CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN SUPERIOR DE ENSENADA

DIVISION DE OCEANOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE ACUICULTURA, BIOTECNOLOGÍA MARINA

DESARROLLO DEL SISTEMA DIGESTIVO DE LARVAS DE CORVINA BLANCA, *Atractoscion nobilis* (Ayres, 1860) (SCIAENIDAE), Y SELECCIÓN DE FUENTES PROTEICAS ADECUADAS PARA SU ALIMENTACIÓN

TESIS

que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de

MAESTRÍA EN CIENCIAS

Presenta:

Silvia Elena Valverde Chavarría

Ensenada, Baja California, México. Noviembre del 2002.

RESUMEN de la tesis de **Silvia Elena Valverde Chavarría**, presentada como requisito parcial, para la obtención del grado de **MAESTRA EN CIENCIAS con orientación en Acuicultura**. Ensenada, Baja California, México. Noviembre del 2002.

DESARROLLO DEL SISTEMA DIGESTIVO DE LARVAS DE CORVINA BLANCA, *Atractoscion nobilis* (Ayres, 1860) (SCIAENIDAE), Y SELECCIÓN DE FUENTES PROTEICAS ADECUADAS PARA SU ALIMENTACION

Resumen aprobado por:

_____

Dr. Juan Pablo Lazo Corvera
Director de Tesis

El estudio de la fisiología digestiva de las larvas de peces es fundamental para establecer protocolos de alimentación y cultivo adecuados, para formular microdietas acordes a la capacidad digestiva de las larvas en cada etapa de desarrollo y para establecer técnicas de digestibilidad *in vitro* confiables que permitan evaluar los alimentos a suministrar.

En el presente trabajo se caracterizó el sistema digestivo de larvas de corvina blanca durante la ontogenia, utilizando técnicas histológicas y bioquímicas, con el objetivo de elucidar su capacidad digestiva. Las larvas provinieron del cultivo realizado en el Hubbs Sea World Research Institute (H-SWRI, CA, E.U.A.), donde se muestrearon larvas entre 0 y 31 días después de la eclosión (DDE). Se disecó el sistema digestivo de las larvas, se homogenizó, centrífugo, y el sobrenadante se utilizó en las pruebas bioquímicas. Adicionalmente, utilizando el extracto enzimático de larvas de 12 y 26 DDE, se realizaron ensayos de digestibilidad *in vitro* para evaluar diferentes ingredientes y dietas formuladas comúnmente utilizadas para larvas de peces marinos.

El desarrollo del sistema digestivo de las larvas de corvina blanca fue muy similar al descrito para otras espcies de peces marinos. Tres DDE (3.5 mm LE), las larvas presentaron todas las estructuras fundamentales para la digestión y absorción de nutrientes, como son el páncreas con zimógenos, el hígado, la vesícula biliar, el intestino diferenciado y la boca abierta. También se detectó actividad de las enzimas proteolíticas tripsina y quimotripsina (enzimas pancreáticas responsables de la digestión luminal de las macromoléculas) y leucina-aminopeptidasa (enzima del borde en cepillo de los enterocitos que completa el rompimiento de los polipéptidos hasta monómeros). Todo esto sugiere que las larvas cuentan con una capacidad digestiva adecuada al inicio de la alimentación exógena.

El estómago se formó y fue funcional (desarrollo de las glándulas gástricas y producción de pepsina) a una edad temprana (12-16 DDE, ~5 mm LE). Este desarrollo precoz del estómago sugiere la posibilidad de realizar el destete de las larvas antes de lo estipulado por el protocolo de cultivo actual (31 DDE, 13.9 mm LE).

Mediante el uso de inhibidores enzimáticos se determinó que la mayor parte de la actividad proteolítica alcalina total (pH 8.8) de las larvas se debe a proteasas tipo serina (~ 95%). En términos de contribución relativa, tripsina es la enzima más importante durante toda la etapa larval. Sin embargo, en las larvas mayores hay un pequeño descenso en su contribución relativa (69 y 48% en larvas de 12 y 25 DDE respectivamente), acompañado por un incremento en la contribución de quimotripsina (12 y 23%).

No hubo diferencias significativas en la digestibilidad proteica relativa (DPR) de los ingredientes evaluados (albúmina, harina de pescado, harina de soya y gluten de trigo), tanto en larvas de 12 DDE (5.4 mm LE) como de 26 DDE (12.9 mm LE). Sin embargo, la albúmina obtuvo el menor valor de DPR en larvas de 12 DDE, de manera opuesta, en larvas de 26 DDE obtuvo el mayor valor de DPR. Se evaluaron tres dietas comerciales (Proton, Bio-Kyowa y Silver cup) y una dieta experimental que incluye quistes de Artemia como fuente proteica. La dieta experimental y la dieta Bio-Kyowa obtuvieron valores de DPR significativamente mayores que el calculado para la microdieta comercial actualmente utilizada para el cultivo larval de esta especie en el H-SWRI. Esto sugiere que la dieta experimental y Bio-Kyowa podrían ser alimentos adecuados para realizar el destete de las larvas de corvina blanca.

Los resultados obtenidos proveen la base para futuros estudios nutricionales, para refinar el protocolo de cultivo actual y para desarrollar dietas formuladas para larvas de corvina blanca.

Palabras clave: larvas de peces marinos, corvina blanca, ontogenia del sistema digestivo, enzimas proteolíticas, digestibilidad *in vitro*

ABSTRACT of the thesis presented by **Silvia Elena Valverde Chavarría** as partial requirement to obtain the **MASTER OF SCIENCES** degree in **Aquaculture**. Ensenada, Baja California, México. November of 2002.

DEVELOPMENT OF THE DIGESTIVE SYSTEM OF WHITE SEABASS LARVAE, *Atractoscion nobilis* (Ayres, 1860) (SCIAENIDAE), AND SELECTION OF PROTEIN SOURCES FOR THEIR ALIMENTATION

Abstract approved by:

_____

Dr. Juan Pablo Lazo Corvera
Thesis Director

The study of the digestive physiology of fish larvae is essential to establish adequate feeding and culture protocols, to formulate diets according to the digestive capacity of the larvae in each stage of ontogeny and to develop reliable *in vitro* digestibility techniques that allow for the evaluation of ingredients and feeds.

In the present work, the digestive system of white seabass larvae was characterized during ontogeny using histological and biochemical techniques to elucidate the digestive capacity of this species. Larvae between 0 and 31 days after hatching (DAH) were sampled at the Hubbs Sea World Research Institute (H-SWRI, CA, USA). The digestive system was dissected, homogenized and centrifuged, and the supernatant was used as the enzymatic extract in all biochemical assays. In addition, *in vitro* digestibility assays were performed on larvae 12 and 26 DAH to evaluate several ingredients and formulated diets commonly used for marine fish larvae.

The development of the digestive system of white seabass larvae was similar to that reported for other marine fish species. By 3 DAH (3.5 mm SL), the larvae presented all the structures necessary for the digestion and absorption of nutrients (i.e., pancreas with zymogens, liver, gall bladder, differentiated gut, and open mouth). In addition, alkaline proteolytic activity was detected specifically trypsin and chymotrypsin (pancreatic enzymes responsible for the luminal digestion of macromolecules) and leucine-aminopeptidase (a brush border enzyme that completes the breakdown of polypeptides).

Early in the larval period (12-16 DAH, ~5 mm SL), the stomach developed and became functional (formation of the gastric glands and production of pepsin). This precocious development of the stomach suggests that weaning can be accomplished earlier than 31 DAH (13.9 mm SL), which is currently achieved at H-SWRI.

A further characterization of the alkaline proteolytic activity (pH 8.8) was achieved using specific enzyme inhibitors. Serine-type proteases contributed with ~95% of the total alkaline activity measured in the larval gut trypsin accounted for the majority of this activity. However, in larger larvae there was a small decrease in the relative contribution of trypsin (69 and 48% in larvae 12 and 25 DAH, respectively) accompanied by an increase in

the relative contribution of chymotrypsin (12 and 23% in larvae 12 and 25 DAH, respectively).

No significant differences were found in relative protein digestibility (RPD) among the ingredients evaluated (albumin, fish meal, soy meal and gluten) for larvae 12 DAH (5.4 mm SL) and 26 DAH (12.9 mm SL). But, albumin had the lowest RPD value in larvae 12 DAH, in contrast it had the highest RPD value in larvae 26 DAH. Three commercial diets (Proton, Bio-Kyowa and Silver cup) and one experimental diet that uses *Artemia* cysts as protein source were subjected to the protein digestibility assays. For larvae of both ages, the experimental diet had the highest RPD values (93 and 75%, for larvae 12 and 26 DAH). The Bio Kyowa diet also exhibits high RPD. Both diets had significantly higher RPD than the microdiet currently used to raise white seabass larvae at the H-SWRI (Silver cup, 52 and 38%, for larvae 12 and 26 DAH). This suggests that the experimental diet and Bio-Kyowa could be adequate for the weaning of this species.

These results provide the basis for further nutritional studies, for refining the actual culture protocol and to develop inert diets for white seabass larvae.

Keywords: marine fish larvae, white seabass, ontogeny of the digestive system, proteolytic enzymes, *in vitro* digestibility

Agradecimientos

A mi asesor, el Dr. Juan Pablo Lazo, por su guía y dirección durante la realización de este trabajo, y por su gran apoyo tanto en lo académico como en lo personal. Gracias por haber sido siempre un excelente ejemplo de amor al trabajo, de ética y de calidad humana. Su ejemplo y su contagioso entusiasmo por la investigación han moldeado en gran medida mis metas como profesional, y esperemos que también, mi futuro desempeño.

A mis sinodales, la Dra. Sharon Herzka, la Dra. María Teresa Viana y el Dr. Benjamín Barón, por sus valiosas observaciones y críticas, aprendí mucho de todas ellas. Gracias por su disponibilidad, interés, comprensión y por haberme guiado durante todo el proceso que conllevó la realización de mi tesis.

A Mark Drawbridge y Paul Curtis, del Hubbs-Sea World Research Institute (H-SWRI, San Diego, CA), por habernos facilitado los organismos utilizados en este estudio, así como sus instalaciones, por su tiempo, su disponibilidad y por compartirnos sin reservas la tecnología del cultivo larval de la corvina blanca. Gracias a todo el personal del H-SWRI por el entrenamiento recibido en la producción de larvas de la corvina blanca y por haber hecho muy agradable mi estancia ahí. En particular, gracias a Christine Anderson y Antonio Rangel por su ayuda en la toma de muestras.

Al Dr. Jorge Cáceres Martínez y su grupo del Laboratorio de Biología y Patología de Moluscos Bivalvos, por enseñarme la técnica histológica y por facilitarnos sus instalaciones y equipo.

A mis profesores: Dr. Miguel Angel del Río, Dra. Beatriz Cordero, Dra. Pilar Sánchez, Dra. Carmen Paniagua, Dr. Manuel Segovia y Dr. Eugenio Díaz, por haber sido

más amigos que maestros, por su apoyo, calidez y por haberme transmitido parte de su conocimiento. En especial, gracias a la M.C. Denise Re Araujo por haberme ayudado con los trámites de ingreso al CICESE y por su hospitalidad durante mis primeros días en Ensenada.

A mis amigos y compañeros: Liza, Miriam, Gustavo, Anselmo, Raúl, Jorge, Alex, René, Gaby, César, Yanet, Rebeca, Gisel y Sergio, por haber sido como una segunda familia y por haberme hecho sentir como en casa aún estando en otro país. Gracias por todos sus favores y por todos los momentos compartidos.

Finalmente, gracias a mi familia y a mi querido Mauricio, quienes desde la distancia me apoyaron y alentaron en todo momento. Su cariño fue mi fuerza y motivación para salir adelante.

Este trabajo fue realizado gracias a una beca otorgada por la Secretaría de Relaciones Exteriores del gobierno de México.

Dedicatoria:

A toda mi familia.

Especialmente a mi madre, Ana.

Gracias infinitas por todo tu amor,

apoyo y sacrificios

ÍNDICE GENERAL

pág.

I. Introducción 1

II. Antecedentes 4
II.1. La corvina blanca 4
II.2. Ontogenia del sistema digestivo de larvas de peces marinos 5
II.3. Enzimas proteolíticas en larvas de peces 7
II.4. Caracterización enzimática 9
II.5. Nutrición y alimentación de larvas de peces marinos 10
II.6. Estudios de digestibilidad *in vitro* en larvas de peces 12

III. Hipótesis 15

IV. Objetivos 15

V. Materiales y Métodos 16
V.1. Origen de las larvas 16
V.2. Muestreo de las larvas 18
V.2.1. Análisis histológico 18
V.2.2. Métodos analíticos 18
V.3. Análisis histológico 19
V.4. Métodos analíticos 20
V.4.1. Preparación de los extractos enzimáticos 20
V.4.2. Determinación de la proteína soluble 20
V.4.3. Actividad proteolítica 21
V.4.3.1. Selección de la hora de muestreo 21
V.4.3.2. Selección del pH para cuantificar la actividad proteolítica alcalina 21
V.4.3.3. Cuantificación de la actividad proteolítica 22
V.4.3.4. Caracterización parcial de la actividad proteolítica alcalina mediante el uso de inhibidores enzimáticos 27
V.4.4. Digestibilidad *in vitro* de la proteína de algunos ingredientes y microdietas para larvas de peces marinos 29
V.5. Análisis estadístico 30

VI. Resultados 32
VI.1. Histología del desarrollo del sistema digestivo de larvas de corvina blanca 32
VI.2. Actividad proteolítica en larvas de corvina blanca 41
VI.2.1. Crecimiento de las larvas 41
VI.2.2. Selección de la hora de muestreo 41

VI.2.3. Selección del pH para cuantificar la actividad proteolítica alcalina.....42
VI.2.4. Ontogenia de las enzimas proteolíticas 43
VI.2.5. Caracterización parcial de la actividad proteolítica alcalina mediante el uso de inhibidores enzimáticos 51
VI.3. Digestibilidad *in vitro* de la proteína de algunos ingredientes y microdietas para larvas de peces marinos 53

VII. Discusión.....55
VII.1. Desarrollo del sistema digestivo de larvas de corvina blanca 55
VII.2. Actividad proteolítica en larvas de corvina blanca 62
VII.3. Digestibilidad proteica relativa de algunos ingredientes y microdietas para larvas de peces marinos 71

Literatura citada 75

Anexos 89

LISTA DE FIGURAS

pág.

Figura 1. Crecimiento en longitud estándar de las larvas durante el primer período de muestreo. 32

Figura 2. Larvas de corvina blanca 0-4 DDE. 37

Figura 3. Larvas de corvina blanca 6-8 DDE. 38

Figura 4. Larvas de corvina blanca 16-22 DDE. 39

Figura 5. Larvas de corvina blanca 31 DDE. 40

Figura 6. Crecimiento en longitud estándar de las larvas durante el segundoperíodo de muestreo 41

Figura 7. Efecto del pH en la actividad proteolítica alcalina total de larvas de corvina blanca de 9 y 25 DDE 42

Figura 8. Actividad proteolítica alcalina total de larvas de corvina blanca de 25 DDE en función de la hora de muestreo 43

Figura 9. Actividad proteolítica alcalina total durante la ontogenia 46

Figura 10. Actividad proteolítica ácida total durante la ontogenia 47

Figura 11. Actividad tipo tripsina durante la ontogenia 48

Figura 12. Actividad tipo quimotrisina durante la ontogenia 49

Figura 13. Actividad de leucina-aminopeptidasa durante la ontogenia 50

Figura 14. Porcentaje de inhibición de la actividad proteolítica alcalina de larvas de corvina blanca de 12 y 25 DDE mediante el uso de diferentes inhibidores enzimáticos . 51

Figura 15. Digestibilidad proteica relativa de diferentes ingredientes y dietas formuladas, por larvas de corvina blanca de 12 y 26 DDE 54

Figura 16. Diagrama de los principales eventos ocurridos durante la ontogenia del tracto digestivo de larvas de corvina blanca 63

Lista de tablas

pág.

