el páncreas en desarrollo, los gránulos de zimógeno se presentan desde el primer día después de la eclosión, denotando la importancia de las secreciones pancreáticas en este período, pero no es sino hasta entre los 27 a 30 DDE, en que comienza a diferenciarse el estómago, coincidiendo con la migración ocular (Gisbert et al. 2004).

Por lo anterior, el hecho de conocer la morfología, histología y regionalización funcional del sistema digestivo durante el desarrollo larvario permite entender, de alguna manera, las características funcionales de cada órgano. Una vez estudiadas estas características, podríamos inferir cuales procesos digestivos se podrían realizar en cada etapa del desarrollo y cuales serían las posibles capacidades funcionales del sistema digestivo. Capacidades

que podrían relacionarse con las características estructurales de las células del epitelio gástrico de las larvas, una vez que éstas se han diferenciado completamente (Bisbal y Bengtson, 1995). Aunado a esto, debemos tener en cuenta que el éxito de un cultivo larvario, depende en buena parte de que las larvas logren asimilar el alimento provisto, el cual, además de ser de buena calidad, se debe adecuar al estado funcional del sistema digestivo y a la interacción de los procesos digestivos y metabólicos, en los diferentes estados de desarrollo (Hoehne-Reitan y Kjørsvik, 2004).

II.2.2.1 Actividad enzimática

En los peces, como en el resto de los vertebrados la utilización de las proteínas provenientes del alimento afecta de manera directa su crecimiento (Dabrowski y Glogowski, 1977). La capacidad de los peces para digerir estos nutrientes depende, no solo de la presencia de enzimas proteolíticas, sino también de que éstas se encuentren en cantidades suficientes y distribuidas de manera adecuada a lo largo del tracto digestivo (Lundstedt et al. 2004).

Diversos estudios han demostrado que, la actividad enzimática y su distribución en el lumen intestinal variará de acuerdo a los hábitos alimenticios y a la morfología intestinal de cada organismo (Tengjaroenkul et al. 2000), por lo que el estudio de la capacidad hidrolítica total del tracto digestivo es parte fundamental en la evaluación de la capacidad digestiva de los organismos. Información que facilitará la formulación de la dieta más adecuada para cada etapa del desarrollo de los organismos y garantizará el mejor uso del alimento (Lundstedt et al. 2004).

Últimamente se han reportado trabajos muy completos que relacionan la actividad funcional de algunos órganos con su actividad enzimática (Cara et al. 2003), esto ha permitido conocer tanto la capacidad digestiva como la asimilación de nutrientes en las larvas de los peces.

La aparición de las glándulas gástricas, para muchos autores, indica la culminación del desarrollo del estómago desde un punto de vista histológico y en algunas especies es posible detectar actividad de pepsina en este momento (Zambonino-Infante y Cahu, 2001). Por otro lado, se ha observado que la diferenciación de las células exocrinas y de los conductos excretorios en el páncreas, coinciden con la presencia de gránulos de zimógeno, así como con la actividad de tripsina (Kurokawa y Suzuki, 1996). Esto ha permitido corroborar en la mayoría de los casos que, la diferenciación morfológica del tracto digestivo corresponde con la regionalización específica de las enzimas digestivas (Baglolle et al. 1998). De la misma manera, el plegamiento de la mucosa concuerda con un fuerte incremento en la actividad de las enzimas localizadas en las membranas del borde de cepillo de los enterocitos; el aumento en grosor de estas membranas indica un incremento en la digestión y absorción en el área. El incremento en la actividad de las enzimas del borde de cepillo del intestino (e.g., fosfatasa alcalina, leucina aminopeptidasa) concomitante con la reducción de la actividad de las enzimas citosólicas (e.g., peptidasa citosólica) son el marcador de un cambio ontogenético en la expresión enzimática a nivel del intestino, característica de su maduración normal (Zambonino-Infante y Cahu, 2001).

En algunos casos como el del esturión blanco (*Acipenser transmontanus*) se observa un claro incremento en la capacidad digestiva de las larvas, asociado con la organización morfológica y funcional de su sistema digestivo. El aumento en la actividad de algunas enzimas, como la fosfatasa alcalina, aminopeptidasa, dipeptil peptidasa IV y γ -glutamyl transpeptidasa en el borde de cepillo del intestino espiral, indican una maduración adecuada del sistema digestivo y el lugar donde se realiza una de las etapas de la digestión de proteínas y la absorción de nutrientes, confirmando que la larva posee las enzimas requeridas para complementar la digestión de proteínas y el transporte de aminoácidos a través de la membrana (Gawlicka et al. 1995). En el lenguado del Senegal (*S. senegalensis*) se presenta una fuerte actividad enzimática semejante a la de las lipasas y peptidasas que demuestran su capacidad para digerir el alimento exógeno, desde el segundo día de desarrollo. La alta actividad de las peptidasas señala la gran capacidad que tienen estas larvas para completar la digestión de las proteínas (Ribeiro et al. 1999b).

Además de la actividad enzimática, la aparición de las glándulas gástricas indican el momento del inicio de la digestión química por la secreción de HCl (Hamlin et al. 2000). El desarrollo de estas estructuras puede influenciar de manera notable la digestión y la asimilación de nutrientes, iniciándose un mecanismo más elaborado de los mismos procesos y, desde la perspectiva del sistema digestivo, iniciando la etapa juvenil (Govoni, 1980; Bisbal y Bengtson, 1995; Hamlin et al. 2000).

La actividad de las proteasas ácidas se encuentra en mayor proporción en el estómago; esta actividad se debe a la activación del pepsinógeno en pepsina, mientras que en el páncreas exócrino se sintetizan y secretan en el lumen intestinal un gran número de enzimas como son las glucosidasas, lipasas y proteasas. Por otro lado, algunas enzimas intestinales son producidas por los enterocitos, pero no son secretadas al lumen intestinal, como en el caso de las enzimas citosólicas (principalmente peptidasas), presentes en el citoplasma y las enzimas de la membrana en el borde de cepillo (Hirji et al. 1982).

II.2.2.2 Histoquímica

El análisis histoquímico es una herramienta útil para el estudio del desarrollo ontogenético del tracto digestivo, ya que brinda una referencia precisa de la funcionalidad de las diferentes regiones del sistema digestivo (Baglolle et al. 1997). Además de la actividad enzimática, la detección y localización de zonas de absorción de proteínas, lípidos y carbohidratos durante los procesos ontogenéticos, pueden complementar la información acerca de la organización morfológica, la fisiología digestiva de las larvas y la absorción de nutrientes.

La histoquímica enzimática ha permitido determinar la importancia de las enzimas enterocíticas en las etapas finales de la digestión. La principal ventaja de estas técnicas es que permiten precisar el tejido y la localización celular de la actividad, mientras se mantiene la relación tejido-espacial (Gawlicka et al. 1995). Mediante estos estudios ha sido posible evaluar el desarrollo histológico del

sistema digestivo y el papel de los diferentes segmentos intestinales en los procesos digestivos y de absorción, inclusive desde el desarrollo embrionario.

La detección de diferentes enzimas resulta de suma importancia para interpretar el estado funcional de cada órgano. Por ejemplo, la tripsina se utiliza como marcador funcional del páncreas (Kurokawa et al. 1995). En la tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*), la detección de diferentes actividades enzimáticas en el tracto intestinal, demuestran la regionalización de la digestión y la absorción de nutrientes (Tengjaroenkul et al. 2000).

La presencia de la fosfatasa alcalina (dada su asociación con el transporte activo mediado por el sodio) puede indicar cambios en los procesos de absorción de nutrientes (Govoni et al. 1986). En el lenguado de invierno esta enzima se puede encontrar en la mucosa intestinal y rectal, identificando a estas regiones como sitios activos en la absorción de nutrientes (Bagloli et al. 1998). En la tilapia del Nilo, Tengjaroenkul et al. (2000) demostraron que esta enzima se localiza asociada a otras enzimas como la maltasa, la lipasa, la amilasa y diversas proteasas, permitiendo la absorción de pequeñas partículas, tan pronto como son producidas.

En el caso de la fosfatasa ácida, ésta se encuentra asociada a cuerpos de inclusión supranucleares y de absorción pinocítica (Govoni et al. 1986), por lo que se le ha relacionado con procesos de absorción y de digestión intracelular de macromoléculas. En el lenguado del Senegal, esta enzima se puede detectar dos DDE con una fuerte actividad sobre todo en el intestino posterior (Ribeiro et al. 1999a). En la dorada (*Sparus aurata*), utilizando microscopía electrónica, se pudo

observar que esta enzima se encuentra en lisosomas primarios y en vacuolas supranucleares, en el sistema endocítico apical de los enterocitos del intestino posterior. Esta región está especializada en la absorción y digestión intracelular de macromoléculas que no han sido degradadas totalmente en el lumen. Este mecanismo les confiere una función digestiva importante a las especies sin estómago y a las larvas cuyas glándulas gástricas no se han desarrollado (Calzada et al. 1998). La ausencia de pepsina durante los primeros estados de desarrollo podría ser compensada por micropinocitosis y digestión intracelular de las proteínas en el intestino posterior, con la participación de las fosfatasa ácidas y catepsinas (Moyano et al. 1996).

Estudios de histoquímica enzimática realizados en diferentes especies de peces han revelado que, desde etapas muy tempranas en el desarrollo larvario, se puede apreciar una clara regionalización funcional del sistema digestivo. En el lenguado del Senegal, a los dos DDE se puede detectar en el borde de cepillo y en el citoplasma de los enterocitos la presencia de lipasa, aminopeptidasa y fosfatasa ácida y alcalina, estas últimas principalmente en el epitelio intestinal (Ribeiro et al. 1999a). En el esturión siberiano es posible detectar actividad de las fosfatasa ácida y alcalina, ATP-asa y esterasa no específica, en larvas completas que aún poseen el saco vitelino (Gisbert et al. 1999). En las larvas de esturión blanco, 12 DDE poseen una fuerte actividad de la fosfatasa alcalina, la aminopeptidasa M, la dipeptidil peptidasa IV y la γ -glutamyl transpeptidasa en el borde de cepillo y en el intestino espiral, indicando que este segmento intestinal es de suma importancia para la digestión de proteínas y para la absorción de

nutrientes (Gawlicka et al. 1995). La fuerte actividad de la esterasa no específica en el estómago se ha correlacionado con su desarrollo funcional, dado que la presencia de esta enzima indica la actividad del retículo endoplasmático rugoso y la funcionalidad de éstas células (Verreth et al. 1992).

La distribución de diferentes enzimas en el tracto digestivo indica que este sistema está funcionalmente regionalizado y altamente especializado en procesos de digestión y absorción específicos (Gawlicka et al. 1995). Tomando en cuenta los estudios realizados por Bengtson (1993), en donde reporta que dependiendo del tipo de alimento, éste será absorbido en una región diferente del intestino, la presencia de una enzima digestiva en un estado de desarrollo determinado, es indicativo de la optimización del procesamiento de nutrientes, aún cuando los órganos principales del sistema digestivo no se han desarrollado completamente (Baglolle et al. 1998).

De la misma manera se ha demostrado que el decremento en la vacuolización de los hepatocitos puede indicar posibles cambios funcionales en el metabolismo de los lípidos o sus requerimientos, tales como el decremento en la actividad de la lipasa, la alteración en el almacenamiento de glucógeno o su utilización (Segner et al. 1994; Gawlicka et al. 1995; e Izquierdo et al. 2000). Asimismo, la transición a una alimentación activa coincide con el incremento en la actividad enzimática en el borde de cepillo del intestino. Por ejemplo, el aumento en la actividad de la acetilcolinesterasa en el intestino pilórico sugiere la secreción intensa de mucus por las células globosas y esto coincide con el incremento en la actividad de las α y β galactosidasas, las cuales son posiblemente responsables

de la degradación de mucopolisacáridos (Gawlicka et al. 1995 e Izquierdo et al. 2000).

Tomando en cuenta toda la información que las técnicas de histoquímica enzimática nos pueden proporcionar sobre la fisiología digestiva de las larvas, se hace necesario evaluar una técnica de cuantificación de la intensidad de las reacciones histoquímicas, la cual nos permita hacer distinciones entre los efectos de diferentes factores, entre etapas del desarrollo, estado nutricional e inclusive entre especies. El uso de analizadores de imágenes que nos permitan evaluar este tipo de reacciones, disminuiría el número de variaciones entre observadores y produciría evaluaciones precisas y repetibles (Floyd, 2002).

Los estudios de la nutrición y la fisiología digestiva de las larvas de peces representan una de las fuentes de información más importantes para la elaboración de dietas formuladas, adecuadas al grado de desarrollo de las larvas. México es uno de los primeros países, a nivel Latinoamérica, que actualmente se encuentra desarrollando la biotecnología para la producción a gran escala de una especie de lenguado, el de California (*Paralichthys californicus*). Por esto, resulta fundamental conocer la capacidad digestiva de la especie durante su desarrollo, lo que favorecería la elaboración de dietas y protocolos de destete exitosos, que permitan la producción de juveniles saludables, y que al mismo tiempo ayuden a abatir los altos costos del uso de alimento vivo durante el largo periodo larvario de esta especie.

II. 3 Hipótesis

El conocimiento de la ontogenia de la producción enzimática y el análisis histoquímico de los diferentes tipos celulares esofágicos, intestinales, gástricos y de órganos asociados del sistema digestivo de *Paralichthys californicus*, permitirá avanzar en el conocimiento de la organización morfológica y capacidad digestiva funcional de las larvas, así como determinar los requerimientos nutricionales, datos que en futuras investigaciones ayudarán a entender y superar una de las limitantes más importantes en el cultivo larvario que es el proceso del destete y la posible implementación de dietas balanceadas adecuadas a los diferentes estados de desarrollo larvario y juvenil del lenguado de California.

II.4 Objetivos

II.4.1 Objetivo general

Contribuir al desarrollo de las técnicas de cultivo para larvas de la especie *Paralichthys californicus*, describiendo la ontogenia de su sistema digestivo y de su capacidad digestiva, utilizando técnicas histológicas, histoquímicas y bioensayos de actividad enzimática, que permitan caracterizar de forma precisa posible el proceso morfológico y funcional del tracto digestivo de la especie.

II.4.2 Objetivos específicos

1. Caracterizar cualitativamente la morfogénesis del sistema digestivo y de los órganos asociados de *P. californicus*, a través de su descripción histológica.
2. Caracterizar cualitativa y cuantitativamente la producción enzimática del sistema digestivo y sus órganos asociados durante su desarrollo ontogenético.
3. Analizar por técnicas histoquímicas la presencia de algunas enzimas gastrointestinales durante la ontogenia del sistema digestivo del lenguado de California y precisar los tejidos que participan en los diferentes procesos digestivos y de absorción.
4. Desarrollar una técnica histoquímica cuantitativa que permita evaluar la actividad enzimática de las fosfatasas alcalina y ácida, en diferentes segmentos del intestino, durante la ontogenia.

II.5 Materiales y métodos

El trabajo experimental se llevó a cabo en el verano del 2003 en el laboratorio húmedo del Departamento de Acuicultura del CICESE, utilizando huevos de *P. californicus*, obtenidos de desoves naturales de reproductores mantenidos en cautiverio, provenientes de California Halibut Hatchery, Redondo Beach, California, USA y de Hubbs Sea World Research Institute, California, USA.

II.5.1 Sistema de cultivo

Las larvas recién eclosionadas de *P. californicus* fueron cultivadas en estanques cilíndricos de 200 L de capacidad, a una densidad de 13 larvas/L. El agua de mar de este sistema de cultivo se recirculó a través de un filtro de arena, un biofiltro y finalmente fue irradiada con luz UV. Las larvas se mantuvieron a una temperatura de 18 ± 0.6 °C, oxígeno disuelto de 6.4 ± 0.1 mg/L y una salinidad de 33 ± 0.07 ‰, parámetros recomendados para el cultivo de esta especie (Gadomski et al. 1990 y Gisbert et al. 2004).

II.5.2 Protocolo de alimentación

II.5.2.1 Suministro de alimento vivo a las larvas

La alimentación exógena de las larvas se inició a los dos días después de la eclosión (DDE), con rotíferos de la especie *Brachionus plicatilis* enriquecidos con ácidos grasos. Los rotíferos fueron suministrados a las larvas a una densidad inicial de 5 rotíferos/mL, incrementándose a 7 rotíferos/mL a los 12 DDE, ésta

concentración se mantuvo hasta los 16 DDE. Entre los 17 y 20 DDE las larvas fueron co-alimentadas con nauplios de *Artemia* recién eclosionados y enriquecidos con ácidos grasos. El suministro de rotíferos se fue disminuyendo paulatinamente en una proporción de 75, 50 y 25% durante esos tres días. Después de los 21 DDE, las larvas fueron alimentadas únicamente con nauplios de *Artemia* enriquecidos, manteniéndose una densidad de 5 nauplios /mL hasta el final de la fase experimental.

Durante todo el experimento se adicionaron diariamente a cada uno de los estanques experimentales 4 mL de microalgas concentradas de la especie *Nannochloropsis* sp (Instant Algae®; Campbell, CA, USA), suministrando 2 mL por la mañana y dos por la tarde.

II.5.2.2 Cultivo y enriquecimiento de rotíferos

Los rotíferos fueron cultivados en la Unidad de Biotecnología en Piscicultura de la Universidad Autónoma de Baja California, en estanques cónicos de 400 L de capacidad, mantenidos a 26 °C, salinidad de 26 ‰ e iluminados continuamente con luz fluorescente. La alimentación se realizó de forma continua con *Nannochloropsis* sp (Instant Algae®; Campbell, CA, USA) utilizando una bomba peristáltica conectada al estanque de cultivo. Los rotíferos fueron cosechados por la mañana, concentrados con una malla de 60 µm y lavados con agua de mar.

Antes de ser suministrados a la larvas, los rotíferos fueron enriquecidos por un período de 12 horas con una suspensión de ácidos grasos altamente

insaturados (RATIO HUFA Enrich, Salt Creek Inc.), a una concentración de 125mg/L para 200-500 rotíferos/mL. Este proceso de enriquecimiento se realizó en el laboratorio húmedo del Departamento de Acuicultura del CICESE, manteniendo a los rotíferos en estanques cilíndricos de 45 L de capacidad, con una temperatura de 20 °C, salinidad de 33 ‰ y aireación constante.

II.5.2.3 Cultivo y enriquecimiento de Artemia

Los quistes de *Artemia* (Salt Creek Inc., Salt Lake City, UT, USA) fueron hidratados en agua dulce por una hora con aireación constante; posteriormente se desinfectaron con una solución de hipoclorito al 50 % y se lavaron profusamente con agua corriente en una malla de 125 µm. La eclosión se realizó en estanques cilíndricos de 45 L, a una temperatura de 25 °C, con luz y aireación constante por un período de 24 horas, siguiendo el protocolo descrito por Sorgeloos et al. (1986). Posteriormente se realizó el proceso de enriquecimiento por 12 horas con la misma suspensión de ácidos grasos utilizada previamente, en este caso utilizando una concentración de 300 mg/L para 300 nauplios/mL a 25 °C.

II.5.3 Crecimiento larvario de Paralichthys californicus

Para llevar a cabo el registro del crecimiento de las larvas, se tomaron al azar 30 larvas de cada estanque y se les midió la longitud estándar (LE, desde la boca hasta el final de la notocorda), utilizando un microscopio estereoscópico con retícula ocular (Wild Heerbrugg). Las larvas fueron anestesiadas con

metasulfonato de tricaína (MS222) al 0.05%. Los muestreos se llevaron a cabo diariamente desde el 1º al 10º DDE, cada 2 días entre los 12 a 20 DDE y cada 4 días entre los 24 a 44 DDE.

II.5.4 Histología

El análisis histológico fue realizado en un grupo de 15 larvas (5 por estanque), las cuales fueron fijadas en solución Bouin a temperatura ambiente por 24-48 h; una vez transcurrido este tiempo se transfirieron a una solución de alcohol al 70% para eliminar el exceso de fijador (Bagogle et al. 1997). Posteriormente fueron sometidas a un proceso de deshidratación a través de un tren de alcoholes de concentración ascendente (50-100%) e incluidas en parafina. Se realizaron cortes sagitales de 4 µm de grosor utilizando un micrótomos de rotación (American optical), formándose series continuas de tres a cinco cortes por laminilla. Los cortes fueron teñidos con la técnica de Hematoxilina-Eosina (Estrada et al. 1982) y analizados utilizando microscopía de luz a diferentes aumentos. A algunas larvas se les tomaron fotos en vivo utilizando un microscopio estereoscópico (Wild Heerbrugg), para observar sus características morfológicas externas

II.5.5 Actividad enzimática

La capacidad digestiva de las larvas se cuantificó llevando a cabo bioensayos específicos para la detección de endo y exoproteasas. Para la

realización de estas pruebas se recolectaron por estanque 48 larvas al azar aproximadamente a las 10:00 a.m. Se mantuvieron sin alimento por un período de 1 a 2 horas para vaciar el intestino y se anestesiaron con metasulfonato de tricaína (MS222) al 0.05%. Finalmente, las larvas fueron colocadas en tubos eppendorf (8 en cada tubo) y se almacenaron a -50 °C hasta su análisis.

Para determinar la actividad enzimática en las larvas menores a 5 días, se prepararon homogenizados de 8 larvas completas, ya que por su tamaño es extremadamente difícil disecar adecuadamente el tracto digestivo. A las larvas de mayor edad se les disecó el tracto digestivo y las glándulas digestivas anexas, esto con el fin de evitar la interferencia de las enzimas presentes en la musculatura de las larvas y que pudieran afectar la medición de la actividad real de las enzimas digestivas (Lazo et al. 2000a). La disección se realizó sobre una placa de vidrio congelada. Para las larvas de 6 a 18 días de edad se utilizaron cinco tractos digestivos, 4 de las larvas de 20 a 28 días y 2 de las de 32 a 44 DDE. Los tejidos y las larvas fueron homogenizados en 1000 μ L de agua destilada a 4 °C, empleando un homogenizador de tejidos manual con las larvas pequeñas y un polytron (Kinematica AG, System PT1200C) en el caso de los tractos digestivos más grandes, las muestras se mantuvieron en hielo durante todo el proceso. Excepto para la medición de leucina aminopeptidasa, los homogenizados fueron centrifugados a 12,300 r.p.m. por 30 minutos a 4 °C (Lazo et al. 2000b) en una centrífuga Eppendorf 5417 R y almacenados a -50 °C hasta su análisis.

La actividad de tripsina se cuantificó utilizando una técnica espectrofotométrica, según el método sugerido por Erlanger et al. (1961). Este método emplea como sustrato BAPNA 0.1 mM (SIGMA-ALDRICH, St. Louis MO) y Buffer 50 mM Tris-HCl, 20 mM CaCl_2 , pH 8.2. En 560 μL de sustrato se agregaron 80 μL de extracto. Después de un período de incubación de 60 minutos a 37 °C, la reacción fue detenida con ácido acético al 30% y se realizó la lectura de la absorbancia a 410 nm.

Para la detección de la leucina-aminopeptidasa se empleó el protocolo de Appel (1974), el cual utiliza como sustrato L-leucina-p-nitroanilida 1.2 mM (SIGMA-ALDRICH, St. Louis MO) y buffer 50 mM de Tris-HCl, pH 8.0. La incubación de 80 μL de extracto enzimático en 720 μL de sustrato, se realizó a 37 °C por 30 minutos, deteniendo la reacción con ácido acético al 30%. El cambio en la absorbancia se leyó a 405 nm.

La actividad proteolítica alcalina total se cuantificó empleando el método sugerido por Sarath et al. (1989), utilizando como sustrato azocaseína al 2% (SIGMA-ALDRICH, St. Louis MO), buffer 50 mM de Tris-HCl, 10 mM CaCl_2 , pH 9. En este caso se usaron 150 μL de sustrato y 100 μL de extracto enzimático. El tiempo de incubación fue de 30 minutos a 37 °C, la reacción se detuvo con ácido tricloroacético al 10%. Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas a 13,400 r.p.m. a temperatura ambiente, por 5 minutos. La absorbancia fue leída 366 nm.

La actividad proteolítica ácida total fue medida de acuerdo al método de Sarath et al. (1989), utilizando hemoglobina al 2% (pH 2.0) como sustrato (SIGMA-ALDRICH, St. Louis MO) y buffer 0.2 M de glicina-HCl, pH 2.6. La reacción se

realizó utilizando 300 µL de sustrato y 100 µL de extracto enzimático. Después de un tiempo de incubación de 60 minutos a 37 °C, la reacción se detuvo con ácido tricloroacético al 5%, dejando reposar las muestras por 30 minutos a 4 °C. Finalmente, las muestras fueron centrifugadas por 5 minutos a 13,400 r.p.m. a temperatura ambiente y la absorbancia del sobrenadante fue leída a 280 nm.

En todas las reacciones se incluyeron dos blancos. En el primero se sustituyó el extracto enzimático de las larvas, por agua desionizada y en el segundo blanco se agregó el ácido correspondiente a cada técnica, antes de agregar el homogenizado.

La actividad enzimática fue expresada como actividad total (U/larva) y actividad específica (U/mg de proteína), utilizando las siguientes fórmulas:

A) Actividad total

$$U/larva = \frac{\left[\frac{\Delta \text{ Abs/min} * \text{FD} * 1000}{E * \text{VM}} \right]}{\text{No. Larvas/mL}} \quad (1)$$

Donde:

Δ Abs/min = Abs de la muestra – Abs del blanco, entre el tiempo de incubación.

FD = Factor de dilución (Vol. total de la reacción entre Vol. del extracto)

1000 = Volumen del homogenizado

E = Coeficiente de extinción (0.01 proteasas totales y tripsina y 0.1 aminopeptidasa)

VM = Volumen del extracto

B) Actividad específica

$$\text{U/mg Proteína} = \frac{\text{U/larva}}{\text{mg P/larva}} \quad (2)$$

Para expresar la actividad proteolítica específica de cada enzima, una unidad fue definida como el incremento de 0.1 unidades de absorbancia/min y expresado por mg ó µg de proteína (U/mg ó µg proteína).

La concentración de proteína soluble en los homogenizados fue determinada por el método de Bradford (BIO RAD, Protein assay; Hercules, CA, U.S.), empleando suero de albúmina bovina (BIO RAD, U.S.) como estándar.

Todos los ensayos fueron realizados por triplicado y los resultados fueron expresados como la media ± desviación estándar.

II.5.6 Histoquímica

En cada muestreo se colectaron al azar 9 larvas por estanque y se mantuvieron por lo menos dos horas en recipientes con agua de mar filtrada, esto con la finalidad de que todo el alimento remanente en el sistema digestivo fuera evacuado. Posteriormente, las larvas se anestesiaron con metasulfonato de tricaína (MS222) al 0.05%, se colocaron en criomoldes y se embebieron en Tissue Tek, congelándose enseguida sobre hielo seco, almacenándose a -50 °C, hasta que fueron procesadas.

Se realizaron cortes de 5 µm de grosor en un criostato (Leica), formando series continuas de tres a cinco cortes por laminilla. Para este propósito se utilizaron laminillas con carga electrostática (Superfrost), ya que en pruebas preliminares realizadas con laminillas cubiertas con gelatina, se observó una interferencia de fondo, al momento de contrateñir los cortes.

Para validar una técnica de histoquímica enzimática cuantitativa se deben tomar en cuenta diferentes criterios, que permitan cuantificar la cantidad de producto final relacionado con la actividad *in situ* de la enzima. Es importante que los tejidos se encuentren perfectamente conservados, evitar en lo posible el uso de fijadores, utilizar medios de incubación lo más frescos posibles, emplear tiempos de incubación iguales, así como la misma temperatura y sobre todo, realizar por lo menos tres réplicas por técnica (Van Noorden y Frederiks, 1992).

Para la detección de las fosfatasas alcalina y ácida se utilizaron los protocolos sugeridos por Wikeley y Goodsell (1994), utilizando como controles

negativos de la reacción, cortes incubados sin el sustrato (ANEXO I). En el primer caso se usó como sustrato 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato-p-toluidina (BCPI), Nitro Blue Tetrazolium (NTB), como sal de acoplamiento (SIGMA-ALDRICH, St. Louis MO) y buffer Tris-HCl 0.1 M, pH 9.4. Las laminillas fueron colocadas en una charola y se adicionó una gota de sustrato recién preparado a cada corte. La charola se cubrió con papel aluminio para protegerla de la luz y los cortes se incubaron por 15 minutos a temperatura ambiente (T.A.). Una vez transcurrido este tiempo, se decantó el sustrato, se lavaron las laminillas con agua destilada y se contratiñeron por 3 minutos con Fast Green al 1%. Los cortes fueron lavados nuevamente con agua destilada y se sumergieron por 15 segundos en una solución saturada de carbonato de litio, para azular el tejido. Finalmente, los cortes se enjuagaron con agua corriente, se secaron con papel filtro y se montaron con el medio Apathy (Estrada et al. 1982).

Para la detección de la fosfatasa ácida se empleo el sustrato α -naftil fosfato de sodio, Fast Garnet GBC como sal de diazodium (SIGMA-ALDRICH, St. Louis MO) y buffer acetato 0.1 M, pH 5.0. Los cortes fueron incubados a T. A. por una hora, efectuando los mismos pasos para lavar, contrateñir y montar los cortes, que los empleados en la técnica para detectar a la fosfatasa alcalina.

Una vez montadas las laminillas, se procedió a observar la distribución de las enzimas a lo largo del sistema digestivo de las larvas, la captura de imágenes y la cuantificación de la densidad del color, resultante de la actividad enzimática en el sustrato.

En la reacción bioquímica que se lleva a cabo utilizando la técnica de acoplamiento simultáneo, la fosfatasa alcalina remueve hidrógenos del sustrato y los transfiere, a través de un proceso oxidativo, a una sal de tetrazolium (NTB), la cual se reduce formando formazán. Este producto puede ser identificado como depósitos de color café-negruzco, en los sitios de actividad enzimática (Wikeley y Goodsell, 1994 y Bancroft, 2002).

En el caso de la fosfatasa ácida, la reacción bioquímica que se lleva a cabo es la liberación del grupo α -naptol, por acción de la enzima. Este grupo se une a la sal de diazonium (Fast Garnet GBC), formando un grupo azo-dye, el cual se evidencia por una coloración roja en el sitio de la actividad enzimática (Bancroft y Hand, 1987 y Bancroft, 2002).

Para cuantificar la actividad enzimática en los cortes del sistema digestivo de las larvas, se utilizó un microscopio Leica, modelo DMRXA2, equipado con una cámara digital de 36-bits y 3.3 megapíxeles (Leica, modelo DC300). La actividad de cada enzima se cuantificó en tres cortes por muestreo, midiendo la densidad óptica (nivel de gris), utilizando el programa de cómputo Image-Pro Plus. La escala de grises que emplea este software utiliza valores de 0 a 250, por lo que los datos fueron transformados a porcentaje, antes de ser graficados.

Las imágenes de todos los cortes fueron capturadas 24 horas después de haberse realizado la técnica histoquímica, de tal manera que cualquier variación del color relacionada con el paso del tiempo, involucrara la misma variación. Todas las imágenes se capturaron con los mismos parámetros: intensidad de luz

(12 V), amplificación (1.0), brillo (0%) y el tiempo de exposición de acuerdo al aumento utilizado (5X, 2.17 ms; 10X, 3.72 ms y 40X, 68.2 ms).

La actividad enzimática en el intestino se midió en cada imagen, trazando manualmente una línea a todo lo largo del epitelio intestinal, procurando pasar por la parte media de los enterocitos. A cada pixel por donde la línea fue trazada, el programa le asignó un valor de gris, valores que fueron almacenados de manera automática en una hoja de cálculo.

Una vez obtenidos todos los datos, se les aplicó un análisis de varianza (ANOVA) ($P < 0.05$), utilizando el programa STATISTICA 6, con la finalidad de observar si existían diferencias significativas entre los días muestreados, entre las diferentes regiones del intestino. Para contrastar las diferencias entre los días y entre los segmentos del intestino, se aplicó la prueba de TUKEY.

II.6 Resultados

II.6.1 Crecimiento larvario

El crecimiento en longitud de las larvas de *P. californicus* estuvo linealmente relacionado con la edad ($r^2=0.966$) (Fig. 1). Al eclosionar las larvas tenían una longitud promedio de 2.2 ± 0.03 mm, presentaban un sistema digestivo indiferenciado y con una a dos gotas de aceite inmersas en el saco vitelino.

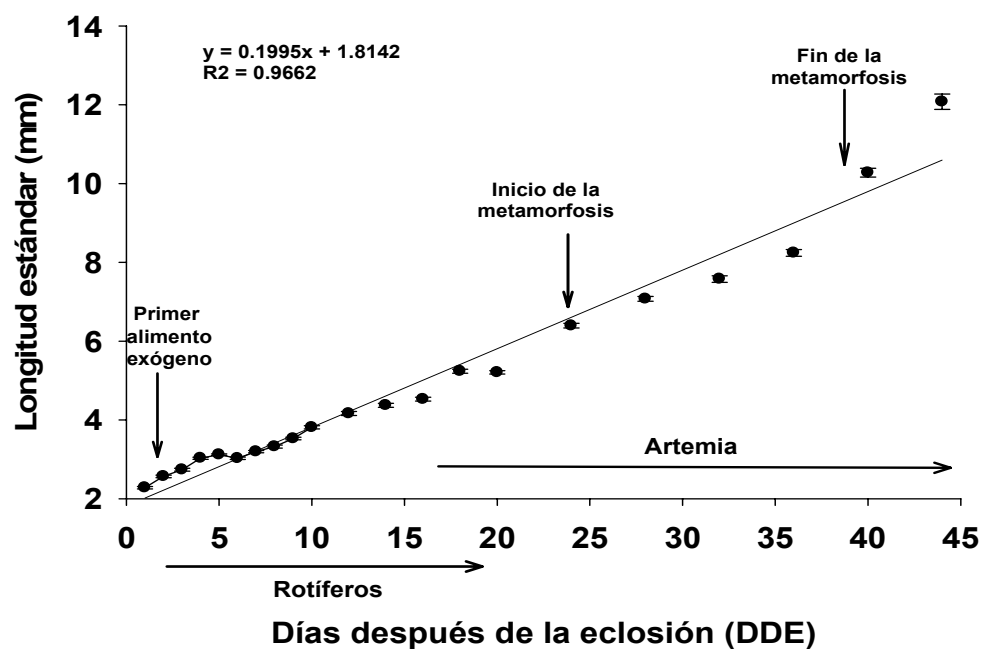


Figura 1. Crecimiento en términos de longitud estándar de *P. californicus* durante el periodo experimental. Media $\pm$ D.E. (n=30).