Tabla I. Protocolo de alimentación de larvas de corvina blanca empleado en el H-SWRI y temperatura del agua 17

Tabla II. Sustratos utilizados para cuantificar espectrofotométricamente la actividad de diferentes enzimas proteolíticas 26

Tabla III. Inhibidores utilizados para caracterizar la actividad proteolítica alcalina 28

Tabla IV. Contenido proteico (en peso seco) de los ingredientes y dietas evaluados y cantidad requerida para preparar 10 ml de una solución con 6.23 mg P/ml 29

Tabla V. Matriz de correlación de Pearson (r) entre edad (DDE) y longitud estándar (LE) y la actividad total de diferentes enzimas proteolíticas.....45

Tabla VI. Contribución de tripsina y quimotripsina a la actividad tripo serina en larvas de 12 y 25 DDE 52

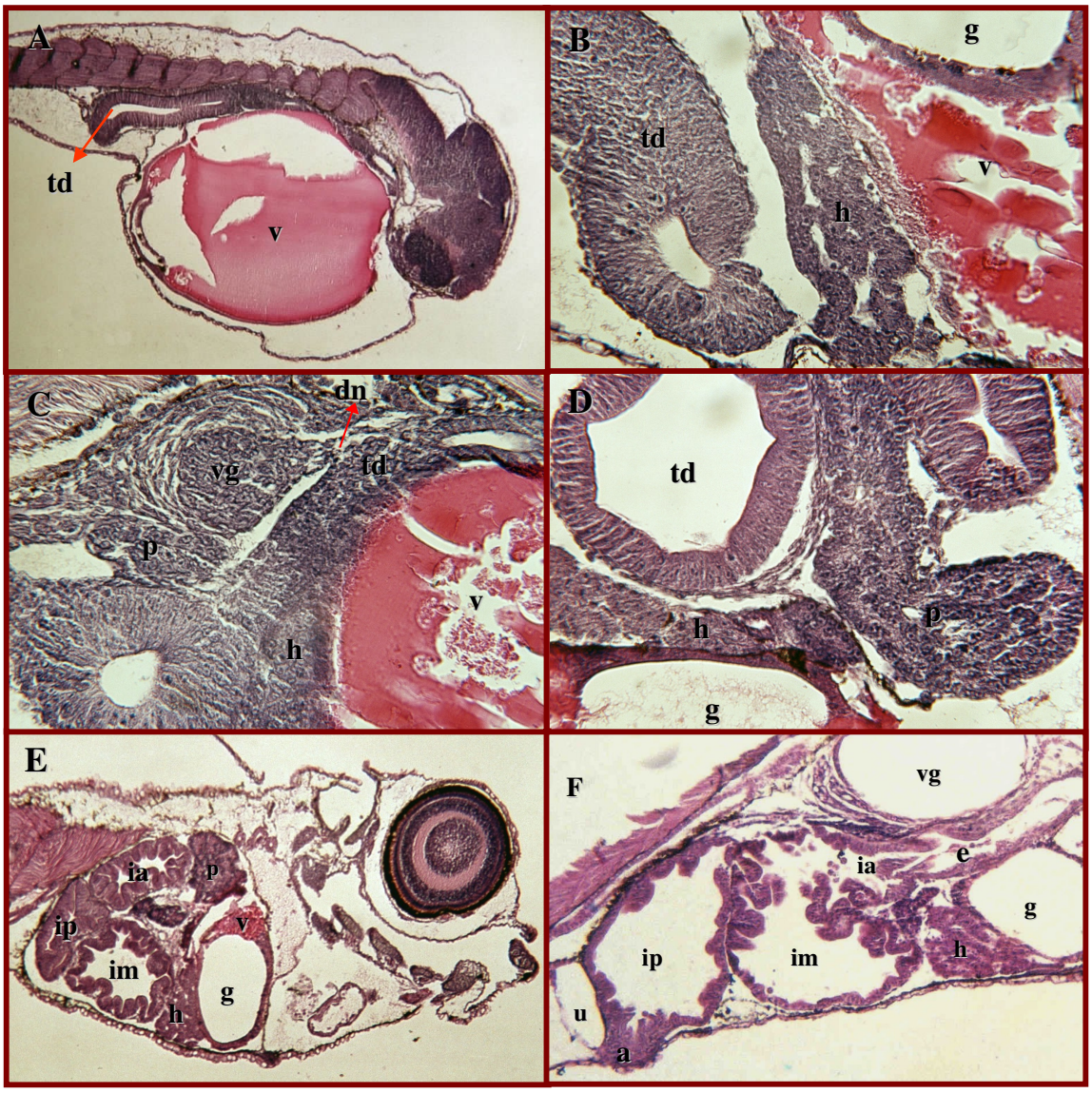


Figura 2. Larvas de corvina blanca 0-4 DDE. A- Larva recién eclosionada (x 100); B- Hígado (x 400); C- Sistema digestivo (x 400); D- Sistema digestivo de larva 2 DDE (x 400); E- Larva 3 DDE (x 100); F- Larva 4 DDE (x 300). a: ano, dn: ducto neumático, e: esófago, g: gota de aceite, h: hígado, ia: intestino anterior, im: intestino medio, ip: intestino posterior, p: páncreas, td: tracto digestivo incipiente, u: vejiga urinaria, v: vitelo y vg: vejiga gaseosa

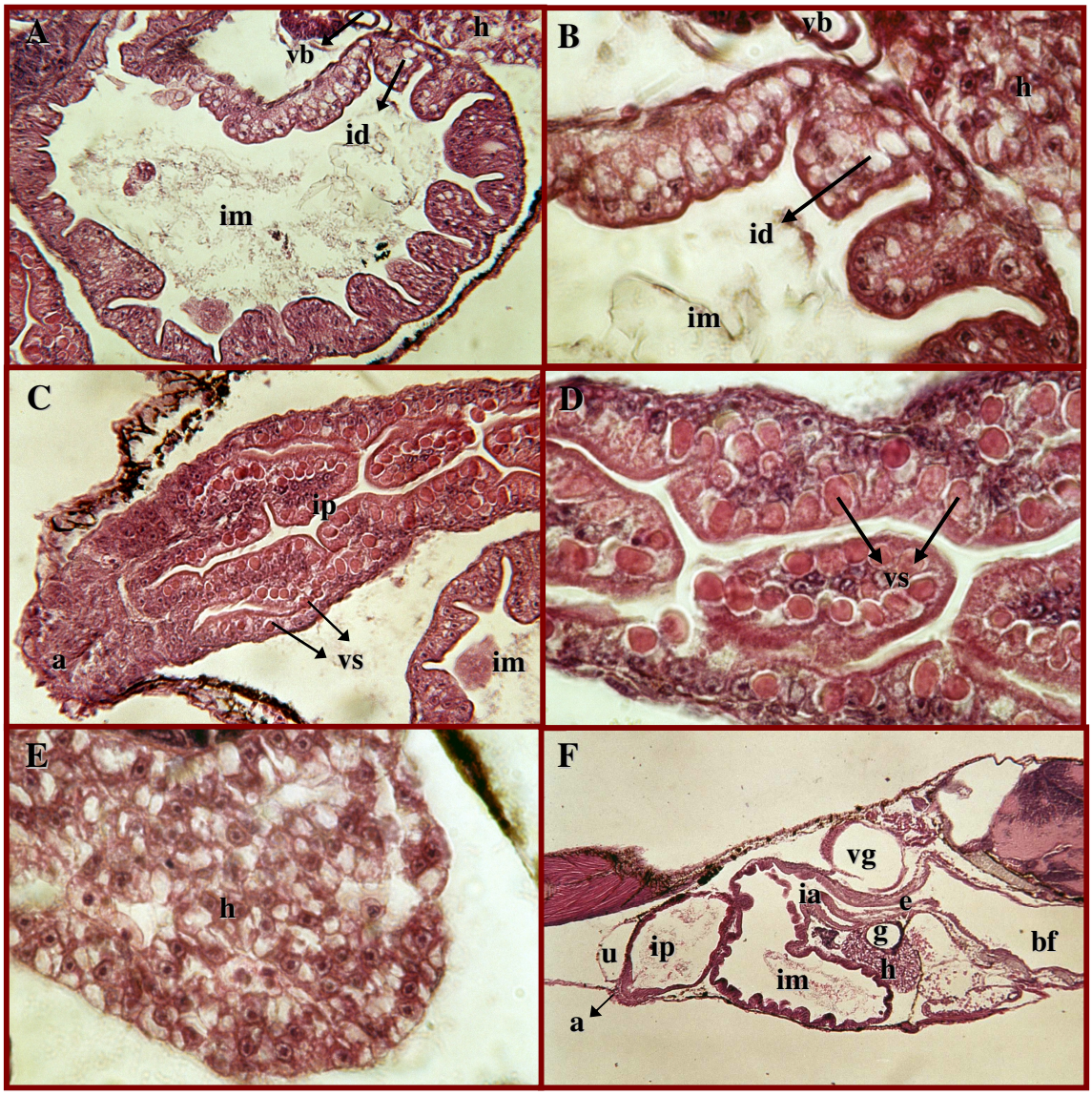


Figura 3. Larvas de corvina blanca 6-8 DDE. A- Intestino medio de larva 6 DDE (x 400); B- Inclusiones densas en el intestino anterior (x 1000); C- Intestino posterior (x 400); D- Vacuolas supranucleares en el intestino posterior (x 1000); E- Hígado (x 1000); F- Larva 8 DDE (x 100). a: ano, bf: bucofaringe, e: esófago, g: gota de aceite, h: hígado, ia: intestino anterior, id: inclusiones densas, im: intestino medio, ip: intestino posterior, u: vejiga urinaria, vb: vesícula biliar y vg: vejiga gaseosa

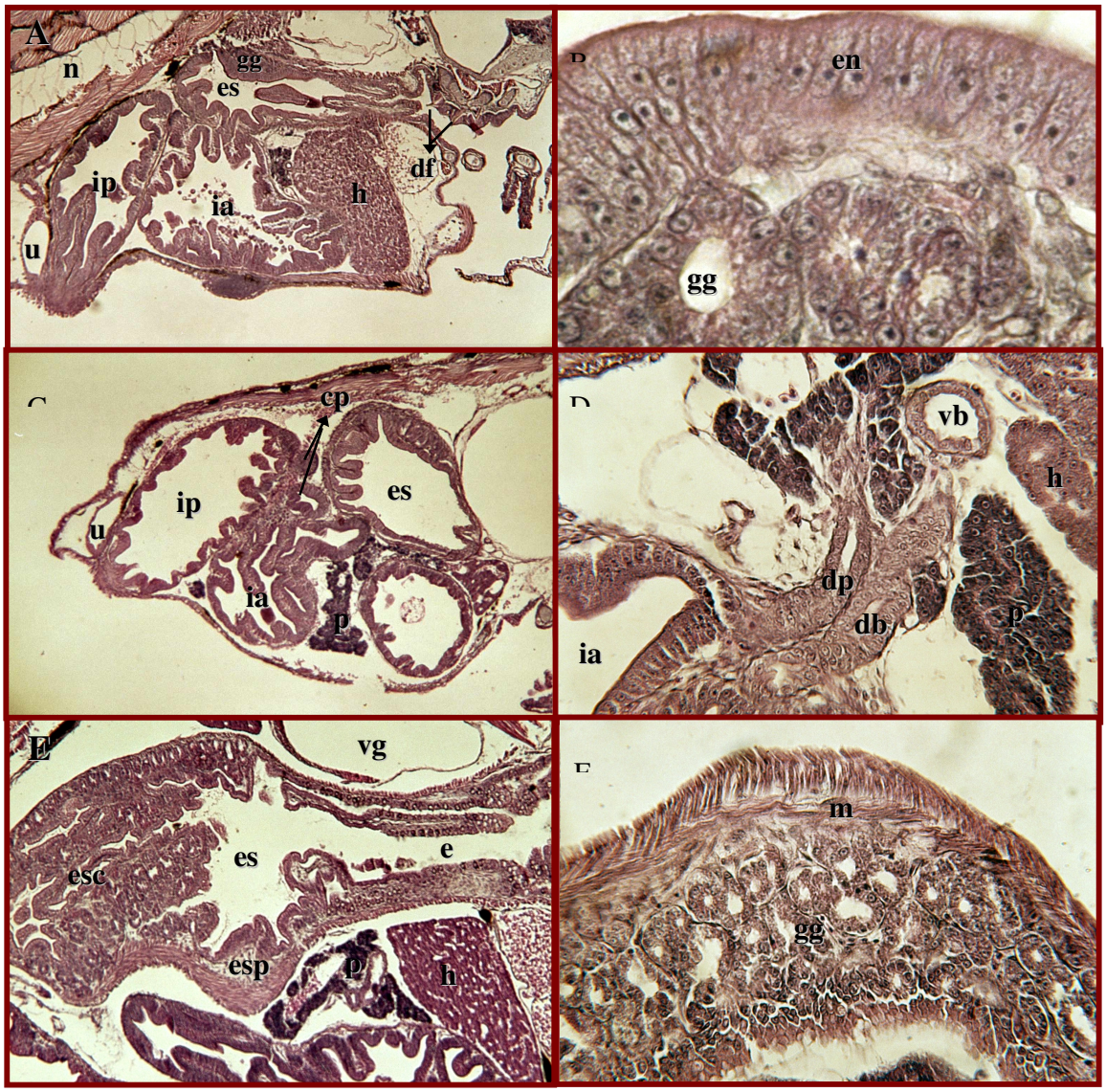


Figura 4. Larvas de corvina blanca 16-22 DDE. A- Sistema digestivo de larva 16 DDE (x 100); B- Glándulas gástricas incipientes (x 1000); C- Sistema digestivo de larva 17 DDE (x 100); D- Ductos pancreático y biliar de larva 19 DDE (x 400); E- Estómago de larva 22 DDE (x 100); F- Pared del estómago. cp: ciegos pilóricos, db: ducto biliar, df: dientes faríngeos, dp: ducto pancreático, e: esófago, en: enterocitos, es: estómago, esc: estómago cardiaco, esp: estómago pilórico, gg: glándulas gástricas, h: hígado, ia: intestino anterior, ip: intestino posterior, m: tejido muscular, n: notocordio, p: páncreas, u: vejiga urinaria, vb: vesícula biliar y vg: vejiga gaseosa

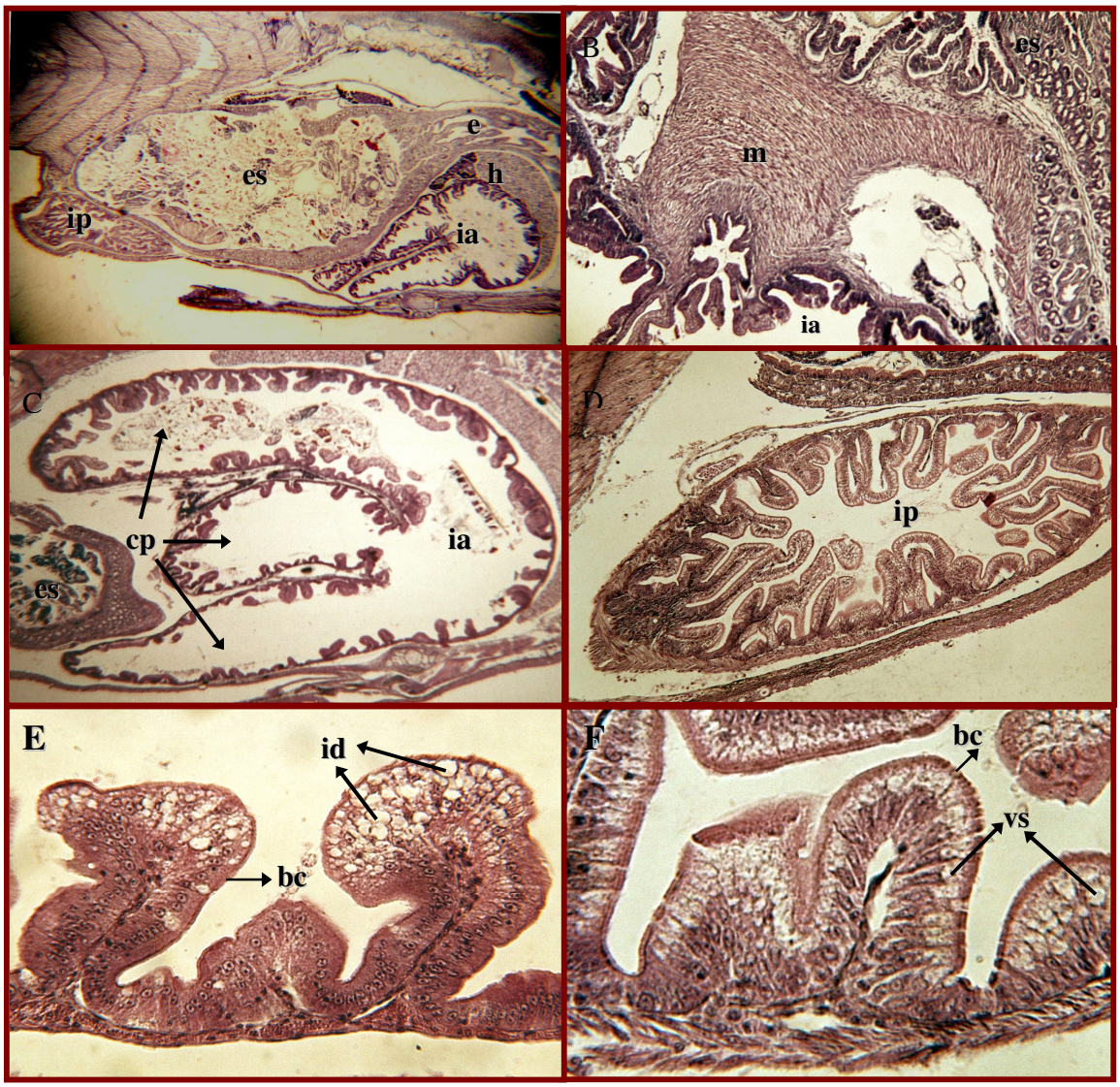


Figura 5. Larvas de corvina blanca 31 DDE. A- Vista general del sistema digestivo (x 40); B- Esfínter pilórico (x 100); C- Ciegos pilóricos (x 40); D- Intestino posterior (x 100); E- Enterocitos del intestino anterior (x 400); F- Enterocitos del intestino posterior (x 1000). bc: borde en cepillo, cp: ciegos pilóricos, e: esófago, es: estómago, h: hígado, ia: intestino anterior, id: inclusiones densas, ip: intestino posterior, m: músculo, vs: vacuolas supranucleares

I. Introducción

La acuicultura es uno de los sectores de producción de alimento para consumo humano de más rápido crecimiento en el mundo. Específicamente la maricultura, ha crecido a una tasa del 15% anual desde 1984. En 1998, la producción de peces marinos representó una pequeña fracción de la producción acuícola total (1.98%). Sin embargo, su valor económico constituyó el 6.47% del valor de la producción total, lo cual evidencia su importancia. Se ha propuesto a la piscicultura como un medio para obtener pescado en comunidades no costeras, disminuir la presión sobre recursos pesqueros, material de siembra para reponer recursos sobreexplotados, exportaciones de valor elevado y carnada para la pesca (FAO 2000).

El cultivo larval es considerado el principal cuello de botella en unidades de producción de peces marinos, ya que usualmente se presenta mortalidad alta. Durante esta fase, la larva agota sus reservas endógenas y se vuelve totalmente dependiente del alimento exógeno. Por lo tanto, la alimentación es uno de los factores críticos para la supervivencia de las larvas (Tanaka 1973). En condiciones de cultivo, las presas vivas (principalmente rotíferos y *Artemia*) constituyen el alimento de los primeros estadios de peces marinos. Sin embargo, la producción de alimento vivo es costosa e impredecible, por lo que existe gran interés en el desarrollo de microdietas formuladas que sustituyan a las presas vivas desde el inicio de la alimentación exógena (Jones *et al.* 1993).

La mayoría de los peces marinos carecen de un estómago funcional al momento de la eclosión y el sistema digestivo se desarrolla a través de la etapa larval (Govoni *et al.*

1986). Esto conlleva a la necesidad de conocer su capacidad digestiva en cada etapa del desarrollo para poder diseñar microdietas formuladas exitosas. La determinación de la capacidad digestiva de las larvas requiere un enfoque multidisciplinario que incluya estudios morfológicos, bioquímicos y fisiológicos, y la posterior integración de la información generada en esos estudios (Lazo 1999).

En los últimos años se han reportado resultados muy alentadores acerca del desempeño de microdietas formuladas en el cultivo de larvas de peces marinos (Yúfera *et al.* 1999, Lazo *et al.* 2000b, Cahu y Zambonino-Infante 2001), pero en la mayoría de los casos todavía no se ha logrado prescindir completamente del alimento vivo (fitoplancton o zooplancton). El pobre desempeño de las larvas alimentadas con dietas formuladas se ha atribuido a un bajo desarrollo y funcionalidad del sistema digestivo, sin embargo, estudios recientes demuestran que las larvas de peces marinos presentan las estructuras y funciones indispensables para degradar el alimento desde el inicio de la alimentación exógena (Alarcón 1997, Lazo 1999, Zambonino-Infante y Cahu 2001). Esto sugiere que los problemas asociados a las dietas formuladas no se deben a una baja capacidad digestiva de las larvas, sino más bien a que el alimento se ha brindado en formas poco digestibles y no ha estimulado en forma adecuada las secreciones pancreáticas (Lazo 2000, Lazo *et al.* 2000b, Cahu y Zambonino-Infante 1997).

La selección de ingredientes altamente digestibles es un factor sumamente importante en la formulación de dietas para larvas de peces marinos (Person-Le Ruyet 1989). Una herramienta importante para la selección de ingredientes son las pruebas de digestibilidad *in vitro*, las cuales generan rápidamente información sobre la digestibilidad

del ingrediente y su efecto en las enzimas digestivas de la larva (Alarcón 1997, Yúfera *et al.* 2000).

Según Lazo *et al.* (2000a), uno de los aspectos importantes a considerar para el desarrollo exitoso de dietas microparticuladas es la digestibilidad y asimilación de los ingredientes que las componen, en cada etapa de formación del sistema digestivo. Por lo tanto, es necesario combinar el estudio de la ontogenia del sistema digestivo con la selección y evaluación de fuentes proteicas adecuadas para la alimentación. Este tipo de estudios permite pasar de un desarrollo empírico de las dietas formuladas para larvas, a un desarrollo más racional (Segner *et al*. 1993).

El propósito del presente trabajo fue contribuir al entendimiento de la capacidad digestiva de larvas de corvina blanca (*Atractoscion nobilis*), a través de la descripción del desarrollo del sistema digestivo y de su actividad proteolítica. Además, se evaluó la digestibilidad *in vitro* de algunas fuentes proteicas por larvas en diferentes etapas de desarrollo. La información obtenida sirve como base para futuros estudios nutricionales, para refinar el protocolo actual de cultivo y para desarrollar dietas formuladas adecuadas para las larvas de esta especie.

II. Antecedentes

II.1. La corvina blanca

La corvina blanca (*Atractoscion nobilis*) es el miembro más grande de los sciaenidos de California, con un peso máximo de 41 kg. En el Pacífico, se distribuye desde Alaska hasta Baja California Sur, México, y hay una población aislada al norte del Golfo de California (Mar de Cortez) (Young 1973, Moser *et al.* 1983).

Los adultos tienen hábitos demersales, son carnívoros y se cree que realizan movimientos migratorios. El desove ocurre entre primavera y verano, luego de alcanzar tallas mayores a los 80 cm. Los huevos y larvas son pelágicos y los juveniles se encuentran en zonas costeras (Vojkovich y Reed 1983).

La corvina blanca es importante en las capturas comerciales de California (E.U.A.) y Baja California y es popular en la pesca deportiva del sur de California. En esta zona se ha reportado una reducción sustancial en el tamaño de las poblaciones naturales a causa de la sobreexplotación, por lo que desde 1931 existen regulaciones para su extracción (Vojkovich y Reed 1993).

Desde 1983, el instituto de investigaciones "Hubbs-Sea World Research Institute (H-SWRI)" (San Diego, CA), produce juveniles de corvina blanca (hasta 80 g) con fines de repoblación. Los huevos se producen a partir de reproductores capturados del medio y mantenidos en el laboratorio bajo condiciones controladas de luz y fotoperiodo (Kent y Drawbridge 1995). Recientemente, este instituto inició un proyecto piloto para determinar

la factibilidad de cultivar esta especie hasta talla comercial en jaulas flotantes y determinar aspectos de mercadeo, con la esperanza de disminuir la presión pesquera sobre las poblaciones naturales y garantizar una producción estable a lo largo del año. La corvina blanca parece ser un buen candidato para el cultivo comercial, ya que presenta un rápido crecimiento (1 kg en 7 meses en "raceways"), una amplia temporada de desove y larvas grandes que pueden consumir *Artemia* desde el inicio de la alimentación exógena. Además, su carne es de excelente calidad (Dawbridge y Kent 1997, Vojkovich y Reed 1997).

Se ha estudiado la morfología externa de los huevos, larvas y juveniles de corvina blanca (Mosert *et al.* 1983, Orhun 1989), la ecología alimenticia de las larvas (Dutton 1992), el efecto de la experiencia de las larvas en el éxito de captura de presas (Dutton 1989) y el efecto de la densidad de siembra y la concentración del alimento en su crecimiento y supervivencia (Kim 1987). Aún falta estudiar la ontogenia de las estructuras digestivas y enzimas de las larvas de esta especie, lo que resulta indispensable para desarrollar un protocolo de alimentación y microdietas formuladas adecuadas a su capacidad digestiva.

II.2. Ontogenia del sistema digestivo de larvas de peces marinos

Los estudios sobre la ontogenia de la fisiología nutricional de larvas de peces (cambios relacionados con los procesos de ingesta, digestión y asimilación) proveen la base para definir la duración del período larval desde el punto de vista nutricional y para entender sus requerimientos nutricionales (Segner *et al.* 1993). Estos estudios requieren la descripción del desarrollo de las estructuras y funciones del sistema digestivo, las cuales están genéticamente determinadas, pero que pueden ser moduladas hasta cierto punto por

las condiciones ambientales y nutricionales (Bengston 1993, Kuz'mina y Gel'man 1998, Cahu y Zambonino-Infante 1997).

Al momento de la eclosión, el intestino incipiente de las larvas de peces marinos es un tubo recto dorsal al saco vitelino, cerrado en la boca y el ano. Al inicio de la alimentación exógena, el intestino incipiente es funcional, pero estructural y funcionalmente menos complejo que el de los juveniles y adultos. La boca, ano, páncreas, vesícula biliar e hígado son funcionales en ese momento (Tanaka 1973). Una vez absorbido el vitelo, el intestino incipiente se diferencia en: bucofaringe y canal alimenticio anterior, medio y posterior. Cada sección del canal alimenticio es histológica y funcionalmente diferente. La primera porción del canal digestivo anterior se diferenciará gradualmente en el esófago, el canal digestivo medio se diferenciará en el intestino anterior y el canal digestivo posterior originará el intestino posterior. No ocurren cambios sustanciales en el sistema digestivo hasta el final del periodo larval, cuando se desarrollan el estómago y los ciegos pilóricos en la parte anterior del intestino (Tanaka 1973, Govoni *et al.* 1986, Zambonino-Infante y Cahu 2001).

Al inicio de la alimentación exógena, las células epiteliales del canal digestivo posterior tienen la capacidad de absorber proteínas por pinocitocis y digerirlas intracelularmente en los lisosomas. Esta forma de digestión proteica compensa la baja actividad enzimática de las larvas en los primeros estadios (Tanaka 1973, Govoni *et al.* 1986). Eventualmente, el mecanismo de digestión intracelular es reemplazado por procesos de digestión extracelular asociados al desarrollo de las glándulas gástricas. Este último mecanismo de digestión es más eficiente. Durante la fase larval, el páncreas es la principal

glándula involucrada en la secreción de enzimas digestivas, y el intestino es el principal órgano involucrado en la absorción de nutrientes.

II.3. Enzimas proteolíticas en larvas de peces

La evolución temporal de la maquinaria enzimática, niveles de actividad, la ubicación y tipo de enzimas deben caracterizarse para determinar la habilidad de las larvas de utilizar el alimento, para desarrollar dietas formuladas adecuadas a esa habilidad y para establecer protocolos de digestibilidad *in vitro* que permitan evaluar los ingredientes a utilizar en la elaboración de las dietas (Moyano *et al.* 1996, Cahu y Zambonino-Infante 1997).

Las proteasas son enzimas que catalizan la hidrólisis de los enlaces peptídicos que forman la estructura primaria de las proteínas. Son las enzimas más estudiadas debido a que las larvas tienen un elevado requerimiento proteico relacionado con sus altas tasas de crecimiento y el uso de proteínas como fuente energética, y a que sus presas tienen un alto contenido proteico (55-60 % (Watanabe y Kiron 1994). Las proteínas son el principal componente de las dietas formuladas, además de ser el más caro. Las lipasas y amilasas han sido menos estudiadas, debido a que los lípidos y carbohidratos representan fracciones menores de la dieta.

En larvas de peces, los órganos productores de enzimas digestivas son: el estómago, el páncreas y el intestino. La actividad proteolítica ácida se localiza principalmente en el estómago, y se debe a la activación del pepsinógeno en pepsina. El páncreas exocrino sintetiza y secreta en el lumen intestinal una gran cantidad de enzimas (glucosidasas, lipasas y proteasas) en forma de precursores inactivos (zimógenos). Estos zimógenos son

activados por tripsina, la cual es a su vez activada por enteroquinasa (secretada por las células intestinales). Las enzimas pancreáticas trabajan a pH alcalino. Los enterocitos poseen 2 tipos de enzimas: las enzimas del citosol y las enzimas del borde en cepillo. Las enzimas del citosol se encuentran en el citoplasma celular y son principalmente peptidasas. Las enzimas del borde en cepillo están asociadas a la membrana celular y las hay de diferente tipo: peptidasas, disacaridasas, esterasas, entre otras (Zambonino-Infante y Cahu 2001).

Generalmente, la actividad de proteasas alcalinas (ej. tripsina y quimotripsina) aparece muy tempranamente en el desarrollo, desde antes de la apertura de la boca. La actividad tipo pepsina aparece hasta el final de la etapa larval y es considerada un indicador de un estómago funcional (Moyano *et al.* 1996). Algunos autores han correlacionado la actividad de la tripsina y la quimotripsina con la viabilidad y capacidad de crecimiento de las larvas (Moyano *et al.* 1996 y Applebaum 2001). Otras enzimas que suelen ensayarse en los estudios de la fisiología digestiva de las larvas de peces son las aminopeptidasas. Estas últimas son enzimas del epitelio intestinal en el borde en cepillo, consideradas indicadores del grado de madurez del intestino y de su estado nutricional (Cahu y Zambonino-Infante 1997).

Las catepsinas son enzimas del citosol relacionadas con los procesos de digestión intracelular de las proteínas. La catepsina D actúa en forma similar a la pepsina y la catepsina B es similar a la papaína (Vernier 1990). Los niveles de leu-alanina-peptidasa están inversamente relacionados con el grado de desarrollo del intestino. La maduración del intestino y el paso al modo adulto de digestión intestinal implican un descenso en la

producción de esta enzima, acompañado por un aumento en la actividad de las aminopeptidasas (Cahu *et al.* 1999).

Las carboxipeptidasas son exoproteasas que actúan en el extremo carboxi-terminal de péptidos y proteínas. Las carboxipeptidasas A y B proceden del páncreas y requieren del ion Zn^{2+} para su activación (Alarcón 1997).

II.4. Caracterización enzimática

La caracterización de las enzimas digestivas es fundamental para comprender su tipo, modo de acción y nivel de actividad. Según Alarcón (1997), entre las metodologías más utilizadas para caracterizar las enzimas se encuentran:

a- Sustratos específicos y generales. Además de hidrolizar proteínas, las proteasas pueden hidrolizar pequeñas moléculas sintéticas formadas por un aminoácido unido a un grupo cromogénico (sustrato específico), simulando un enlace peptídico. Cuando la enzima hidroliza esa unión, aparece un compuesto que puede cuantificarse mediante métodos espectrofotométricos o fluorométricos. Utilizando sustratos generales (proteínas purificadas como caseína o hemoglobina) se puede evaluar la actividad de grupos de enzimas, tales como proteasas alcalinas o ácidas.

b- Inhibidores específicos. Un inhibidor es cualquier compuesto que disminuya la actividad de una enzima. Se han identificado alrededor de 100 inhibidores naturales de proteasas y existen muchos más de origen sintético. El porcentaje de inhibición, provocado por el uso de sustratos generales e inhibidores específicos, es proporcional al aporte relativo de la enzima con el mecanismo de acción sobre el que actúa el inhibidor.

c- Técnicas electroforéticas (Substrate-SDS-PAGE). La electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de aniones (duodecil sulfato sódico, SDS) es una herramienta útil en la separación de proteínas y el cálculo de su peso molecular. Al combinar esta técnica con el uso de sustratos generales e inhibidores específicos se puede conocer el tipo de enzimas presentes en la muestra (García-Carreño *et al.* 1993, García-Carreño y Haard 1993).