II.6.2 Histología

Entre el primer y segundo día después de la eclosión (DDE) (2.3 ± 0.17 mm LE) las larvas presentan una región bucofaríngea muy corta caracterizada por una capa de células planas; el intestino tubular se encuentra formado por un epitelio cilíndrico simple con núcleo basal, sostenido por una delgada capa de tejido conjuntivo. En esta etapa no se observan glándulas accesorias y la boca y el ano permanecen cerrados (Fig. 2).



Figura 2. Corte sagital de *P. californicus*, dos DDE. Intestino tubular (it), saco vitelino (s), ojo (o); H-E. Barra 300 μ m.

Entre los 3 y 4 DDE (2.7 ± 0.19 mm LE) intestino se divide en dos regiones, la zona anterior o prevalvular y la región posterior o postvalvular, esta

regionalización del intestino se identifica por la aparición de un ángulo de constricción en el último tercio del intestino (Fig. 3). A nivel histológico no se encontraron diferencias morfológicas entre las dos zonas, ambas presentan un epitelio columnar simple con núcleo basal y microvellosidades eosinófilas largas, paralelas, muy juntas formando un borde en cepillo; el epitelio descansa en una lámina propia formada de tejido conjuntivo, rodeada de una delgada serosa (Fig. 4). En este mismo período se ha reabsorbido casi por completo el saco vitelino, permaneciendo únicamente la gota de aceite (Fig. 3).



Figura 3. Imagen en vivo de *P. californicus*, 3 DDE. Zona prevalvular (pr), zona postvalvular (po), gota de aceite (*), ángulo de constricción (→).

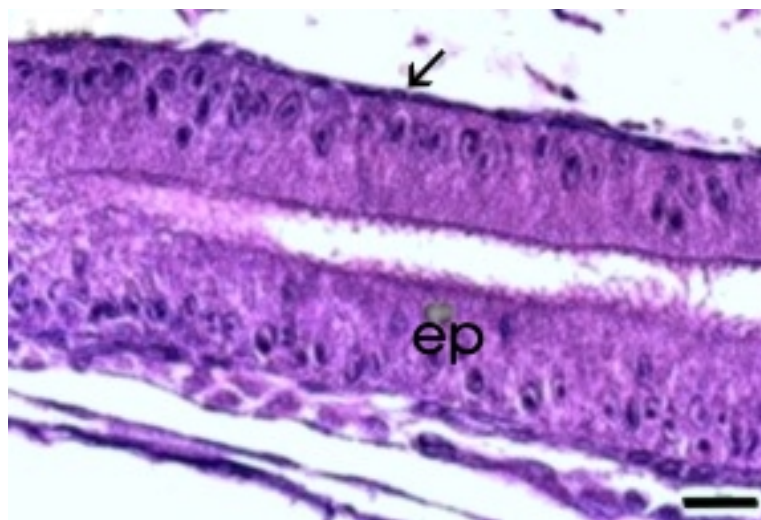


Figura 4. Corte sagital del intestino de *P. californicus*, 2 DDE. Epitelio cilíndrico con microvellosidades eosinófilas formando el borde en cepillo (ep), serosa (→); H-E. Barra 25 μ m.

En esta etapa el esófago se encuentra cubierto por un epitelio cúbico simple; el hígado y el páncreas se encuentran en fase de diferenciación comenzando a formar órganos compactos; aparentemente, estas glándulas se originan de dos grupos pequeños de células ubicados en la parte anterior del sistema digestivo, por detrás de la cavidad cardíaca. En el hígado aún no se observa un arreglo en particular de los hepatocitos, mientras que en el páncreas ya se identifican células acinares exocrinas, con numerosos gránulos de cimógeno (acidófilos) (Fig. 5).

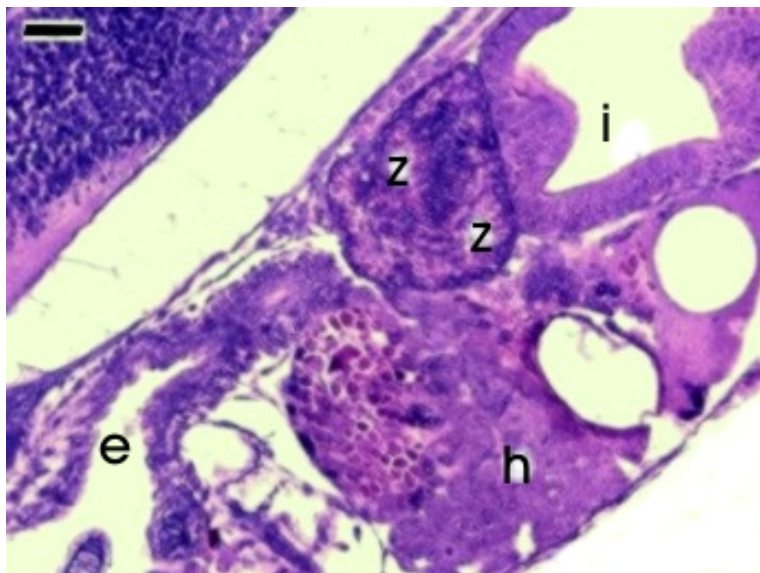


Figura 5. Corte sagital del hígado y páncreas de *P. californicus*, 3 DDE. Gránulos de zimógeno (z), esófago (e), hígado (h), intestino (i); H-E. Barra 50 μ m.

A los 6 DDE (3.0 ± 0.17 mm LE) en el esófago es claramente visible una diferenciación entre la parte anterior y la posterior, acentuada por una ligera constricción. La primera parte del esófago se caracteriza por un epitelio cúbico ciliado pseudoestratificado y abundantes células mucosas de forma globosa, la capa submucosa es ancha. El esófago posterior tiene una submucosa más delgada y en la mucosa el epitelio es cúbico simple ciliado, con escaso número de células mucosas (Fig. 6).

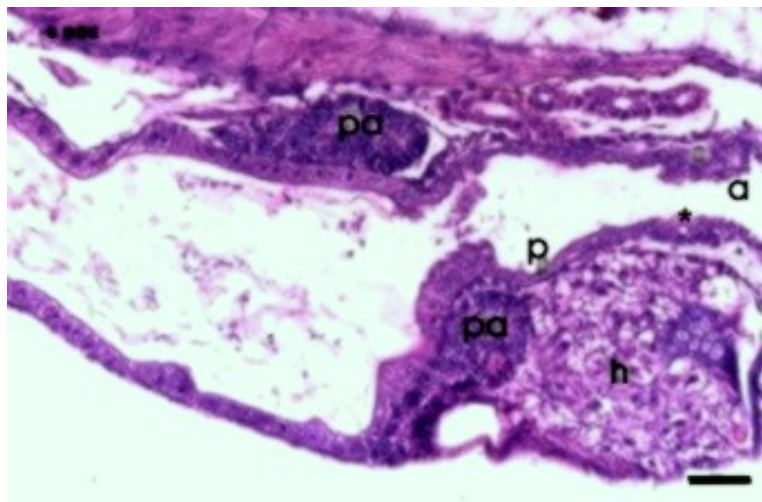


Figura 6. Corte sagital del esófago e intestino de *P. californicus*, 6 DDE. Esófago anterior (a), esófago posterior (p), células mucosas (*), páncreas (pa), hígado (h); H-E. Barra 50 μ m.

A partir de los 7 DDE (3.2 ± 0.16 mm LE) los sinusoides comienzan a penetrar entre los hepatocitos, los cuales se arreglan formando cordones a lo largo de los vasos. En este momento también se distinguiéndose el conducto biliar, el cual desemboca directamente al intestino anterior (Fig. 7A). Estas características sugieren que tanto el hígado como la vesícula biliar son funcionales. En esta etapa también se puede diferenciar en la región bucofaríngea, la formación de un primer folículo tiroideo, caracterizado por un epitelio plano recubriendo a una sustancia coloide (Fig. 7B).

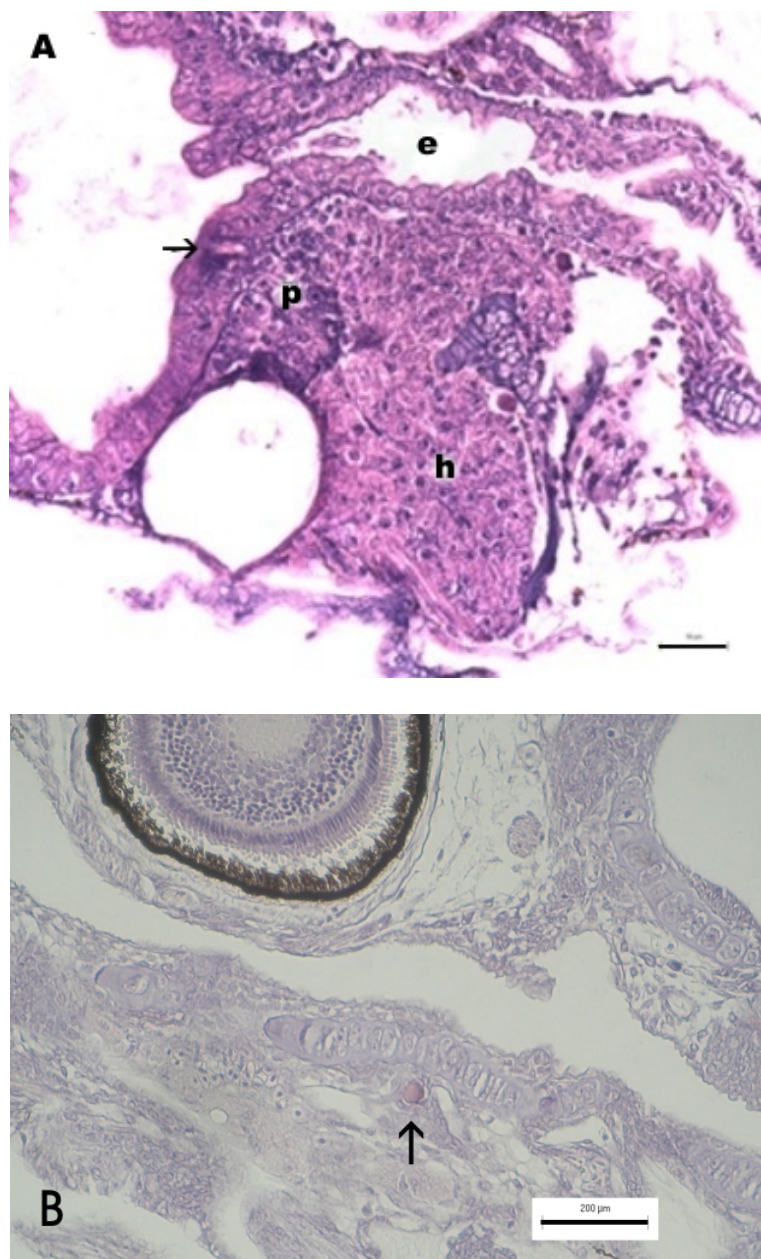


Figura 7. A) Corte sagital del hígado y páncreas de *P. californicus*, 7 DDE. Hepatocitos en cordón (h), conducto biliar (→), páncreas (p), esófago (e); H-E. Barra 100 μm. B) Corte sagital a nivel de la glándula tiroides (↑) de *P. californicus*, 7 DDE; H-E. Barra 200 μm.

Entre los 9 y 10 DDE (3.8 ± 0.22 mm LE) la mucosa del intestino comienza a formar pliegues en donde penetra tejido conjuntivo de la submucosa (Fig. 8). En este mismo período, en el páncreas se puede observar perfectamente un islote de Langerhans, caracterizado por la agrupación de células pequeñas, fusiformes, con citoplasma muy poco teñido. Estas estructuras se encuentran cubiertas por una cápsula fina (Fig. 9)

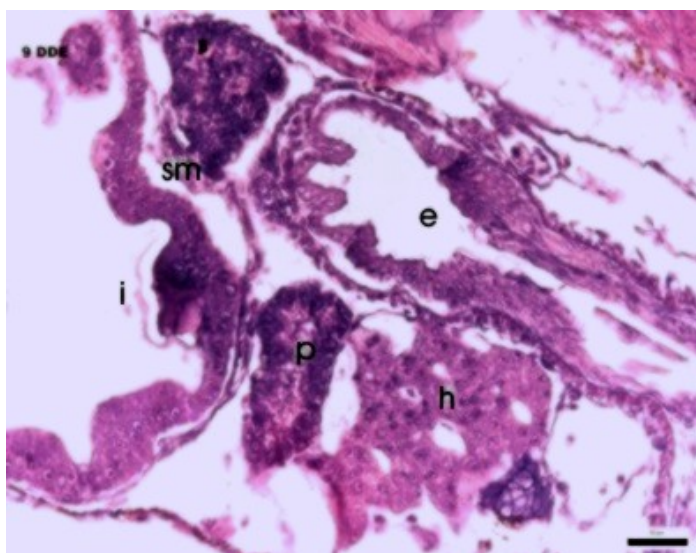


Figura 8. Corte sagital de *P. californicus*, 9 DDE. Intestino (i), submucosa (sm), páncreas (p), hígado (h), esófago (e); H-E. Barra 50 μ m.

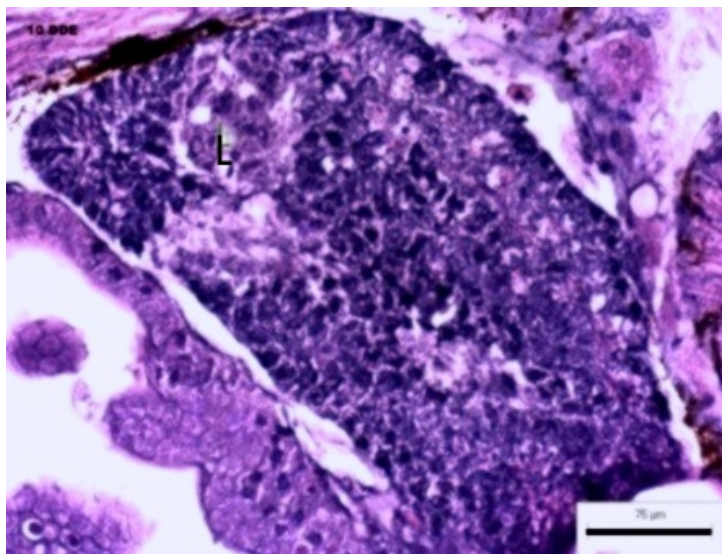


Figura 9. Corte sagital del páncreas de *P. californicus*, 10 DDE. Islote de Langerhans (L); H-E. Barra 75 μm.

A los 12 DDE se forma un asa intestinal y se inicia un reacomodo de los órganos internos (Fig. 10), posteriormente (14 DDE) (4.3 ± 0.27 mm LE) parte del páncreas es envuelto por el asa intestinal (Fig. 11).



Figura 10. Imagen en vivo de *P. californicus*, 13 DDE. Asa intestinal (→).

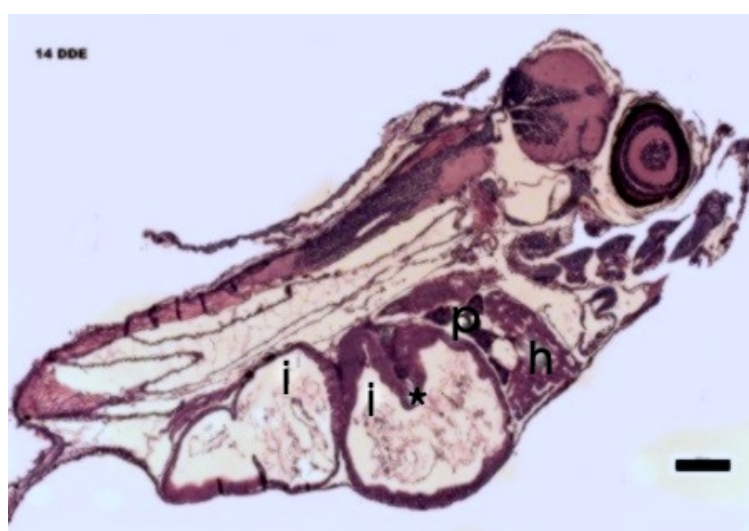


Figura 11. Corte sagital de *P. californicus*, 14 DDE. Asa intestinal (*), páncreas (p), hígado (h), intestino (i); H-E. Barra 200 μ m.

A los dieciséis DDE, la flexión de la notocorda puede ser observada en algunas larvas (Fig. 12). A nivel histológico, a los 18 DDE (5.2 ± 0.27 mm LE) destaca el aumento en número de vacuolas a lo largo del intestino (Fig. 13).

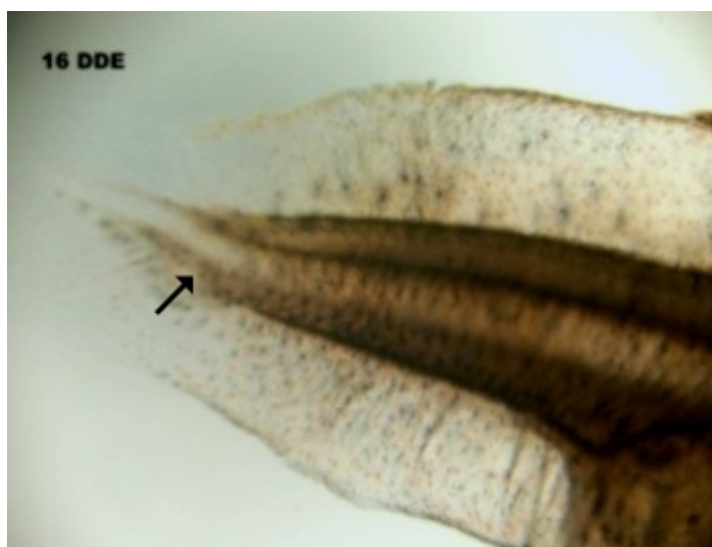


Figura 12. Imagen en vivo de *P. californicus* a los 16 DDE. Flexión de la notocorda (→).

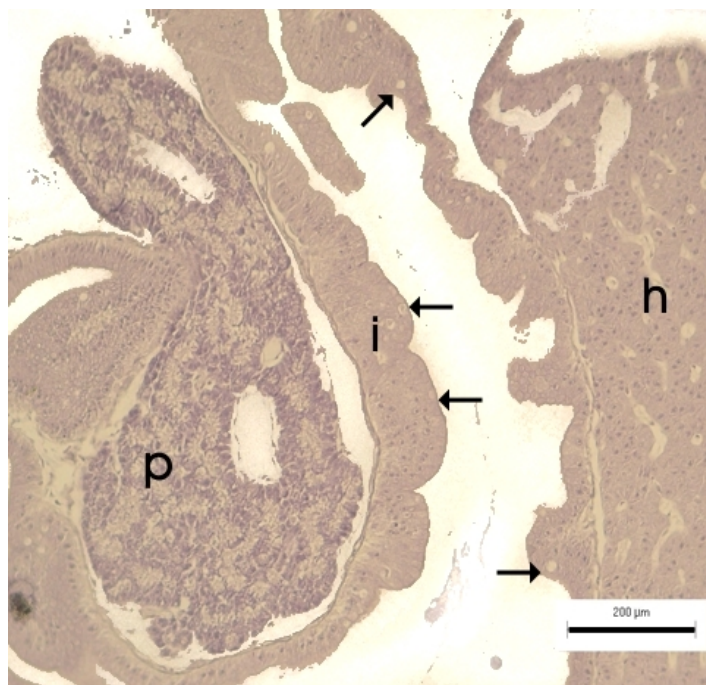


Figura 13. Corte sagital del sistema digestivo de *P. californicus*, 18 DDE. Vacuolas (→), intestino (i), páncreas (p), hígado (h); H-E. Barra 200 μm.

Entre los 24 y 28 DDE (6.4 ± 0.32 y 7.07 ± 0.06 mm LE) comienza la migración ocular y el asentamiento de las larvas. La gran mayoría de los organismos presentan la aleta caudal bien definida, también se observa una reorganización general de todos los órganos, propiciado por el cambio de simetría de los organismos. Treinta y dos DDE (7.5 ± 0.45 mm LE), en las larvas más grandes es posible observar en el intestino anterior, pequeños grupos de células cúbicas, justo por debajo del epitelio intestinal. Los dientes que empezaron a desarrollarse aproximadamente a los 24 DDE, se encuentran bien formados, así mismo, aumenta el número de corpúsculos gustativos (Fig. 14). En la región

bucofaríngea, todos los folículos tiroideos han acumulado una sustancia coloidea (Fig. 15).

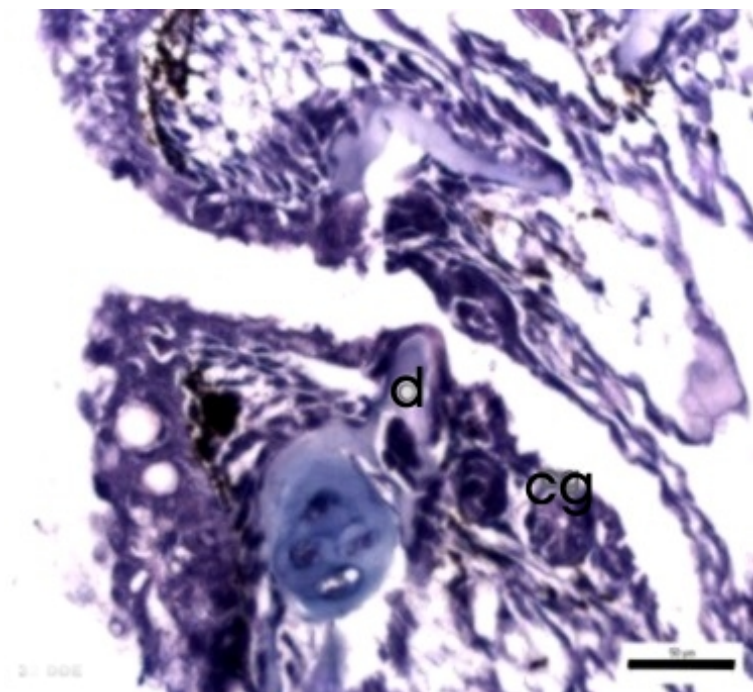


Figura 14. Corte sagital de la zona bucal de *P. californicus*, 32 DDE. Diente (d), corpúsculos gustativos (cg); H-E. Barra 50 µm.

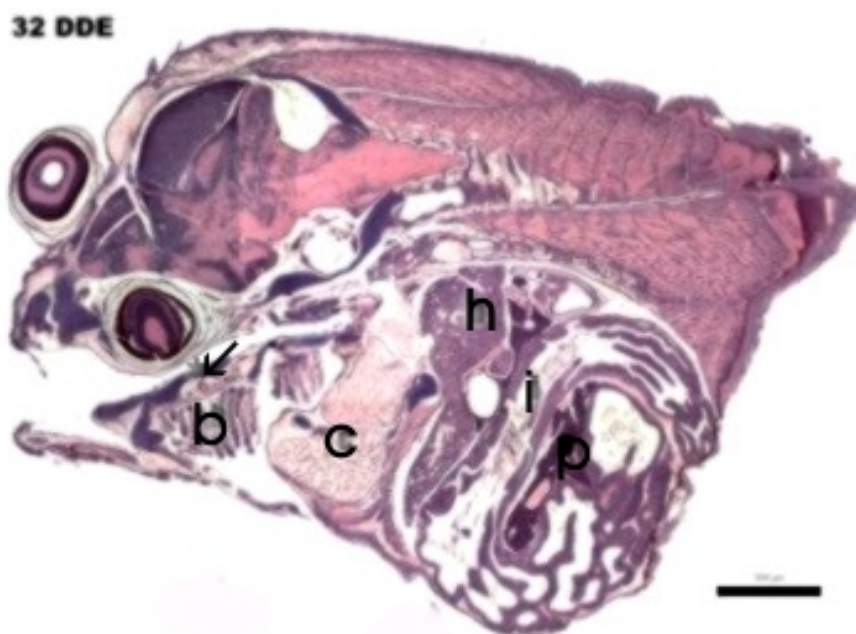


Figura 15. Corte sagital de *P. californicus*, 32 DDE. Glándula tiroides (→), intestino (i), hígado (h), branquias (b), corazón (c), páncreas (p); H-E. Barra 500 μ m.

Entre los 32 y 36 DDE comienza una diferenciación morfológica más pronunciada entre el intestino anterior y el posterior; en la primera parte se forman una serie de pliegues y comienza a incrementarse el grosor de la capa submucosa, la cual penetra en los pliegues; mientras que en el intestino posterior sólo se forman algunos pliegues de menor tamaño y la capa submucosa permanece más delgada (Fig. 16).

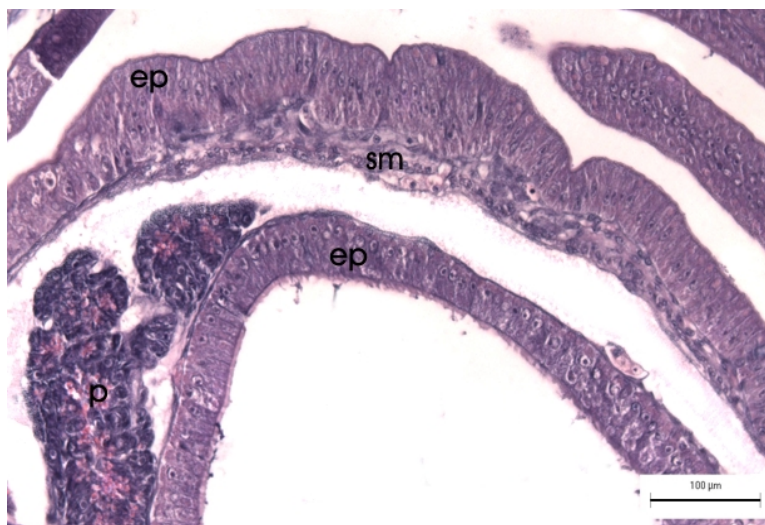


Figura 16. Corte sagital de *P. californicus*, 32 DDE. Epitelio (ep), submucosa (sm), páncreas (p); H-E. Barra 100 μ m.

El asentamiento de todas las larvas se completó entre los 36 y 40 DDE (8.2 ± 0.46 y 10.2 ± 0.62 mm LE, respectivamente). Así mismo, se inicia la diferenciación del estómago en todas las larvas, observándose en la región anterior del tubo digestivo las glándulas digestivas en desarrollo recubiertas de un epitelio cilíndrico ciliado, dentro de la lámina propia de la mucosa y una submucosa formada por una capa delgada de tejido conjuntivo (Fig. 17).

En el último día de muestreo, a los 44 DDE (12.07 ± 0.19 mm LE) la mayoría de las glándulas digestivas se encontraban bien definidas (Fig. 18) y claramente se distingue la diferenciación del estómago en tres regiones: la región cardiaca, caracterizada por una mucosa con epitelio columnar ciliado bajo; la región fúndica, en donde el epitelio se transforma a columnar ciliado alto, con

abundantes células mucosas y las glándulas gástricas en desarrollo, rodeadas de tejido conjuntivo y la región pilórica, donde el epitelio cilíndrico o columnar ciliado se acorta y no se observan glándulas gástricas. La mucosa del estómago se asienta en una capa submucosa formada de tejido conjuntivo, seguida de delgadas fibras musculares circulares y una capa serosa muy delgada (Fig. 19).

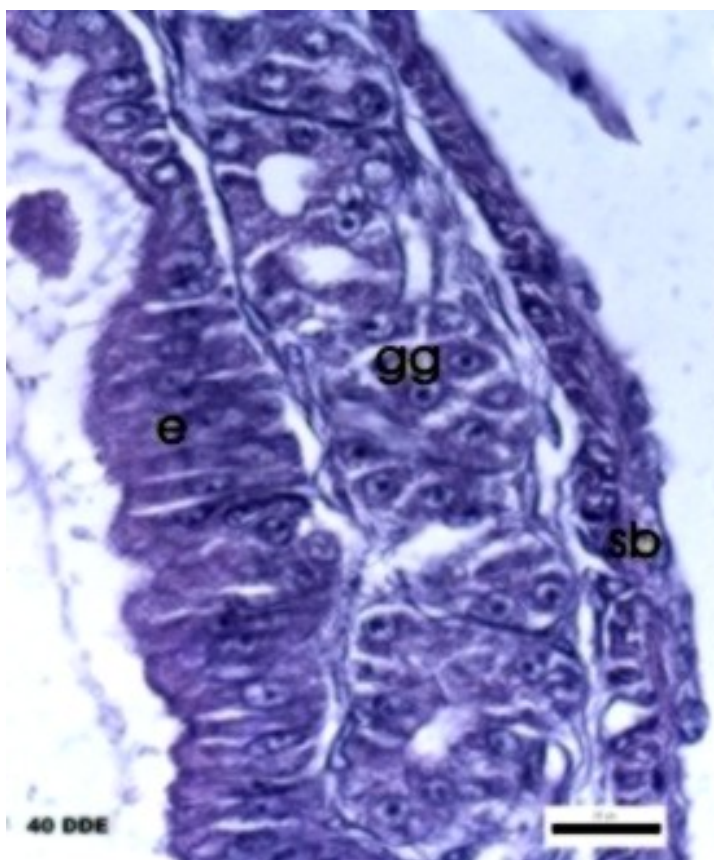


Figura 17. Corte sagital del estómago de *P. californicus*, 40 DDE. Esbozos de las glándulas gástricas (gg), epitelio cilíndrico ciliado (e), submucosa (sb); H-E. Barra 25 μ m.

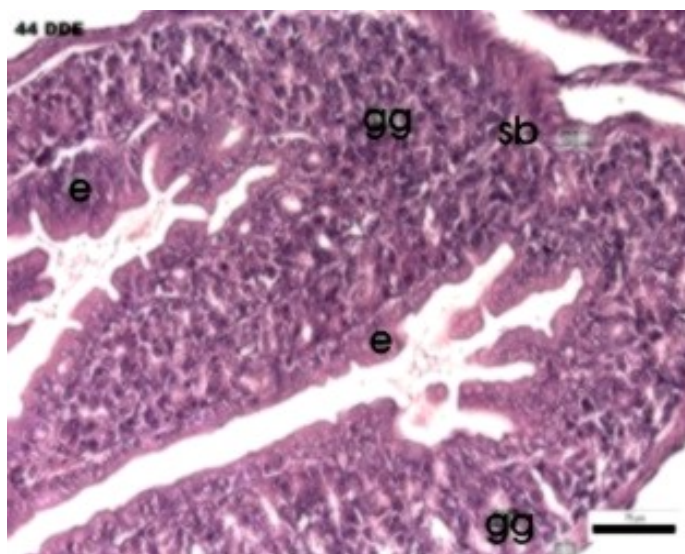


Figura 18. Corte sagital de la región fúndica del estómago de *P. californicus*, 44 DDE. Glándulas gástricas (gg), epitelio (e), submucosa (sb); H-E. 25 μ m.

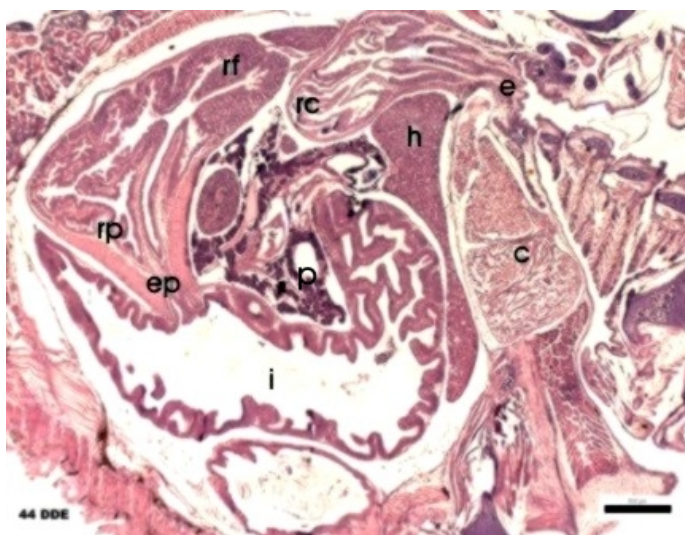


Figura 19. Corte sagital del estómago de *P. californicus*, 44 DDE. Región cardiaca (rc), región fúndica (rf), región pilórica (rp), hígado (h), páncreas (p), corazón (c), esófago (e), intestino (i), esfínter pilórico (ep); H-E. Barra 100 μ m.

II.6.3 Actividad enzimática

La actividad enzimática de las larvas se cuantificó empleando bioensayos específicos para la detección de endoproteasas y exoproteasas. En el caso de la tripsina, la actividad total de la enzima pudo detectarse un DDE (5.25 ± 1.37 U/larva) y se incrementó de manera constante conforme las larvas se desarrollaron, hasta alcanzar su punto máximo (49.76 ± 11.52 U/larva) 36 DDE, descendiendo un poco hacia el final del experimento (41.70 ± 7.36 U/larva) (Fig. 20A).

Al evaluar la actividad específica de la tripsina se observó gran actividad un DDE (8.92 U/ μ g P), presentando dos picos máximos a los 5 y 8 DDE (10.97 y 11.97 U/ μ g P, respectivamente). Posteriormente, la actividad descendió progresivamente presentando dos ligeros incrementos, el primero a los 14 DDE (5.10 U/ μ g P) y el segundo a los 20 DDE (7.18 U/ μ g P), fecha en la que se sustituyó por completo el suministro de rotíferos por nauplios recién eclosionados de *Artemia*. Veinticuatro DDE la actividad de la tripsina tiende a descender, alcanzando su valor mínimo (0.51 U/ μ g P) al final de la experimentación (44 DDE) (Fig. 20B).

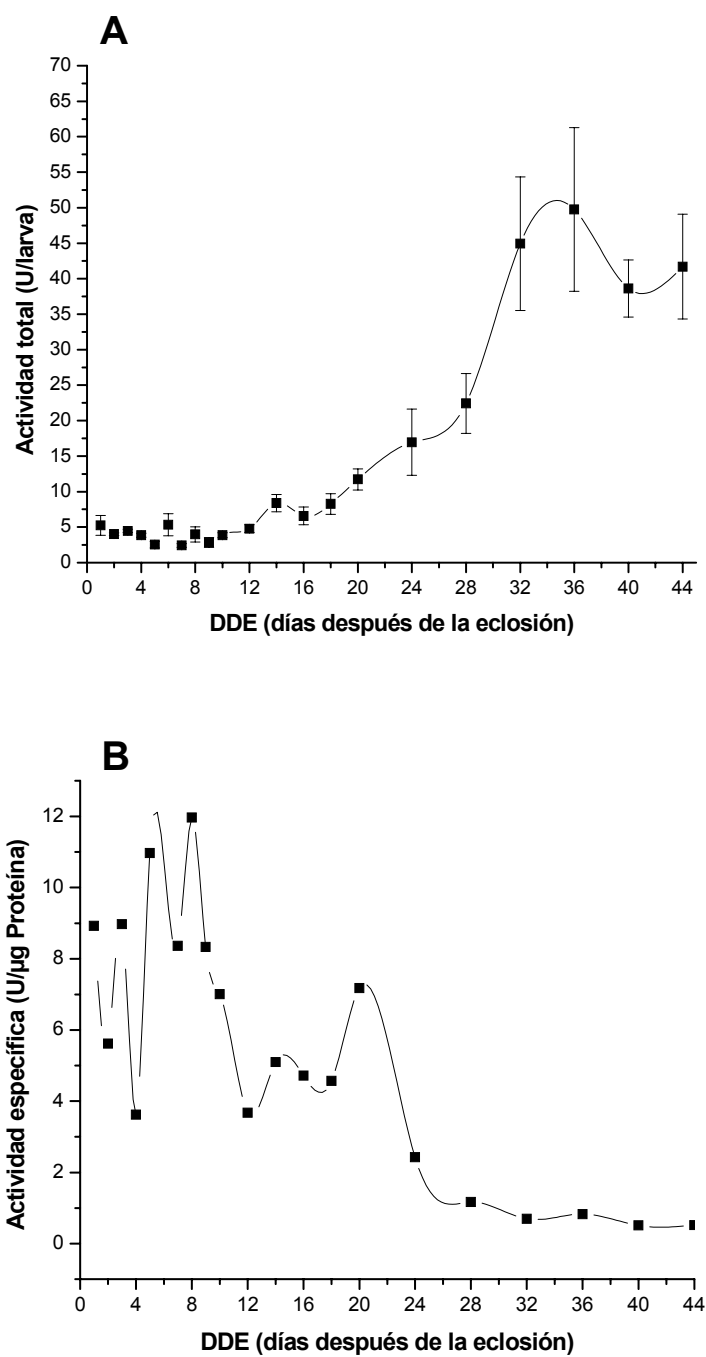


Figura 20. A) Actividad total de tripsina, B) Actividad específica de tripsina, durante el desarrollo de *P. californicus*. Media $\pm$ D.E. (n=3).

La actividad total de leucina aminopeptidasa, al igual que la de la tripsina, se detectó un DDE (0.63 ± 0.07 U/larva). Se registró un aumento gradual de la actividad de esta enzima durante los primeros días de desarrollo. Posteriormente, se observó un incremento de manera más pronunciada a los 20 DDE (2.29 ± 0.13 U/larva), con un ligero descenso 36 DDE (11.62 ± 0.20 U/larva) y finalmente un aumento hacia el final de la metamorfosis (Fig. 21A).

La actividad específica de la leucina-aminopeptidasa alcanzó su punto máximo 7 DDE (2176.44 U/mg P). Posterior a esta fecha se observó un descenso abrupto, con dos picos de gran actividad 14 y 20 DDE (1209.79 y 1403.18 U/mg P respectivamente) (Fig. 21B).

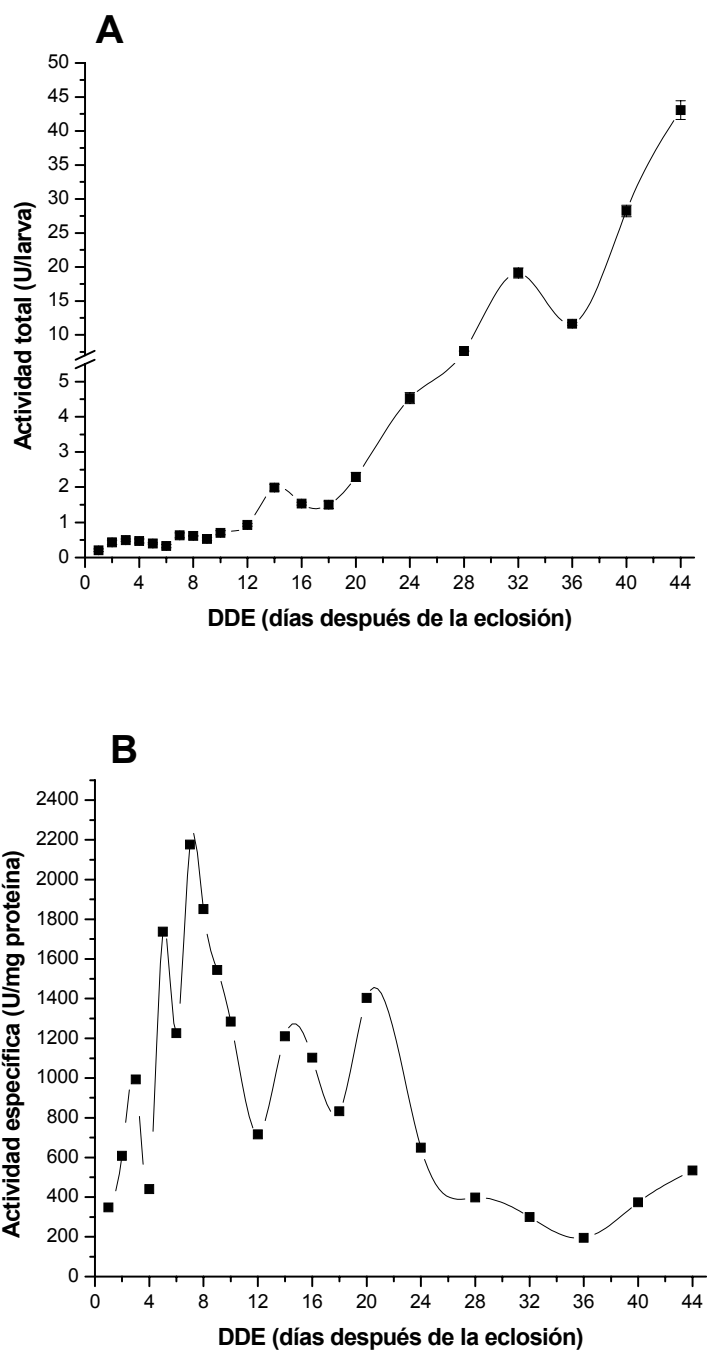


Figura 21. A) Actividad total de leucina aminopeptidasa, B) Actividad específica de leucina-aminopeptidasa, durante el desarrollo de *P. californicus*. Media $\pm$ D.E. (n=3).

La actividad proteolítica ácida total y la específica fueron detectadas 40 DDE (4.50 ± 1.09 U/larva y 59.48 U/mg P respectivamente), coincidiendo con el desarrollo casi completo de las glándulas gástricas (Figs. 22 A y B).

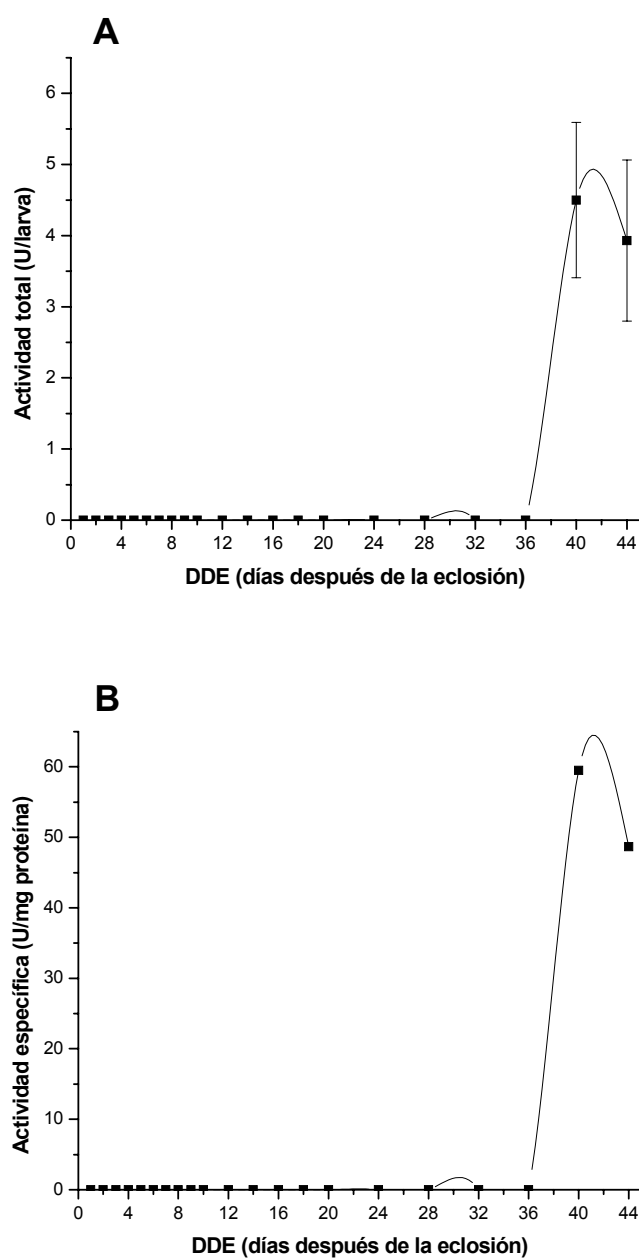


Figura 22. A) Actividad proteolítica ácida total, B) Actividad proteolítica ácida específica, durante el desarrollo de *P. californicus*. Media $\pm$ D.E. (n=3).

La actividad proteolítica alcalina no pudo ser cuantificada adecuadamente en los homogenizados del sistema digestivo de las larvas. Es posible que la técnica empleada, no fuera lo suficientemente sensible para detectar este tipo de actividad en larvas tan pequeñas, ya que los controles con enzimas comerciales si presentaron actividad.

II.6.4 Histoquímica

II.6.4.1 Fosfatasa alcalina

Seis DDE fue posible detectar la actividad de la fosfatasa alcalina a lo largo del epitelio intestinal. No se observaron diferencias a nivel morfológico o en la actividad de la enzima, entre la parte anterior y la posterior del intestino hasta los 6 DDE (Figs. 23 A y B).

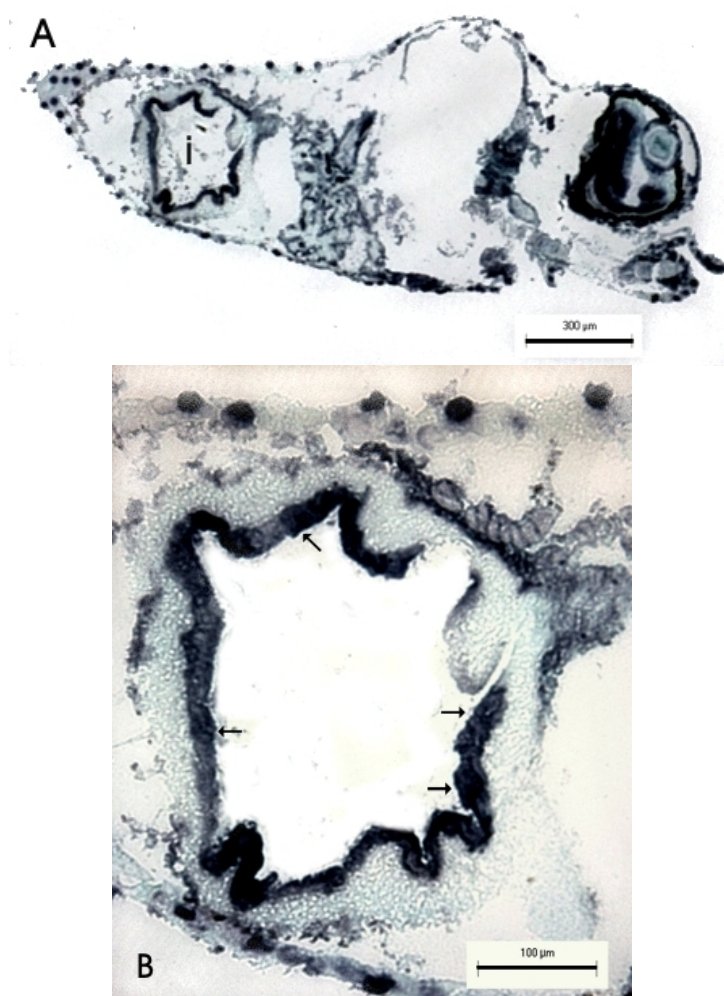


Figura 23. Fosfatasa alcalina en cortes sagitales de *P. californicus* a los 6 DDE. A) Intestino (i); Fast green. Barra 300 µm. B) Fosfatasa alcalina en el epitelio de los enterocitos (→); Fast green. Barra 100 µm.

El análisis de la actividad enzimática por densidad óptica reveló que en el intestino anterior la actividad de la fosfatasa alcalina se mantiene con valores casi constantes a lo largo del desarrollo, a excepción de 11 DDE, fecha en la cual se obtuvo el valor más alto de actividad y 26 DDE en donde se alcanza el valor mínimo. A partir de esta fecha se observó un incremento lineal de la actividad, alcanzando niveles altos a los 46 DDE (Fig. 24). En el intestino posterior se observa un fuerte aumento en la actividad 21 DDE, manteniéndose en niveles altos durante todo el periodo previo a la metamorfosis y durante las primeras etapas de la misma, descendiendo de manera abrupta a los niveles más bajos observados 36 DDE, coincidiendo con el inicio de la regionalización del estómago (Fig. 24).

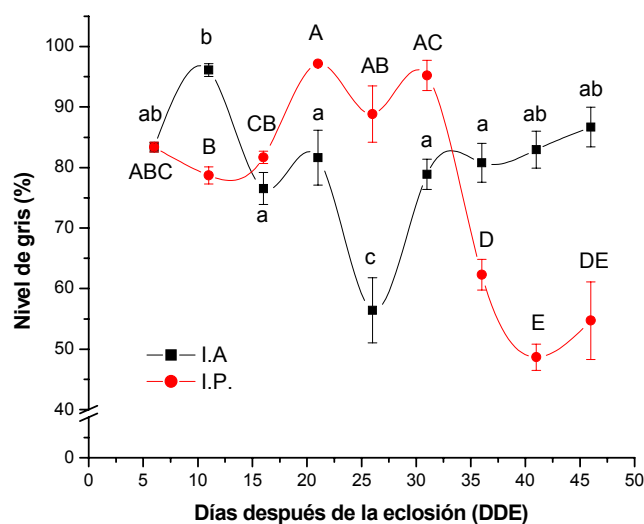


Figura 24. Actividad de la fosfatasa alcalina en el intestino de *P. californicus*, durante su desarrollo larvario. Media $\pm$ D.E. (n=3). Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre los DDE en el intestino anterior (IA). Letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas entre los DDE en el intestino posterior (IP).

A los 11 DDE es posible distinguir una primera regionalización del intestino en la mayoría de los organismos, considerando el nivel de actividad de la enzima. Se observa un incremento en el intestino posterior (Figs. 25 A y B). Es en este período cuando se observa uno de los primeros grandes cambios a nivel morfológico que es la formación de una primera asa intestinal.

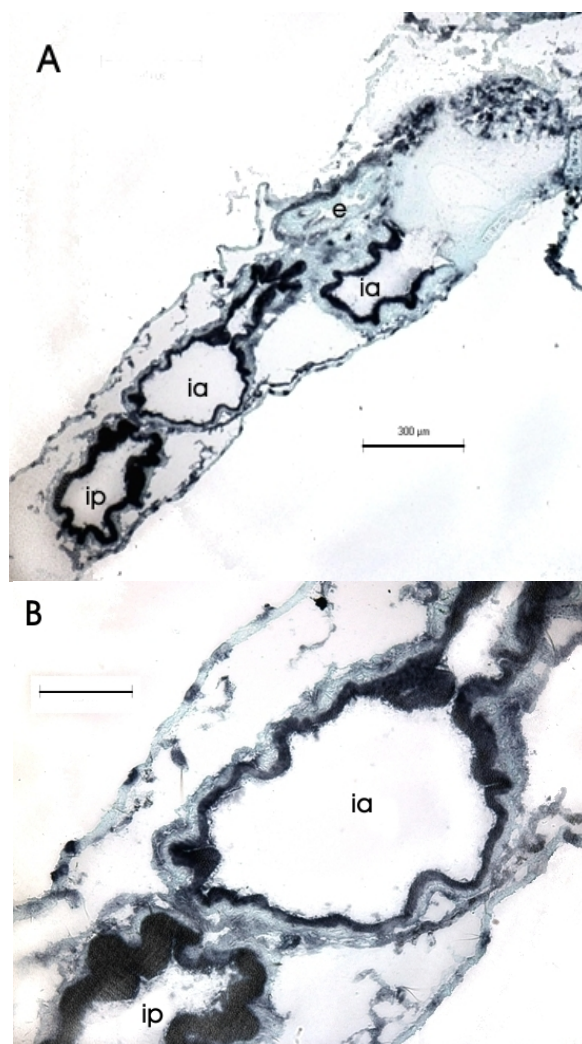


Figura 25. Fosfatasa alcalina en cortes sagitales de *P. californicus* a los 11 DDE. A) Fast green. Barra 300 µm. B) Fast green. Barra 100 µm. Intestino anterior (ia), intestino posterior (ip) esófago (e).

Entre los 21 y 31 DDE el nivel de actividad de la fosfatasa alcalina se mantiene prácticamente sin cambios notorios en ambas zonas. Sin embargo, es en este período cuando comienza a incrementarse la superficie de absorción en la parte anterior del intestino, caracterizada por el plegamiento de la mucosa y la submucosa (Fig. 26).

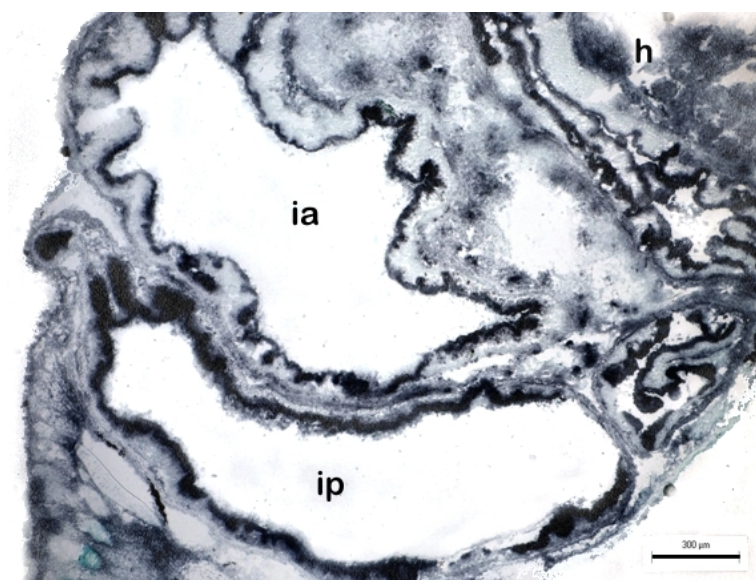


Figura 26. Fosfatasa alcalina en cortes sagitales de *P. californicus* a los 31 DDE. Intestino anterior (ia), intestino posterior (ip), hígado (h); Fast green. Barra 300 μm.

Aproximadamente a los 36 DDE, el estómago se encuentra parcialmente diferenciado en sus tres regiones y es posible apreciar la actividad de la fosfatasa alcalina en las células de las glándulas gástricas en desarrollo, así como en la membrana basal y en la capa submucosa. En este momento puede apreciarse

que la actividad de la fosfatasa se concentra en la parte anterior del intestino, manteniendo esta distribución hasta los 46 DDE (Fig. 27).

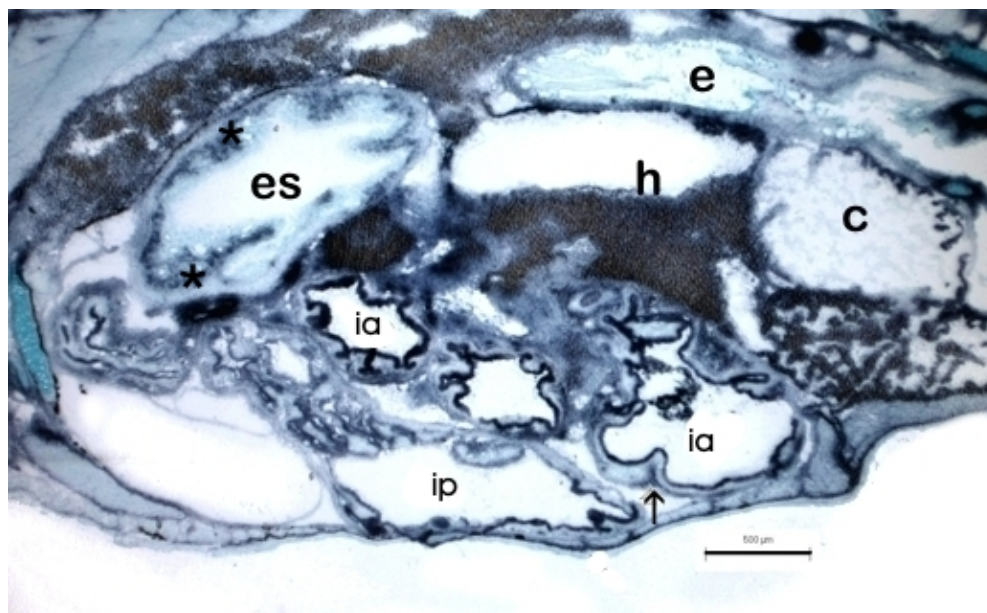


Figura 27. Fosfatasa alcalina en cortes sagitales de *P. californicus* a los 36 DDE. Intestino anterior (ia), intestino posterior (ip), esófago (e), estómago (es), hígado (h), corazón (c), glándulas gástricas (*), submucosa (↑); Fast green. Barra 500 μm.

A los 41 DDE el estómago se encuentra prácticamente formado, incrementándose un poco la actividad de la enzima en las células glandulares gástricas y la submucosa. A los 46 DDE es posible apreciar actividad de esta fosfatasa a nivel de la delgada capa muscular circular (Figs. 28 A y B).

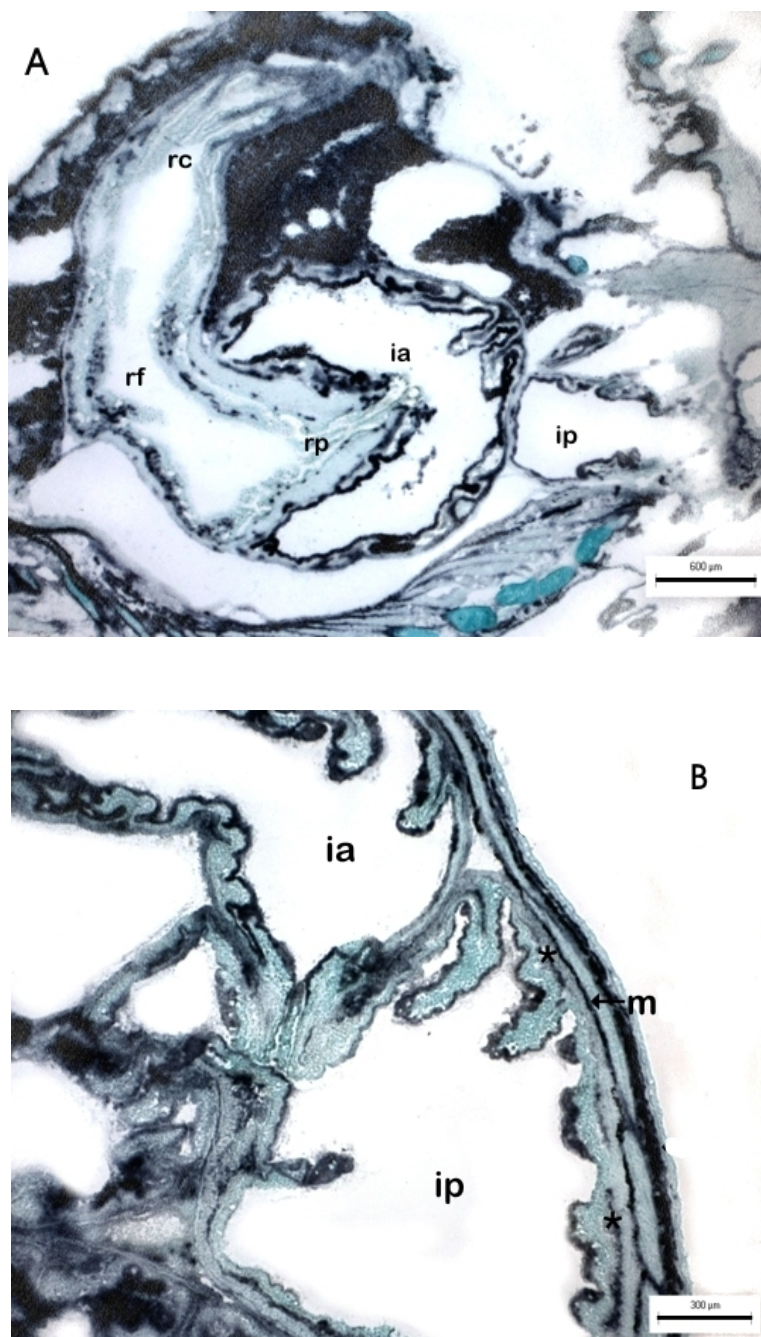


Figura 28. Fosfatasa alcalina en cortes sagitales de *P. californicus*. A) Cuarenta y un DDE. Fast green. Barra 600 µm. B) Cuarenta y seis DDE. Fast green. Barra 300 µm. Intestino anterior (ia), intestino posterior (ip), región cardiaca (rc), región fúndica (rf), región pilórica (rp), capa muscular (m), membrana basal (*).

II.6.4.2 Fosfatasa ácida

La actividad de la fosfatasa ácida pudo ser detectada un DDE, observándose una distribución uniforme alrededor del saco vitelino (Fig. 29 A). En los primeros días de desarrollo larvario, la actividad de esta enzima puede apreciarse a lo largo del epitelio intestinal, dispuesta de manera perinuclear en los enterocitos (Fig. 29 B).

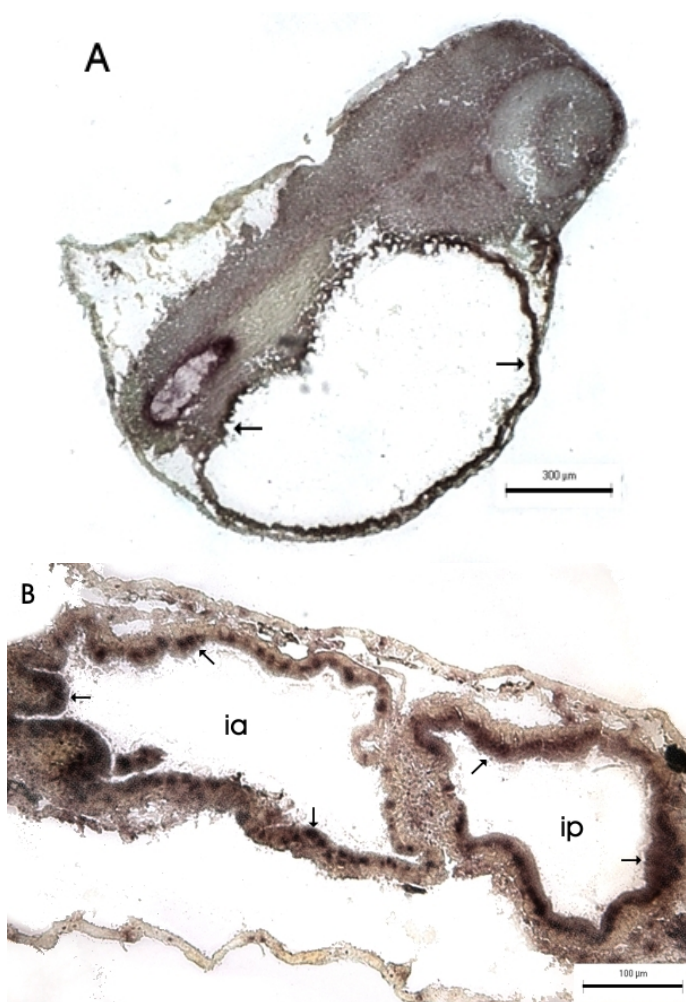


Figura 29. Fosfatasa ácida en cortes sagitales de *P. californicus*. A) Un día después de la eclosión. Actividad enzimática en el saco vitelino (→); Fast green. Barra 300 µm. B) Once DDE. Intestino anterior (ia), intestino posterior (ip), actividad enzimática (→); Fast green. Barra 100 µm.

La evaluación de la actividad por densidad óptica mostró que esta enzima presenta su valor más bajo a los 6 DDE, con un aumento pronunciado a los 11 DDE en ambas regiones intestinales, período después del cual la actividad vuelve a disminuir. Aunque la actividad de esta enzima tiende a aumentar durante el desarrollo larvario, a los 26 DDE se puede observar una regionalización intestinal, registrándose una mayor actividad en el intestino anterior (Fig. 30).

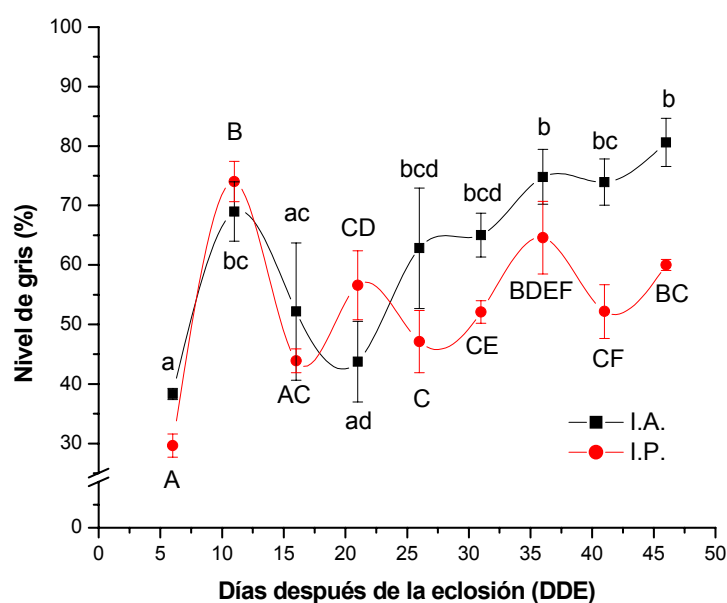


Figura 30. Actividad de la fosfatasa ácida en el intestino de *P. californicus*, durante su desarrollo larvario. Media $\pm$ D.E. (n=3). Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre DDE en el intestino anterior (IA). Letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas entre DDE en el intestino posterior (IP).

A los 26 DDE, la actividad de la fosfatasa ácida se concentró en la parte anterior del intestino, disminuyendo en el intestino anterior y desapareciendo en la parte posterior del esófago (Fig. 31). Posteriormente, se registró este mismo patrón de distribución sin cambios hasta los 46 DDE (Figs. 32 y 33).

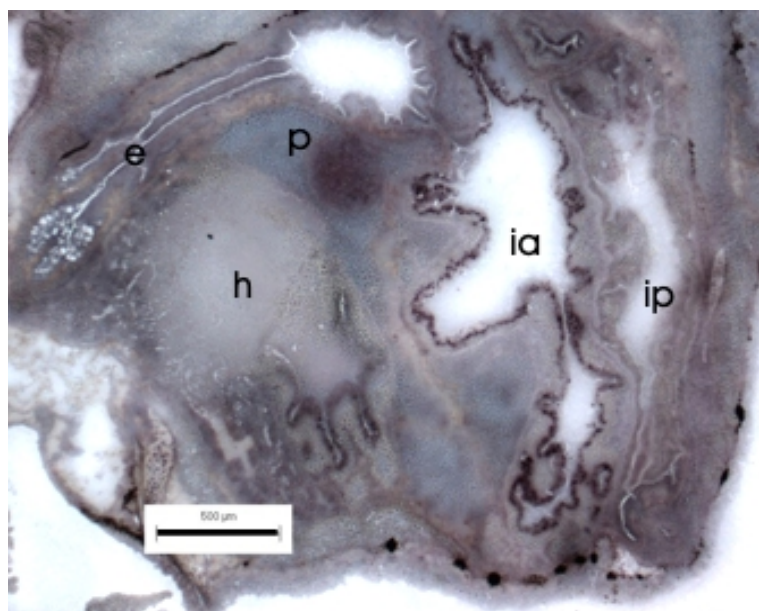


Figura 31. Fosfatasa ácida en cortes sagitales de *P. californicus* a los 26 DDE. Intestino anterior (ia), intestino posterior (ip), hígado (h), páncreas (p), esófago (e); Fast green. Barra 500 μm.

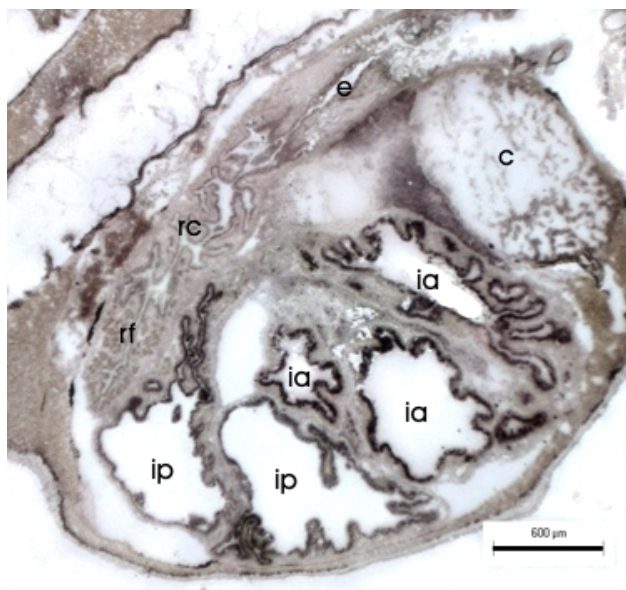


Figura 32. Fosfatasa ácida en cortes sagitales de *P. californicus* a los 36 DDE. Intestino anterior (ia), intestino posterior (ip), corazón (c), región cardiaca (rc), región fúndica (rf), esófago (e); Fast green. Barra 600 μm.

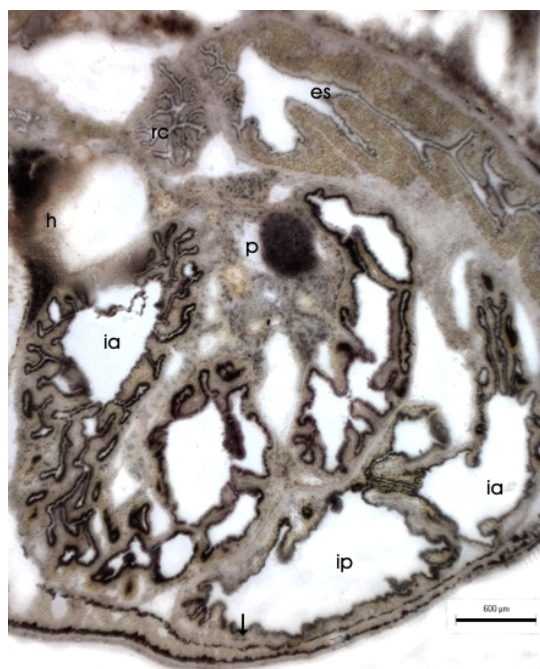


Figura 33. Fosfatasa ácida en cortes sagitales de *P. californicus* a los 46 DDE. Intestino anterior (ia), intestino posterior (ip), región cardiaca (rc), estómago (es), páncreas (p), hígado (h), submucosa (↓); Fast green. Barra 600 μm.