Otros métodos empleados en la caracterización de las enzimas digestivas son la evaluación del efecto de la temperatura, el pH y de iones específicos (Ca^{2+}, Zn^{2+}, Mg^{2+}, etc.) en la actividad y estabilidad de la enzima (Alarcón 1997).

II.5. Nutrición y alimentación de larvas de peces marinos

El alimento vivo (principalmente rotíferos y *Artemia*) constituye el principal alimento de los estadios tempranos de la mayoría de especies cultivadas. Sin embargo, el alimento vivo provee una nutrición subóptima ya que es deficiente en algunos nutrientes esenciales para las larvas, tiene una composición bioquímica variable, su oferta es fluctuante y la producción es laboriosa, impredecible y costosa (~50% de los costos de alimentación) (Jones *et al.* 1993, Person-Le Ruyet *et al.* 1993, Lavens y Sorgeloos 2000). Las desventajas del alimento vivo han estimulado el interés por desarrollar microdietas formuladas que puedan ser utilizadas desde el inicio de la alimentación exógena. Ésto permitiría tener un alimento de calidad constante, disminuir los riesgos involucrados en la producción de alimento vivo, estudiar los requerimientos nutricionales de las larvas y añadir probióticos en la dieta más fácilmente (Person-Le Ruyet 1989, Planas y Cunha 1999, Lavens y Sorgeloos 2000).

Hasta ahora no se ha logrado desarrollar una dieta formulada que reemplace totalmente al alimento vivo. El uso exclusivo de microdietas formuladas en la alimentación de larvas en estadios tempranos resulta en una disminución drástica en el crecimiento y la supervivencia, en comparación con los alcanzados por larvas alimentadas con presas vivas. El pobre desempeño de las microdietas formuladas se ha atribuido a la baja digestibilidad de los ingredientes, bajo valor nutricional, poca estabilidad en el agua y falta de estimuladores de la ingesta y de la secreción de las enzimas digestivas endógenas (Cahu *et al.* 1998, Planas y Cunha 1999, Lazo 2000). Igualmente, un pobre manejo de los estanques de cultivo (especialmente de la calidad del agua) enmascara el efecto de las microdietas formuladas y afecta el crecimiento y la supervivencia de las larvas (Roselund *et al.* 1997). El problema del deterioro de la calidad del agua producto de la lixiviación de las microdietas formuladas puede reducirse con el uso de microencapsulados, con los que se han logrado resultados muy prometedores (Ozkizilcik y Chu 1996, Yúfera *et al.* 1999).

El uso de alimento vivo por un período previo a la introducción de la dieta formulada o en conjunto con ésta (co-alimentación) mejora el desempeño de las microdietas formuladas. De esta forma se ha logrado alcanzar un crecimiento similar o incluso superior al obtenido con el uso exclusivo del alimento vivo (Appelbaum 1985, Kanazawa *et al.* 1989, Holt 1993, Person-Le Ruyet *et al.* 1993, Cahu *et al.* 1998, Baskerville y Kling 2000a, Lazo *et al.* 2000b). Esto sugiere que el alimento vivo tiene un efecto positivo en la ingestión, la digestión y la asimilación de las microdietas formuladas. Este efecto es posiblemente el resultado de la estimulación visual o química, la estimulación de la secreción pancreática, de la activación de los zimógenos de las larvas por las enzimas y/o hormonas de las presas, o de algún otro factor presente en el alimento

vivo (Kolkovski *et al.* 1997 a y b, Reitan *et al.* 1997, Planas y Cunha 1999, Koven *et al.* 2001). Aún no está clara la función de las enzimas proteolíticas de las presas en la digestión, ya que éstas pueden ser inactivadas por las proteasas alcalinas de las larvas. Además, se han registrado niveles similares de actividad proteolítica en larvas alimentadas con presas vivas, con microdietas formuladas y con partículas inertes (Pedersen y Andersen 1992, Cahu y Zambonino-Infante 1997, García-Ortega *et al.* 1998 y Lazo *et al.* 2000a).

Según Segner *et al.* (1993), la ontogenia de las estructuras y funciones digestivas de las larvas de peces está genéticamente determinada y su capacidad adaptativa (modificaciones en estructuras y funciones) a cambios en el alimento es poca. Por lo tanto, estos autores sugieren que deben desarrollarse microdietas formuladas adecuadas a su capacidad digestiva en lugar de tratar que las larvas se adapten a la dieta. Este enfoque ha conducido al estudio de la ontogenia del sistema digestivo de las larvas de peces marinos.

II.6. Estudios de digestibilidad *in vitro* en larvas de peces

El pobre desempeño de las larvas alimentadas con microdietas formuladas se puede atribuir en parte a su baja digestibilidad. La selección adecuada de los ingredientes, especialmente las fuentes proteicas (55-60% de la dieta), parece ser un factor importante en el éxito de una microdieta formulada (Yúfera *et al.* 2000). Además, debido a las dificultades y altos costos asociados con el cultivo larval, es conveniente realizar una evaluación preliminar de los ingredientes y de las microdietas formuladas.

Todavía no se han establecido medidas cuantitativas convenientes para la evaluación *in vivo* de la digestibilidad de las microdietas formuladas para larvas de peces (Baskerville-Bridges y Kling 2000b). Las técnicas de digestibilidad *in vitro* permiten

cuantificar el grado de hidrólisis de las proteínas sometidas a la acción de enzimas comerciales o extractos de las propias larvas, como una estimación de su biodisponibilidad (Haard 1993, Alarcón *et al.* 1999). Se ha hipotetizado que el pobre desempeño de las microdietas formuladas podría deberse a la inhibición parcial de la actividad enzimática por ciertos ingredientes. Las pruebas de digestibilidad *in vitro* proveen información acerca del efecto del ingrediente en las enzimas digestivas de las larvas (Alarcón *et al.* 1999).

Dentro de las técnicas para evaluar la digestibilidad *in vitro* destacan el pH-Stat y el pH-Drop. El primer método cuantifica la cantidad de NaOH requerido para mantener constante el pH durante el período de incubación del ingrediente/dieta con la enzima. El segundo método cuantifica la reducción del pH causada por la liberación de hidrógeno durante la ruptura de los enlaces peptídicos por las enzimas proteolíticas. Este método tiene la limitante de que el pH puede salirse del intervalo óptimo de acción de las enzimas proteolíticas. Otros métodos cuantifican directa o indirectamente la disminución en la concentración de proteína disuelta o la liberación de aminoácidos luego del período de incubación (absorbancia a 280 nm) (Lazo y Davis 2000). Este último método indirecto de cuantificación de aminoácidos se basa en que la tirosina y el triftófano se encuentran presentes en cantidades muy constantes entre proteínas, y en que poseen su absorbancia máxima a 280 nm (Clark 1964). El incremento en la absorbancia a 280 nm es proporcional al grado de hidrólisis (digestibilidad) de la proteína.

Los estudios de digestibilidad *in vitro* en larvas de peces marinos son muy escasos. Destacan los trabajos de Ozkizilcik y Chu (1996), quienes evaluaron la digestibilidad de microcápsulas complejas por larvas de dorada (*Sparus aurata*) mediante la medición del número de aminoácidos liberados después de un período de incubación con enzimas

comerciales y con extractos larvarios. Alarcón (1997) y Alarcón *et al.* (1999) utilizaron el método del pH-Stat para evaluar diferentes fuentes proteicas (ingredientes y microcápsulas) para la alimentación de larvas de dorada (*S. aurata*) y dentón (*Dentex dentex*), con base en el grado de inhibición de los ingredientes sobre la actividad enzimática y de hidrólisis de las proteínas. Más recientemente, Lazo *et al.* (2002) evaluaron diferentes fuentes proteicas, incluyendo organismos del zooplancton (copépodos y krill), para ser utilizadas en la elaboración de dietas formuladas para larvas de la corvina dorada (*Sciaenops ocellatus*).

Dado que el tipo de enzimas presentes influye en el grado de hidrólisis de las proteínas y que durante la etapa larval se presentan cambios en los niveles de las enzimas digestivas, es necesario evaluar la digestibilidad de distintas fuentes proteicas utilizando extractos enzimáticos obtenidos en diferentes fases del desarrollo del sistema digestivo.

III. HIPÓTESIS

Durante el periodo larval ocurren cambios en las estructuras del sistema digestivo y en el perfil enzimático que ameritan la selección de fuentes proteicas adecuadas a las especificidades de cada etapa de desarrollo.

IV. Objetivos

IV.1. Objetivos generales

1- Elucidar la capacidad digestiva de las larvas de corvina blanca durante la ontogenia

2- Evaluar si la digestibilidad de fuentes proteicas específicas cambia durante la ontogenia

IV.2. Objetivos específicos

1- Describir el desarrollo de las estructuras digestivas de larvas de corvina blanca mediante técnicas histológicas

2- Describir el patrón temporal de actividad de algunas proteasas digestivas

3- Caracterizar parcialmente la actividad proteolítica alcalina

4- Evaluar la digestibilidad de distintas fuentes proteicas por larvas en diferentes fases del desarrollo

V. Materiales y Métodos

V.1. Origen de las larvas

Las larvas de corvina blanca se colectaron en el laboratorio de producción de peces marinos Leon Raymond Hubbard, Jr., del Instituto de Investigaciones Hubbs-Sea World (H-SWRI, San Diego, CA), durante octubre del 2001 y mayo del 2002. En este laboratorio se realiza la reproducción controlada de esta especie mediante control del fotoperiodo y la temperatura del agua. El desove ocurre al incrementar la temperatura del agua de 14 a 17 °C y disminuir el fotoperiodo de 14 a 10 horas luz. La fertilización se lleva a cabo en forma natural y los huevos fertilizados (1.31 mm) se colectan en estanques adyacentes a los estanques de los reproductores. Los huevos son desinfectados con formalina al 37% diluida a una concentración de 0.1 ml/l, durante 1 h. Posteriormente, se colocan en incubadoras de 1600 l a una densidad de 40-60 huevos/l y una temperatura de 17 °C. En estas incubadoras se realiza tanto la eclosión como el cultivo larval. La eclosión ocurre 48 h después de la fertilización.

La tabla I resume el protocolo de alimentación y cultivo larval de corvina blanca empleado en el H-SWRI. En breve, la alimentación exógena se inicia 5 días después de la eclosión (DDE), y consiste de nauplios de *Artemia*. A partir de los 12 DDE, las larvas son trasladadas a estanques circulares de 8000 l y sembradas a una densidad de 4-6 larvas/l. En estos estanques la temperatura del agua es mayor (23 C) y el alimento vivo se complementa con *Mysis relicta* (Piscine Energetics, Canadá) congelada y una dieta comercial con 50% de proteína (Moore Clark, USA). Para el segundo periodo de muestreo (mayo del 2001), se cambió el alimento comercial por uno con 58% de proteína (Silver cup, USA). Pruebas

realizadas en el H-SWRI demostraron un mejor desempeño de las larvas de corvina blanca alimentadas con esta dieta (Curtis, com. pers.). El alimento vivo se enriquece con una mezcla de DC Selco Vit. C (INVE AQUACULTURE NV, Bélgica) y Algamac 3050 Schizochytrium Plus (Aquafauna Bio. Marine, Inc, USA) y se administra 7 veces al día. El alimento congelado y la dieta comercial se administran a saciedad mediante alimentadores automáticos. A partir de los 16 DDE, las larvas se seleccionan por talla cada 10 días con el fin de reducir el canibalismo. El destete se realiza 30 DDE, a partir de entonces, las larvas son alimentadas únicamente con la dieta comercial. El fotoperiodo es de 20.5 horas de luz y 3.5 horas de oscuridad durante todo el periodo de cultivo larval. Durante el período de consumo de *Artemia* (5-29 DDE), los estanques cuentan con iluminación artificial adicional colocada directamente sobre los estanques.

Tabla I. Protocolo de alimentación de las larvas de corvina blanca empleado en el H-SWRI, y temperatura del agua. DDE: días después de la eclosión

DDE	*Alimento*	*Densidad de Artemia (nauplios/ml)*	*Temperatura (°C)*
5	*Artemia*: Instar I[1]	5	18
9	*Artemia*: Instar II[2]	5	Inicia incremento
12	Instar II +Mysis[3] +Dieta Comercial[4]	6	23
30	Dieta comercial	5.5	23

[1] San Francisco Bay. Instar I: nauplios recién eclosionados
[2] Salt Creek. Instar II: 24 h después de la eclosión
[3] *Mysis relicta* (Piscine Energetics, Canadá)
[4] Primer muestreo: Moore Clark (USA)
Segundo muestreo: Silver cup (USA)

V.2. Muestreo de las larvas

V.2.1. Análisis histológico

Para el análisis histológico se tomaron muestras de larvas diariamente desde la eclosión hasta 23 DDE y posteriormente a los 31 DDE, durante octubre del 2001. Todas las muestras se colectaron a la misma hora: 12:00 p.m. Cada muestra consistió de 30 larvas, las que fueron medidas (longitud estándar) bajo un estereoscopio antes de ser fijadas.

V.2.2. Métodos analíticos

Para la determinación de la actividad enzimática y los ensayos de digestibilidad *in vitro*, se realizó un segundo muestreo durante mayo del 2002. Se colectaron larvas 3, 6, 9, 12, 17, 22, 25, 28 y 31 DDE. Todas provinieron de un mismo desove y estanque de cultivo, excepto por las larvas colectadas 31 DDE, las que fueron cultivadas en condiciones muy similares. Las muestras se colectaron a las 12:00 p.m. para eliminar el posible efecto de la hora de muestreo en los niveles de actividad enzimática (ver sección V.4.3.1).

El número de individuos por muestra varió en función del tamaño de las larvas, desde 15 larvas de las más pequeñas hasta 3 de las más grandes fueron agrupadas por triplicado para cada edad. En cada fecha, se intentó colectar solamente larvas de talla intermedia para disminuir la variabilidad en el estado de desarrollo asociada a diferencias en la talla. Las larvas se mantuvieron en vasos de precipitado con agua de mar filtrada durante 2 horas para permitir la evacuación de cualquier remanente de alimento en el intestino. Posteriormente, las larvas se anestesiaron con tricaína metanosulfonato (MS-222) y fueron medidas bajo el microscopio estereoscópico para registrar la longitud estándar

(LE). Las muestras se almacenaron a –70 °C por un período no mayor a tres meses, antes de ser disecadas y analizadas.

V.3. Análisis histológico

Diez larvas se fijaron en solución Bouin (ac. pícrico, formalina y ac. acético 75:20:5) durante 24 h y se conservaron en etanol al 70% hasta ser procesadas. Posteriormente se colocaron en un deshidratador de tejidos automático Leica TP 1040, el cual las incubó en soluciones sucesivas de etanol, benceno y finalmente parafina. Los bloques de parafina se cortaron sagitalmente en láminas de 5 µm de diámetro. Las láminas se desparafinaron y rehidrataron al colocarlas en soluciones sucesivas de xileno, etanol y agua destilada. Posteriormente, se tiñeron con hematoxilina-eosina (Humanson 1979). La hematoxilina es un tinte básico que tiñe de color violeta, café o negro los ácidos nucleicos del núcleo celular y compuestos basofílicos dentro del citoplasma. La eosina es un tinte ácido, que tiñe en tonalidades rojas los compuestos acidofílicos, como las proteínas alcalinas (Lazo 1999).

Las láminas se fotografiaron con una cámara C-35 Olympus (Japón) conectada a un microscopio BH-2 Olympus (Japón), para posteriormente realizar la descripción del desarrollo del sistema digestivo de las larvas siguiendo la clasificación de los estadios de desarrollo propuesta por García-Hernández *et al.* (2001) para la lobina europea (*Dicentrarchus labrax*).

V.4. Métodos analíticos

V.4.1. Preparación de los extractos enzimáticos

Se disecó el sistema digestivo de las larvas con el propósito de eliminar los inhibidores enzimáticos que pudieran estar presentes en la musculatura, así como otras enzimas, principalmente tripsinas relacionadas con el metabolismo de las proteínas musculares y el sistema inmune (Hjelmeland 1995). El análisis de las larvas completas, y por ende la inclusión de estos compuestos en los extractos, podría causar ya sea subestimaciones o sobreestimaciones de la actividad proteolítica de las larvas. Las disecciones se realizaron bajo un microscopio estereoscópico Wild Heerbrugg (Alemania) sobre portaobjetos enfriados en hielo seco con el fin de mantener las larvas a baja temperatura (~0 °C) durante la disección.

Cada muestra, proveniente de la disección de 3 a 15 larvas, se homogenizó en 1 ml de agua desionizada y en baño de hielo (4 °C) utilizando un homogenizador de tejidos Kontes (USA). Los homogenizados se centrifugaron a 16000 g durante 30 min y a 4 °C, en una centrífuga refrigerada Eppendorf 5415R (USA). El sobrenadante se utilizó como extracto enzimático y se dispuso en alícuotas de 200 µl que se almacenaron a –70 °C hasta ser analizadas.

V.4.2. Determinación de la proteína soluble

La proteína soluble en cada muestra se cuantificó utilizando un kit de Bio-Rad (USA), basado en el método de Bradford (1976). El ensayo consistió en mezclar la cantidad necesaria de muestra con agua destilada hasta alcanzar un volumen de 800 µl y

posteriormente añadir 200 µl del reactivo de Bio-Rad. La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 5 min, después de lo cual se leyó la absorbancia de las muestras a 595 nm contra un blanco sin extracto utilizando un espectrofotómetro HACH –D/4000U (USA).

La concentración de proteína en las muestras se determinó al ajustar el valor de la absorbancia corregida a la ecuación de regresión de una recta patrón, elaborada con concentraciones crecientes de albúmina bovina:

$$P = (\text{Abs. corregida} - 0.0084) / 0.0101 \qquad (r^2 = 0.99)$$

Donde P es la concentración de proteína en µg/ml y la Abs. corregida es la absorbancia de la muestra menos la absorbancia del blanco.

V.4.3. Actividad proteolítica

V.4.3.1. Selección de la hora de muestreo

Se determinó el patrón de actividad proteolítica alcalina de larvas de 25 DDE durante un período de 24 h, las muestras se colectaron cada 4 horas a partir de las 12:00 p.m. La actividad se cuantificó según la metodología descrita en el apartado V.4.3.3A. Se eligió la hora en que se detectó mayor actividad proteolítica alcalina para realizar los muestreos.

V.4.3.2. Selección del pH para cuantificar la actividad proteolítica alcalina

El efecto del pH sobre la actividad proteolítica alcalina de larvas de 9 y 25 DDE se evaluó en un intervalo de pH de 7.5 a 8.8 usando tampón Trizma (Sigma). La actividad se

cuantificó de acuerdo a la metodología descrita en el apartado V.4.3.3A. El pH al cual se obtuvo mayor actividad proteolítica fue elegido para realizar los ensayos siguientes

V.4.3.3. Cuantificación de la actividad proteolítica

La tabla II indica los sustratos utilizados para cuantificar espectrofotométricamente la actividad de algunas enzimas proteolíticas presentes en los extractos larvarios. A continuación se describe brevemente la metodología empleada.

A- Actividad proteolítica alcalina total: Para la medición de la actividad proteolítica alcalina se utilizó una modificación de la metodología de Sarath *et al.* (1989). A 50 µl de extracto enzimático (3-15 larvas/ml, dependiendo del tamaño de las larvas) se le añadieron 75 µl de azocaseína al 2%. La mezcla se incubó a 37 °C durante 30-60 min que fue el tiempo necesario para detectar la actividad, y fue mayor en las muestras correspondientes a las primeras fases del desarrollo. Al término de este tiempo, se detuvo la reacción con 375 µl de ácido tricloroacético al 10% y se dejó reposar durante 30 min a 4 °C. La proteína precipitada se eliminó por centrifugación a 19000 g durante 5 min. Se midió la absorbancia del sobrenadante a 366 nm contra un blanco en el que el extracto enzimático se inactivó por adición del ácido antes de iniciar la reacción. Se utilizó tripsina comercial (SIGMA Tipo IX, de páncreas porcino) en una concentración de reacción de 9 µg/ml como control.

B- Actividad proteolítica ácida total: Para la medición de la actividad proteolítica ácida se utilizó una modificación de la metodología de Sarath *et al.* (1989). A 50 µl de extracto enzimático se le añadieron 150 µl de hemoglobina desnaturalizada. La mezcla se incubó a

37 °C durante 10 min; al término de este tiempo se detuvo la reacción con 300 µl de ácido tricloroacético al 5% y se dejó reposar durante 30 min a 4 °C. La proteína precipitada se eliminó por centrifugación a 19000 g durante 5 min. Se midió la absorbancia del sobrenadante a 280 nm contra un blanco en el que el extracto enzimático se inactivó por adición del ácido antes de iniciar la reacción. Se utilizó pepsina porcina comercial (SIGMA) en una concentración de reacción de 10 µg/ml como control.

C- Actividad tipo tripsina: Para la medición de la actividad tipo tripsina se utilizó una modificación de la metodología de Erlanger *et al.* (1961). A 50 µl del extracto enzimático se le añadieron 350 µl de BAPNA (Nα-Benzoil-DL-Arginina-P-Nitroanilida). La mezcla se incubó a 37 °C durante 30-60 min; al término de este tiempo se detuvo la reacción con 100 µl de ácido acético al 30% y se dejó reposar durante 15 min a temperatura ambiente. Se leyó la absorbancia a 410 nm contra un blanco en el que el extracto enzimático se inactivó por previa adición del ácido. Se utilizó tripsina comercial (SIGMA Tipo IX, de páncreas porcino) en una concentración de reacción de 10 µg/ml como control.

D- Actividad tipo quimotripsina: Para la medición de la actividad tipo quimotripsina se utilizó la metodología de Hummel (1959) con las modificaciones realizadas por Applebaum (2001). La cantidad de extracto enzimático necesaria para detectar actividad (5-50 µl) se llevó a un volumen final de 50 µl con agua desionizada. La reacción se inició al añadir 450 µl de BTEE (N-Benzoil-L-Tirosina Etil Ester) y se incubó por 15-30 min a 37 °C. Inmediatamente después de ese tiempo, se leyó la absorbancia a 256 nm contra un blanco

en el que se sustituyó el extracto enzimático por agua desionizada. Se utilizó quimiotripsina comercial (SIGMA Tipo II, de páncreas bovino) en una concentración de reacción de 1 µg/ml como control.

E- Actividad de Leucina-Aminopeptidasa: Para la medición de la actividad de leucina-aminopeptidasa se utilizó una modificación de la metodología de Appel (1974). Esta enzima se encuentra asociada al epitelio intestinal, por lo que se utilizó el extracto no centrifugado al cuantificar su actividad, ya que al centrifugar y eliminar los tejidos no disueltos en el agua puede perderse cierta cantidad de la enzima. La cantidad de extracto enzimático no centrifugado necesario para detectar la actividad (20-50 µl) se llevó a un volumen final de 50 µl con agua desionizada. La reacción se inició al añadir 450 µl de l-leucina-p-nitroanilida y se incubó por 30 min a 37 °C. Se leyó la absorbancia antes y después del período de incubación y se registró el cambio ocurrido. El blanco fue agua desionizada incubada con el sustrato. Se utilizó aminopeptidasa comercial (SIGMA Tipo IV-S, microsomal de riñón porcino) en una concentración final de 1 µg/ml como control.

La actividad de las enzimas digestivas se expresó en unidades (U), donde 1U se definió como el incremento de 0.01 unidades de absorbancia/min. Los valores reportados representan la media de tres mediciones realizadas en muestras independientes. En el caso de quimotripsina y leuina-aminopeptidasa, las cuales presentaron muy alta afinidad por el sustrato utilizado, se definió 1U como el cambio de 0.1 unidades de absorbancia/min. La actividad se presentó como actividad total (U/larva) y como actividad específica (U/mg P).

A- Actividad total:

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

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

B- Actividad específica:

$$U/mg\ P = \frac{U/larva}{mg\ P/larva}$$

V.4.3.4. Caracterización parcial de la actividad proteolítica alcalina mediante el uso de inhibidores enzimáticos

La caracterización del mecanismo de acción de las proteasas alcalinas presentes en los extractos de larvas colectadas 12 y 25 DDE se realizó según la metodología descrita por Alarcón (1997). El método se basa en el uso de inhibidores específicos para determinado mecanismo de acción enzimática. También se utilizó EDTA, que es un quelante que disminuye la actividad de ciertas enzimas al secuestrar los iones divalentes que éstas requieren. En la tabla III se describen los inhibidores utilizados.

El ensayo consistió en incubar 50 µl del extracto enzimático con 5 µl del inhibidor (A) a 25 °C durante 1 h. El blanco de inhibición (B) estuvo compuesto por el extracto inactivo por previa adición del ácido, más el inhibidor. En el control de actividad (C) se sustituyó el inhibidor por agua desionizada, y en el blanco de actividad (D) se utilizó el extracto inactivo por previa adición del ácido más agua desionizada en vez del inhibidor. Luego de 1 hora, se cuantificó la actividad proteolítica alcalina utilizando azocaseína como sustrato, según el protocolo descrito en el apartado V.4.3.3A. A la mezcla anterior se le adicionaron 75 µl de azocaseína y se incubó a 37 °C durante 30 min. La reacción se detuvo con 375 µl de ácido tricloroacético. Posteriormente, la mezcla se centrifugó a 14000 rpm durante 5 min y la absorbancia del sobrenadante se leyó a 366 nm. Como controles positivos se utilizaron tripsina y quimiotripsina comerciales, ambas en concentración de reacción de 10 µg/ml. Cada inhibidor se ensayó por triplicado.

Se calculó el porcentaje de inhibición (%I) como la reducción porcentual de la actividad proteolítica con respecto al control sin inhibidor:

$$\% I = 100 - [((Abs.\ A - Abs.\ B)/(Abs.\ C - Abs.\ D)) * 100]$$

V.4.4. Digestibilidad *in vitro* de la proteína de algunos ingredientes y microdietas para larvas de peces marinos

Con el fin de estimar la variación en la digestibilidad de algunas fuentes proteicas durante el período larval, se evaluaron diferentes ingredientes comúnmente incorporados en dietas para larvas de peces y cuatro microdietas formuladas, utilizando el extracto de larvas colectadas 12 y 26 DDE. Se siguió la metodología de Lan y Pan (1993) con las modificaciones realizadas por Lazo *et al.* (2002).

La tabla 4 muestra los ingredientes y dietas utilizadas y su contenido proteico. Los ingredientes y dietas se molieron hasta 90 µm en un mortero y se secaron a 60 °C durante 36 h. Después de ese tiempo, se pesó la cantidad de ingrediente/dieta necesaria para preparar 10 ml de una solución con una concentración de proteína de 6.23 mg/ml en tampón 50 mM Trizma, 20 mM $CaCl_2$ y pH 8.8. Las soluciones se mantuvieron en agitación (130 rpm) a temperatura ambiente durante 2 h. La proteína disuelta en las soluciones se cuantificó según la metodología descrita en el apartado V.4.2.

Tabla IV. Contenido proteico (en peso seco) de los ingredientes y dietas evaluados y cantidad requerida para preparar 10 ml de una solución con 6.23 mg P/ml.

Fuente proteica	*% P*	*mg requeridos*	*Origen*
Ingredientes:			
Caseína	92.7	67.4	Sigma
Albúmina	80	78.1	Bio-Rad
H. de pescado	68	91.9	International Protein Corporation. (# 750)
H. de soya[1]	49.9	125.3	Harina comercial producida localmente
Gluten de trigo	25	250	Harina comercial producida localmente
Microdietas:			
PROTON	62.4	100.2	INVE AQUACULTURE NV, Bélgica
Bio-Kyowa	51.1	122.3	Kyowa Hakko Kogyo Co., Japón
Silver cup	65.6	95.3	Silver cup, USA
Dieta quistes[2]	52.7	118.6	CIAD, Mazatlán. México

[1] Lípidos extraídos con una solución de cloroformo: metanol (2:1)
[2] Dieta experimental formulada y elaborada por el Dr. Armando García-Ortega del CIAD (Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo), Mazatlán, México. Utiliza quistes de *Artemia* decapsulados como fuente proteica.

El ensayo de digestibilidad *in vitro* inició al mezclar 50 µl del extracto (~ 7.5 U de actividad proteolítica alcalina) con 150 µl de la solución del ingrediente/dieta. Esta mezcla se incubó a 30 C durante 1 h. La reacción se detuvo con 300 µl de ácido tricloroacético al 10% y se dejó reposar a 4 C durante 30 min. Pasado este tiempo, se centrifugó a 19000 g durante 5 min y se recuperó el sobrenadante. La absorbancia del sobrenadante se leyó a 280 nm contra un blanco en el que se sustituyó el extracto por agua desionizada. El ensayo se realizó por triplicado para cada ingrediente/dieta.

Se calculó la digestibilidad proteica relativa (DPR), considerando a la caseína como proteína patrón por presentar el mayor valor de digestibilidad (Lazo *et al*. 1998):

$$DPR = \Delta \text{ Abs.}_{\text{Ingrediente/Dieta}} / \Delta \text{ Abs.}_{\text{Caseína}}) * 100$$

V.5. Análisis estadístico

Se realizó un análisis de regresión para describir la relación existente entre la edad y la longitud estándar de las larvas de corvina blanca y calcular el valor de la tasa de crecimiento específico. Se realizó una correlación de Pearson entre la edad y longitud de las larvas y la actividad total de las diferentes proteasas estudiadas. La DPR de las diferentes fuentes proteicas se comparó mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA) y se

utilizó la prueba de rangos múltiples de Tukey para separar las medias. Las pruebas se realizaron a un nivel de significancia del 5%. Se utilizó el paquete estadístico SYSTAT 8.0.

VI. Resultados

VI.1. Histología del desarrollo del sistema digestivo de larvas de corvina blanca

Las larvas recién eclosionadas medían 3.5 mm (LE) y crecieron en forma exponencial hasta 13.9 mm al finalizar el período de estudio (31 DDE). La tasa de crecimiento específico durante este período fue de 0.04 d^{-1} (fig. 1). La tasa de crecimiento puede variar en función de varios factores (i.e., temperatura, alimentación), por lo cual organismos de la misma edad pueden tener diferentes tallas y niveles de desarrollo. Por lo tanto, las observaciones realizadas durante la ontogenia del sistema digestivo de la corvina blanca se examinaron tanto en función de la edad como de la longitud estándar de las larvas.