II.7 Discusión

El crecimiento en la longitud estándar (LE) de las larvas de *P. californicus*, al igual que el crecimiento descrito por Gisbert et al. (2002), se relaciona linealmente con la edad ($LE = 0.1996 \text{ DDE} + 1.8142$, $r^2 = 0.966$). Durante el desarrollo larvario, la morfología interna se modifica, observándose los cambios más drásticos durante el proceso de la metamorfosis. Etapa en la cual, además de presentarse un reacomodo general de los órganos internos, la morfología a nivel histológico también tiene grandes cambios. En estudios realizados con el lenguado del Senegal (*S. senegalensis*), Fernández-Díaz et al. (2001) observaron que la longitud en las larvas se correlaciona mejor con el estado de desarrollo ontogenético, en comparación con el peso, debido a que el crecimiento y por lo tanto el tamaño de las larvas, dependen de las condiciones del cultivo.

Tomando como base la ontogenia del sistema digestivo, se pueden definir tres estadios de desarrollo: 1) crecimiento y regionalización del intestino a partir de un órgano primordial en forma de tubo, 2) formación y crecimiento de las glándulas anexas al tubo digestivo, y 3) desarrollo de las glándulas gástricas y la formación de un estómago funcional, también regionalizado (Zacarias-Soto et al. 2006). Estos eventos son similares a los reportados para la misma especie por Gisbert et al. (2004), así como para otras especies (Zambonino-Infante y Cahu, 2001). Las larvas recién eclosionadas del lenguado de California miden en promedio 2.2 mm (LE), presentan un sistema digestivo indiferenciado y el saco vitelino con una a dos gotas de aceite en su porción posterior. Este grado de inmadurez del tracto digestivo al momento de la eclosión es típico de las larvas de peces marinos y se

ha descrito para otras especies, como el lenguado del verano, *Paralichthys dentatus* (Bisbal y Bengtson, 1995), el rodaballo, *Scophthalmus maximus* (Al-Maghazachi y Gibson, 1984), el esturión siberiano, *Acipenser baeri* (Gisbert et al. 1998), la anguila japonesa, *Anguilla japonica* (Kurokawa et al. 1995), la perca, *Leiotomus xanthurus* (Govoni, 1980), la dorada, *Sparus aurata* (Sarasquete et al. 1995), el sabalote, *Chanos chanos* (Ferraris et al. 1987), la platija amarilla, *Pleuronectes ferruginea* (Baglole et al. 1997), el lenguado senegalés, *Solea senegalensis* (Ribeiro et al. 1999b) y el eglefino, *Melanogrammus aeglefinus* (Hamlin et al. 2000). La ausencia de un estómago funcional en las primeras etapas de desarrollo, limita la disponibilidad de aminoácidos contenidos en muchas de las fuentes proteicas provenientes del alimento (Verret et al. 1992). A nivel histológico se observó que las larvas a los 3 DDE ya tienen el hígado diferenciado y con un mayor grado de desarrollo en comparación con otros órganos. De la misma manera, a esa edad, el páncreas exócrino ya presenta células acinares basófilas y abundantes gránulos de zimógeno lo que indica la producción de precursores de enzimas (Govoni, 1980).

En cuanto a la actividad de las enzimas digestivas, numerosos estudios realizados en la etapa larvaria de diferentes especies revelan que al inicio del desarrollo la actividad es muy baja, incrementando sus niveles progresivamente con la edad, niveles que pueden modificarse debido a los cambios morfológicos asociados con la maduración de tracto digestivo, así como por los cambios en la alimentación durante el desarrollo (Alarcón López, 1997).

Kim et al. (2001) sugieren que las diferencias en la actividad específica enzimática al momento de consumir el primer alimento, son especie-dependiente y pueden ser el resultado de diferencias en la utilización del vitelo. Al momento de la eclosión, el páncreas es el único órgano responsable de la secreción de enzimas digestivas, siendo la tripsina una de las enzimas más importantes en esta etapa, dado su importante papel en la activación de otras proteasas alcalinas (Hjelmeland y Jorgensen, 1985). Por lo que los altos picos en la actividad de la tripsina, indican un incremento en la funcionalidad del páncreas (Gawlicka et al. 2000).

En las larvas de *P. olivaceus*, Kurokawa y Suzuki (1996) observaron la secreción de tripsinógeno antes del primer alimento, lo que sugiere que hay una secreción basal de enzimas digestivas desde el páncreas. Este tipo de comportamiento se ve reflejado en los resultados obtenidos en este trabajo, en donde la actividad específica de la tripsina es alta al momento de la eclosión (8.92 U/ μ g P), y posteriormente desciende entre el tercer y cuarto DDE e incrementa nuevamente su actividad a los 5 DDE, llegando a un punto máximo a los 8 DDE (11.97.1 U/ μ g P), para decrecer con el desarrollo, excepto por un pico de actividad a los 20 DDE (7.18 U/ μ g P). Este comportamiento también se ha observado en *S. senegalensis* y se ha interpretado como un indicador de grandes cambios metabólicos, posteriores a la reabsorción del saco vitelino, principalmente por el incremento en el depósito de proteína para el crecimiento (Ribeiro et al. 1999b). Este proceso también se ha registrado para la corvina japonesa (*Pseudosciaena crocea*), en donde la actividad específica de la tripsina y de la amilasa son muy altas las dos primeras semanas de desarrollo y declinan posteriormente. Este

decremento en la actividad específica se explica por el incremento de la proteína corporal y no necesariamente significa un descenso en la capacidad digestiva (Ma et al. 2005). Mientras que el pico de actividad registrado a los 8 DDE podría reflejar procesos intrínsecos del desarrollo, el pico de actividad específica a los 20 DDE se puede asociar al efecto causado por el cambio de alimentación de las larvas, es decir la sustitución progresiva de los rotíferos por nauplios de *Artemia*. Ferron y Leggett (1994) señalan que las enzimas proteolíticas pueden ser afectadas fuertemente por el alimento exógeno, por lo que en corto plazo su actividad podría ser indicativa del estatus alimenticio de las larvas.

La presencia de tripsina y quimotripsina durante las primeras etapas del desarrollo larvario sugiere que estas enzimas contribuyen a la digestión de las proteínas, compensando en parte la ausencia de la digestión ácida antes del desarrollo del estómago (Applebaum y Holt, 2003).

La actividad específica de la leucina-aminopeptidasa presentó un patrón muy parecido al de la tripsina, a excepción de que la actividad de esta enzima es baja los primeros 4 días de desarrollo. También se observó un incremento en la actividad durante el cambio de dieta, de rotíferos a *Artemia*; posteriormente, la actividad tiende a descender con el desarrollo de las larvas. En la especie *D. sargus*, Cara et al. (2003) observaron, al igual que en *P. californicus*, un pico en la actividad específica de la leucina-aminopeptidasa durante el período de alimentación con *Artemia*. Este pico en la actividad específica puede ser atribuido al desarrollo temprano de las glándulas gástricas, ya que la iniciación de la digestión ácida, por la acción de la pepsina, provoca un incremento en la cantidad

de sustratos accesibles para otras enzimas que digieren polipéptidos a péptidos más pequeños y aminoácidos libres, para una adecuada asimilación por los enterocitos.

Las actividades específicas de tripsina y leucina-aminopeptidasa se presentaron un DDE, antes de la apertura de la boca, lo que sugiere una pre-programación genética de su actividad y no una actividad inducida por la ingesta del primer alimento (Ribeiro et al. 1999b; Lazo et al. 2000a y Zambonino-Infante y Cahu, 2001). De la misma manera se ha reportado en otros peces la presencia de enzimas con alto nivel de actividad durante los primeros días de desarrollo, como la amilasa en *D. sargus*, (Cara et al. 2003) y la quimotripsina en la corvina ocelada (*Sciaenops ocellatus*) (Applebaum et al. 2001) a las cuales también se les atribuye una expresión genética programada.

La ausencia de pepsina durante los primeros días de desarrollo en especies que aún no han formado un estómago verdadero se compensa con la actividad micropinocítica y la digestión intracelular de proteínas realizada por peptidasas citosólicas en el intestino posterior, procesos en los cuales participan activamente la leucina-alanina peptidasa y la fosfatasa ácida (Govoni, 1980; Gawlicka et al. 1985; Zambonino-Infante y Cahu, 2001 y Cara et al. 2003), enzimas que van decreciendo en actividad conforme se desarrolla el organismo y se forma el estómago. En las larvas del lenguado de California, la actividad proteolítica ácida no pudo ser detectada hasta la formación del estómago funcional, mientras que la actividad de la fosfatasa ácida se mantiene constante en ambas zonas del intestino, una vez que se inicia el proceso de la metamorfosis. Esto indicaría un

cambio sustancial en la capacidad fisiológica de las larvas, asociada con cambios anatómicos y funcionales (e.g. enzimáticos) (Govoni, 2004).

La actividad proteolítica ácida tiene un desarrollo sincrónico con la formación del estómago. La diferenciación de éste órgano se detectó por primera vez a los 32 DDE (7.57 ± 0.08 mm LE) y se caracterizó por la aparición de pequeños grupos de células cúbicas que forman los primordios glandulares en la mucosa en la región anterior del intestino. La formación completa del estómago ocurre relativamente rápido, ya que a los 44 DDE se observan las glándulas gástricas completamente bien desarrolladas y la regionalización de estómago en 3 zonas perfectamente distinguibles por sus características morfológicas (región cardiaca, región fúndica y región pilórica. Esta morfología concuerda con la descrita para el estómago de otras especies de peces (Tanaka, 1973; Bisbal y Bengtson, 1995 y Gisbert et al. 1998) y con la morfología de las larvas de *P. californicus*, descrita por Gisbert et al. (2004). Sin embargo, en los estudios realizados por Gisbert et al. (2002, 2004), la diferenciación de las primeras células que formarán las glándulas gástricas fueron observadas desde los 23 DDE (6.1 ± 0.4 mm LE) y las glándulas completas se reportan a los 30 DDE (7.4 ± 0.5 mm LE). En este trabajo, las larvas a los 24 DDE (6.39 ± 0.06 mm LE), apenas comienzan a presentar el plegamiento de la submucosa intestinal y sólo es hasta los 32 DDE, momento en el que miden 7.57 ± 0.08 mm LE, cuando comienzan a formarse los esbozos de las glándulas gástricas, longitud en la cual, a diferencia de lo observado por Gisbert et al. (2004), las glándulas están perfectamente formadas. Estas diferencias se podrían atribuir a las diferencias en el sistema de

cultivo (e.g., tipo y calidad del alimento, parámetros físico-químicos del agua, densidad de cultivo, etc.). Por ejemplo, en pruebas realizadas en *P. dentatus*, se encontró que las larvas presentan mejor crecimiento y se desarrollan más rápido cuando son cultivadas a baja salinidad (8 ‰), en comparación con larvas cultivadas en agua de mar de 30 ‰ o de mayor salinidad (38 ‰) (Specker et al. 1999).

La temperatura es otro factor primario que afecta directamente al desarrollo larvario. En el salmón del Atlántico, la modificación de este factor puede provocar cambios en la expresión de las diferentes isoenzimas de tripsina durante las primeras etapas del desarrollo, afectando directamente la utilización del alimento y por lo tanto la eficiencia en el crecimiento (Rungruangsak-Torrissen et al. 1998). En la corvina japonesa (*Pseudosciaena crocea*), un descenso en la temperatura de cultivo de 23 a 17 °C, provoca una reducción en el crecimiento en tan solo 6 días (Ma et al. 2005).

De la misma manera, se ha observado que el incremento en la concentración de lípidos en la dieta (10-30%), puede favorecer una ganancia en peso de hasta el 100% en la lobina (*Dicentrarchus labrax*), además de estimular la actividad de las enzimas digestivas como la lipasa, la fosfolipasa A₂ y la fosfatasa alcalina, beneficiando su desarrollo. Por lo que se considera que tanto la maduración intestinal como la adaptación de la mucosa intestinal, son procesos nutriente-sensitivos (Zambonino-Infante y Cahu, 1999).

Se ha comprobado que la diferenciación del estómago, así como la producción de pepsinógeno en los peces son estimuladas por la acción de las

hormonas tiroideas (T3 y T4), hormonas que además influyen en los cambios morfológicos durante la metamorfosis de los peces planos (Power et al. 2001). En este trabajo los folículos tiroideos se observaron por primera vez a los 7 DDE y continúan su desarrollo hasta formar una glándula tiroidea con varios folículos llenos de líquido coloidal, dispersos a lo largo de la arteria aorta, a los 44 DDE. En contraste, Gisbert et al. (2004) observaron los primeros folículos tiroideos a partir del tercer DDE; sin embargo, reportan la formación de una glándula tiroidea funcional, con espacios vacuolares en el coloide, entre los 28 a 30 DDE, lo cual coincide con lo observado en este estudio.

Como se mencionó anteriormente, la ausencia de un estómago funcional y por lo tanto la falta de digestión ácida en las larvas puede ser compensada por una alta actividad micropinocítica y por la digestión intracelular de las proteínas, procesos en los cuales las fosfatasa juegan un papel importante. Hamlin et al. (2000) señalan que el proceso de absorción pinocítica de macromoléculas proteicas, pudiera ser un proceso especializado de las larvas, en respuesta a la falta de enzimas proteolíticas producidas por el estómago. Govoni et al. (1986) sugieren que la absorción por pinocitosis y la digestión intracelular de las proteínas, posiblemente les confiera una ventaja adaptativa. Esta absorción de nutrientes se caracteriza por la presencia de vesículas citoplasmáticas y vacuolas en el epitelio intestinal (Bisbal y Bengtson, 1995); las cuales desaparecen cuando se forma el estómago y se inicia la digestión extracelular (Luizi et al. 1999). En las larvas del bacalao (*Gadus morhua*), los cambios ultraestructurales en el patrón de absorción en el estómago (presencia y/o abundancia de vacuolas), sugieren

cambios en las capacidades digestivas y de absorción, así como en sus necesidades nutricionales, eventos que en esta especie se llevan a cabo alrededor de los días 15 al 17, concomitantes con el inicio de la formación del estómago (Kjørsvik et al. 1991).

La fosfatasa alcalina se ha reportado en diversas especies de peces desde los primeros días de desarrollo y su actividad incrementa con el tiempo, lo que indica el aumento en la absorción de nutrientes por un mecanismo de transporte activo, mediado por el sodio (Govoni et al. 1986). Los decrementos en la actividad de esta enzima, generalmente se presentan en procesos de inanición, o cuando la dieta suministrada no es la adecuada (Gawlicka et al. 2000). Los pequeños péptidos y aminoácidos liberados después de la acción de las diferentes enzimas digestivas, se transportan a través de las membranas de los enterocitos, con ayuda de la fosfatasa alcalina y la ATP-asa (Segner et al. 1994 y Gawlicka et al. 1995).

En la platija amarilla (*Pleuronectes ferruginea*) y en el lenguado de invierno (*P. americanus*), esta enzima se localiza en el borde de cepillo de los enterocitos desde los 3 DDE y aumenta con la edad (Baglolle et al. 1998). Esta misma distribución también se ha observado en el sabalote (Ferraris et al. 1987) y en *S. senegalensis*, en este último, la enzima está activa desde el momento en que la larva abre la boca (Ribeiro et al. 1999a). En el dentón (*Dentex dentex*), la fosfatasa alcalina aparece desde los 2 DDE (Santamaría et al. 2004), mientras que en *S. maximus*, se puede detectar desde la etapa embrionaria (Segner et al. 1994). En el esturión blanco la fosfatasa alcalina se ubica en el borde de cepillo,

principalmente en los enterocitos del intestino posterior, lo que implica que esta área es la más importante en la absorción de nutrientes y en la digestión de proteínas (Gawlicka et al. 1995 y Gawlicka et al. 2000). Finalmente, en el esturión siberiano, esta enzima muestra una fuerte actividad en el intestino y el hígado de las larvas, justo antes de que dé inicio la alimentación exógena, ubicándose principalmente en los enterocitos del intestino posterior (Gisbert et al. 1999).

En este estudio, a pesar de que se logró detectar la actividad de la fosfatasa alcalina desde el primer día de eclosión, solo se detectó una actividad significativa de la enzima en el intestino a partir de los 6 DDE, debido a que fue imposible obtener un corte histológico adecuado para medir la actividad por densidad óptica antes de esta fecha.

Aparentemente las fluctuaciones en la actividad de esta enzima en el intestino de *P. californicus* se encuentran relacionadas con eventos morfológicos importantes, así como con las fluctuaciones de las otras enzimas digestivas. Por ejemplo, el descenso en la actividad registrada en el día 26 DDE, también se pudo observar en las actividades específicas de tripsina y leucina aminopeptidasa, efectos coincidentes con el inicio de la metamorfosis.

El análisis del comportamiento de la enzima por regiones intestinales, mostró que durante la fase pre-metamórfica y el inicio de la metamorfosis (21 a 31 DDE), la enzima se mantiene en sus valores más altos (7 – 27 U.A.), presentándose mayor actividad en el intestino posterior, lo cual caracteriza a esta región como la de mayor transporte de nutrientes, durante este período de transición. Una vez que se inicia el desarrollo de estómago (32 DDE), la actividad

de la fosfatasa alcalina se concentra principalmente en el intestino anterior, descendiendo de manera abrupta en el intestino posterior, lo que indica la alta especialización por regiones intestinales en la absorción de nutrientes durante el desarrollo.

La fosfatasa ácida se ha reportado como una enzima importante en los procesos de absorción pinocítica de proteínas y se asocia con cuerpos de inclusión supranucleares (Govoni et al. 1986). Así mismo, la actividad de esta enzima se ha relacionado con la digestión intracelular en larvas de peces planos (Ribeiro et al. 1999a). Esta enzima lisosomal hidroliza una amplia variedad de ésteres fosfóricos y puede estar relacionada con procesos catabólicos (Parana, 1997). En *S. aurata* la fosfatasa ácida se puede detectar desde la eclosión y se distribuye principalmente en las microvellosidades del intestino, las vacuolas apicales y supranucleares, y el complejo de Golgi de los enterocitos intestinales (Calzada et al. 1998). En *S. senegalensis* la fosfatasa ácida se presenta desde que se abre la boca y, al igual que la fosfatasa alcalina, su actividad se incrementa durante el desarrollo y se concentra en la parte posterior del intestino (Santamaría et al. 2004).

En *P. californicus* la fosfatasa ácida se presenta desde el primer día de desarrollo y se localiza principalmente en la pared del saco vitelino, esta distribución coincide con la distribución descrita durante las primeras etapas de desarrollo del esturión siberiano (Gisbert et al. 1999). Dentro de los enterocitos se distribuye de manera perinuclear, lo que de acuerdo con Tengjroenkul et al. (2000), indica que el sitio de producción de la enzima es el aparato de Golgi,

localizado en la región supranuclear. Esta enzima presenta los valores más bajos de actividad en el día 6 DE (154 y 175 U.A., IA e IP respectivamente), con un ascenso notable en el día 11 DE (64 y 77 U.A., IA e IP respectivamente) y coincide con la formación de la primera asa intestinal y el inicio en el reacomodo de los órganos internos. Un segundo descenso en la actividad se observó entre los 16 y 21 DDE, coincidiendo con el cambio en la alimentación, efecto que también pudo ser observado en la actividad específica de la tripsina y de la leucina aminopeptidasa (Zacarias-Soto et al. 2006). Posteriormente la actividad tiende a incrementarse, manteniendo una mayor actividad en la parte anterior del intestino, por lo que aparentemente para *P. californicus*, esta sección del intestino, correspondería al segmento más importante en la digestión intracelular. La distribución de la fosfatasa ácida durante el desarrollo larvario se ha reportado en diferentes especies de peces, asociando su presencia a las regiones intestinales en donde se llevan a cabo procesos de digestión intracelular. La presencia de esta enzima se ha observado principalmente en el intestino posterior en especies como el lenguado del Senegal (*S. senegalensis*) (Ribeiro et al. 1999), la dorada (*S. aurata*) (Sarasquete et al. 1995), el esturión siberiano (*A. baeri*), y el esturión blanco (*A. transmontanus*) (Gawlicka et al. 1995), entre otros, contrastando con lo observado en *P. californicus*. Lo anterior podría interpretarse como una característica distintiva de la especie, por lo menos durante la fase de desarrollo estudiada. Sin embargo, en todos los estudios antes mencionados, la actividad de la fosfatasa ácida no fue cuantificada, únicamente se reporta la presencia o ausencia de la enzima, asignando valores arbitrarios a la intensidad. En este

trabajo, el cambio en la actividad de las dos fosfatasas evaluadas fue cuantificado y los valores resultantes concuerdan con las imágenes obtenidas de los ensayos histoquímicos.

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que las larvas de *Paralichthys californicus* eclosionan con una actividad enzimática alcalina suficiente para digerir y absorber el alimento suministrado y que la actividad de sus enzimas digestivas está íntimamente relacionada con los eventos metamórficos de la especie.

Tomando en cuenta las características morfológicas y fisiológicas descritas en este trabajo, se puede sugerir que el proceso de destete en *P. californicus* se inicie aproximadamente a los 40 DDE, (10.2 mm LE). Etapa en la que las larvas ya desarrollaron por completo su sistema digestivo y su capacidad digestiva quedó establecida por la actividad enzimática alcalina y ácida, permitiéndole a la larva digerir y absorber con mayor eficiencia los nutrientes suministrados en el alimento.

La importancia de este tipo de estudios radica en tratar de entender la fisiología nutricional de las larvas y la capacidad del sistema digestivo, en cada etapa del desarrollo. Estos resultados, además de describir los cambios ontogenéticos morfológicos y de la actividad enzimática digestiva, permitirán esclarecer el estado de madurez del estómago y los procesos de asimilación del alimento asociados, favoreciendo la integración de protocolos de destete, adecuados a la capacidad del intestino de las larvas para hidrolizar y transportar los nutrientes específicos, esenciales para el desarrollo.

De la misma manera, se podrá favorecer la formulación de dietas adaptadas a las organismos y sustituir, por lo menos de manera parcial, el uso de alimento vivo, el cual es uno de los principales factores limitantes (Ma et al. 2005), que encarecen y dificultan la producción en masa de las diferentes especies de peces marinos, con alto potencial comercial.

3. CAPÍTULO III. Evaluación de probióticos como promotores de la maduración del tracto digestivo de *Paralichthys californicus*.

III.1 Introducción

III.1.1 Uso de probióticos en acuicultura

Una de las principales dificultades que se presenta en los cultivos de larvas de peces marinos es la alta mortalidad que se obtiene, debido principalmente al desconocimiento de los requerimientos nutricionales, así como a la capacidad digestiva que tienen las larvas durante su desarrollo (Kurokawa et al. 1998), lo que impide el suministro de alimento balanceado, adecuado a las necesidades nutricionales de los organismos, en cada etapa de su desarrollo.

La capacidad digestiva de los organismos incluye procesos digestivos, de absorción y de transporte de nutrientes (Zambonino-Infante y Cahu, 2001), los cuales dependerán del desarrollo adecuado de los órganos digestivos y las glándulas anexas, la secreción de enzimas digestivas; así como de la presencia de una microbiota intestinal que, además de ser una barrera natural contra la entrada de posibles patógenos, participe en los procesos digestivos, aportando parte de la actividad enzimática.

La microbiota gastrointestinal de los peces es particularmente dependiente del medio externo, ya que el flujo de agua y alimentos que pasan a través del tracto digestivo, provocan una continua intrusión de microbios (Gatesoupe, 1999). Markridis et al. (2000) aluden que las bacterias que colonizan el estómago en los peces se originan principalmente de la epiflora de los huevos y posteriormente en agua de cultivo y el alimento. También se ha observado que en los organismos

cultivados, una vez que se inicia la alimentación con rotíferos y copépodos el número de bacterias en el tracto digestivo aumenta significativamente, estableciéndose así la flora gástrica (Munro et al. 1995). Por lo tanto, las larvas están altamente expuestas a alteraciones gastrointestinales asociadas a la microbiota circundante, debido a que inician su alimentación exógena aún cuando su sistema digestivo no está completamente desarrollado y el sistema inmune está todavía incompleto. Las larvas de la mayoría de los peces eclosionan en un estadio ontogenético temprano, con un sistema inmune pobremente desarrollado y principalmente constituido por una defensa no específica, por lo que el sistema inmune de origen materno posiblemente es el único disponible para las larvas durante los primeros estadios de desarrollo (Vadstein, 1997). Es por esto que el uso de estimuladores del sistema inmune, como por ejemplo los probióticos podrían ser deseables durante los estadios larvarios, ya que estos microorganismos pueden producir inmunoestimulantes como glucanos y lipopolisacáridos (Gatesoupe, 1999).

La investigación sobre el uso de probióticos en la larvicultura marina se ha incrementado en los últimos años, destacando sobretudo los trabajos dirigidos a proteger u optimizar el sistema digestivo de las larvas, suministrándoles diferentes probióticos a través del agua de cultivo o por vía oral, contenidos en el alimento vivo (Vine et al. 2006). Uno de los investigadores que ha trabajado intensamente en el uso de probióticos como promotores de crecimiento y antagonistas a los patógenos de las larvas de peces es el Dr. Joel Gatesoupe del instituto IFREMER, en Francia (Gatesoupe, 1990), quien define a los probióticos como “células

microbianas que son suministradas de manera que entran al tracto gastrointestinal y pueden mantenerse vivas para mejorar la salud del hospedero”.

Los microorganismos que podrían ser empleados como agentes probióticos deben ayudar a mejorar la salud del hospedero, por lo que deben contar con las siguientes características: 1) tener antagonismo hacia los patógenos, ya sea por la competencia por nutrientes o mediante la expresión de factores inhibitorios, 2) colonización potencial en alguna región del hospedero, y 3) incrementar la resistencia a enfermedades en el hospedero (Gatesoupe, 1999). Otros efectos benéficos que podrían esperarse de los probióticos, son la competencia con patógenos por nutrientes o por sitios de adhesión y la estimulación del sistema inmune del hospedero (Hansen y Olafsen, 1999); el establecimiento de una flora estomacal e intestinal normal en los peces, que complemente la actividad de las enzimas digestivas y bajo condiciones normales pueda servir como una barrera contra diversos patógenos (Ringo y Gatesoupe, 1998).

La adhesión a la mucosa intestinal es una de las características principales que deben poseer los probióticos, ya que de esto depende su establecimiento y colonización en el intestino y por lo tanto, su efecto en el hospedero. La adhesión de las levaduras a la mucosa intestinal se ha demostrado en algunas especies de peces; por ejemplo, en la trucha arcoiris (*Onchorhynchus mykiss*) (Waché et al. 2006), se ha observado la producción de poliaminas específicas, moléculas esenciales para el crecimiento y la proliferación celular, involucradas en la diferenciación y la maduración del tracto intestinal (Péres et al. 1997). La administración oral de una poliamina específica, la espermina, puede inducir

diferentes modificaciones en el trato digestivo de las ratas, como son cambios tisulares, aumento de la permeabilidad intestinal para la absorción de macromoléculas y aumento en la actividad específica de las enzimas pancreáticas (Peulen et al. 2000). De la misma manera, en la lobina europea *Dicentrarchus labrax*, esta poliamina provoca variaciones en la actividad de algunas enzimas, por ejemplo, aumentan la actividad de la leucina aminopeptidasa y de la fosfatasa alcalina y bajan el nivel de actividad de la leucina-alanina peptidasa, ambas condiciones son indicativas de una maduración adecuada del sistema digestivo de las larvas (Péres et al. 1997).

Algunas bacterias lácticas aisladas del tracto intestinal de los peces se han considerado excelentes candidatos para ser empleadas como probióticos ya que son capaces de colonizar el estómago y actuar como antagonistas contra bacterias patógenas Gram-negativas. Asimismo, se ha encontrado una relación positiva entre la composición de la flora bacteriana del tracto gastrointestinal y la supervivencia de las larvas, esto posiblemente se deba a la competencia entre las diferentes especies de bacterias (Gatesoupe, 1990 y Ringo y Gatesoupe, 1998). Además de que las bacterias ingeridas pueden servir como una fuente externa de nutrientes o factores esenciales en los primeros estadios de la vida larvaria (Hansen y Olafsen, 1999), comprobándose que especies como *Pediococcus acidilactici*, promueven el crecimiento del abadejo (*P. pollachius*) (Gatesoup, 2002).

Los principales grupos de bacterias que se han empleado como probióticos en los cultivos de camarón, cangrejos, almejas y peces, pertenecen a los géneros

Vibrio, *Pseudomonas* y *Bacillus*, además de diferentes lactobacilos (Gómez-Gil et al. 2000). Muchas de estas bacterias se han seleccionado como probióticos ya que se encuentran de forma natural en la flora intestinal de los organismos; su capacidad para colonizar el estómago, se debe a que están adaptadas al ambiente físico, químico y biótico del entorno, puesto que resisten la acción de las enzimas digestivas del sistema inmune del hospedero, así como las variaciones de pH y la acción de la bilis (Makridis et al. 2000).

III.2 Antecedentes

III.2.1 Efecto de los probióticos sobre la capacidad digestiva de las larvas de peces.

El potencial probiótico de las levaduras en el desarrollo del tracto digestivo se ha estudiado en diferentes especies, principalmente en mamíferos, donde se describe ampliamente su efecto tanto a nivel morfológico como funcional. Por ejemplo, en ratas se ha observado que *Saccharomyces boulardii* estimula la actividad de las enzimas digestivas, incrementando hasta 157% la actividad de la sacarasa y 47% la actividad de la maltasa (Buts et al. 1994).

El uso de las levaduras como probióticos se ha extendido últimamente en el cultivo de peces, dada la gran capacidad de adhesión y colonización del intestino de este tipo de organismos (Gatesoupe, 1999). En bioensayos con larvas de la lobina europea (*D. labrax*) y de la cabrilla arenosa *Paralabrax maculatofasciatus*, Tovar-Ramírez et al. (2000) y Tovar et al. (2002) evaluaron dos especies de levaduras *Debaryomyces hansenni* cepa HF1 y *Saccharomyces cerevisiae* cepa X2180, que producen una gran cantidad de poliaminas (moléculas esenciales para el crecimiento y proliferación celular) y que tienen una buena capacidad de adhesión al intestino de las larvas. Sus resultados más sobresalientes señalan el aumento en la supervivencia; además que tanto la actividad de la amilasa, como los cocientes entre la fosfatasa alcalina, maltasa y leucina aminopeptidasa y la leucina-alanina aminopeptidasa, se incrementan en las larvas alimentadas con dicha cepa (cepa HF1), lo que sugiere una maduración temprana del sistema digestivo de las larvas. *D. hansenni* no solo mejora la supervivencia de la lobina

europaea, también reduce el desarrollo de malformaciones en las larvas y aumenta la actividad y concentración del ARNm de la tripsina y la lipasa, disminuyendo los niveles de amilasa que denotan la maduración temprana del páncreas. De la misma manera, esta bacteria promueve el desarrollo temprano de la digestión intestinal, dado que aumenta la actividad de la fosfatasa alcalina, la aminopeptidasa N y la maltasa (Tovar-Ramírez et al. 2004).

Las bacterias ácido lácticas forman parte de la microbiota del tracto gastrointestinal de los peces sanos y su nivel poblacional está asociado a factores nutricionales (e.g., ácidos grasos poliinsaturados) y medioambientales (e.g., estrés, salinidad) (Ringo y Gatesoupe, 1998). Estas bacterias son del tipo Gram-positivas, bastones o cocos que no esporulan, utilizan carbohidratos como fuente de energía y producen ácido láctico como producto único del metabolismo (Ringo y Gatesoupe, 1998). Las especies de bacterias que se pueden encontrar en las larvas varían durante el desarrollo. Por ejemplo, en el lenguado del Atlántico (*Hippoglossus hippoglossus*) se ha observado que tanto en los huevos como en las larvas con saco vitelino, predominan las bacterias de los géneros *Vibrio* y *Pseudoalteromonas*, pero al comenzar la alimentación exógena, diferentes especies de *Vibrio* colonizan el tracto digestivo de manera predominante (Verner-Jeffreys et al. 2003). Pocas han sido las especies de bacterias ácido lácticas que se han logrado aislar del intestino de las larvas de peces. Esto debido principalmente al corto período que permanecen en el intestino por la alta tasa de evacuación de los organismos (Vine et al. 2006) y al alto recambio celular del epitelio intestinal (Tovar-Ramírez et al. 2000). Dado que las bacterias producen

sus metabolitos solo cuando se encuentran en la fase estacionaria (Vine et al. 2006), al haber baja adherencia y por lo tanto colonización, su eficiencia se ve disminuida.

En estudios realizados con diversas especies de bacterias aisladas de los tractos digestivos de camarones y peces, se ha observado que tienen la capacidad de producir enzimas tipo tripsina, lipasa, esterases, fosfohidrolasas, leucina arilamidasa, fosfatasas ácida y alcalina, además de α y β -glucoronidasas (Dixon et al. 2001). En *Paralichthys lethostigma*, parte de su flora intestinal anaeróbica produce diversas enzimas, entre las que se encuentran las fosfatasas alcalina y ácida, esterasa lipasa (C8), fosfohidrolasa y leucina arilamidasa. Este tipo de bacterias participan en la digestión enzimática de los residuos de alimento y sintetizan vitaminas; además de que inhiben la multiplicación y dispersión del hongo *Candida albicans* y poseen cierta actividad antibacterial (Ramírez y Dixon, 2003).

Se ha comprobado que algunas cepas de bacterias ácido lácticas tienen la capacidad de suprimir el crecimiento de *Vibrio anguillarum* y de *Aeromonas salmonicida* (Jöborn et al. 1997). De la misma manera, se ha observado que la bacteria *Pediococcus acidilactici*, además de tener gran actividad antibacterial, incrementa la tasa de crecimiento específico de los rotíferos (*Brachionus plicatilis*), así como su densidad máxima de cultivo (Planas et al. 2004). También han sido identificadas especies (como la cepa K1 de *Carnobacterium* sp.) con una alta capacidad de adherencia al intestino (Jöborn et al. 1997). En particular, la especie

C. divergens puede desplazar a otros colonizadores potenciales en el intestino del bacalao del Atlántico (*G. morhua*), ayudando a disminuir la mortalidad (Gildberg et al. 1997).