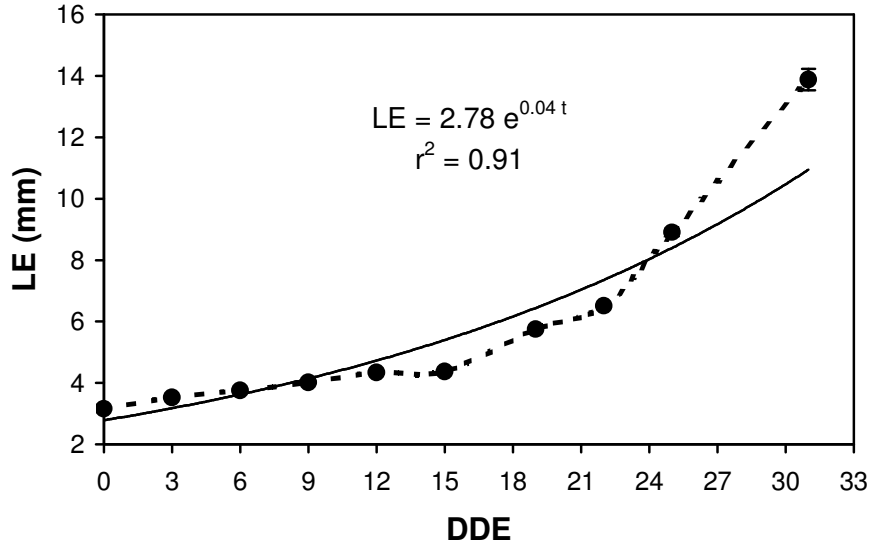


Figura 1. Crecimiento en longitud estándar (LE) de las larvas de corvina blanca. Las barras de error representan el error estándar de la media (n=30). t: días después de la eclosión (DDE)

Para facilitar su descripción, el desarrollo del sistema digestivo de las larvas de corvina blanca se dividió en 4 etapas principales de acuerdo a la clasificación de García-Hernández *et al.* (2001). A continuación se describen los principales eventos ocurridos durante cada etapa de desarrollo:

A- Desde la eclosión hasta la apertura de la boca (0-3 DDE, 3.2-3.5 mm)

Las larvas de corvina blanca recién eclosionadas (3.2 mm LE) presentaron un tracto digestivo incipiente recto e indiferenciado, cerrado en la parte anterior y posterior. El tracto digestivo se encontró en posición dorsal al saco vitelino y su lumen estaba cerrado en la parte media, probablemente por la presión ejercida por el vitelo. El saco vitelino se caracterizó por ser fuertemente acidofílico, ocupaba la mayor parte de la cavidad abdominal y contenía una sola gota de aceite (fig. 2A). En las larvas recién eclosionadas se logró distinguir el hígado y páncreas incipientes. El hígado se localizó posterior al saco vitelino (fig. 2B) y el páncreas se observó en posición dorsal al tracto digestivo (fig. 2C). Las células de ambos órganos eran muy similares a las del tracto digestivo. La vejiga gaseosa incipiente estaba comunicada con la parte anterior del tracto digestivo por medio del ducto neumático (fig.2C).

El tracto digestivo empezó a doblarse y formar un lazo 2 DDE, a través de un proceso conocido como "torsión" (fig. 2D). La torsión del tracto digestivo se completó 3 DDE (3.5 mm LE). A partir de entonces, fue posible diferenciarlo en 3 secciones: intestino incipiente anterior, medio y posterior (fig. 2E). El núcleo de los enterocitos del intestino anterior y medio se observó en posición basal, mientras que el núcleo de los enterocitos del intestino posterior se observó en posición central. La mucosa intestinal presentó muchos

pliegues, principalmente en la sección posterior del tracto digestivo. La apertura de la boca se observó al mismo tiempo que ocurrió la torsión del tracto digestivo (3 DDE). Para esa edad, el hígado y páncreas se encontraban ya bien desarrollados. Este último se observó como un órgano difuso que se encontraba rodeando al intestino, sus células eran fuertemente basofílicas y tenían una conformación acinar. En medio de los acinos se observaron granulosidades acidofílicas, probablemente correspondientes a zimógenos o pro-enzimas. La vesícula biliar se localizó entre el páncreas y el hígado. Los ojos estaban pigmentados y las reservas vitelinas casi se habían agotado.

B- Desde la apertura de la boca hasta la absorción de la gota de aceite (4-10 DDE, 3.7-4.2 mm)

Cuatro DDE (3.7 mm LE), las larvas presentaron un ano bien desarrollado, la boca estaba abierta y se observaron movimientos mandibulares. Los ductos renales se observaron sobre la cavidad abdominal, paralelamente al notocordio, y desembocaban en la vejiga urinaria, junto al ano. Durante esta etapa, las larvas contaban únicamente con la gota de aceite como reserva nutritiva endógena, pues ya habían agotado las reservas vitelinas (fig. 2 F).

La mayoría de larvas habían inflado la vejiga gaseosa. Cinco DDE (3.7 mm LE), se inició la alimentación exógena con el suministro de *Artemia*. Un día después de la primera alimentación (6 DDE, 3.8 mm LE), se observaron inclusiones densas en los enterocitos del intestino medio y vacuolas supranucleares acidofílicas en el intestino posterior (fig. 3A-D). Además, se observaron vacuolas en el hígado (fig. 3E). Durante esta etapa no se observaron cambios morfológicos importantes en el aparato digestivo, excepto por un notable

incremento en el tamaño del intestino, especialmente en la sección media (fig. 3 F). Las larvas absorbieron totalmente la gota de aceite 10 DDE (4.2 mm LE).

C- Desde la absorción de la gota de aceite hasta la formación de las primeras glándulas gástricas y ciegos pilóricos (11-17 DDE, 4.2-4.9 mm)

Doce DDE (4.3 mm LE) se observaron células mucosas en el esófago de las larvas. El intestino anterior empezó a engrosarse, al igual que su capa externa de tejido muscular. La formación de las glándulas gástricas inició 16 DDE (4.6 mm LE), éstas se observaron como grupos de células cuboidales en disposición acinar, en la pared dorsal del intestino anterior (fig. 4B). Las células mucosas del esófago incrementaron en número y aparecieron los dientes faríngeos (fig. 4A). Diecisiete DDE (4.9 mm LE) se observaron los ciegos pilóricos incipientes (fig. 4C). El hígado aumentó considerablemente en tamaño y se observó como un órgano bilobular.

D- Desde la formación de las glándulas gástricas hasta la adquisición de la morfología del adulto (18-31 DDE, 5.3-13.9 mm)

Durante esta etapa, los cambios más importantes en la morfología del sistema digestivo de las larvas fueron la formación del estómago y el incremento en número y tamaño de los ciegos pilóricos. Los ductos que comunican al páncreas (ducto pancreático) y a la vesícula biliar (ducto biliar) con el intestino anterior, en donde se secretan los zimógenos (pro-enzimas) y la bilis, respectivamente, se observaron 19 DDE (5.8 mm LE) (fig. 4D).

Hubo un rápido incremento en el número de glándulas gástricas así como en el tamaño del estómago. A los 22 DDE (6.5 mm LE), se logró distinguir una parte cardiaca o glandular y una parte pilórica o muscular (fig. 4E), y en muestras en fresco fue posible observar que el estómago adquirió forma de "Y". La pared del estómago glandular estaba formada por una capa de células columnares con núcleo central, una capa formada por las glándulas gástricas y una capa de tejido muscular (fig. 4F). La pared estomacal presentaba varios pliegues y las glándulas gástricas se observaron a lo largo de todo el estómago excepto en el estómago pilórico.

Treinta y un DDE (13.9 mm LE) el sistema digestivo adquirió la morfología del adulto, con un estómago ensanchado y provisto de gran cantidad de glándulas gástricas (fig. 5A). Éste se comunicaba con el intestino anterior a través del esfínter pilórico, el cual estaba cubierto por una gruesa pared muscular (fig. 5B). Del intestino anterior, en la parte más próxima al estómago pilórico, surgían 5 grandes ciegos pilóricos, histológicamente idénticos al intestino anterior (fig. 5C). El intestino anterior era muy alargado y fuertemente plegado en su longitud, mientras que el intestino posterior era más corto pero su mucosa formaba más pliegues internos (fig. 5D). En ambos intestinos se observaron pliegues secundarios de la mucosa. Las larvas continuaban presentando inclusiones densas en los enterocitos del intestino anterior, éstas aparecieron en gran cantidad en los enterocitos ubicados en la parte apical de los pliegues formados por la mucosa intestinal (fig. 5E). También se continuaron observando vacuolas supranucleares en los enterocitos del intestino posterior (fig. 5F).

VI.2. Actividad proteolítica en larvas de corvina blanca

VI.2.1. Crecimiento de las larvas

Las larvas recién eclosionadas medían 3.5 mm (LE) y crecieron en forma exponencial hasta 17.1 mm al finalizar el período de estudio (31 DDE). La tasa de crecimiento específico durante este período fue de 0.06^{-1} (fig. 6). Los valores de actividad enzimática se expresaron tanto en función de la edad como de la longitud.

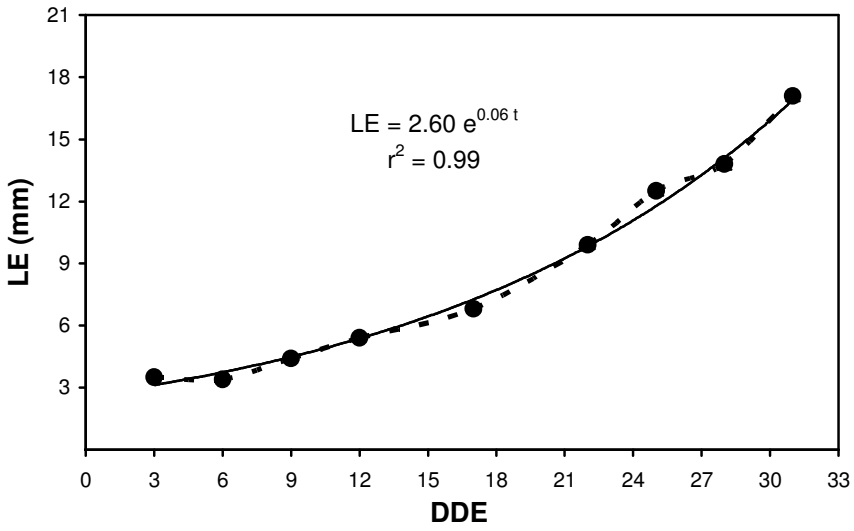


Figura 6. Crecimiento en longitud estándar (LE) de larvas de corvina blanca. Las barras de error representan el error estándar de la media (n=20). t: días después de la eclosión (DDE)

VI.2.3. Selección de la hora de muestreo

Al medir la actividad proteolítica alcalina de larvas de 25 DDE (12.5 mm LE) durante un ciclo de 24 h, se encontraron 2 máximos de actividad: a las 1200 horas y a las 2000 horas (fig. 7). Los valores más bajos de actividad se encontraron a las 400 y 1600

horas y representaron el 71.5 y 60.0% de la actividad máxima, respectivamente. El descenso de actividad de las 400 horas aparentemente se relaciona con la ausencia de luz y con que no se suministró alimento durante la madrugada (fig. 7).

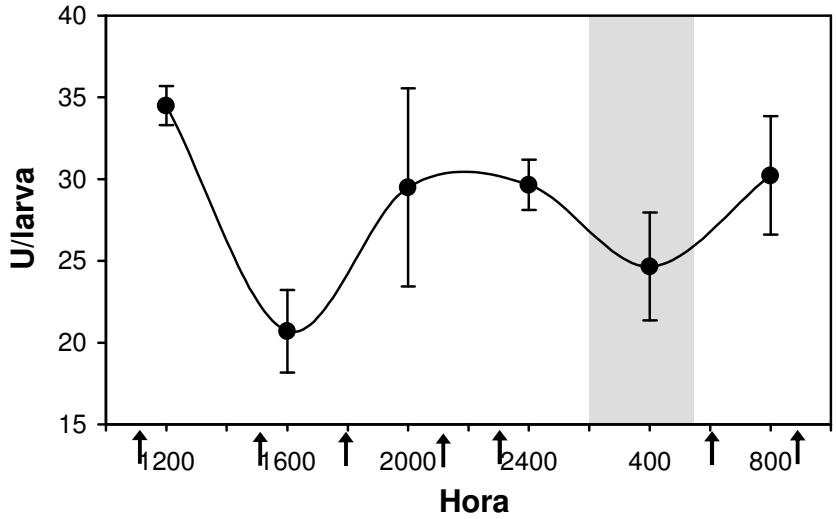


Figura 7. Actividad proteolítica alcalina total de larvas de corvina blanca de 25 DDE en función de la hora del día. El área sombreada representa el período de oscuridad en el día y las flechas indican la hora en que se suministró el alimento vivo (*Artemia*). Las barras de error representan el error estándar de la media (n= 3).

VI.2.2. Selección del pH para cuantificar la actividad proteolítica alcalina

La figura 8 presenta el efecto del pH, dentro del intervalo de neutro a alcalino, sobre la actividad de las proteasas alcalinas totales de larvas de corvina blanca en dos edades diferentes: 9 DDE (4.4 mm LE) y 25 DDE (12.5 mm LE). La actividad alcalina total de las larvas de 25 DDE aumentó en forma lineal con el incremento en el pH. El incremento relativo fue de 64.2% a pH 8.8 con respecto a pH 7.3 (fig. 8). En larvas de 9 DDE, la actividad proteolítica fluctuó con el pH y el incremento relativo en la actividad fue de

41.5% a pH 8.8 con respecto a pH 7.3. Con base en estos resultados, se seleccionó el pH 8.8 para realizar los siguientes ensayos de actividad enzimática.

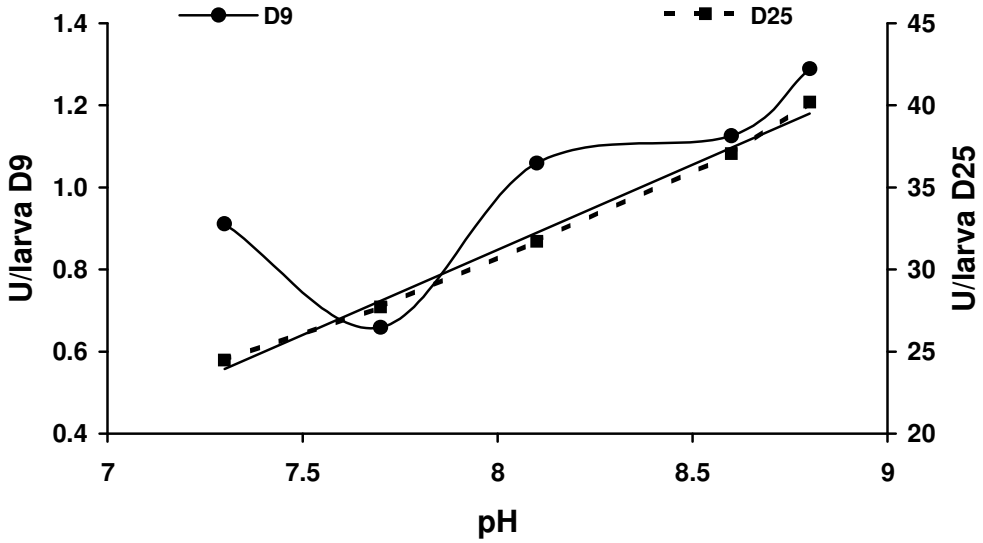


Figura 8. Efecto del pH en la actividad proteolítica alcalina total de larvas de corvina blanca de 9 y 25 DDE. Las barras de error representan el error estándar de la media (n= 3).

VI.2.4. Ontogenia de las enzimas proteolíticas

Las figuras 9-13 muestran la actividad de las enzimas proteolíticas analizadas durante la ontogenia de las larvas de corvina blanca. Para cada enzima estudiada se presenta la actividad total (U/larva) en función de la edad (DDE) y de la longitud estándar (LE), y la actividad específica (U/mg P) en función de la edad.

A- Actividad proteolítica alcalina. Se detectó actividad proteolítica alcalina en larvas de 3 DDE (3.5 mm LE), dos días antes de que se les suministrara alimento por primera vez. La

actividad total fue relativamente baja durante los primeros 9 días, pero con tendencia al ascenso. Las larvas de 12 DDE (5.4 mm LE) presentaron un pico de actividad alcalina (10.8 U/larva) (fig. 9A). Posteriormente, la actividad total descendió para incrementarse nuevamente y alcanzar su valor mayor 31 DDE (17.1 mm LE) con una actividad de 49.8 U/larva. La actividad total mostró un patrón muy similar cuando se expresó en función de la edad o de la longitud estándar (fig. 9A-B), debido a la estrecha relación que presentaron ambas variables (fig. 6). En términos de actividad específica (fig. 9C), las larvas presentaron alta actividad a los 3 DDE (59% del valor mayor), que luego disminuyó 6 DDE (inicio de la alimentación exógena) y alcanzó su valor mayor 12 DDE (1195 U/mg P). Las larvas de 28 DDE (13.8 mm LE) presentaron el valor más bajo de actividad proteolítica alcalina específica (7.3 U/mg P).