Uno de los medios por el cual se realiza el suministro de los probióticos a las larvas de los peces en cultivo es el alimento vivo (rotíferos, artemias y/o copépodos). Se recomienda no exceder la carga bacteriana en los procesos de enriquecimiento del zooplancton, ya que esto puede afectar la palatabilidad y el movimiento de las presas (Vine et al. 2006). Así mismo, se debe tomar en cuenta que la cantidad de células probióticas que se introduzcan en el alimento vivo dependerán del tipo de probiótico, así como del tiempo de exposición y el estado del organismo (Gómez-Gil et al. 2000).

En ensayos de enriquecimiento de rotíferos con diferentes cepas de bacterias lácticas con capacidad probiótica (*Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus helveticus* y *Lactobacillus plantarum*), se ha observado que la concentración de bacterias en su flora es significativamente más baja en comparación con los grupos control (sin adición de probióticos). Al alimentar con estos rotíferos a las larvas del lenguado japonés (*Paralichthys olivaceus*), se obtienen mayores tasas de crecimiento (Gatesoupe et al. 1989). Así mismo, el suministro de *L. plantarum* en cultivos de rotíferos, disminuye la presencia de bacterias patógenas, favoreciendo el aumento en el peso promedio de las larvas de rodaballo (*Scophthalmus maximus*) (Gatesoupe, 1991).

En los cultivos de peces marinos, el suministro de alimento vivo durante el desarrollo larvario, representa una de las fracciones más costosas de la

producción. Por lo que el uso de agentes enriquecedores (sustancias o microorganismos), que ayuden en la maduración del sistema digestivo y que a su vez ayuden a proteger a las larvas contra patógenos, podría ayudar a disminuir costos en la producción de los peces marinos ya que, además de disminuir el tiempo de suministro de alimento vivo, se podría obtener una reducción en el porcentaje de mortalidad, causado por enfermedades de origen viral o bacteriológico.

III.3 Hipótesis

El suministro de probióticos en la dieta de las larvas de *P. californicus*, promoverá la maduración temprana del sistema digestivo de las larvas en desarrollo, así como el aumento de la actividad de las diferentes enzimas digestivas. Esto ayudará a crear protocolos de destete exitosos y la implementación de microdietas balanceadas, disminuyendo el tiempo de suministro de alimento vivo.

III.4 Objetivos

III.4.1 Objetivo general

1. Evaluar el efecto del suministro de probióticos sobre el desarrollo ontogenético del sistema digestivo de las larvas de *Paralichthys californicus*, tomando como base la caracterización morfológica y fisiológica de su capacidad digestiva.

III.4.2 Objetivos específicos

1. Evaluar el efecto del suministro de probióticos sobre el desarrollo ontogenético del sistema digestivo de *P. californicus*, a través de la descripción histológica detallada de todos sus órganos, caracterizando cualitativamente la morfogénesis del sistema digestivo.

2. Evaluar el efecto del suministro de probióticos sobre el desarrollo ontogenético del sistema digestivo de *P. californicus*, utilizando la caracterización cualitativa y cuantitativa de la producción de enzimas digestivas.

3. Evaluar el efecto de los probióticos sobre la maduración del sistema digestivo utilizando como indicador la actividad y distribución de la fosfatasa alcalina en el sistema digestivo del lenguado de California, por medio de técnicas histoquímicas.

III.5 Materiales y métodos

Esta fase experimental se efectuó en el verano del 2005 en el laboratorio húmedo del Departamento de Acuicultura del CICESE, utilizando huevos de *P. californicus*, obtenidos de desoves naturales de reproductores en cautiverio, mantenidos en Hubbs Sea World Research Institute, California, USA.

III.5.1 Sistema de cultivo

Las larvas recién eclosionadas de *P. californicus* fueron cultivadas en 12 estanques circulares con fondo plano y de 200 L de capacidad, con una densidad de 13 larvas/L. Los estanques fueron divididos en 4 grupos experimentales, cada uno con tres repeticiones y distribuidos al azar. La recirculación de agua marina de este sistema fue la misma que la utilizada en el experimento descrito en el Capítulo II, sección II.4.1 y se mantuvieron las mismas condiciones de cultivo.

III.5.2 Diseño experimental

El suministro de los probióticos a las larvas se realizó utilizando al alimento vivo (rotíferos y *Artemia*) como vector para introducir a los microorganismos en el tracto gastrointestinal (Hansen y Olafsen, 1999). Método que resulta efectivo, dado que estos organismos son filtradores no selectivos (Patra y Mohamed, 2003).

El bioensayo consistió de cuatro tratamientos experimentales. El primer tratamiento denominado LEVUCCELL utilizó una levadura comercial (LEVUCCELL-SB[®]), el segundo, denominado BACTOCELL, utilizó una bacteria láctica (BACTOCELL[®]); ambos fueron donados por la empresa LALLEMAND de Francia.

El tercer y cuarto tratamientos fueron los grupos control. El primer control se denominó Control levadura (negativo), al cual se le suministró levadura de cerveza comercial (*Saccharomyces cerevisiae*) de la misma manera que los experimentales y en el segundo, denominado Control positivo, no se utilizaron microorganismos.

La alimentación, el suministro de probióticos y el enriquecimiento de los rotíferos y los nauplios de *Artemia* se llevaron a cabo en estanques cilíndricos de 45 L de capacidad, abastecidos con agua de mar filtrada y tratada con UV. La temperatura se mantuvo a 20 °C, la salinidad en 33 ‰ y la aireación se mantuvo constante.

III.5.3 Protocolo de alimentación

III.5.3.1 Suministro de alimento vivo a las larvas

Las larvas fueron alimentadas dos veces al día a partir del segundo día después de la eclosión (DDE), empleando rotíferos de la especie *Brachionus plicatilis*. Éstos fueron suministrados a las larvas a una densidad de 7 rotíferos/mL, desde el segundo DDE y hasta los 17 DDE. A partir de éste día se suministraron nauplios de *Artemia* recién eclosionados, enriquecidos con HUFA's y con sus respectivos probióticos. Durante los días 17 a 20 DDE, la ración de rotíferos disminuyó gradualmente en una proporción de 75, 50 y 25%. A partir del día 21 y hasta los 46 DDE, las larvas fueron alimentadas únicamente con nauplios de *Artemia* a una densidad de 5 artemias/mL.

Cada mañana antes de alimentar a las larvas, se realizaba un conteo del número de rotíferos y/o nauplios de *Artemia* presentes en el estanque de cultivo, con la finalidad de ajustar y mantener la densidad de presas en cada estanque experimental.

III.5.3.2 Enriquecimiento de rotíferos

Los rotíferos fueron cultivados y cosechados bajo las mismas condiciones que en el experimento anterior (Capítulo II, sección II.4.2.2.).

Durante el proceso de enriquecimiento, cada lote de los rotíferos fue suplementado con 272×10^9 microalgas de la especie *Nannochloropsis* sp (Instant Algae®; Campbell, CA, USA), divididos en dos raciones. Cada uno de los probióticos experimentales y la levadura de cerveza control, fueron agregados a una concentración de 50 mg/L durante 24 hrs., siguiendo el protocolo descrito por (Gatesoupe, 2002). Para mejorar la calidad nutrimental de los rotíferos, doce horas antes de ser suministrados a las larvas, fueron enriquecidos con una solución de ácidos grasos altamente insaturados (RATIO HUFA Enrich, Salt Creek Inc.), a una concentración de 125mg/L para 200-500 rotíferos/mL. El tratamiento Control positivo solo fue alimentado con las microalgas y enriquecido con los HUFA's. Proceso que se realizó en el laboratorio húmedo del Departamento de acuicultura del CICESE.

III.5.3.3 Enriquecimiento de Artemia

Los quistes de *Artemia* (Salt Creek Inc., Salt Lake City, UT, USA) fueron hidratados y desinfectados siguiendo el protocolo descrito en el Capítulo II, sección II.4.2.3. La eclosión se realizó en estanques cilíndricos de 45 L, a una temperatura de 25 °C, con luz y aireación constante, por un período de 24 horas, siguiendo el protocolo descrito por Sorgeloos et al. (1986).

La alimentación, el suministro de probióticos y el enriquecimiento con los HUFA's se realizaron de la manera descrita en la sección II.5.3.2 y utilizando las mismas concentraciones, solo que en este caso se empleó una concentración de 300 mg/L de HUFA's para 300 nauplios/mL y a una temperatura de 25 °C. El tratamiento control positivo solo recibió microalgas como alimento y también fue enriquecido con los HUFA's por 12 hrs.

III.5.4 Crecimiento larvario de Paralichthys californicus

Se realizaron 10 muestreos cada 5 días a partir del primer día de la eclosión y hasta los 46 DDE. Para el registro del crecimiento, se tomaron 10 larvas por estanque, las cuales fueron anestesiadas con metasulfonato de tricaína (MS-222) al 0.05%. A las larvas anestesiadas se les midió la longitud estándar (LE) utilizando un microscopio estereoscópico con retícula ocular (Wild Heerbrugg).

Al finalizar el período experimental se contaron todas las larvas sobrevivientes y se clasificaron según su grado de pigmentación en: 1) pigmentación normal (organismos con la pigmentación normal característica de los juveniles y adultos de la especie), 2) pigmentación media (organismos con más de

la mitad del cuerpo con los colores característicos de la especie), y 3) pseudoalbinos (organismos sin pigmentación) (Fig. 34).

Esta clasificación se propuso con la finalidad de observar si el suministro de alguno de los probióticos experimentales, inducía algún cambio en el porcentaje de organismos pigmentados. Bolker y Hill (2000) reportan que la mala pigmentación en las diversas especies de lenguados cultivados puede ir desde 0 hasta el 100%, anomalía que puede ser provocada por múltiples factores en los sistemas de cultivo, principalmente relacionados con deficiencias nutricionales.

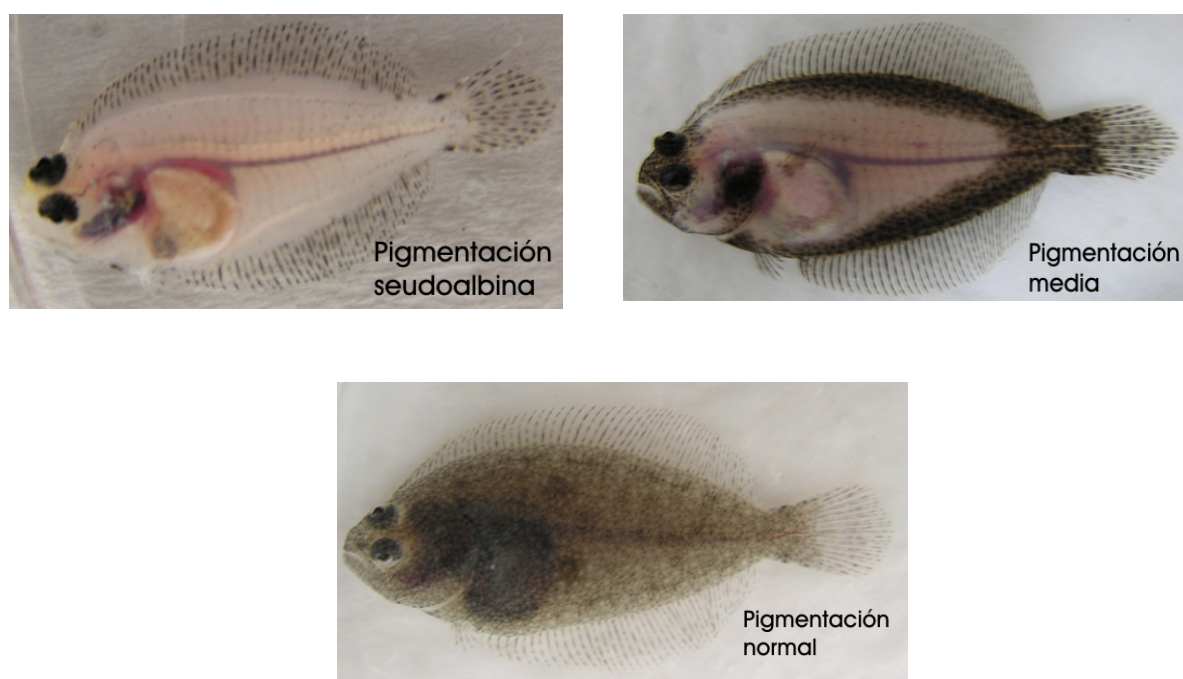


Figura 34. Patrones de pigmentación en *P. californicus*.

III.5.5 Histología

En cada muestreo se tomaron 8 larvas por estanque, se anestesiaron con MS-222 y se fijaron en Bouin a temperatura ambiente por 24 a 48 h y a continuación se siguió el protocolo utilizado para el análisis histológico, descrito en el Capítulo II, sección II.4.4.

III.5.6 Actividad enzimática

Los bioensayos de actividad enzimática se realizaron por triplicado, siguiendo los mismos protocolos utilizados para detectar la actividad de las enzimas tripsina, leucina-aminopeptidasa y proteasas ácidas totales, descritos en el Capítulo II, sección II.4.5.

En esta fase experimental, se cuantificó la actividad enzimática de la lipasa dependiente de sales biliares, utilizando como sustrato el p-Nitrofenil caproato (4-NPC) 100mM y buffer Tris-HCl 0.5 M, taurocolato de sodio 6 mM, pH 7.4, según el protocolo sugerido por Gjellesvik et al. (1992). La incubación se realizó a 30 °C, utilizando 1 mL de sustrato y 50 µL de extracto enzimático. El incremento en la absorbancia se leyó a los 5, 10, 15, 20 y 30 min.

Así mismo, se cuantificó la actividad de la quimotripsina, utilizando el método de Humel (1959) modificado por Applebaum et al. (2001). Brevemente, se utilizó BTEE 0.56 mM como sustrato y buffer Tris-HCl 0.1 M, CaCl₂ 28 mM, pH 7.8. La incubación se llevó a cabo a 37 °C por 30 min., utilizando 630 µL de sustrato y 70 µL de extracto enzimático. El incremento en la absorbancia fue registrado a 256 nm.

Finalmente, se realizaron análisis enzimáticos en cada uno de los probióticos (LEVUCCELL Y BACTOCELL), así como en la levadura comercial, con el fin de verificar si presentaban actividad con alguno de los sistemas enzimáticos, evaluados en este trabajo. La actividad se expresó como U/ μ g de probiótico o levadura comercial y en el caso del Control, como U/ μ g de la enzima comercial correspondiente.

En cada muestreo se recolectaron 48 larvas por estanque que fueron colocadas en tubos eppendorf (8 en cada tubo) y almacenadas a -50 °C hasta su utilización en los ensayos enzimáticos. La disección del sistema digestivo y la obtención de los homogenizados se realizaron manteniendo las mismas condiciones que las descritas en el Capítulo anterior.

Para evaluar la actividad total y la actividad específica de cada una de las enzimas se utilizó lo propuesto con anterioridad (Capítulo II, sección II.4.5.), excepto que para este análisis se utilizó un volumen de homogenización de 1500 μ L.

III.5.7 Histoquímica

III.5.7.1 Fosfatasa alcalina

Debido a que la fosfatasa alcalina es una de las principales enzimas involucrada en los procesos de absorción de nutrientes y es comúnmente utilizada para caracterizar la maduración del sistema digestivo (Tovar et al. 2000 y Zambonino-Infante y Cahu 2001), se decidió cuantificar su actividad, a lo largo del intestino de las larvas.

La actividad de la fosfatasa alcalina se cuantificó utilizando el protocolo empleado en el Capítulo 2, sección II.4.6., registrando la actividad de la enzima por densidad óptica en tres cortes de diferentes larvas. La cuantificación se realizó únicamente en los días 41 y 46 DE, debido a que solo en esta fase del desarrollo se detectaron diferencias en la actividad enzimática, entre los grupos experimentales.

III.5.8 Análisis estadístico

A los datos obtenidos en los bioensayos enzimáticos, una vez que se comprobó que presentaban una distribución normal, se les aplicó un análisis de varianza (ANOVA) ($P < 0.05$). En los casos en que se encontraron diferencias significativas entre los lotes experimentales, se aplicó la prueba de TUKEY (Paquete STATISTICA 6, StatSoft®), con el fin de identificar las diferencias entre tratamientos. Este mismo tipo de análisis fue empleado para evaluar el crecimiento de las larvas.

Para analizar las diferencias en el porcentaje de pigmentación, los datos fueron normalizados, transformándolos con $\log_{10}$, posteriormente se realizó un análisis de varianza (ANOVA).

La cuantificación de la fosfatasa alcalina en el intestino, se realizó siguiendo el protocolo usado en el análisis histoquímico de las fosfatasas, descrito en el Capítulo II, sección II.4.6.

III.6 Resultados

III.6.1 Crecimiento larvario

El crecimiento de las larvas de *Paralichthys californicus* presentó la misma tendencia que la observada en el estudio de la ontogenia del sistema digestivo, a excepción de los 11 y 16 DDE, en donde se puede apreciar un ligero aceleramiento en el crecimiento en todos los grupos. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre ellos (Fig. 35).

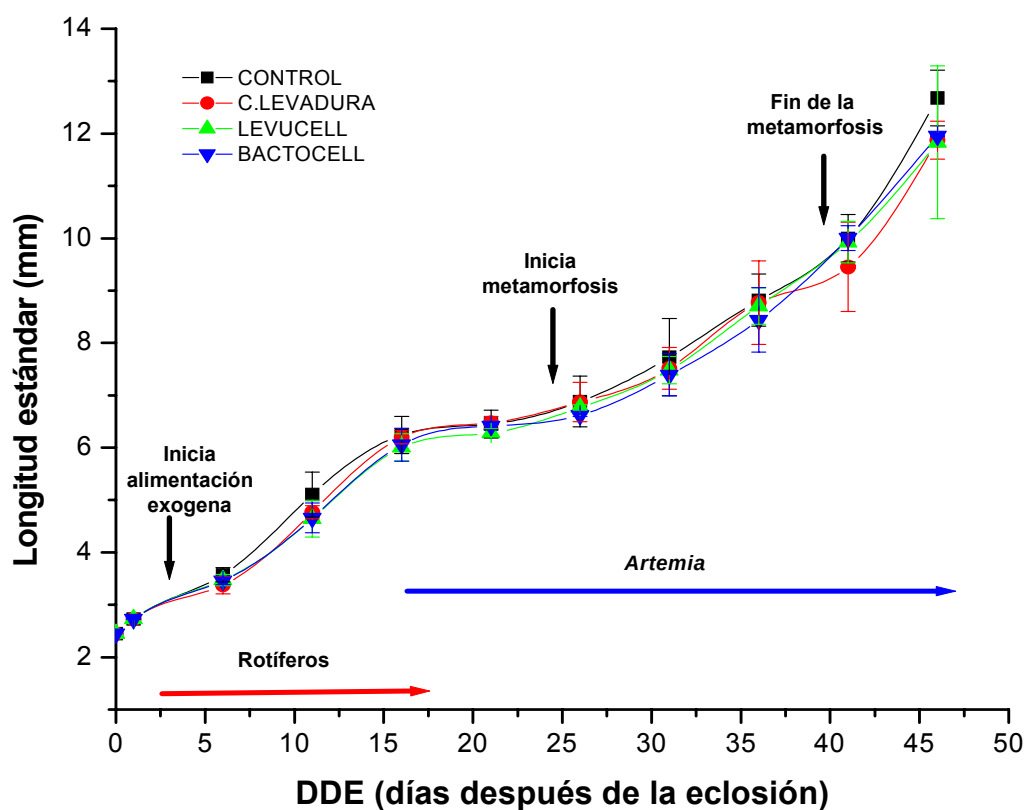


Figura 35. Crecimiento en términos de longitud estándar de las larvas de *P. californicus* mantenidas en cultivos experimentales con el suministro de probióticos. Media $\pm$ D.E. (n=30).

III.6.2 Supervivencia y pigmentación

No fue posible determinar con precisión el porcentaje de supervivencia a través del bioensayo, debido a que en los primeros días de desarrollo las larvas que mueren se desintegran muy rápido. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de supervivencia entre los tratamientos ni en pigmentación (Tabla 1).

Tabla I. Pigmentación y supervivencia (%) de las larvas de *P. californicus* mantenidas en los cultivos experimentales con el suministro de probióticos (Media $\pm$ D.E.).

PIGMENTACIÓN						
TRATAMIENTO	ALBINA	MEDIA	NORMAL	TOTAL	% PIGM. NORMAL	% SUPERVIVENCIA
CONTROL	27 $\pm$ 13	300 $\pm$ 29	87 $\pm$ 40	414 $\pm$ 75	20.4 $\pm$ 5.8 ^a	38 $\pm$ 7 ^a
C. LEVADURA	129 $\pm$ 34	344 $\pm$ 76	104 $\pm$ 15	577 $\pm$ 61	18.1 $\pm$ 2.4 ^a	29 $\pm$ 2 ^a
LEVUCCELL	57 $\pm$ 13	254 $\pm$ 94	48 $\pm$ 1	359 $\pm$ 106	14.1 $\pm$ 4.6 ^a	46 $\pm$ 11 ^a
BACTOCELL	10 $\pm$ 5	212 $\pm$ 41	53 $\pm$ 5	275 $\pm$ 30	19.5 $\pm$ 4.2 ^a	49 $\pm$ 1 ^a

III.6.3 Histología

A nivel morfológico, el desarrollo del sistema digestivo de las larvas alimentadas con los probióticos y ambos controles siguió el mismo patrón que el observado en el experimento anterior (Capítulo II), por lo menos durante los primeros 25 días del bioensayo.

Al eclosionar las larvas, éstas poseen un tubo digestivo recto sin glándulas anexas visibles y el saco vitelino con una a dos gotas de aceite, ubicadas en posición proximal con respecto al cuerpo de la larva. A los 6 DDE (3.47 ± 0.08 mm LE) todas las larvas presentaron una constricción de la parte posterior del intestino (Fig. 36) y abundantes vacuolas supranucleares en los enterocitos del intestino posterior (Fig. 37). Estas vacuolas que se observaron a los 4 DDE en el experimento realizado en el 2003, lo que no se pudieron corroborar en esta segunda fase del trabajo, quizás debido a que en este caso, los muestreos se realizaron cada cinco días. Asimismo, en el hígado se comenzó a observar el arreglo de los hepatocitos en cordones, en tanto que en el páncreas ya se pueden distinguir abundantes gránulos de zimógeno, éstas características denotan la funcionalidad de ambas glándulas.

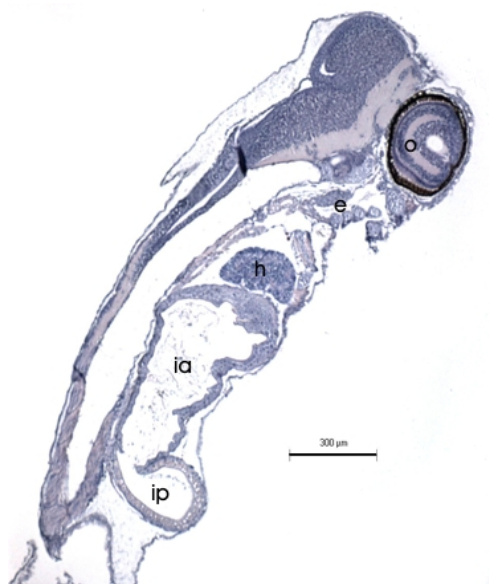


Figura 36. Corte sagital de *P. californicus* a los 6 DDE (control). Sistema digestivo en forma de tubo con una constricción en la parte posterior. Intestino posterior (ip), intestino anterior (ia), hígado (h), esófago (e), ojo (o). H-E, 100X. Barra 300 μ m.

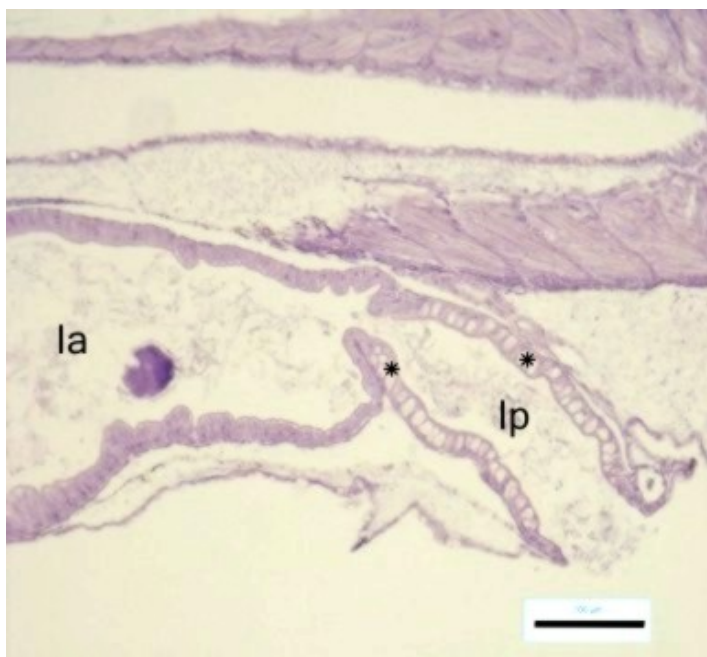


Figura 37. Corte sagital de *P. californicus* a los 6 DDE (control). Intestino posterior (lp), intestino anterior (la), vacuolas (*). H-E, 100X. Barra 200 μ m.

A los 11 DDE (4.79 ± 0.21 mm LE) las larvas presentaron un hígado y un páncreas bien desarrollados, este último con un islote de Langerhans evidente, además de abundantes gránulos de zimógeno (Figs. 38 A y B). En esta etapa también se pudo distinguir la glándula tiroides, formada por uno o dos folículos tiroideos, con una sustancia coloidal en su interior (Figs. 39 A y B).

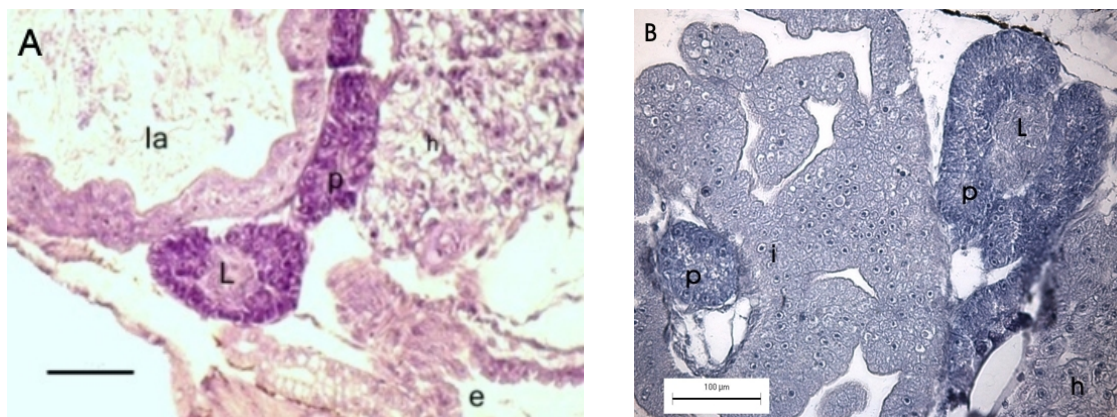


Figura 38. Corte sagital a nivel del hígado y del páncreas de *P. californicus* a los 11 DDE. A) LEVUCCELL; B) Control. Intestino anterior (la), esófago (e), islote de Langerhans (L), hígado (h), páncreas (p). H-E, 400X. Barra 100 µm.

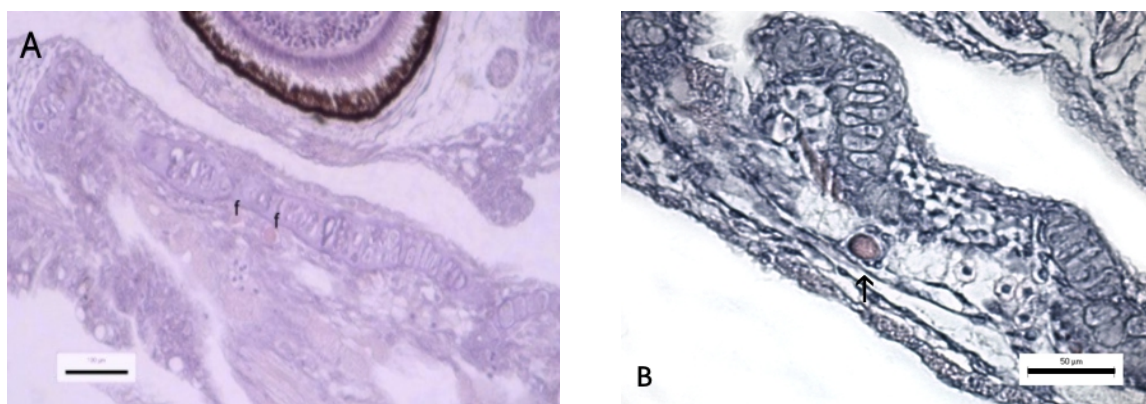


Figura 39. Corte sagital de *P. californicus* a los 11 DDE A) BACTOCELL. Folículos tiroideos (f). H-E; Barra 100 µm. B) Control. Tiroides (→). H-E; Barra 50 µm.

A los 16 DDE (6.12 ± 0.11 mm LE), ya se formó una primer asa intestinal que envuelve una parte del páncreas (Fig. 40). Los gránulos de zimógeno se mostraron más abundantes. Externamente, la mayoría de las larvas en esta etapa

ya desarrollaron cuatro de las cinco espinas de la aleta dorsal, mientras que la notocorda permanece recta.

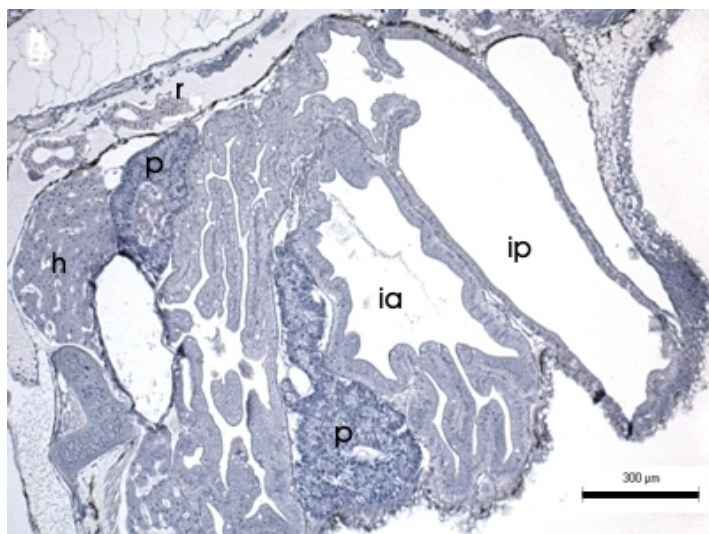


Figura 40. Corte sagital del sistema digestivo de *P. californicus* a los 16 DDE (control). Intestino anterior (ia), intestino posterior (ip), páncreas (p), hígado (h), riñón (r). H-E; Barra 300 μ m.

A los 21 DDE (6.41 ± 0.09 mm L.E) se formaron más asas intestinales, se observaron abundantes corpúsculos gustativos y los primeros dientes en la mandíbula inferior (Fig. 41); la glándula tiroidea está más dividida, llegándose a observar hasta 5 folículos en algunos organismos (Fig. 42). En esta misma etapa se comenzó a evidenciar la migración ocular, sobre todo en las larvas a las que se les suministraron rotíferos enriquecidos con levadura comercial (*Saccharomyces cerevisiae*). En general, las larvas de todos los tratamientos, incluyendo ambos

controles, alcanzaron la etapa de desarrollo E o F, descritas por Gisbert et al. (2002), aunque a esta edad (21 DDE) aproximadamente el 50% de la población se encontraba en una de estas dos etapas.

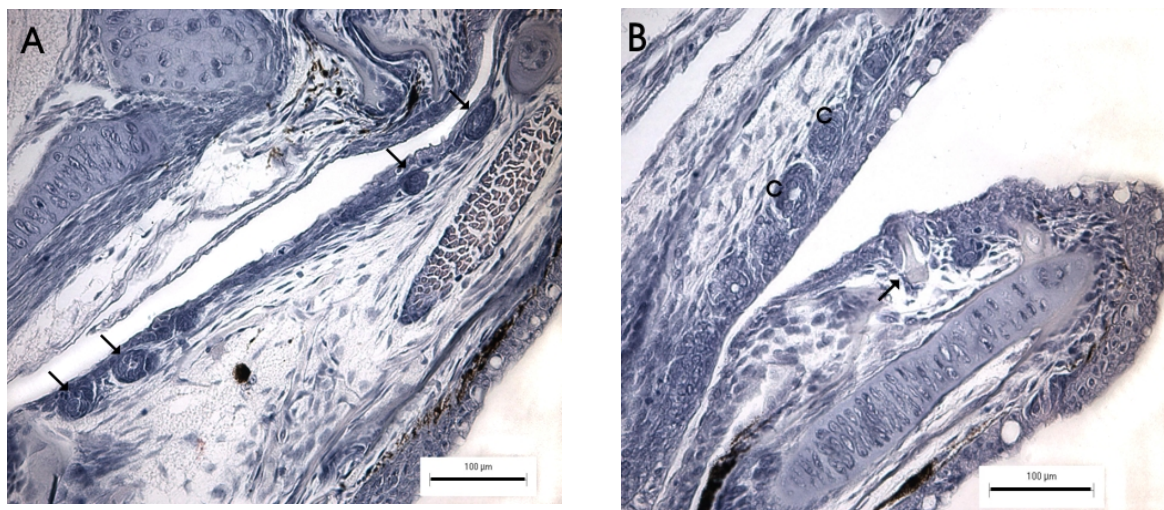


Figura 41. Corte sagital de *P. californicus* a los 21 DDE. A) Control. Corpúsculos gustativos (→). B) *C. levadura*. Corpúsculos gustativos (c), diente (→). H-E; Barra 100 µm.

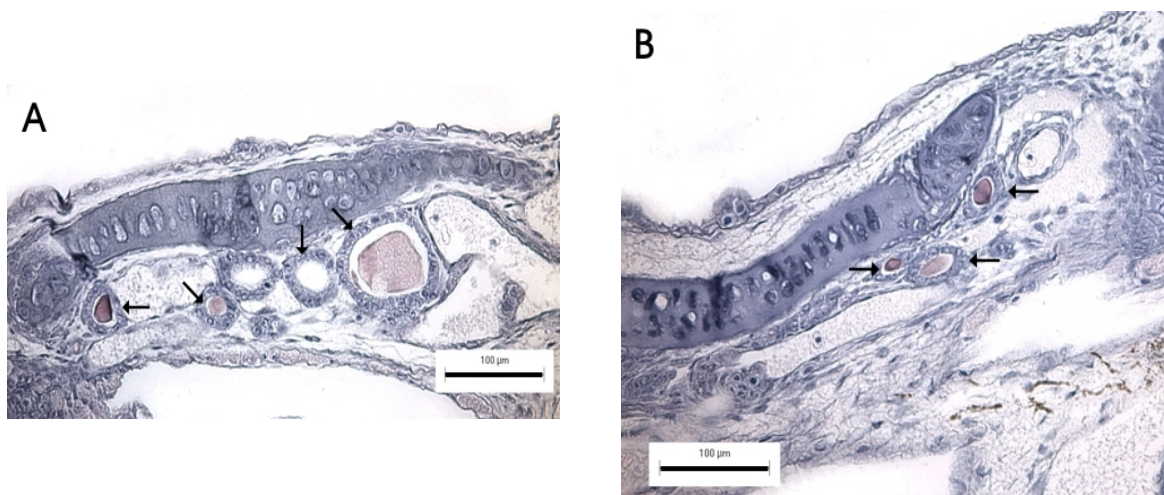


Figura 42. Corte sagital de *P. californicus* a los 21 DDE (control). A) Control. B) Control *levadura*. Folículos tiroideos (→). H-E; Barra 100 µm.

A diferencia del primer bioensayo (Capítulo II, sección II.5.2), en éste se observaron los primeros esbozos de las glándulas digestivas a los 26 DDE (6.78 ± 0.12 mm) (Fig. 43), en particular en los organismos de los tratamientos Control, C. Levadura y LEVUCCELL. En el caso de los organismos a los que se les suministró BACTOCELL, los primordios de las células gástricas fueron observados hasta los 31 DDE (7.53 ± 0.14 mm), aunque no se realizó ningún muestreo intermedio entre el día 27 y 30 DE (Fig. 44).

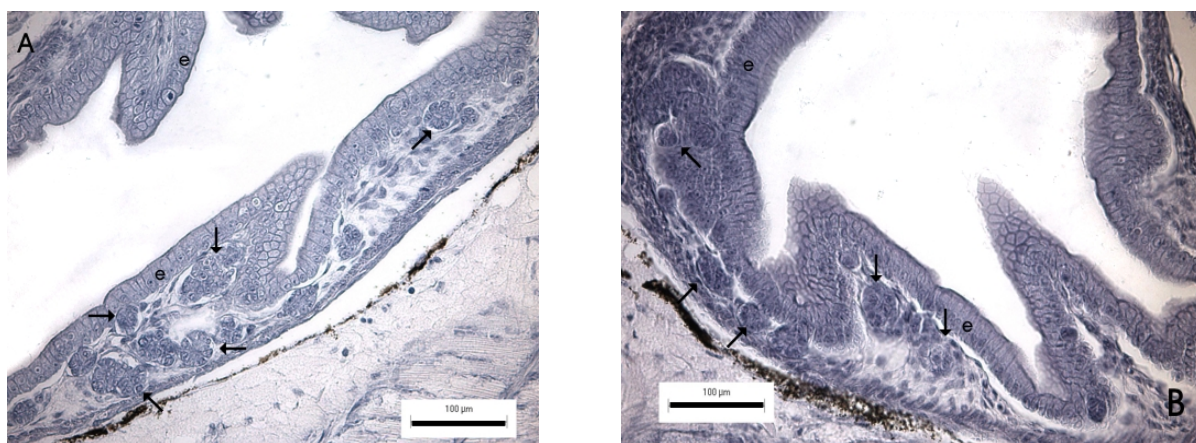


Figura 43. Corte sagital de *P. californicus* a los 26 DDE. A) Control. B) Control levadura. Primeros esbozos de las glándulas digestivas (→), epitelio (e). H-E; Barra 100 µm.

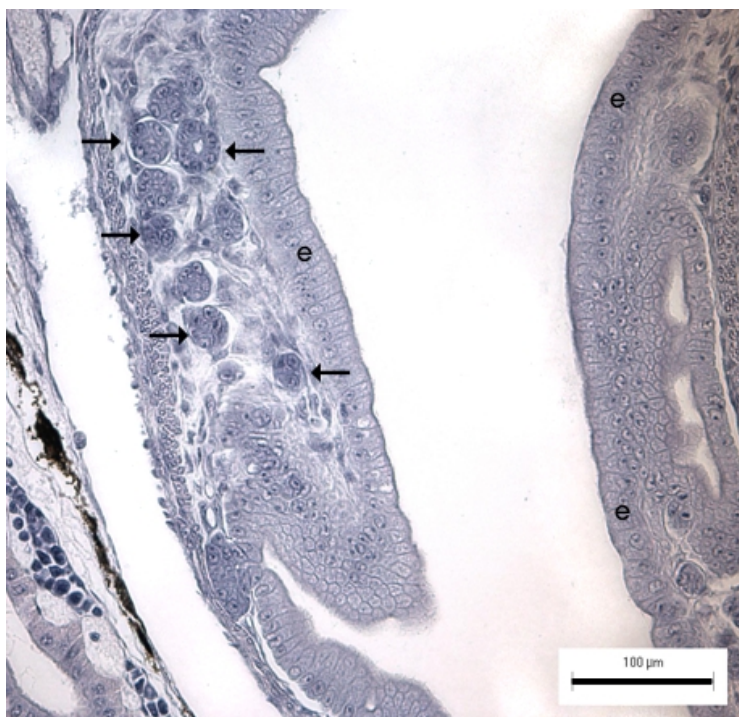


Figura 44. Corte sagital de *P. californicus* a los 31 DDE en los organismos con suministro de BACTOCELL. Primeros esbozos de las glándulas digestivas (→). H-E; Barra 100 μ m.

La regionalización del estómago en sus tres zonas (cardiaca, fúndica y pilórica), se observó en todos los tratamientos experimentales desde los 36 DDE (8.68 ± 0.17 mm LE), en todos los tratamientos experimentales (Fig. 45). Regionalización que en el bioensayo anterior se observó entre los 40 y 44 DDE.

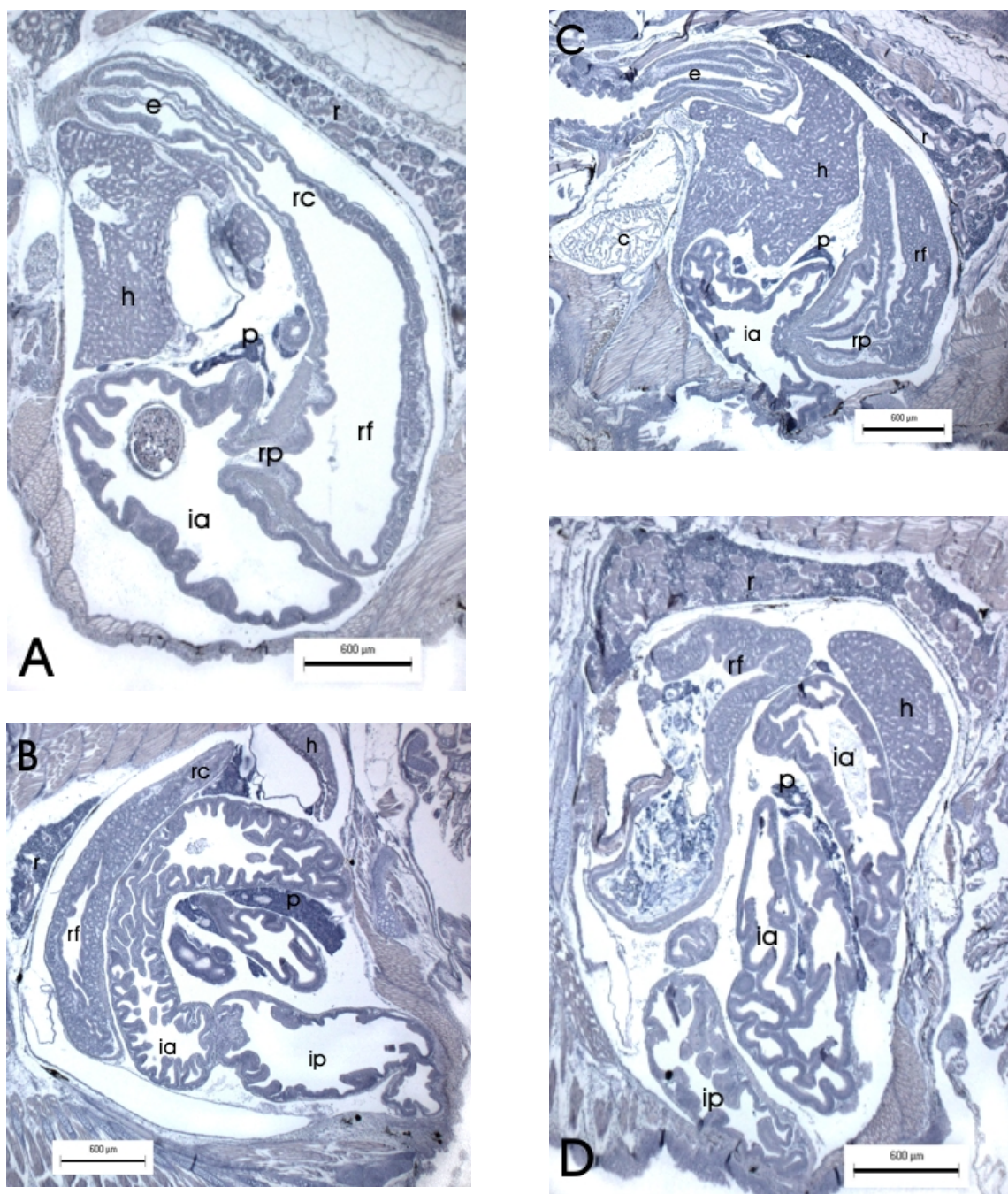


Figura 45. Corte sagital del sistema digestivo de *P. californicus* a los 36 DDE
A) Control. B) Control levadura, C) LEVUCCELL, D) BACTOCELL.
Regionalización completa del estómago. Esófago (e), hígado (h), corazón (c),
páncreas (p), intestino anterior (ia), intestino posterior (ip), región cardiaca
(rc), región fúndica (rf), región pilórica (rp), riñón (r). H-E; Barra 600 µm.

III.6.4 Actividad enzimática

Se detectó actividad enzimática en los probióticos analizados incluyendo la levadura de cerveza. Se detectó actividad enzimática del tipo tripsina, quimotripsina, leucina aminopeptidasa, proteolítica ácida y lipasa. Sin embargo, con el probiótico BACTOCELL no se detectó actividad de lipasa (Fig. 46).

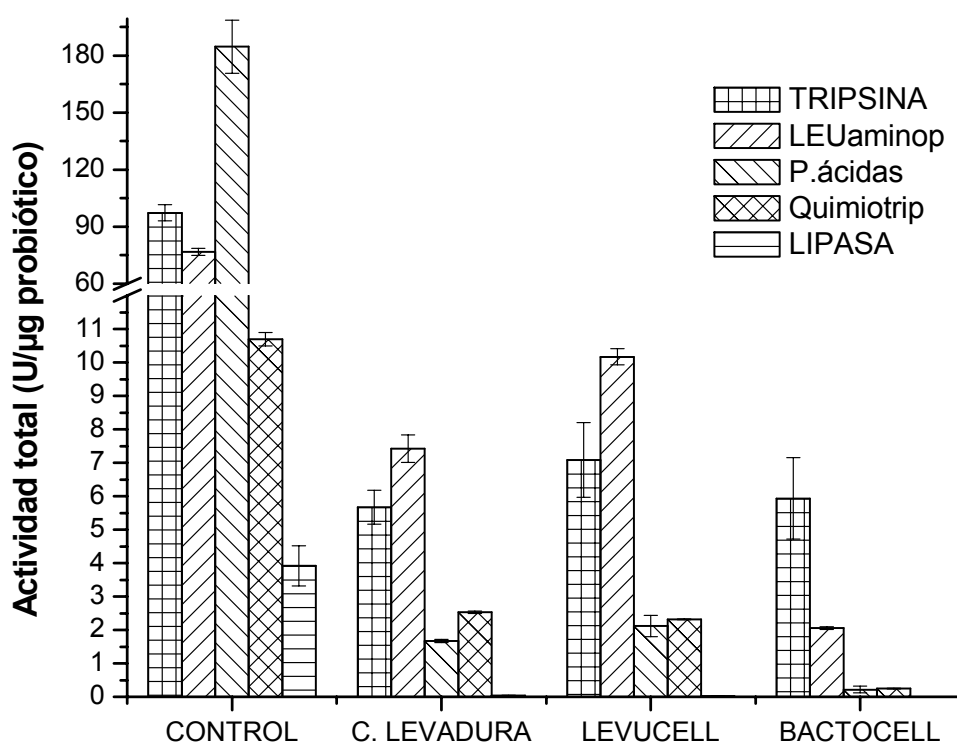


Figura 46. Actividad enzimática en los probióticos (U/μg de probiótico).

La actividad enzimática cuantificada en las larvas alimentadas con los diferentes probióticos presentó la misma tendencia que la actividad cuantificada en

el bioensayo. Se observaron patrones similares, principalmente en los estadios en donde se realizaron cambios morfológicos importantes, cambios en el alimento o en estadios posteriores al proceso metamórfico.

En el caso de la tripsina, la actividad total se incrementó con el desarrollo en todos los tratamientos experimentales. La actividad se mantuvo con ligeras fluctuaciones en los primeros días, incrementándose de manera abrupta a partir de los 16 DDE y llegando a un primer punto máximo a los 26 DDE para los lotes control (23.12 ± 5.06 U/larva), C. levadura (23.43 ± 4.81 U/larva) y BACTOCELL (29.50 ± 6.91 U/larva). En los organismos con suministro del probiótico LEVUCCELL, el pico se desplazó a los 31 DDE (28.37 ± 3.38 U/larva). A partir de este punto los organismos del tratamiento control se mantuvieron prácticamente sin cambios hasta los 46 DDE, mientras que en el resto de los tratamientos experimentales la actividad aumentó hasta esa fecha. A pesar de este despunte en la actividad enzimática, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos (Fig. 47A).

Una alta actividad específica de tripsina se observó desde el primer día después de la eclosión (46.04 ± 2.013 U/ μ g P). Posteriormente, la actividad descendió, en los períodos que corresponden a la apertura de la boca y al inicio de la alimentación exógena, alcanzando un pico máximo a los 6 DDE en todos los tratamientos (Control, C. levadura, LEVUCCELL, BACTOCELL, con valores de 36.31 ± 2.78 , 43.83 ± 7.63 , 47.47 ± 11.89 y 50.55 ± 2.18 U/ μ g P, respectivamente). Ulteriormente, la actividad tendió a descender y a los 11 DDE se observaron diferencias significativamente mayores entre el tratamiento BACTOCELL ($19.0 \pm$

3.44 U/ μ g P) y los tratamientos Control (7.60 ± 0.48 U/ μ g P) y C. levadura (7.25 ± 0.19 U/ μ g P). De la misma manera, a los 16 DDE se encontraron diferencias significativas entre el tratamiento Control (3.41 ± 0.33 U/ μ g P) con relación a los tratamientos C. levadura (2.59 ± 0.19 U/ μ g P) y LEVUCCELL (2.48 ± 0.28 U/ μ g P). Así mismo, este último tratamiento fue significativamente diferente a BACTOCELL (3.19 ± 0.19 U/ μ g P). A los 21 DDE se presentó un pequeño incremento en la actividad específica de la tripsina, este incremento, al igual que en el experimento anterior, coincidió con el cambio total de la alimentación de rotíferos a nauplios de *Artemia*. A partir de esta fecha la actividad tendió a descender, registrándose nuevamente diferencias significativamente mayores a los 26 DDE, en el tratamiento BACTOCELL (3.27 ± 0.10 U/ μ g P) en comparación con los tratamientos Control (1.21 ± 0.11 U/ μ g P) y el C. levadura (1.25 ± 0.06 U/ μ g P) (Fig. 47B).

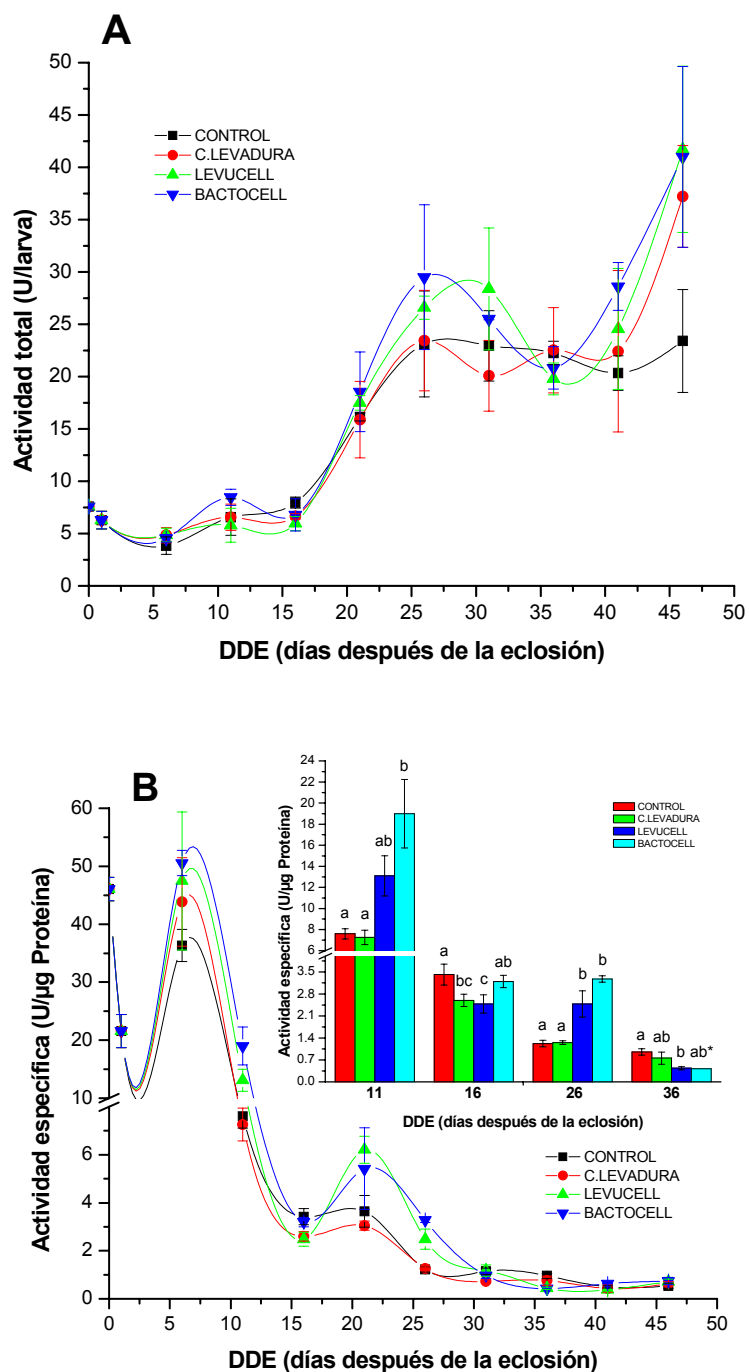


Figura 47. A) Actividad total de tripsina y B) Actividad específica de tripsina durante el desarrollo de las larvas de *P. californicus*, con el suministro de diferentes probióticos. Media $\pm$ D.E. (n=3).

* n=1.

La actividad total de la quimotripsina se pudo detectar desde el primer DDE (0.31 ± 0.02 U/larva). Actividad que descendió en todos los tratamientos a los 6 DDE, observándose diferencias significativas entre los tratamientos *C. levadura* (0.11 ± 0.01 U/larva) y el Control ($0.08 \pm .008$ U/larva). A partir de esta fecha, la actividad tendió a incrementarse con el desarrollo, encontrándose nuevamente diferencias significativas a los 26 DDE, entre los tratamientos LEVUCCELL (1.36 ± 0.04 U/larva) y Control (0.60 ± 0.05 U/larva). A los 41 DDE, la actividad se incrementó de manera abrupta, llegando a sus valores más altos al final del bioensayo, en donde se hallaron diferencias significativas entre el tratamiento Control (6.7 ± 0.67 U/larva) y los tratamientos *C. levadura* (12.62 ± 0.84 U/larva) y BACTOCELL (15.21 ± 2.72 U/larva), asimismo se detectaron diferencias significativas entre el tratamiento LEVUCCELL (8.69 ± 1.84 U/larva) y BACTOCELL (15.21 ± 2.72 U/larva) (Fig. 48A).

En cuanto a la actividad específica de la quimotripsina, tanto en el día de la eclosión como en el primer día de desarrollo, la actividad presentó sus valores máximos (3273.60 ± 251.05 y 3343.34 ± 244.16 U/mg P, respectivamente). Conforme las larvas se desarrollaron, la actividad específica de la enzima descendió y se observaron diferencias significativas entre el Control (323.65 ± 30.84 U/mg P) y los tratamientos BACTOCELL (459.11 ± 87.94 U/mg P) y LEVUCCELL (435.11 ± 61.17 U/mg P), éste último tratamiento también difirió significativamente con el *C. levadura* (339.32 ± 37.51 U/mg P). Hacia el final del bioensayo, la actividad tendió a incrementarse en todos los tratamientos, lográndose identificar diferencias significativas entre el Control (142.51 ± 2.27

U/mg P) y los tratamientos C. levadura (207.92 ± 9.27 U/mg P) y BACTOCELL (247.18 ± 38.56 U/mg P), éste último difiriendo significativamente también con el tratamiento LEVUCCELL (170.18 ± 2.0 U/mg P) (Fig. 48B).

La actividad total de leucina aminopeptidasa se detectó el primer DDE (0.06 ± 0.01 U/larva) y en todos los grupos se incrementó con el desarrollo. A los 11 DDE, LEVUCCELL presentó los valores de actividad más bajos (0.73 ± 0.20 U/larva), siendo significativamente diferente de los tratamientos Control (1.55 ± 0.23 U/larva) y C. levadura (1.45 ± 0.11 U/larva). A los 21 DDE, el control resultó significativamente diferente al resto de los lotes experimentales, con una mayor actividad (5.43 ± 0.51 U/larva). Posteriormente, se presentaron dos descensos en la actividad en todos los grupos, los cuales concuerdan con eventos morfológicos importantes. El primero a los 26 DDE, coincidió con el inicio de la metamorfosis. En este caso el tratamiento Control presentó la menor actividad (3.77 ± 0.15 U/larva), siendo diferente significativamente de los tratamientos C. Levadura (7.49 ± 1.86 U/larva) y LEVUCCELL (7.79 ± 0.47 U/larva). El segundo descenso se presentó a los 36 DDE, coincidiendo con la elongación de las glándulas digestivas y la regionalización del estómago (Fig. 49A).

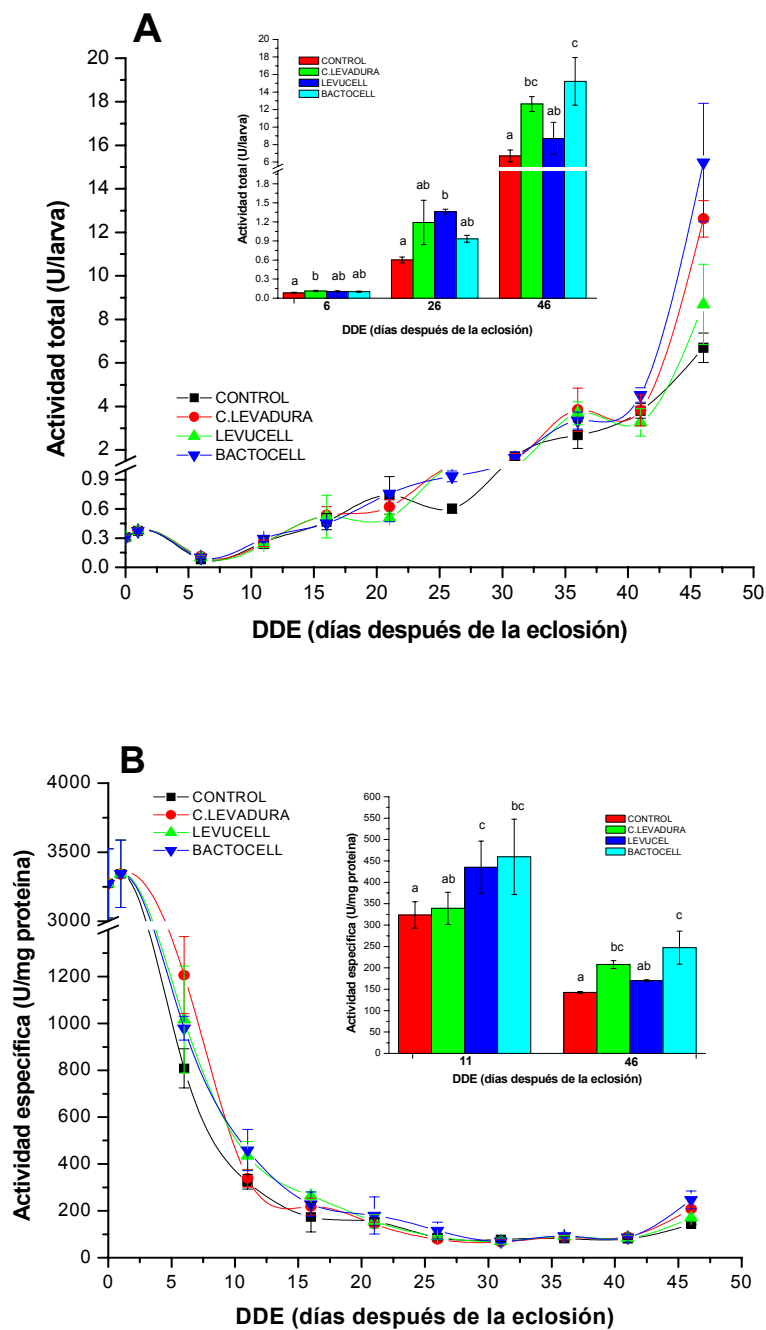


Figura 48. A) Actividad total de quimotripsina y B) Actividad específica de quimotripsina durante el desarrollo de las larvas de *P. californicus*, con el suministro de diferentes probióticos. Media $\pm$ D.E. (n=3).

Las larvas de *P. californicus* eclosionan con un nivel bajo en la actividad específica de la leucina aminopeptidasa (524.48 ± 61.81 U/mg P). A los 6 DDE esta actividad se incrementó y se mantuvo con ligeras oscilaciones durante los primeros 20 días de desarrollo. Una vez que inició el proceso de la metamorfosis (26 DDE), la actividad descendió y se mantuvo baja durante toda esta etapa de cambios morfológicos drásticos. Una vez que se formó el estómago comenzó a registrarse la actividad de proteasas ácidas (41 DDE), la actividad específica de la leucina aminopeptidasa volvió a incrementarse. Este comportamiento se presentó en todos los tratamientos. En este caso se observó que a los 16 DDE el Control (1527 ± 242.64 U/mg P) presentó una actividad significativamente mayor, en comparación con el tratamiento de LEVUCCELL (956.23 ± 71.88 U/mg P) (Fig. 49B).

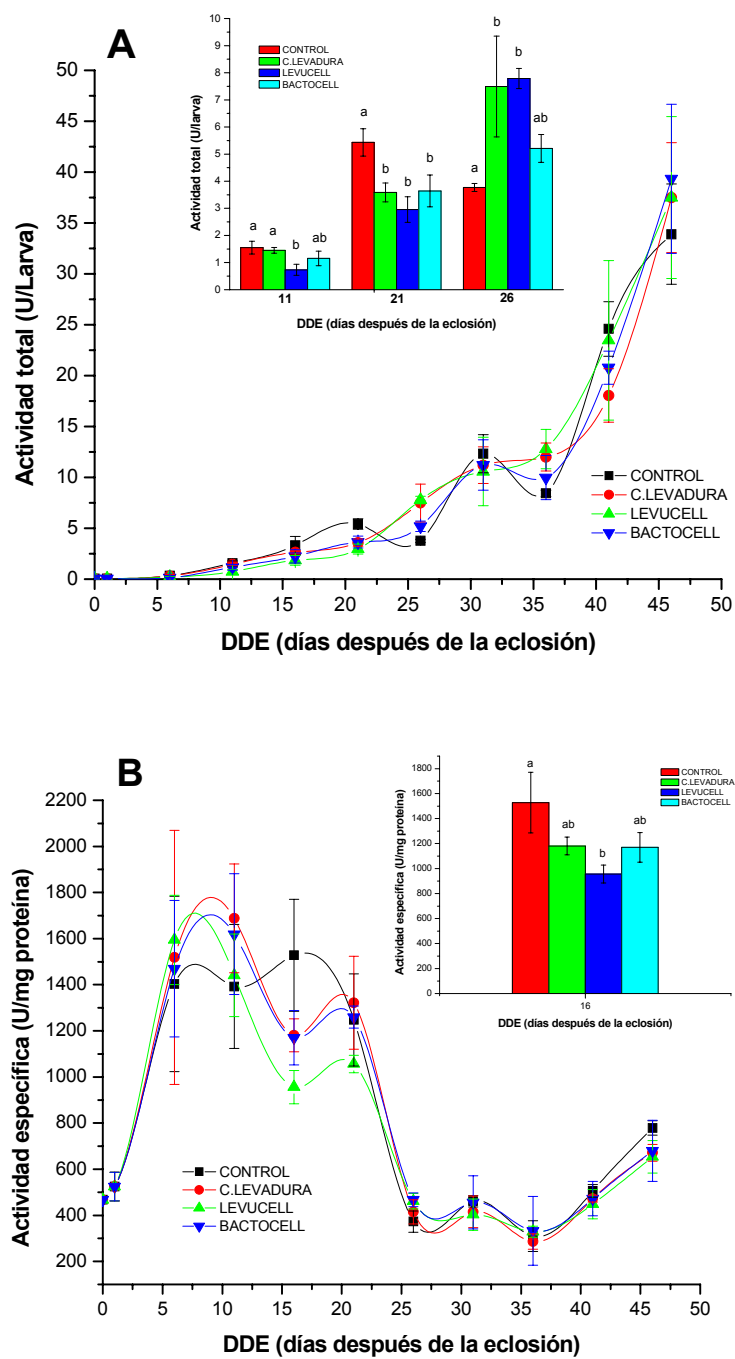


Figura 49. A) Actividad total de leucina aminopeptidasa y B) Actividad específica de leucina aminopeptidasa durante el desarrollo de las larvas de *P. californicus*, con el suministro de diferentes probióticos. Media $\pm$ D.E. (n=3).

La actividad proteolítica ácida total fue detectada 41 DDE, 10 días después de que las glándulas digestivas iniciaran su diferenciación. Una vez que concluyó la regionalización del estómago y las glándulas digestivas se observaron completamente formadas (46 DDE), se detectó una actividad significativamente mayor en el tratamiento BACTOCELL (15.23 ± 1.12 U/larva), en comparación con los otros tres tratamientos (Control, C. levadura y LEVUCCELL, 5.80 ± 1.34 , 9.06 ± 0.82 y $6.69 \pm 2.1.2$ U/larva, respectivamente) (Fig. 50A).

Se observó que la actividad proteolítica ácida específica siguió la misma tendencia que la actividad total. Se encontró una actividad significativamente mayor a los 46 DDE en BACTOCELL (247.72 ± 12.52 U/mg P), en contraste con los otros tres tratamientos (Control, C. levadura y LEVUCCELL, 123.24 ± 25.84 , 149.51 ± 16.9 y 129.46 ± 15.74 U/larva, respectivamente) (Fig. 50B).

Bajo las condiciones ensayadas, la actividad proteolítica alcalina no se pudo cuantificar adecuadamente con la técnica de Sarath et al. (1989). Por lo que se hace necesario buscar un método lo suficientemente sensible, para el tipo de actividad que se presenta durante el desarrollo de las larvas de *P. californicus*.

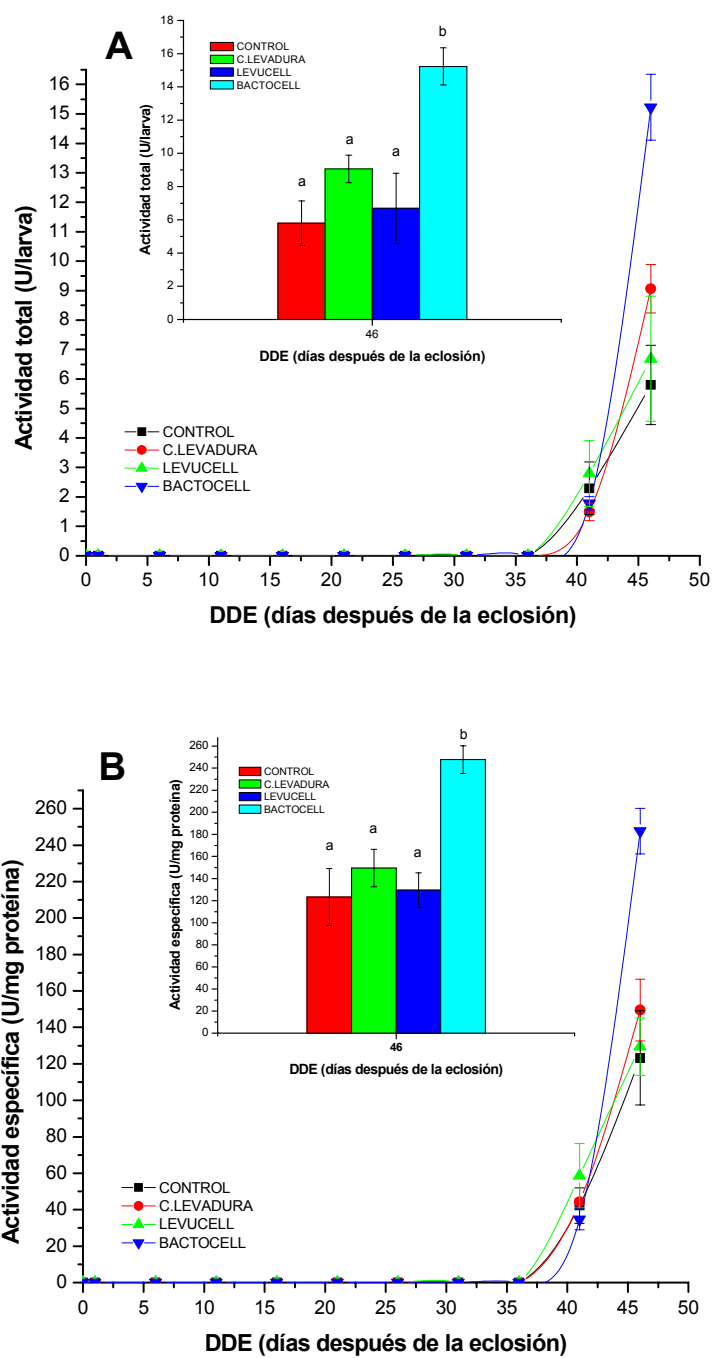


Figura 50. A) Actividad proteolítica ácida total y B) Actividad proteolítica ácida específica, durante el desarrollo de las larvas de *P. californicus*, con el suministro de diferentes probióticos. Media $\pm$ D.E. (n=3).