B- Actividad proteolítica ácida total. La actividad ácida (tipo pepsina) se detectó por primera vez en larvas de 12 DDE. A partir de entonces, la actividad ácida total incrementó con la edad y longitud de las larvas, mientras que la actividad específica presentó su valor mayor en larvas de 12 DDE (342.6 U/mg P) y posteriormente descendió hasta alcanzar su valor menor a los 28 DDE (74.3 U/mg P) (fig. 10A-C).

C- Actividad tipo tripsina. La actividad tipo tripsina presentó un patrón muy similar a las proteasas alcalinas totales hasta los 22 DDE (6.8 mm LE); en ambos casos se observó un pico de actividad total y específica en larvas de 12 DDE. Sin embargo, en contraste con las proteasas alcalinas totales, la actividad total tipo tripsina continuó incrementando hasta alcanzar su mayor valor en larvas de 28 DDE (11.25 U/larva), para luego descender (fig.

11A-B). La actividad específica tipo tripsina se mantuvo relativamente constante a partir de los 17 DDE (fig. 11 C).

D- Actividad tipo quimotripsina. Las larvas presentaron actividad tipo quimotripsina desde antes de la primera alimentación. La actividad total fue relativamente baja en las larvas más pequeñas (0.08-12.45 U/larva) y se incrementó notablemente a los 22 DDE (294.8 U/larva), después de lo cual descendió y volvió a incrementar hasta alcanzar su valor mayor en larvas de 31 DDE (fig. 12A-B). Se observó un pico de actividad específica en larvas de 12 DDE (1413 U/mg P) y un segundo pico, pero de menor magnitud, en larvas de 22 DDE (423 U/mg P) (fig. 12C).

E- Actividad de leucina-aminopeptidasa. La actividad total de leucina-aminopeptidasa incrementó linealmente con la edad y la longitud estándar de las larvas. La actividad específica fue muy alta inicialmente, y presentó 2 picos muy marcados a los 6 (562 U/mg P) y 12 DDE (518 U/mg P) (fig. 13C).

La actividad total de todas las proteasas estudiadas tuvo mayor correlacionación con la longitud de las larvas que con la edad, excepto por tripsina, la cual no se correlacionó en forma significativa con ninguno de los dos parámetros (tabla V).

Tabla V. Matriz de correlación de Pearson (r) entre edad (DDE) y longitud estándar (LE) y la actividad total de diferentes enzimas proteolíticas.

	Proteasas alcalinas	Tripsina	Quimotripsina	Leucina-aminopeptidasa	Proteasas ácidas
DDE	0.834	0.498	0.889	0.895	0.879
LE	0.935*	0.407	0.922*	0.980*	0.974*

* P< 0.05 luego de aplicar la corrección de Bonferroni

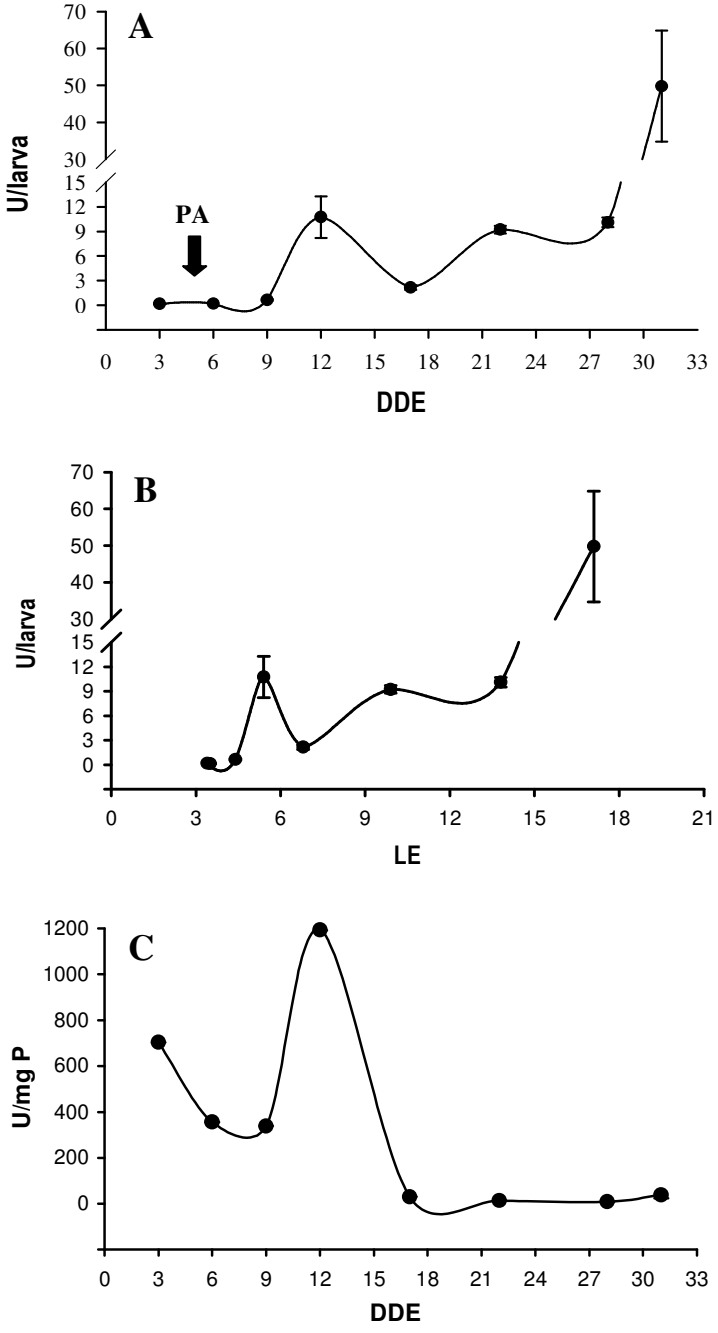


Figura 9. Actividad proteolítica alcalina total durante la ontogenia de larvas de corvina blanca. A- Actividad total (U/larva) en función de la edad (días después de la eclosión, DDE); B- Actividad total en función de la longitud estándar (LE); C- Actividad específica (U/mg P) en función de la edad. Las barras de error representan el error estándar de la media (n= 3). La flecha señala el momento en que inició el suministro de *Artemia*.

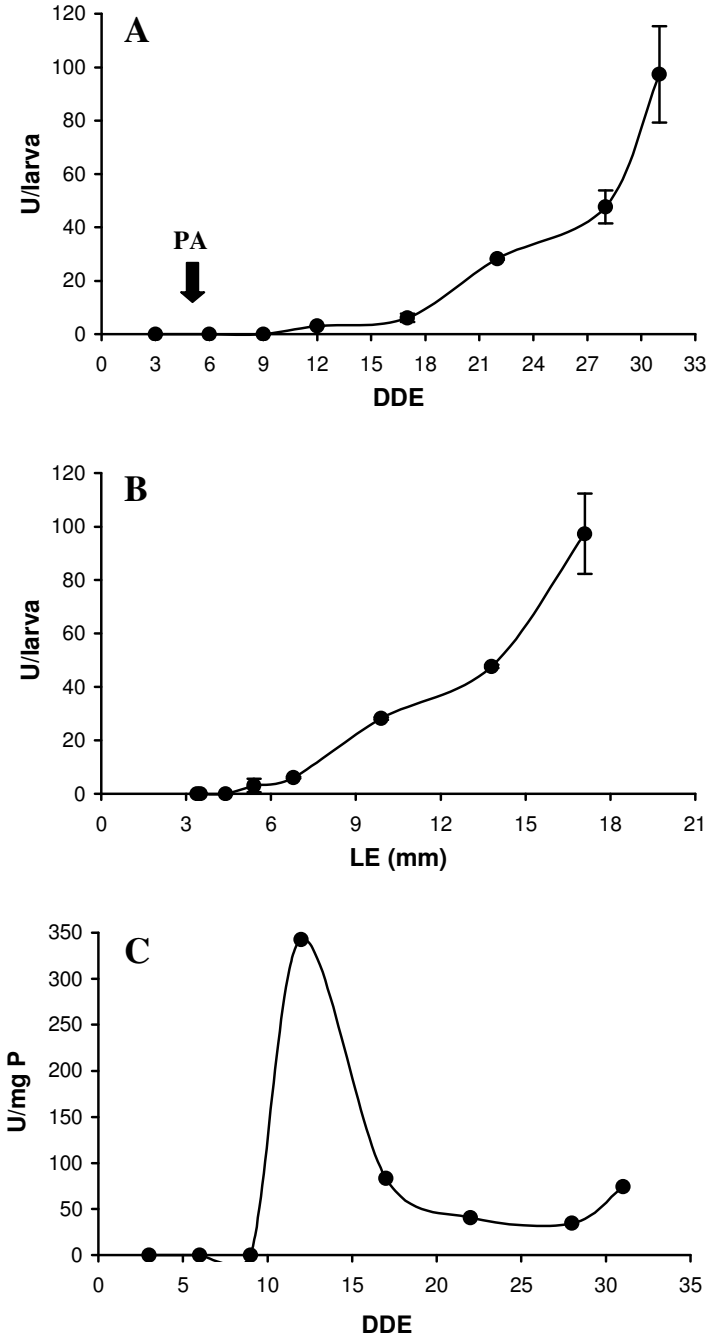


Figura 10. Actividad proteolítica ácida total durante la ontogenia de larvas de corvina blanca. A- Actividad total (U/larva) en función de la edad (días después de la eclosión, DDE); B- Actividad total en función de la longitud estándar (LE); C- Actividad específica (U/mg P) en función de la edad. Las barras de error representan el error estándar de la media (n= 3). La flecha señala el momento en que inició el suministro de *Artemia*.

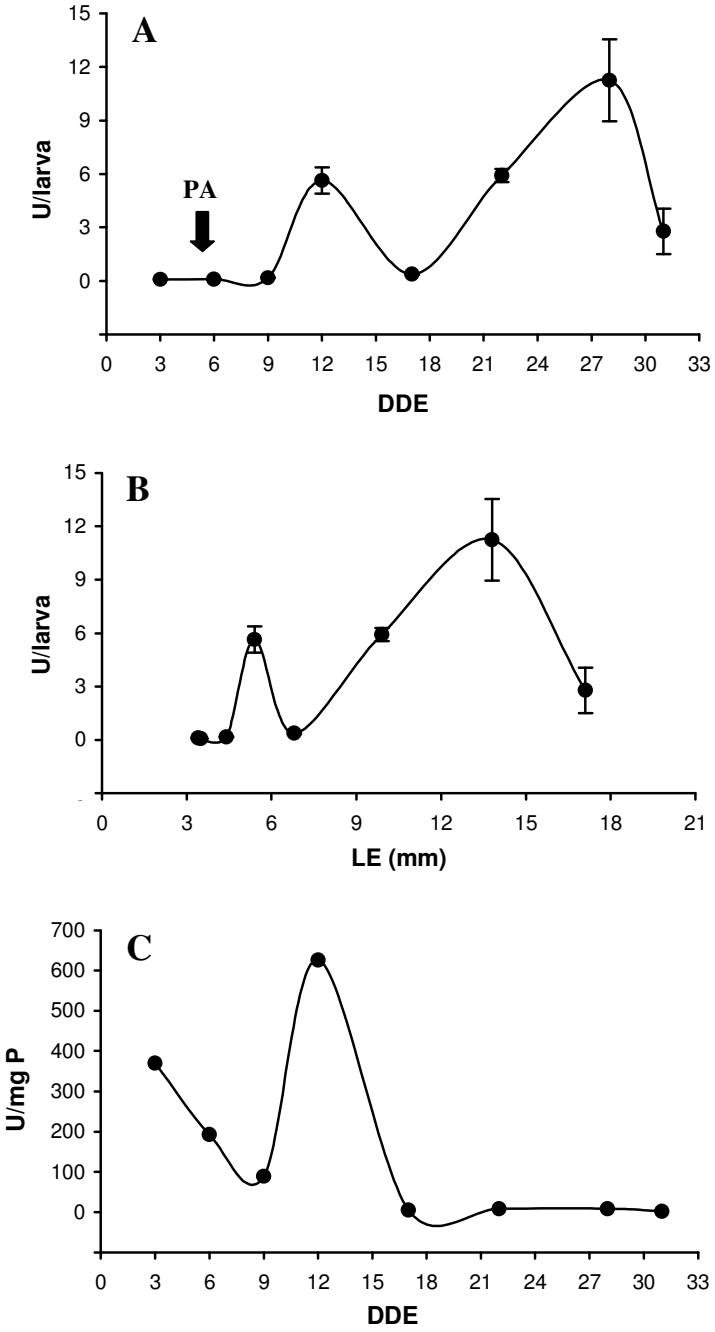


Figura 11. Actividad tipo tripsina durante la ontogenia de larvas de corvina blanca. A- Actividad total (U/larva) en función de la edad (días después de la eclosión, DDE); B- Actividad total en función de la longitud estándar (LE); C- Actividad específica (U/mg P) en función de la edad. Las barras de error representan el error estándar de la media (n= 3). La flecha señala el momento en que inició el suministro de *Artemia.*

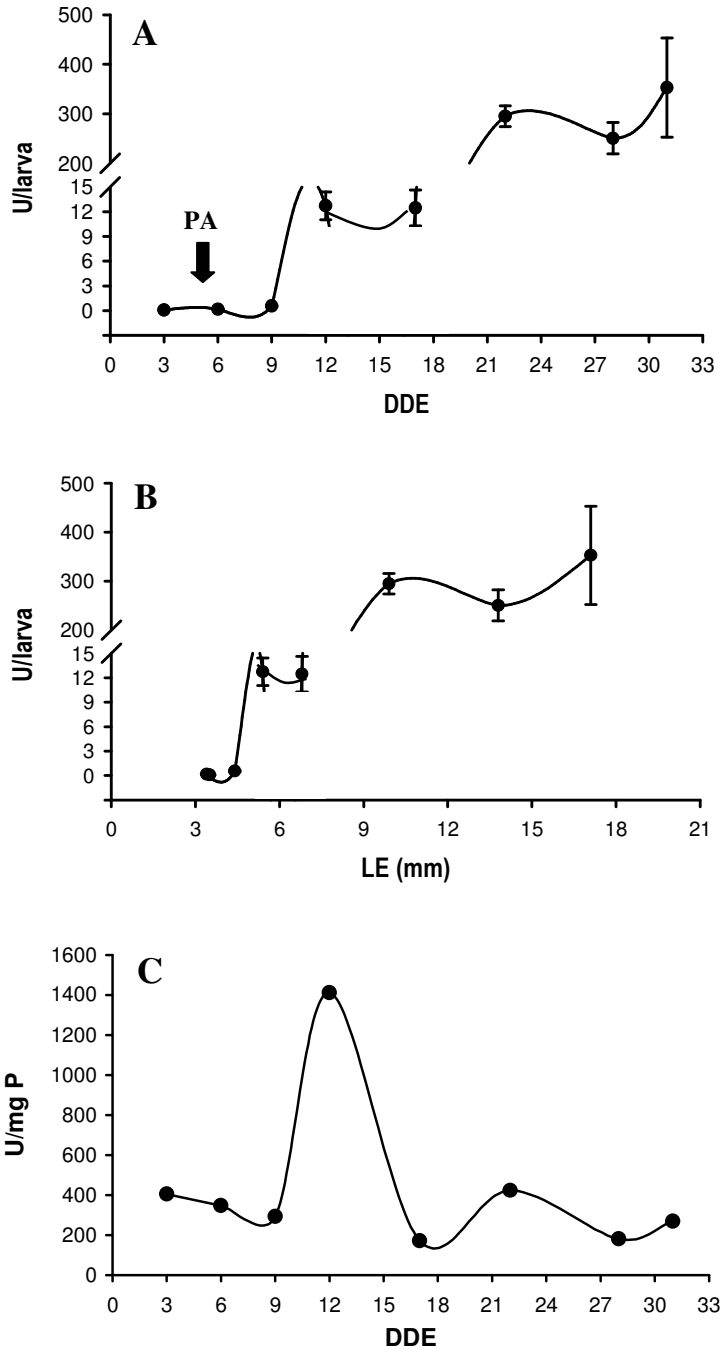


Figura 12. Actividad tipo quimotrisina durante la ontogenia de larvas de corvina blanca. A- Actividad total (U/larva) en función de la edad (días después de la eclosión, DDE); B- Actividad total en función de la longitud estándar (LE); C- Actividad específica (U/mg P) en función de la edad. Las barras de error representan el error estándar de la media (n= 3). La flecha señala el momento en que inició el suministro de *Artemia*.