Finalmente, no se detectó actividad de lipasa los primeros 6 DDE. Una vez detectada, la actividad se incrementó con el desarrollo de los organismos. Sin embargo, diferencias significativas solo fueron detectadas a los 11 DDE, en donde BACTOCELL presentó menor actividad (0.05 ± 0.01 U/larva) comparado con los tratamientos Control (0.14 ± 0.02 U/larva) y C. levadura (0.13 ± 0.01 U/larva). A los 26 DDE, nuevamente coincidiendo con el inicio de la metamorfosis, se observó que el C. levadura (2.73 ± 0.23 U/larva) presentó actividad significativamente mayor que la encontrada en BACTOCELL (1.39 ± 0.26 U/larva) (Fig. 51A).

La actividad específica de la lipasa registró un incremento significativo a los 11 DDE, alcanzando su punto máximo a los 16 DDE en el lote control (327.54 ± 53.89 U/mg P). Este punto máximo se desplazó a los 21 DDE en los otros tratamientos (C. levadura, LEVUCCELL y BACTOCELL, 314.38 ± 51.58 , 268.64 ± 69.95 y 240.27 ± 28.86 U/mg P, respectivamente). La actividad específica de esta enzima, al igual que la actividad de tripsina, quimotripsina y leucina aminopeptidasa, se mantuvo prácticamente sin cambios durante la fase de metamorfosis; período en el que todas estas enzimas presentaron sus valores de actividad específica más bajos.

La única diferencia encontrada en la evaluación de la actividad específica de la lipasa fue, al igual que en la actividad total a los 11 DDE, observándose la menor actividad en BACTOCELL (122.19 ± 23.25 U/mg P) y difiriendo significativamente de los tratamientos Control (214.39 ± 5.81 U/mg P) y LEVUCCELL (204.48 ± 40.0) (Fig. 51B).

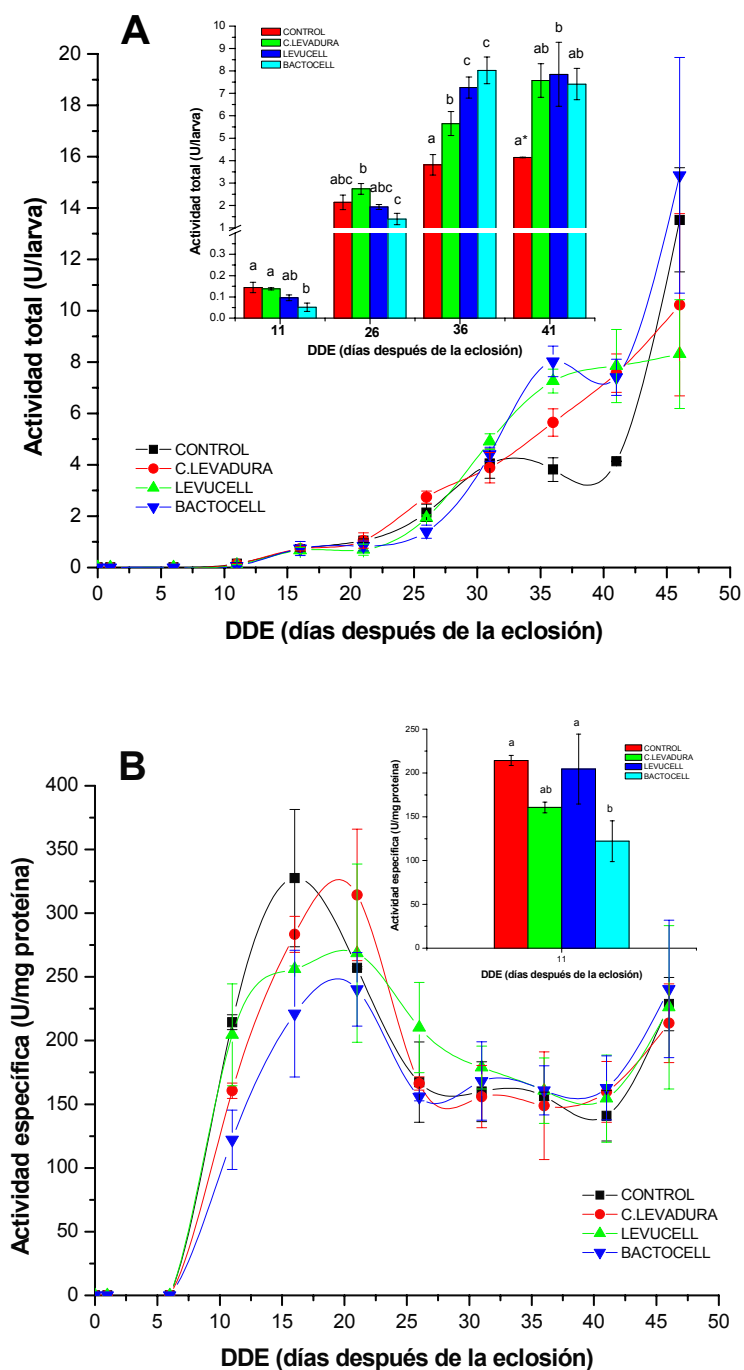


Figura 51. A) Actividad total de lipasa y B) Actividad específica de lipasa durante el desarrollo de las larvas de *P. californicus*, con el suministro de diferentes probióticos. Media $\pm$ D.E. (n=3).

*n=1

III.6.5 Histoquímica

III.6.5.1 Fosfatasa alcalina

Como se observó en el Capítulo anterior, la actividad de la fosfatasa alcalina mantuvo sus valores más altos en los días posteriores al proceso metamórfico. Al cuantificar la actividad enzimática de las diferentes zonas del intestino, por medio de la densidad óptica, no se encontraron diferencias significativas entre los diferentes tratamientos.

Se pudo observar que en esta etapa del desarrollo la parte anterior del intestino presenta mayor actividad en todos los grupos, con la única excepción del grupo Control levadura, en donde las dos zonas intestinales presentaron la misma actividad, a los 41 DDE (Figs. 52 y 53).

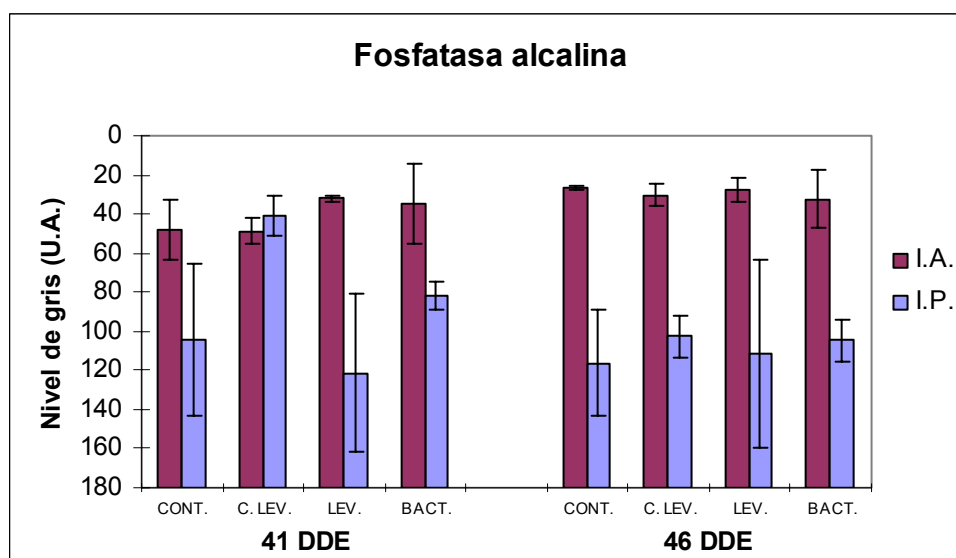


Figura 52. Actividad de la fosfatasa alcalina en el intestino anterior (I.A.) y posterior (I.P.) de *P. californicus* a los 41 y 46 DDE, con el suministro de probióticos. (n = 3).

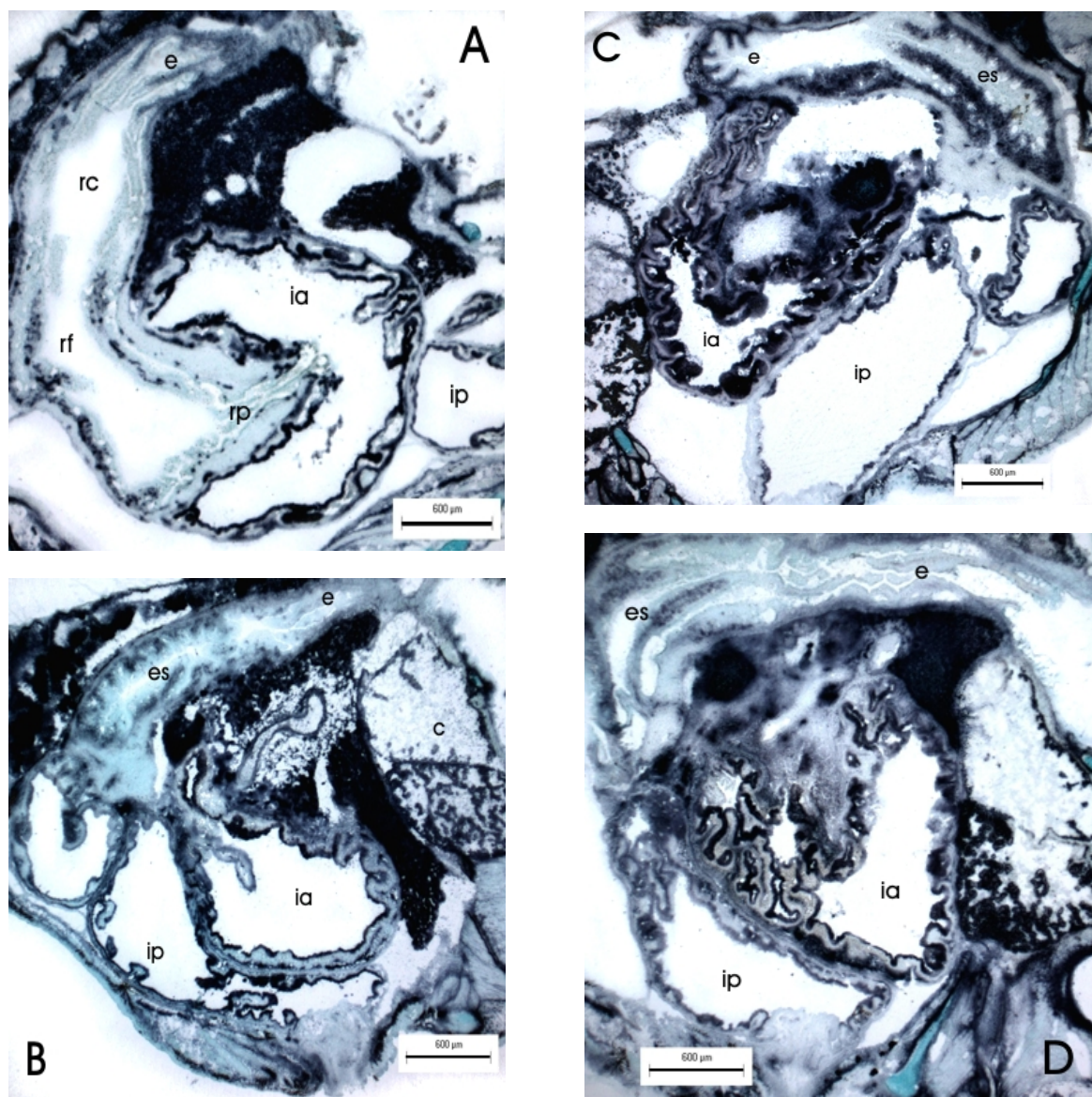


Figura 53. Actividad de la fosfatasa alcalina en cortes sagitales de *P. californicus* a los 41 DDE, con suministro de probióticos. A) Control, B) Control levadura, C) LEVUCCELL, D) BACTOCELL. Esófago (e), región cardiaca (rc), región fúndica (rf), región pilórica (rp), intestino anterior (ia), intestino posterior (ip), corazón (c). Fast green. Barra 600 µm.

III.7 Discusión

El cultivo intensivo de organismos marinos es una práctica cada vez más extendida a nivel mundial. El control de las enfermedades y el desarrollo de dietas adecuadas y rentables para la producción comercial son dos temas de mayor interés, ya que se consideran dos de los factores limitantes más importantes para el éxito de los cultivos.

El uso desmedido de antibióticos para el control de enfermedades es una práctica común, lo que ha provocado la selección artificial de bacterias patógenas, resistentes a los antibióticos usados comúnmente (Verschuere, et al. 2000). Es por esto que el suplemento de probióticos en los cultivos, podría ser una manera alternativa de reducir el uso de antibióticos y simultáneamente evitar el desarrollo de bacterias resistentes a los antibióticos (Nikoskelainen et al. 2001).

Como una opción al uso de antibióticos surgió el desarrollo de aditivos microbianos en el alimento, los cuales pudieran de alguna manera modificar la digestibilidad del alimento, una vez que fuera ingerido por los peces (Lyndon, 1999). Por ejemplo, Schrijver y Ollevier (2000) suministraron *Vibrio proteolitycus* como aditivo al alimento de juveniles de rodaballo y lograron estimular la digestibilidad aparente del nitrógeno, incrementando la degradación de la proteína en el intestino proximal. Existen casos en donde se han empleado los probióticos como aditivos en el alimento, donde se ha logrado aumentar el porcentaje de supervivencia y/o tamaño de los organismos. Por ejemplo, en los cultivos del rodaballo (*S. maximus*) (Gatesoupe, 1991), en el bacalao (*G. morhua*) (Gildberg et al. 1997), la lobina (*D. labrax*) (Péres et al. 1997), el bagre de canal (*Ictalurus*

punctatus) (Queiroz y Boid, 1998) y en el abadejo (*Pollachius pollachius*) (Gatesoupe 2002), entre otros. Diversos son los trabajos en donde la inclusión de ciertos probióticos en la dieta aumenta la actividad enzimática digestiva del hospedero, incrementando con esto la digestibilidad de ciertos componentes de la dieta, sin alterar la formulación de la misma (Lyndon 1999).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo, empleando dos probióticos comerciales como estimuladores de la maduración del sistema digestivo de *Paralichthys californicus*, revelan que el efecto de estos probióticos no se manifestó en ninguna de las variables evaluadas (pigmentación, morfología, actividad enzimática e histoquímica), por lo menos durante las primeras etapas de desarrollo, es decir, no antes de que las larvas completen la metamorfosis y/o cuenten con un estómago diferenciado. Estudios realizados con larvas de *P. olivaceus* demuestran que la diferenciación del estómago es parte esencial del desarrollo, ya que provee a los organismos de los mecanismos de defensa no inmunológicos (Kim et al. 2004).

Existen diferentes explicaciones para tratar de entender los resultados obtenidos. La primera podría ser que el establecimiento de los probióticos en el intestino de *P. californicus* requiera de más días de exposición que permitan la retención y la colonización del intestino, o que, bajo las condiciones de cultivo que se establecieron, los probióticos no tuvieron efecto, debido a que las respuestas generadas por éstos, generalmente se obtienen bajo situaciones de estrés. Otra razón podría ser que, debido a los constantes cambios morfológicos y funcionales en el sistema digestivo, previos a la culminación de la metamorfosis (recambios

del epitelio intestinal, variación de pH en el lumen intestinal, etc.), los probióticos no hubieran podido adherirse a la superficie intestinal. Finalmente, una tercera explicación pudiera ser que los probióticos empleados requieran de un pH intestinal determinado (ácido) para poder establecerse. Esta suposición se basa principalmente en el hecho que el efecto en el aumento de la actividad de algunas enzimas, se pudo medir únicamente después de la diferenciación total del sistema digestivo y del establecimiento del proceso de secreción de enzimas digestivas proteolíticas ácidas.

El efecto de los probióticos en los cultivos piscícolas se ha investigado principalmente a nivel enzimático, basándose en el cambio de actividad de diferentes enzimas en el sistema digestivo. Diversos trabajos han demostrado el efecto que producen algunas especies de levadura en la maduración del sistema digestivo, tomando en cuenta que estos microorganismos poseen una gran capacidad de adhesión y colonización del intestino de los peces (Gatesoupe, 1999).

En el caso de levaduras empleadas como probióticos, Waché et al. (2006) observaron que *S. cerevisiae* var. *boulardii* acelera la maduración intestinal y pancreática a los 10 días de iniciar el tratamiento en los alevines de la trucha arcoiris. *S. cerevisiae* contiene varios componentes inmunoestimulantes como los β -glucanos, ácidos nucleicos y oligosacáridos de manosa y se ha comprobado que estas levaduras junto con el probiótico comercial Grobiotic™ AE, promueven el crecimiento y la respuesta inmunológica en un híbrido de lobina (*Morone chrysops*

X *M. saxatilis*) (Li y Gatlin III, 2004). De la misma manera, Tovar et al. (2004) reportan el aumento en actividad de algunas enzimas pancreáticas a los 26 días de iniciar el suministro de *D. hansenii* en juveniles de cabrilla arenosa (*Paralabrax maculatofasciatus*), tomando en cuenta que esta última especie tiene un período de desarrollo larvario mas largo. Otras pruebas han demostrado que el suplemento con *S. cerevisiae* a dietas con 40% de contenido proteico, produce las mejores tasas de crecimiento específico y de conversión alimenticia en la tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*), comparadas con dietas sin el suplemento de levaduras, lo que indica que el suplemento probiótico mejora la utilización del alimento, optimizando el uso de la proteína para el crecimiento (Lara-Flores et al. 2003).

Al analizar los resultados obtenidos en los análisis enzimáticos, podemos observar que LEVUCCELL únicamente promueve un incremento (sin efectos significativos) en la actividad total de la tripsina a los 46 DDE, así como un incremento en la actividad específica a los 26 DDE. Estos resultados difieren de los obtenidos por Tovar et al. (2002) en *D. labrax*, donde esta levadura produce un decremento en la actividad de la tripsina, que se interpretó como una disminución en la maduración del páncreas. Sin embargo, Waché et al. (2006) registraron incrementos en la actividad de la fosfatasa alcalina, la γ -glutamyl transpeptidasa y la leucina aminopeptidasa N, con el suministro de este probiótico, lo que sugiere la maduración temprana del sistema digestivo de la trucha arcoiris, cultivada entre 11 y 11.5 °C. Esta temperatura contribuyó de manera notable en la maduración prematura del sistema digestivo, dado que a temperaturas más bajas no se

observó ese efecto, por lo que se podría inferir que el efecto del probiótico en el organismo cultivado no solo dependerá de su capacidad de fijación al intestino, sino también de que el organismo se encuentre en las condiciones ambientales adecuadas.

Tovar et al. (2004) evaluaron otra especie de levadura (*D. hansenii*) en *D. labrax*, con buenos resultados en cuanto a la maduración temprana del sistema digestivo; es decir, registraron un incremento en la actividad y la concentración del ARNm para tripsina y lipasa; también registraron un aumento en la actividad de la fosfatasa alcalina, la aminopeptidasa N y la maltasa, así mismo se redujo el porcentaje de malformación de las larvas. En el presente experimento se observó una alta actividad específica de la lipasa los primeros 20 días de desarrollo. Posteriormente, la actividad específica se mantuvo constante durante el período metamórfico. Esta alta actividad específica de la lipasa podría indicar que las larvas del lenguado de California incrementan el uso de lípidos durante esta etapa para obtener energía (Gawlicka et al. 2000) y reservas que utilizarán durante la metamorfosis, período en el cual, la actividad específica de esta enzima se mantiene constante, lo que probablemente indica un descenso en los requerimientos de lípidos (Gawlicka, et al. 1995). Este mismo patrón en la actividad específica de la lipasa fue observado en *P. olivaceus*, en donde se presentó un incremento en la actividad de la enzima a partir de los 10 DDE, manteniéndose en niveles altos, antes y durante el proceso metamórfico y descendiendo durante la fase de asentamiento. Este comportamiento en la actividad de la lipasa fue relacionado al metabolismo de las reservas de lípidos

acumuladas antes de la metamorfosis y que son movilizadas durante este proceso (Bolosina et al. 2006). Una vez que se completó la metamorfosis, se observó que la actividad específica de la lipasa tendió a incrementarse, patrón de actividad que no fue modificado por la presencia de los probióticos.

En este trabajo se observó que LEVUCCELL no produjo ningún efecto significativo en la maduración del sistema digestivo de *P. californicus*, debido posiblemente a que el tiempo que fue suministrado a las larvas, no fue suficiente para permitir la colonización del intestino, o que la actividad enzimática intrínseca del probiótico no sea la adecuada para incrementar o promover la actividad enzimática natural del sistema digestivo de las larvas.

El uso de cepas bacterianas como probióticos también se ha difundido ampliamente, destacándose el empleo de bacterias ácido lácticas, las cuales, además de tener la capacidad de suprimir el crecimiento de algunas bacterias patógenas, se adhieren a la mucosa intestinal y se multiplican fácilmente.

La importancia de la colonización bacteriana del intestino radica en que la producción de metabolitos solo se realiza durante la fase estacionaria (Vine et al. 2006), fase en la que se producen diferentes clases de péptidos con actividad promotora del crecimiento en diferentes especies de bacterias (Lilly y Stillwell, 1965). El rápido recambio celular que se realiza en el epitelio intestinal, por la fricción del alimento durante su paso por el tracto digestivo, disminuye las posibilidades de anclaje de los microorganismos (Tovar et al. 2000). Por ejemplo, en experimentos realizados en las larvas de rodaballo, Nicolas et al. (1989) observaron que las condiciones del estómago de las larvas seleccionan de

manera específica su contenido bacteriano, lisando a la mayoría de las bacterias durante su paso por el sistema digestivo. En la trucha arcoiris alimentada con altas dosis de *Carnobacterium* sp. (5×10^7 células/g de dieta), se observó que el mayor porcentaje de colonización bacteriana se obtuvo después de 28 días de tratamiento, pero disminuyó al retirar el suministro del probiótico (Robertson et al. 2000). El estudio con diferentes especies de bacterias ácido lácticas, comúnmente usadas como probióticos en humanos, demostró que *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103 y *L. bulgaricus*, presentan una alta resistencia a la acidez de la bilis, una buena adhesión y penetración de la mucosa y lograron suprimir el crecimiento de algunos patógenos en la trucha arcoiris (*Oncorhynchus mikiss*). Estas características hacen que estas bacterias sean excelentes candidatos para ser empleadas como probióticos en el cultivo de larvas de peces marinos (Nikoskelainen et al. 2001).

En este estudio, la única diferencia registrada en la morfología del sistema digestivo, fue el retraso en la aparición de los primordios glandulares en las larvas a las cuales se les suministró el probiótico BACTOCELL. Estos esbozos comenzaron a observarse a los 31 días de desarrollo en los tratamientos Control, Control levadura y LEVUCCELL, mientras que en el grupo alimentado con BACTOCELL, se observaron solo hasta los 36 DDE. A partir de esta fecha las glándulas digestivas siguieron desarrollándose normalmente en todos los grupos, por lo que al final del experimento todas las larvas presentaron un estómago bien diferenciado y aparentemente funcional, con base en la actividad proteolítica ácida registrada. Curiosamente, el grupo que presentó la mayor actividad proteolítica

ácida fue el de BACTOCELL, sin poder atribuir esta alta actividad al hecho que los organismos estuvieran más desarrollados, ya que en comparación con los otros grupos experimentales, no se encontraron diferencias en la longitud estándar. Estos resultados no concuerdan con lo observado por Gatesoupe (2002), en donde BACTOCELL estimuló el crecimiento en el abadejo (*P. pollachius*). Sin embargo, el autor propone que más que un efecto como promotor de crecimiento, el probiótico estimula el consumo del alimento y por lo tanto promueve un mayor crecimiento.

Sin embargo, el uso de BACTOCELL como probiótico confirió un efecto positivo en la maduración del sistema digestivo de *P. californicus*, dado que se determinó un incremento en la actividad total de la tripsina, así como una mayor actividad específica, en comparación con los tratamientos Control y C. levadura, a los 11 DDE. Asimismo, a los 26 DEE este tratamiento presenta mayor actividad específica de la tripsina, comparada con la actividad desarrollada por LEVUCCELL. En ambas fechas, como se mencionó anteriormente, se llevan a cabo procesos morfológicos importantes, tales como la formación de la primera asa intestinal y el inicio de la metamorfosis, respectivamente. De la misma forma, BACTOCELL aumentó la actividad total de la quimotripsina y de la lipasa, la mayor diferencia en la actividad de esta última enzima se observó a los 36 DDE, con una tendencia a incrementar a los 46 DDE. Otro efecto importante de este probiótico fue el aumento significativo de las actividades total y específica de las proteasas ácidas, a los 46 DDE, lo que podría indicar que BACTOCELL tiene un efecto positivo en la función secretora de las glándulas digestivas, implicando al mismo tiempo una

maduración temprana del estómago de las larvas, en comparación con los tratamientos control y LEVUCCELL.

El probiótico BACTOCELL se ha empleado con otras especies de peces en donde, además de promover el crecimiento de los organismos, también se ha visto que posee propiedades antibióticas (Gatesoupe, 2002). Así mismo se ha registrado que puede incrementar la tasa de crecimiento específica y la densidad máxima del cultivo de rotíferos (Planas et al. 2004). Estas propiedades pudieron beneficiar a las larvas de los lenguados alimentadas con este probiótico, ya que probablemente se les suministró un alimento de mejor calidad, con menos carga microbiana patógena. Así mismo, aunque no se obtuvieron diferencias significativas, este tratamiento experimental tendió a presentar el mayor porcentaje de supervivencia, así como el mayor porcentaje de larvas con pigmentación normal.

A nivel histoquímico no se detectó ninguna diferencia en la actividad de la fosfatasa alcalina entre los grupos experimentales, por lo que podríamos afirmar que los probióticos utilizados no ejercen cambios en el proceso de transporte de nutrientes en el intestino, al menos en la etapa de desarrollo larvario y bajo las condiciones en las que se desarrolló el experimento. La actividad de esta enzima, al igual que en el capítulo II, es mayor en la región anterior de intestino, lo que indica la importancia de esta región en el transporte de nutrientes hacia el interior del epitelio (Gawlicka et al. 1995). Esta región intestinal se ha identificado como el sitio de mayor absorción de aminoácidos y es posible que la asimilación de los nutrientes cambie en las diferentes partes del tracto digestivo (Dabrowski y

Dabrowska, 1981), lo que explicaría en parte, la presencia regionalizada de la fosfatasa alcalina en el intestino.

Diversos han sido los trabajos que involucran el uso de bacterias para aumentar la supervivencia de los peces, así como para aumentar su resistencia a enfermedades. Es así que se reportó que *Carnobacterium divergens* fue capaz de desplazar a otras bacterias en el intestino de *G. morhua*, con la disminución de la mortalidad (Gildberg et al. 1997). El enriquecimiento de los rotíferos con esferas de bacterias de las especies *Lactobacillus plantarum*, *L. helveticus* y *Streptococcus thermophilus*, incrementan el peso de juveniles del rodaballo (*S. maximus*) (Gatesoupe, 1991). Así mismo, los inóculos de diferentes especies de *Bacillus* mejoraron significativamente la supervivencia y producción del bagre de canal (*I. punctatus*) (Queiroz y Boyd, 1998). Truchas arcoiris expuestas a *Pseudomonas fluorescens* AH2, disminuyeron hasta un 46% la mortalidad acumulada provocada por *Vibrio anguillarum*. Esta bacteria tiene un crecimiento muy rápido, lo que le permite competir por nutrientes, ocupar los sitios disponibles para la colonización, además de que secreta sustancias antibacteriales (Gram et al. 1999).

Se ha observado que la microflora que se establece en la fase larvaria de los peces será la flora que persistirá en el estadio juvenil o después de la metamorfosis. Esta microflora se establecerá desde el momento de la eclosión, dada la necesidad de las larvas de tomar agua para osmoregular (Schreiber, 2001). La microflora intestinal entrante proveniente del agua, alimento etc. deberá adaptarse a la variación en la composición de nutrientes, el pH, condiciones

anóxicas, concentración de sales biliares, enzimas digestivas y al sistema inmune del organismo (Hansen y Olafsen, 1999). Esto acelerará el establecimiento de nuevas comunidades bacterianas en el intestino de las larvas.

El establecimiento de la microbiota final en el estómago puede ser complementaria a la diferenciación del sistema digestivo que, bajo condiciones normales, sirve como una barrera contra patógenos (Verschuere et al. 2000). Basándonos en esta información, resulta importante considerar estos aspectos a la hora de seleccionar un probiótico, tomando como base el efecto que se desea producir.

Los resultados obtenidos en este trabajo, sugieren que el efecto de los probióticos en la maduración del sistema digestivo de *P. californicus*, no puede ser valorado en las etapas tempranas de su desarrollo, debido posiblemente a los múltiples cambios que presenta su sistema digestivo antes y después de la metamorfosis, procesos que posiblemente no permiten una adecuada adhesión de las células probióticas y por lo tanto, enmascaran el efecto que se pudiera producir. Estas observaciones podríamos apoyarlas tomando en consideración que las diferencias significativas obtenidas en la evaluación de la actividad enzimática, ocurrieron principalmente en los días en que las larvas presentaron cambios morfológicos internos importantes, como son la diferenciación de las dos regiones intestinales a los 11 DDE, seguida por el inicio de la migración ocular y por lo tanto la reorganización interna de los órganos a los 26 DDE y finalmente la aparición de las glándulas gástricas y la formación y regionalización del estómago funcional a los 40 DDE. Posterior a todos estos cambios, se puede observar que

las enzimas digestivas comenzaron a presentar patrones diferentes entre el control y los grupos experimentales restantes, con la característica principal de que todas las enzimas estudiadas, independientemente de la presencia o ausencia de los probióticos, tienden a aumentar su actividad una vez que se completado la transformación del sistema digestivo.

El suministro de probióticos como moduladores de la maduración del sistema digestivo de larvas de peces se encuentra en sus primeras etapas de investigación. Poco se conoce sobre el modo exacto en que los probióticos producen sus efectos. En muchas ocasiones no se ha podido aclarar si el efecto producido por el probiótico se debe atribuir a la supresión de patógenos o si es el resultado de un efecto nutricional del mismo microorganismo (Verschuere et al. 2000), por lo que se hace necesario desarrollar nuevas técnicas que permitan identificar su sitio de colonización, así como su acción *in situ*.

Una de las metas del uso de probióticos como aditivos en el alimento de los peces, es que estos microorganismos incrementaran la disponibilidad de ciertos nutrientes (e.g., carbohidratos), durante su tránsito por el tracto digestivo (Lyndon, 1999). Esta capacidad de los probióticos permitiría formular dietas adecuadas que contengan microorganismos seleccionados para actuar sobre los componentes básicos de la dieta, optimizando la disponibilidad de nutrientes de acuerdo a las necesidades de cada especie. De la misma manera, se podrían integrar nuevos ingredientes (más económicos) en la elaboración de dietas, los cuales, actualmente no se utilizan debido a su baja digestibilidad. Esta práctica podría, en el corto plazo, reducir los gastos en la producción de alimento y en la producción

de organismos cultivados. Así mismo, si el efecto producido por los probióticos diera como resultado una mayor producción de enzimas digestivas en las etapas tempranas del desarrollo, se podrían crear protocolos de destete que reduzcan el tiempo de suministro de alimento vivo, lográndose nuevamente con esto, reducir los gastos de alimentación en los cultivos larvarios de diferentes especies de peces marinos.

Tomando en cuenta que los probióticos utilizados en este trabajo, aparentemente, comienzan a tener un efecto significativo en la actividad de las enzimas digestivas, una vez que se ha formado el sistema digestivo. Se sugiere realizar nuevas pruebas, suministrando estos microorganismos a partir de los 36 DDE, con la finalidad de confirmar sus propiedades sobre la capacidad digestiva de las larvas y la posible anticipación del destete.

4. CAPITULO IV

IV.1 Conclusiones generales

1.- La ontogenia del sistema digestivo de la especie *Paralichthys californicus* presenta procesos similares a los reportados en otras especies de lenguados, la culminación del desarrollo de un sistema digestivo funcional ocurre aproximadamente a los 44 DDE.

2.- Las larvas de *P. californicus* eclosionan con un sistema digestivo lo suficientemente efectivo para la digestión y asimilación de nutrientes de diferentes orígenes, provenientes del alimento vivo suministrado.

3.- Se pueden distinguir claramente tres fases importantes en el desarrollo del sistema digestivo de *P. californicus*: 1) Formación de la primera asa intestinal, con una primera regionalización del tubo digestivo (4.16 ± 0.5 mm LE); 2) Inicio de la formación del estómago, concomitante con el reacomodo de los órganos internos (7.5 ± 0.45 mm LE); y 3) formación y regionalización del estómago y establecimiento de zonas de absorción de nutrientes, a lo largo del intestino (10.2 ± 0.62 mm LE).

4.- Entre los 20 y 30 DDE se presentan los cambios más sobresalientes en cuanto a la regionalización de los procesos digestivos y la absorción de nutrientes en la especie, identificados por los cambios en la actividad enzimáticas de las

fosfatasas, a lo largo del intestino, así como por el inicio de la formación de las glándulas gástricas.

5.- Tomando como base el desarrollo del sistema digestivo, se debe considerar que el suministro de dietas formuladas para esta especie, no es recomendable antes del día 44 DE, ya que es en este momento cuando se desarrolla por completo su sistema digestivo y por lo cual es más probable que puedan aceptar y digerir con mayor eficiencia dietas microparticuladas, balanceadas de acuerdo a su capacidad digestiva y hábitos alimentarios.

6.- Las larvas de lenguado son capaces de digerir y asimilar lípidos desde los primeros días de desarrollo, además de la gran capacidad que poseen para asimilar proteínas.

7.- El uso de probióticos como promotores de la maduración del sistema digestivo de *P. californicus*, no es recomendable antes de que los organismos completen la formación de su sistema digestivo, ya que posiblemente los profusos cambios morfológicos y por lo tanto los sucesivos recambios celulares, impidan el establecimiento y colonización de las células probióticas.

8.- Aparentemente BACTOCELL podría incrementar la actividad de las enzimas digestivas una vez que se forma el estómago, estableciendo mejores condiciones para la asimilación de dietas formuladas.

IV.2 Recomendaciones

- 1.- Estandarizar un método lo suficientemente sensible, que permita cuantificar la actividad proteolítica alcalina durante el desarrollo de las larvas de *P. californicus*.
- 2.- Estandarizar las técnicas histoquímicas que permitan observar los sitios de absorción de otros nutrientes (lípidos y carbohidratos) además de proteínas, verificando su evolución y regionalización en el sistema digestivo a través de la ontogenia.
3. – Estandarizar técnicas histoenzimáticas que permitan cuantificar la presencia de tripsina, leucina-aminopeptidasa, lipasa y enzimas citosólicas, que ayuden a comprender mejor la capacidad digestiva de las larvas.
- 4.- Comprobar que los probióticos LEVUCCELL y BACTOCELL efectivamente producen poliaminas que pudieran estimular el crecimiento y la diferenciación celular en el sistema digestivo.
- 5.- Realizar bioensayos suministrando probióticos a organismos con el sistema digestivo diferenciado, para comprobar si el efecto observado en la actividad enzimática durante los últimos días de experimentación, se conserva o se incrementa,

6.- Verificar en que momento los probióticos se establecen y colonizan el intestino de las larvas en desarrollo, utilizando técnicas de marcaje *in situ*.

5. ANEXO

A) FOSFATASA ALCALINA, método de tetrazolium, acoplamiento simultáneo (Wikeley and Goodsell, 1994)

NOTA: Los cortes pueden fijarse con una solución de formol-calcio (Bancroft and Hand, 1987), o usar cortes por congelación no fijados (Van Noorden and Frederiks, 1992)

Sustrato: Uso de guantes, evitar inhalar

5-bromo-4-cloro-3-indolyl-fosfato-p-toluidina	5 mg
Tris buffer 0.1 M, pH 9.4	10 ml
Sal de Nitro B, tetrazolium	6 mg
N, N-dimetilformamida	0.2 ml

Tris buffer 0.1 M, pH 9.4

Solución A: Tris 0.2 M (P.M. 121.0)

Pesar 2.42 g de Tris (hydroxymethyl) aminometano y aforar a 100 ml con agua destilada.

Solución B: HCl 0.2 M (P.M. 36.46)

1.7 ml de ácido, aforar a 100 ml con agua destilada.

Ajustar el pH a 9.4 de la solución A con la solución B.

Disolver el sustrato en dimetilformamida, adicionar el Nitro BT y el buffer, mezclar perfectamente y filtrar. Usar inmediatamente. Proteger de la luz.

Incubación:

Incubar 15 min a T. A.

Tratamiento final:

Decantar el medio de incubación

Lavar con agua destilada

Poner en formaldehído al 4% (opcional) por 2 horas.

Lavar con agua corriente por 5 min.
Contrateñir con Fast Green al 1% por 3 min.
Lavar con agua destilada.
Azular en una solución saturada de carbonato de litio por 15 seg.
Lavar con agua corriente por 5 min.
Secar con papel filtro
Montar con medio Apaty

Resultados:

Los sitios con actividad se tiñen de color negruzco-café. Los núcleos son azules.

B) FOSFATASA ÁCIDA (acoplamiento coloración-AZO) (Wikeley and Goodsell, 1994)

NOTA: Usar cortes por congelación no fijados (Bacroft and Hand, 1987; Van Noorden and Frederiks, 1992)

Sustrato: Uso de guantes

α -naftil fosfato de sodio	10 mg
Buffer acetato 0.1 M, pH 5.0	20 ml
Polyvinilpyrrolidona	1.5 g
Fast Garnet GBC (sal)	20 mg

Buffer acetato 0.1 M, pH 5.0

Solución A: Ácido acético 0.2 M (P.M. 60.0)

Ácido acético glacial 1.2 ml aforar a 100 ml con agua destilada.

Solución B: Acetato de sodio 0.2 M

Acetato de sodio anhidro (P.M. 82) 1.64 g (también se puede utilizar acetato de sodio trihidratado (P.M. 136), aforar a 100 ml con agua destilada.

Mezclar 14.8 ml de la sol. A y 35.2 ml de la sol. B para obtener un pH de 5.0.

Mezclar todo perfectamente hasta disolver y filtrar. Proteger de la luz. Usar en el momento.

Incubación:

Incubar 60 minutos a T. A.

Tratamiento final:

Lavar en agua corriente por 5 min.

Contrateñir con Fast Green al 1%, por 3 min.

Enjugar con agua destilada

Azular en una solución saturada de carbonato de litio por 15 seg.

Lavar en agua corriente por 5 min.

Secar con papel filtro

Montar medio Apathy

Resultados

Los sitios con actividad de fosfatasa ácida se tiñen de color rojizo-café y los núcleos se tiñen de azul.

6. LITERATURA CITADA

- Al-Maghazachi, S. J. y R. Gibson. 1984. The developmental stages of larval turbot, *Scophthalmus maximus* (L.). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 82:35-51 p.
- Alarcón López, F. J. 1997. Procesos digestivos en peces marinos: Caracterización y aplicaciones prácticas. Tesis doctoral. Universidad de Almeria. 322 p.
- Alvial, A. y J. Manríquez. 1999. Diversification of flatfish culture in Chile. *Aquaculture*. 176:65-73 p.
- Appel, W. 1974. Leucine Aminopeptidase determination with L-Leucineamide as substrate. En: H. U. Bergmeyer (ed.). *Methods of Enzymatic Analysis*. Academic Press, New York, 954-958 p.
- Applebaum, S. L. y G. J. Holt. 2003. The digestive protease, chymotrypsin, as an indicator of nutritional condition in larval red drum (*Sciaenops ocellatus*). *Marine Biology*. 142:1159-1167 p.
- Applebaum, S. L., R. Pérez, J. P. Lazo y G. J. Holt. 2001. Characterization of chymotrypsin activity during early ontogeny of larval red drum (*Sciaenops ocellatus*). *Fish Physiology and Biochemistry*. 25:291-300 p.
- Avilés Quevedo, A., U. McGregor, R. Rodríguez, O. Hiraes, M. A. Huerta y M. Lizawa. 1995. *Biología y cultivo de la cabrilla arenera Paralabrax maculatofasciatus* (Steindacher, 1868). INP-CRIP, La Paz-JICA. México, 85 p.
- Baglole, C. J., G. P. Goff y G. M. Wright. 1998. Distribution and ontogeny of digestive enzymes in larval yellowtail and winter flounder. *Journal of Fish Biology*. 53:767-784 p.
- Baglole, C. J., H. M. Murray, G. P. Goff y G. M. Wright. 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 p.
- Bancroft, J. D. 2002. Enzyme histochemistry and its diagnostic applications. En: Bancroft, J. D. y M. Gamble (eds.). *Theory and practice of histological techniques* 5a. ed. Churchill Livingstone, China, 593:620 p.
- Bancroft, J. D. y N. M. Hand. 1987. *Enzyme histochemistry. Microscopy Handbooks* 14. Oxford University Press, Great Britain, 70 p.

- Barrera-Guevara, J. C. M. J. Roman y H. A. Licón. 1994. Desarrollo de la biotecnología para el cultivo de la totoaba. Secretaría de Pesca. Subsecretaría de Fomento y Desarrollo Pesquero, Dirección General de Acuicultura. Sonora, CIDESON, 89 p.
- Bengtson, D. A. 1993. A comprehensive program for the evaluation of artificial diets. *Journal of the World Aquaculture Society*. 24:285-293 p.
- Bengtson, D. A. 1999. Aquaculture of summer flounder (*Paralichthys dentatus*): status of knowledge, current research and future research priorities. *Aquaculture*. 176:39-49 p.
- Benetti, D. 1997. Spawning and larval husbandry of flounder (*Paralichthys woolmani*) and Pacific yellowtail (*Seriola mazatlanica*), new candidate species for aquaculture. *Aquaculture*. 155:307-318 p.
- Berg, L. 1997. Commercial feasibility of semi-intensive larviculture of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Aquaculture*. 155:333-340 p.
- Bisbal, G. A. y D. A. Bengtson. 1995. Development of the digestive tract in larval summer flounder. *Journal of Fish Biology*. 47:277-291 p.
- Bolasina, S., A. Pérez, and Y. Yamashita. 2006. Digestive enzymes activity during ontogenetic development and effect of starvation in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture* 252:503-515 p.
- Bolker, J.A. y C. R. Hill. 2000. Pigmentation development in hatchery-reared flatfishes. *Journal of Fish Biology* 56:1029-1052 p.
- Branker, M. 2000. Enfoque veterinario de la cría del halibut. En: Brown, L. (ed.). *Acuicultura para veterinarios. Producción y clínica de peces*. Acribia, S.A. España, 357-364 p.
- Branson, E. 2000. Anatomía y fisiología básicas. En: L. Brown (ed.). *Acuicultura para veterinarios. Producción y clínica de peces*. Acribia, S.A. España, 1:32 p.
- Buts, J. P., De Keyser, N. y L. De Reademaeker. 1994. *Saccharomyces boulardii* enhances rat intestinal enzyme expression by endoluminal release of polyamines. *Pediatric Research*. 36:522-527 p.
- Cadena-Roa, M. A. y G. L. Roldán. 1994. Desarrollo científico y tecnológico del cultivo de la cabrilla. Convenio SEPESCA/UABCS. Secretaría de Pesca, México, 76 p.
- Calzada, A., A. Medina y L. González de Canales. 1998. Fine structure of the intestine development in cultured sea bream larvae. *Journal of Fish Biology*. 53:340-365 p.

- Cara, J. B., F. J. Moyano, S. Cárdenas, C. Fernández-Díaz y M. Yúfera. 2003. Assessment of digestive enzyme activities during larval development of white bream. *Journal of Fish Biology*. 63:48-58 p.
- Carroll, P. M., W. O. Watanabe y T. M. Losordo. 2005. Pilot production of hatchery-reared summer flounder *Paralichthys dentatus* in a marine recirculating aquaculture system: the effects of ration level on growth, feed conversion, and survival. *Journal of the World Aquaculture Society*. 36:120-128 p.
- Dabrowski, K. y H. Dabrowska. 1981. Digestion of protein by rainbow trout (*Salmo gairdneri* RICH.) and absorption of amino acids within the alimentary tract. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* 69:99-111 p.
- Dabrowski, K. y J. Glogowski. 1977. Studies on the role of exogenous proteolytic enzymes in digestion processes in fish. *Hydrobiologia* 54:129-134 p.
- De Schrijver, R. y F. Ollevier. 2000. Protein digestion in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*) and effects of dietary administration of *Vibrio proteolyticus*. *Aquaculture* 186:107-116 p.
- Dinis, M. T., F. Sores, L. Ribeiro y C. Sarasquete, 1997. Histochemistry of carbohydrates, proteins and lipids during swimbladder development in seabream, *Sparus aurata* and seabass, *Dicentrarchus labrax*. *European journal of histochemistry*. 41:279-284 p.
- Dixon, B. A., R. F. Ramirez y H. Quinn. 2001. Identification of intestinal anaerobic bacteria of cultured foodfish and shrimp for potential use as probiotics. En: C. I. Hendry, G. V. S. M. Wille y P. Sorgeloos (eds.). LARVI'01 - FISH & SHELLFISH LARVICULTURE SYMPOSIUM. European Aquaculture Society, Special publication No. 30, Oostend, 158-161 p.
- Erlanger, B. F., N. Kokowsky y W. Cohen, 1961. The propagation and proprieties of two new chromatogenic substrates of trypsin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 95:271-278 p.
- Estrada, E., L. Peralta y P. Rivas. 1982. Manual de técnicas histológicas. AGT Editor, México, Distrito Federal, 140 p.
- FAO 2004. El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2004.
- Fernández-Díaz, C., M. Yúfera, J. P. Cañavate, F. J. Moyano, F. J. Alarcón y M. Díaz. 2001. Growth and physiological changes during metamorphosis of Senegal sole reared in the laboratory. *Journal of Fish Biology*. 58:1086-1097 p.

- Ferron A. y W. C. Legget. 1994. An appraisal of condition measures for marine larvae. En: J. Blaxter y B. Douglas (eds.). *Advances in marine biology* volume 30. Academic Press Inc., London, 217-303 p.
- Ferraris, R. P., J. D. Tan y M. C. De la Cruz. 1987. Development of the Digestive Tract of Milkfish, *Chanos chanos* (Forsskal): Histology and Histochemistry. *Aquaculture* 61:241-257 p.
- Floyd, A. D. 2002. Quantitative data from microscopic specimens. En: Bancroft, J. D. y M. Gamble (eds.). *Theory and practice of histological techniques* 5a. ed. Churchill Livingstone, China, 729:747 p.
- Gadomski, D. M., S. M. Caddell, L. R. Abbott y T. C. Caro. 1990. Growth and development of larval and juvenile California halibut, *Paralichthys californicus*, reared in the laboratory. En: W. H. Charles (ed.). *The California halibut, Paralichthys californicus, resource and fisheries*. The Resources Agency. Department of Fish and Game. Fish Bulletin 174, State of California, 85-98 p.
- Gatesoupe, F. J. 1990. The continuous feeding of turbot larvae, *Scophthalmus maximus*, and control of the bacterial environment of rotifers. *Aquaculture*. 89:139-148 p.
- Gatesoupe, F. J., 1991. The effect of three strains of lactic bacteria on the production rate of rotifers, *Brachionus plicatilis*, and their dietary value for larval turbot, *Scophthalmus maximus*. *Aquaculture*. 96:335-342 p.
- Gatesoupe, F. J. 1999. The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture*. 180:147-165 p.
- Gatesoupe, F. J. 2002. Probiotic and formaldehyde treatments of *Artemia* nauplii as food for larval pollack, *Pollachius pollachius*. *Aquaculture*. 212:347-360 p.
- Gatesoupe, F. J., T. Arakawa y T. Watanabe. 1989. The effect of bacterial additives on the production rate and dietary value of rotifers as food for Japanese Flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture*. 83:39-44 p.
- Gawlicka, A., S. J. The, S. S. O. Hung, D. E. Hinton y J. de la Noüe. 1995. Histological and histochemical changes in the digestive tract of white sturgeon larvae during ontogeny. *Fish Physiology. and Biochemistry*. 14(5):357-371 p.
- Gawlicka, A., B. Parent, M. H. Horn, N. Ross, I. Opstad y O.J. Torrissen. 2000. Activity of digestive enzymes in yolk-sac larvae of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*): indication of readiness for first feeding. *Aquaculture* 184:303-314 p.

- Gildberg, A., H. Mikkelsen, E. Sandaker, y E. Ringo. 1997. Probiotic effect of lactic acid bacteria in the feed on growth and survival of fry of Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Hydrobiologia*. 352:279-285 p.
- Gisbert, E., R. H. Piedrahita y D. E. Conklin. 2004. Ontogenetic development of the digestive system in California halibut (*Paralichthys californicus*) with notes on feeding practices. *Aquaculture*. 232:455-470 p.
- Gisbert, E., A. Rodríguez, F. Castelló-Orvay y P. Williot. 1998. A histological study of the development of the digestive tract of Siberian sturgeon (*Acipenser baeri*) during early ontogeny. *Aquaculture*. 167:195-209 p.
- Gisbert, E., M. C. Sarasquete, P. Willot y F. Castelló-Orvay. 1999. Histochemistry of the development of the digestive system of Siberian sturgeon during early ontogeny. *Journal of Fish Biology* 55:596-616 p.
- Gisbert, E., G. Merino, J. B. Muguet, D. Bush, R. H. Piedrahita y D. E. Conklin. 2002. Morphological development and allometric growth patterns in hatchery-reared California halibut larvae. *Journal of Fish Biology*. 61:1217-1229 p.
- Gjellesvik, D. R., D. Lombardo y B. T. Walther. 1992. Pancreatic bile salt dependent lipase from cod (*Gadus morhua*): purification and properties. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1124:123-134 p.
- Gómez-Gil, B., A. Roque y J. F. Turnbull. 2000. The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms. *Aquaculture*. 191:259-270 p.
- Govoni, J. J. 1980. Morphological, Histological, and Functional Aspects of Alimentary Canal and Associated Organ Development in Larval *Leiostomus xanthurus*. *Review of Canadian Biology*. 39:69-80 p.
- Govoni, J. J. 2004. The development of form and function in fishes and the question of larval adaptation. En: J. Govoni (ed.). *The development of form and function in fishes and the question of larval adaptation*. American Fisheries Society, Symposium 40, Bethesda, 1-7 p.
- Govoni, J. J., G. W. Boehlert e Y. Watanabe. 1986. The physiology of digestion in fish larvae. *Environmental Biology of Fishes*. 16(1-3):59-77 p.
- Gram, L., J. Melchiorson, B. Spanggaard, I. Huber y T. F. Nielsen. 1999. Inhibition of *Vibrio anguillarum* by *Pseudomonas fluorescens* AH2, a possible probiotic treatment of fish. *Applied and Environmental Microbiology* 65(3):969-973 p.

- Hacker, D. L. 1975. The Biology of the California Halibut, *Paralichthys californicus* (Ayres) in Anaheim Bay. En: E. D. Lane y C.W. Hills (eds.). The Marine Resources of Anaheim Bay. The Resources Agency, Department of Fish and Game, Fish Bulletin 165. State of California, 137-151 p.
- Hamlin, H. J.; I. Hunt von Herbing y L. J. Kling. 2000. Histological and morphological evaluations of the digestive tract and associated organs of haddock throughout post-hatching ontogeny. *Journal of Fish Biology*. 57:716-732 p.
- Hansen, G. H. y J. A. Olafsen. 1999. Bacterial Interactions in Early Life Stages of Marine Cold Water Fish. *Microbial Ecology*. 38:1-26 p.
- Hensley, D. A. 1995. *Paralichthyidae*. Lenguados. En: W. Fisher, F. Krupp, W. Schneidre, C. Sommer, K.E. Carpenter y V. Niem (eds.). Guía FAO para la identificación de especies para fines de la pesca. Pacífico Centro-Oriental. FAO, Rome, 1349-1380 p.
- Hirji, K. N. y W. A. M. Courtney. 1982. Leucine aminopeptidase activity in the digestive tract of perch, *Perca fluviatilis* L. *Journal of Fish Biology*. 21:615-622 p.
- Hjelmeland, K. y T. Jorgensen. 1985. Evaluation of radioimmuno-assay as a method to quantify trypsin and trypsinogen in fish. *Transactions of the American Fish Society*. 114:619-621 p.
- Hoehne-Reitan, K., and E. Kjørsvik. 2004. Functional development of the liver and exocrine pancreas in teleost fish. En: Govoni, J.J. (ed.). The development of form and function in fishes and the question of larval adaptation. American Fisheries Society Symposium 40, Bethesda, Maryland, 9-36 p.
- Ikenove, H. y T. Kafuku 1992. Modern Methods of Aquaculture in Japan. Kodansha LTD. Japón, 144-149 p.
- Izquierdo, M. S.; J. Socorro; L. Arantzamendi y C. M. Hernández-Cruz. 2000. Recent advances in lipid nutrition in fish larvae. *Fish Physiology and Biochemistry*. 22(2):97-107 p.
- Jöborn, A., J. C. Olsson, A. Westerdahl, P. L. Conway y S. Kjelleberg. 1997. Colonization in the fish intestinal tract and production of inhibitory substances in intestinal mucus and faecal extracts by *Carnobacterium* sp. strain K1. *Journal of Fish Diseases*. 20:383-392 p.
- Kim, B. G., S. Divakaran, C. L. Brown y A. C. Ostrowski. 2001. Comparative digestive enzyme ontogeny in two marine larval fishes: Pacific threadfin (*Polydactylus sexfilis*) and bluefin trevally (*Caranx melampygus*). *Fish Physiology and Biochemistry*. 24:225-241 p.

- Kim, D.H., H. J. Han, S. M. Kim, D. C. Lee y S. I. Park. 2004. Bacterial enteritis and the development of the larval digestive tract in olive flounder, *Paralichthys olivaceus* (Temminck & Schlegel). *Journal of Fish Diseases* 27:497-505 p.
- Kjørsvik, E., T. Van Der Meerent, H. Kryvi, J. Arnfinnson y P. G. Kvenseth. 1991. Early development of the digestive tract of cod larvae, *Gadus morhua* L., during start-feeding and starvation. *Journal of Fish Biology* 38:1-15 p.
- Kucas, S. T. y T. J. Hassler. 1986. Species Profiles: Life Histories and Environmental Requirements of Coastal Fishes and Invertebrates (Pacific Southwest) California Halibut. U.S. Fish and Wildlife Service Biology Reproductive. 82(11.44):8 p.
- Kurokawa, T. y T. Suzuki. 1996. Formation of the diffuse pancreas and the development of digestive enzyme synthesis in larvae of the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture*. 141:267-276 p.
- Kurokawa, T. y T. Suzuki, 1998. Development of intestinal brush border aminopeptidase in the larval Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture*. 162:113-124 p.
- Kurokawa, T.; M. Shiraishi y T. Suzuki. 1998. Quantification of exogenous protease derived from zooplankton in the intestine of Japanese sardine (*Sardinops melanotictus*) larvae. *Aquaculture*. 162:491-499 p.
- Kurokawa, T.; H. Kagawa; H. Ohta; H. Tanaka; K. Okuzawa y K. Hirose. 1995. Development of digestive organs and feeding ability in larvae of Japanese eel (*Anguilla japonica*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science*. 52:1030-1036 p.
- Lara-Flores, M., M. A. Olvera-Novoa, B. E. Guzmán-Méndez y W. López-Madrid, 2003. Use of the bacteria *Streptococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus*, and the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as growth promoters in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture* 216:193-201 p.
- Lazo, J. P.; G. J. Hold y C. R. Arnold. 2000a. Ontogeny of pancreatic enzymes in larval red drum (*Sciaenops ocellatus*) *Aquaculture Nutrition*. 6(3):183-192 p.
- Lazo, J. P.; M. T. Dinis; C. Faulk; G. J. Holt y C. R. Arnold. 2000b. Co-feeding microparticulate diets with algae: Toward eliminating the need for zooplankton at first feeding in larval red drum. *Aquaculture*. 188:339-351 p.

- Li, P. y D. M. Gatlin III. 2004. Dietary brewers yeast and the prebiotic Grobiotic™ AE influence growth performance, immune responses and resistance of hybrid striped bass (*Morone chrysops* x *M. saxatilis*) to *Streptococcus iniae* infection. *Aquaculture* 231:445-456 p.
- Lobos, G., A. Silva, R. Rojas y P. Quero. 1992. Rentabilidad de un centro de cultivo de Lenguado en la IV Región. *Panorama Económico de la Agricultura*. 81:8-12 p.
- Lilly, D.M. y R. H. Stillwell. 1965. Probiotics: growth-promoting factors produced by microorganisms. *Science* 147:747-748 p.
- Luizi, F. S., B. Gara, R. J. Shields y N. R. Bromage. 1999. Further description of the development of the digestive organs in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) larvae, with notes on differential absorption of copepod and *Artemia* prey. *Aquaculture*. 176:101-116 p.
- Lundstedt, L. M., J. F. Bibiano y G. Morales. 2004. Digestive enzymes and metabolic profile of *Pseudoplatystoma coruscans* (Teleostei: Siluriformes) in response to diet composition. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 137:331-339 p.
- Lyndon, A.R. 1999. Fish growth in marine culture systems: a challenge for biotechnology. *Marine Biotechnology* 1:376-379 p.
- Ma, H., C. Cahu, J. Zambonino, H. Yu, Q. Duan, M. Le Gall y K. Mai. 2005. Activities of selected digestive enzymes during larval development of large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*). *Aquaculture* 245:239-248 p.
- Makridis, P., A. J. Fjellheim, J. Skjermo y O. Vadstein. 2000. Colonization of the gut in first feeding turbot by bacterial strains added to the water or bioencapsulated in rotifers. *Aquaculture International*. 8:367-380 p.
- Munro, P. D., A. Barbour y T. H. Birkbeck. 1995. Comparison of the growth and survival of larval turbot in the absence of culturable bacteria with those in the presence of *Vibrio anguillarum*, *Vibrio alginolyticus*, or a marine *Aeromonas* sp. *Applied and Environmental Microbiology*. 61:4425-4428 p.
- Nicolas, J. L., E. Robic y D. Ansquer. 1989. Bacterial flora associated with a trophic chain consisting of microalgae, rotifers and turbot larvae: Influence of bacteria on larval survival. *Aquaculture*. 83:237-248 p.
- Nikoskelainen, S., S. Salminen, G. Bylund y A. Ouwehand. 2001. Characterization of the properties of human-and dairy-derived probiotics for prevention of infectious diseases in fish. *Applied and Environmental Microbiology* 67(6):2430-2435 p.

- Parana, F. 1997. Acid phosphatases of *Esox lucius*: tissue distribution and partial characterization. *Journal of Fish Biology* 51:275-283 p.
- Patra, S.K. y K. S. Mohamed. 2003. Enrichment of *Artemia nauplii* with the probiotic yeast *Saccharomyces boulardii* and its resistance against a pathogenic *Vibrio*. *Aquaculture International* 11:505-514 p.
- Péres, A., C. L. Cahu y J. L. Zambonino-Infante. 1997. Dietary spermine supplementation induces intestinal maturation in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Fish Physiology and Biochemistry*. 16:479-485 p.
- Person-Le-Ruyet, J. 1986. L'élevage de poissons plats: sole, turbot. En: G. Bernabé y S. Yves (eds.). *Aquaculture, Technique et Documentation*. Paris, 667-711 p.
- Peulen, O., P. Deloyer, C. Grandfils, S. Loret y G. Dandrifosse. 2000. Intestinal maturation induced by spermine in young animals. *Livestock Production Science*. 66:109-120 p.
- Planas, M. y I. Cunha. 1999. Larviculture of marine fish problems and perspectives. *Aquaculture*. 177:171-190 p.
- Planas, M., J. A. Vázquez, J. Marqués, R. Pérez-Lomba, M. P. González y M. Murado. 2004. Enhancement of rotifer (*Brachionus plicatilis*) growth by using terrestrial lactic acid bacteria. *Aquaculture*. 240:313-329 p.
- Power, D. M., L. Llewellyn, M. Faustino, M. A. Nowell, B. Th. Björnsson, I. E. Einarsson, A. V. M. Canario y G. E. Sweeney. 2001. Thyroid hormones in growth and development of fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*. 130:447-459 p.
- Queiroz, J. F. y C. E. Boyd. 1998. Effects of a bacterial inoculum in channel catfish ponds. *Journal of The World Aquaculture Society*. 29:67-73 p.
- Ramirez, R. F. y B. A. Dixon. 2003. Enzyme production by obligate intestinal anaerobic bacteria isolated from oscars (*Astronotus ocellatus*) angelfish (*Pterophyllum scalare*) and southern flounder (*Paralichthys lethostigma*). *Aquaculture*. 227:417-426 p.
- Ramírez-Hernández, E. y D. González. 1976. Catálogo de peces marinos mexicanos. Instituto Nacional de la Pesca. Secretaría de Industria y Comercio. Subsecretaría de Pesca. México. 462 p.
- Ringo, E. y F. J. Gatesoupe. 1998. Lactic acid bacteria in fish: a review. *Aquaculture*. 160:177-203 p.

- Ribeiro, L.; C. Sarasquete y M. T. Dinis. 1999a. Histological and histochemical development of the digestive system of *Solea senegalensis* (Kaup, 1858) larvae. *Aquaculture*. 171:293-308 p.
- Ribeiro, L., J. L. Zambonino-Infante, C. Cahu y M. T. Dinis. 1999b. Development of digestive enzymes in larvae of *Solea senegalensis*, Kaup 1858. *Aquaculture*. 179:465-473 p.
- Robertson, P. A. W., C. O. Dowd, C. Burrells, P. Williams y B. Austin. 2000. Use of *Carnobacterium* sp. as a probiotic for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Aquaculture*. 185:235-243 p.
- Rungruangsak-Torrissen, K., G.M. Pringle, R. Moss y D.F. Houlihan, 1998. Effects of varying rearing temperatures on expression of different trypsin isozymes, feed conversion efficiency and growth in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Fish Physiology and Biochemistry* 19:247-255 p.
- Santamaría, C. A., M. Marín de Mateo, R. Traveset, R. Sala, A. Grau, E. Pastor, C. Sarasquete y S. Crespo. 2004. Larval organogenesis in common dentex *Dentex dentex* L. (Sparidae): histological and histochemical aspects. *Aquaculture*. 237:207-228 p.
- Sarasquete, M. C., A. Polo y M. Yúfera. 1995. Histology and histochemistry of the development of digestive system of larval gilthead seabream, *Sparus aurata* L. *Aquaculture*. 130:79-92 p.
- Sarath, G., R. S. De la Monte y F. W. Warner. 1989. Protease assay methods. En: R. J. Beyon y J. S. Bond (eds.). *Proteolytic Enzymes: A practical Approach*. Oxford University Press, New York, 25-56 p.
- Schreiber, A.M. 2001. Metamorphosis and early larval development of the flatfishes (Pleuronectiformes): an osmoregulatory perspective. *Comparative Biochemistry and Physiology Parte B* 129:587-595 p.
- Segner, H., V. Storch, M. Reinecke, W. Kloas y W. Hanke. 1994. The development of functional digestive and metabolic organs in turbot, *Scophthalmus maximus*. *Marine Biology*. 119:471-486 p.
- Sorgeloos, P., P. Lavens, P. Lè, W. Tackarert y D. Versichele. 1986. Manual para el cultivo y uso de artemia en acuicultura. Documento de campo 10. Programa Cooperativo Gubernamental FAO-ITALIA., Universidad del Estado de Gent, Bélgica.

- Soutar, R. 2000. Enfoque veterinario de la cría del rodaballo. En: L. Brown (ed.). *Acuicultura para veterinarios. Producción y clínica de peces*. Acribia, S.A. España, 343-356 p.
- Specker, J.L., A. M. Schreiber, M. E. McArdle, A. Poholek, J. Henderson y D. A. Bengtson. 1999. Metamorphosis in summer flounder: effects of acclimation to low and high salinities. *Aquaculture* 176:145-154 p.
- Srivastava, A. S., T. Kurokawa y T. Suzuki. 2002. mRNA expression of pancreatic enzyme precursors and estimation of protein digestibility in first feeding larvae of the Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*. 132:629-635 p.
- Stickney, R. R. y H. W. Liu. 1991. Spawning and Egg incubation of Pacific Halibut. *World Aquaculture*. 22(4):46-48 p.
- Tanaka, M., 1973. Studies on the structure and function of the digestive system of teleost larvae, Tesis doctoral. Department of Fisheries. Faculty of Agriculture, Universidad de Kyoto, 136 p.
- Tengjaroenkul, B., B. J. Smith, T. Caceci y S. A. Smith. 2000. Distribution of intestinal enzyme activities along the intestinal tract of culture Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L. *Aquaculture*. 182:317-327 p.
- Tovar-Ramírez, D., J. L. Zambonino-Infante, C. Cahu, F. J. Gatesoupe y R. Vázquez-Juárez. 2000. Efecto de la administración de levaduras en el proceso de maduración del tracto digestivo de peces. En: L. E. Cruz-Suárez, D. Ricque-Marie, M. Tapia-Salazar, M. A. Olvera-Novoa y R. Civera-Cerecedo (eds.). *Avances en Nutrición Acuicola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuicola*, 19-22 Noviembre, 2000. Mérida, Yucatán, México, 33-46 p.
- Tovar-Ramírez, D., J. L. Zambonino-Infante, C. Cahu, F. J. Gatesoupe y R. Vázquez-Juárez. 2004. Influence of dietary live yeast on European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larval development. *Aquaculture*. 234:415-427 p.
- Tovar Ramírez, D., J. Zambonino, C. Cahu, F. J. Gatesoupe, R. Vázquez-Juárez y R. Lésel. 2002. Effect of live yeast incorporation in compound diet on digestive enzyme activity in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Aquaculture*. 204:113-123 p.
- Vadstein, O. 1997. The use of immunostimulation in marine larviculture: possibilities and challenges. *Aquaculture*. 155:401-417 p.

- Van Noorden, C. J. F. y W. M. Frederiks. 1992. Enzyme histochemistry: a laboratory manual of current methods. Microscopy Handbooks 26. Oxford University Press Inc., New York, 3:35 p.
- Verner-Jeffreys, D., R. J. Shields, I. R. Bricknell y T. Harry Birkbeck. 2003. Changes in the gut-associated microflora during the development of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) larvae in the three British hatcheries. *Aquaculture*. 219:21-42 p.
- Verreth, J. A. J., E. Torreele, E. Spazier, Van der Sluiszen, A, J. H. W. M. Rombout, R. Booms y H. Segner. 1992. The Development of a functional digestive system in the African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell). *Journal of the World Aquaculture Society*. 23:286-298 p.
- Verschuere, L., G. Rombaut, P. Sorgeloos y W. Verstraete. 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 64 (4):655-671 p.
- Vine, N. G., W. D. Leukes y H. Kaiser. 2006. Probiotics in marine larviculture. *Federation of European Microbiological Societies. Microbiology Review*. 30:404-427 p.
- Waché, Y., F. Auffray, F. J. Gatesoupe, J. Zambonino, V. Gayet, L. Labbé y C. Quentel. 2006. Cross effects of the strain of dietary *Saccharomyces cerevisiae* and rearing conditions on the onset of intestinal microbiota and digestive enzymes in rainbow trout, *Onchorhynchus mykiss*, fry. *Aquaculture*. 258:470-478 p.
- Wikeley, D. M. y A. Goodsell. 1994. Manual of histological and histochemical methods used for larval evaluation. Technical Report No. 49. Marine Research Laboratories, Taroom. Marine Resources Division, Department of Primary Industry and Fisheries, Tasmania, 44 p.
- Zacarias-Soto, M., J. B. Muguet y J. P. Lazo. 2006. Proteolytic activity in California halibut larvae (*Paralichthys californicus*). *Journal of the World Aquaculture Society*. 37(2):175-185 p.
- Zambonino-Infante, J.L., y C.L. Cahu. 1999. High dietary lipid levels enhance digestive tract maturation and improve *Dicentrarchus labrax* larval development. *Journal of Nutrition* 129:1195-1200 p.
- Zambonino-Infante, J. L. y C. L. Cahu. 2001. Ontogeny of the Gastrointestinal Tract of Marine Fish Larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*. 103:477-487 p.