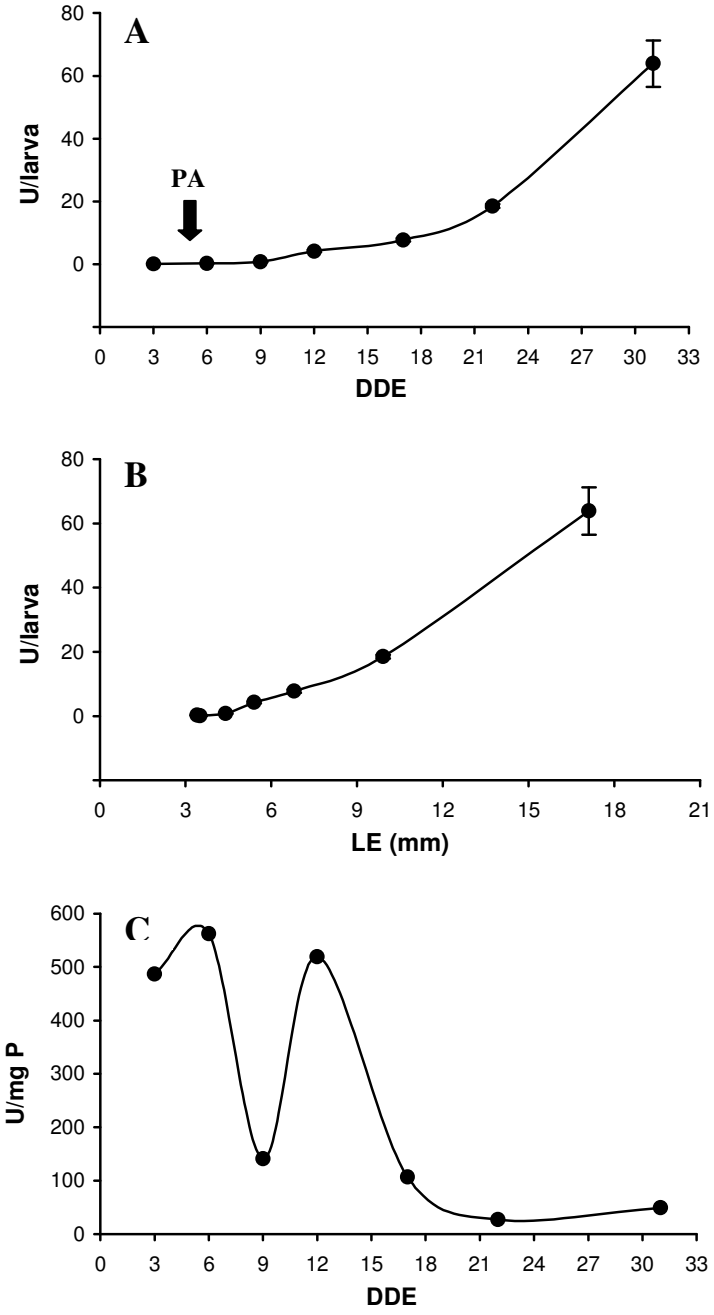


Figura 13. Actividad de leucina-aminopeptidasa durante la ontogenia de larvas de corvina blanca. A- Actividad total (U/larva) en función de la edad (días después de la eclosión, DDE); B- Actividad total en función de la longitud estándar (LE); C- Actividad específica (U/mg P) en función de la edad. Las barras de error representan el error estándar de la media (n= 3). La flecha señala el momento en que inició el suministro de *Artemia*.

VI.2.5. Caracterización parcial de la actividad proteolítica alcalina mediante el uso de inhibidores enzimáticos

La figura 14 presenta el porcentaje de inhibición de la actividad proteolítica alcalina total, producto de la incubación del extracto de larvas de corvina blanca de 12 DDE (5.4 mm LE) y 25 DDE (12.5 mm LE) con diferentes inhibidores enzimáticos. El porcentaje de inhibición es equivalente a la contribución relativa de la(s) enzima(s) con el mecanismo de acción sobre el que actúa el inhibidor utilizado, en la digestión del sustrato proteico (azocaseína).

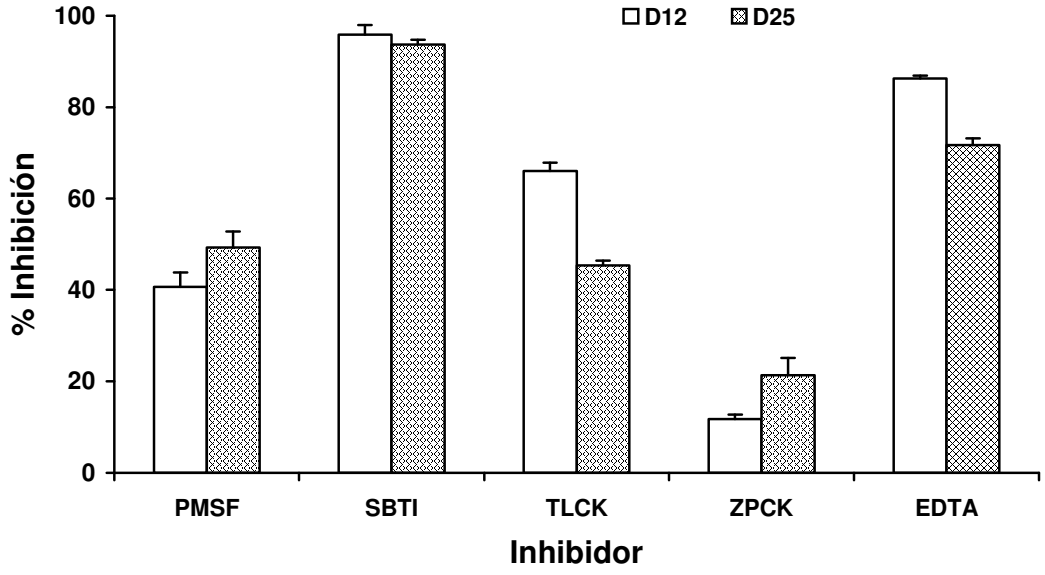


Figura 14. Porcentaje de inhibición de la actividad proteolítica alcalina de larvas de corvina blanca de 12 y 25 DDE mediante el uso de diferentes inhibidores enzimáticos. Las barras de error representan el error estándar de la media (n= 3).

El inhibidor de la soya (SBTI) resultó ser más efectivo que el PMSF en inhibir las proteasas tipo serina de los extractos larvarios, bajo las condiciones experimentales utilizadas. La contribución relativa de las proteasas tipo serina a la actividad proteolítica alcalina total fue muy alta en larvas de ambas edades (12 y 25 DDE) y correspondió aproximadamente al 95.8 y 93.7% respectivamente (tabla VI). En el caso de la actividad tipo tripsina (inhibida por TLCK) y tipo quimotripsina (inhibida por ZPCK), se observaron diferencias en relación con la edad de las larvas. En larvas de 12 DDE, el 81.2% de la actividad de serina proteasas correspondió a tripsina y quimotripsina, siendo la actividad de la primera 5.6 veces mayor que quimotripsina. En larvas de 25 DDE, tripsina y quimotripsina constituyeron el 71.16% de la actividad de serina proteasas, pero la actividad de la primera sólo fue 2.1 veces mayor que quimotripsina (tabla VI).

El porcentaje de inhibición por EDTA fue muy alto en larvas de ambas edades (fig. 14). El EDTA es un quelante que inhibe a las metalo-proteasas al secuestrar los iones divalentes sin los que éstas no son funcionales, sin embargo, no es un inhibidor específico como los demás inhibidores utilizados por lo que puede inhibir más de una clase de enzimas.

Tabla VI. Contribución de tripsina y quimotripsina a la actividad tipo serina en larvas de 12 y 25 DDE. Junto a la media se presenta el error estándar (n= 3).

Mecanismo de acción	**12 DDE**	**25 DDE**
Serina proteasas	95.8% (2.2)	93.7% (1.0)
Tipo Tripsina (A)	68.9% (1.8)	48.4% (1.2)
Tipo Quimotripsina (B)	12.3% (1.1)	22.8% (4.0)
A + B	81.2%	71.2%

VI.3. Digestibilidad *in vitro* de la proteína de algunos ingredientes y microdietas para larvas de peces marinos

La figura 15 presenta la digestibilidad proteica relativa (DPR) de algunos ingredientes de uso común en la elaboración de dietas para larvas de peces marinos y cuatro microdietas formuladas (incluyendo una dieta experimental), por extractos enzimáticos de larvas de corvina blanca de 12 DDE (5.4 mm LE) y 26 DDE (12.9 mm LE).

Las soluciones de las diferentes fuentes proteicas tuvieron una concentración total de proteína cruda de 6.25 mg/ml. Sin embargo, al cuantificar la proteína soluble, se observó gran variación entre los diferentes ingredientes y dietas (anexo 2). No se encontró relación ($P>0.05$) entre la concentración de proteína disuelta y la DPR del ingrediente o dieta, a pesar de que evidentemente debe haber un efecto ya que las enzimas hidrolíticas (ie. tripsina y quimotripsina) solo pueden actuar sobre la fracción de proteína disuelta.

No hubo diferencias significativas ($P= 0.11$) en la DPR de los ingredientes evaluados cuando se incubaron con el extracto de larvas de 12 DDE (fig. 15). Sin embargo, se observó menor digestibilidad de la albúmina con respecto al resto de los ingredientes. En el caso de las dietas formuladas, se encontraron diferencias significativas en la DPR ($P= 0.01$). La "dieta quistes" y Biokyowa obtuvieron los valores más altos de DPR, mientras que la dieta comercial Silver cup, de uso actual en el H-SWRI, presentó el valor menor, que no fue significativamente diferente del presentado por Proton (fig. 15B).

Al utilizar el extracto de larvas de 26 DDE, no se encontraron diferencias significativas ($P= 0.96$) en la DPR de los ingredientes evaluados (fig. 15C). Sin embargo, en este caso la albúmina presentó una DPR relativamente alta. En el caso de las dietas

formuladas, se encontraron diferencias significativas en la DPR (P= 0.001) con un patrón similar al observado en larvas de 12 DDE (fig. 15D).

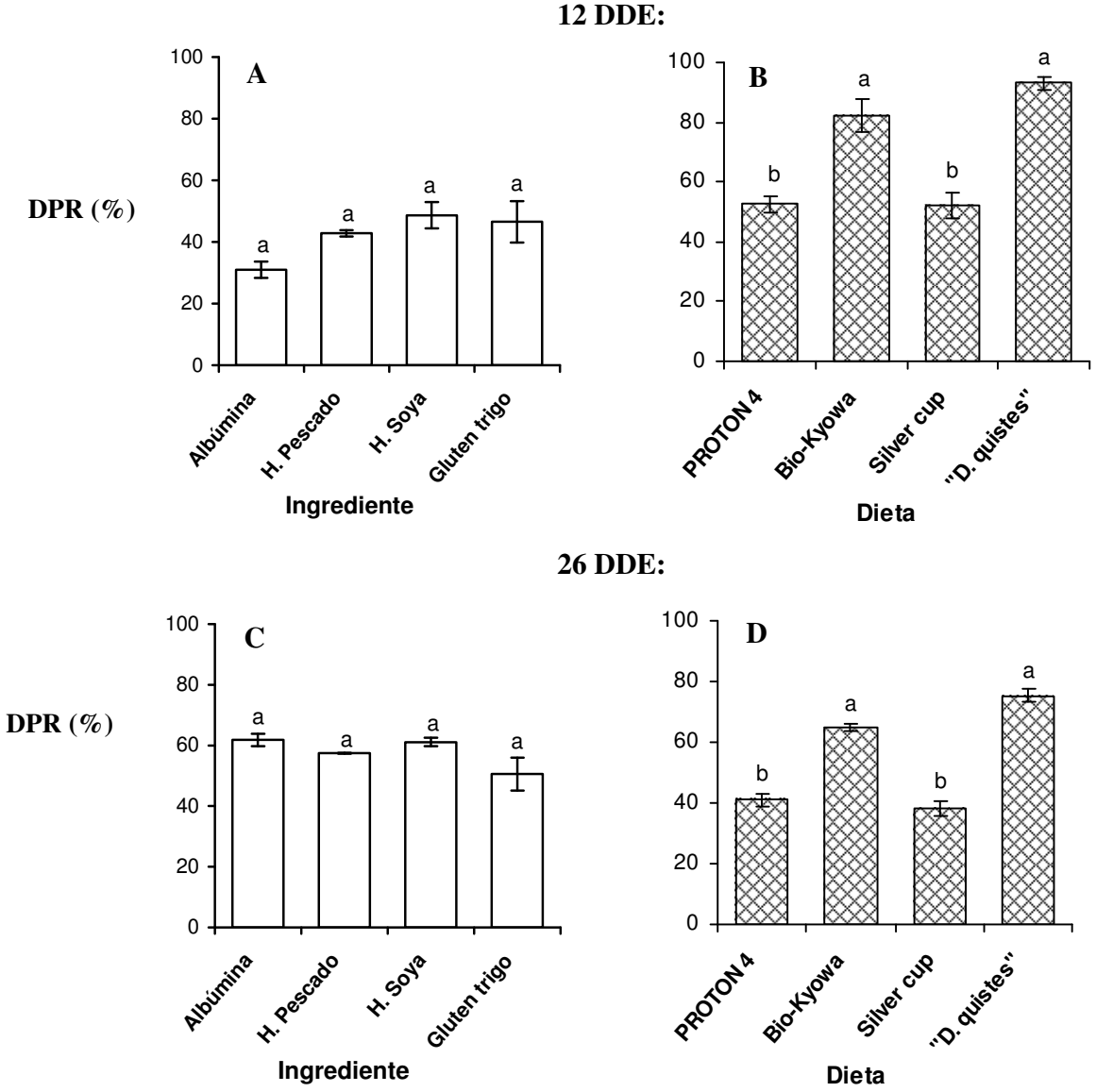


Figura 15. Digestibilidad proteica relativa (DPR) de diferentes ingredientes y dietas formuladas para larvas de peces marinos, por larvas de corvina blanca de: 12 DDE (A y B) y 26 DDE (C y D). Las barras de error representan el error estándar de la media (n= 3). Sobre las barras de error se muestra el resultado de la prueba de rangos múltiples de Tukey ($P < 0.05$).

VII. Discusión

En el presente trabajo se utilizaron dos estrategias para elucidar la capacidad digestiva de las larvas de corvina blanca, la descripción de la morfogénesis del sistema digestivo y la medición de la actividad proteolítica. Las larvas utilizadas en ambos estudios presentaron diferentes tasas de crecimiento específico (0.04 y 0.06 d^{-1} respectivamente), por lo que todos los datos se presentan en función de la edad y la longitud. Sin embargo, se utilizó la longitud de las larvas para hacer relacionar ambos estudios, ya que ésta es un mejor predictor del estado de desarrollo del sistema digestivo (Fuiman and Higgs 1997, Nolting *et al.* 1999, Lazo *et al.* 2000a).

VII.1. Desarrollo del sistema digestivo de larvas de corvina blanca

Se han reportado numerosos estudios histológicos caracterizando el desarrollo del sistema digestivo (tracto digestivo y órganos asociados) de larvas de peces marinos de importancia comercial (Tanaka, 1973, Govoni 1980, Ferraris *et al.* 1987, Walford y Lam 1993, Bengtson *et al.* 1993, Morrison 1993, Segner *et al.* 1993 y 1994, Bisbal y Bengtson 1995, Sarasquete *et al.* 1995, Kahi *et al.* 1996, Baglole *et al.* 1997, Baglole *et al.* 1998, Kaji *et al.* 1999, Lazo 1999, Ribeiro *et al.* 1999, Hamlin *et al.* 2000, García-Hernández *et al.* 2001, Gordon y Hecht 2002). Todos estos trabajos han estado dirigidos hacia la comprensión de la fisiología nutricional de las larvas, con la finalidad de desarrollar protocolos de cultivo y formular dietas de acuerdo a su capacidad digestiva, en cada etapa de desarrollo.

El desarrollo del sistema digestivo de las larvas de corvina blanca fue muy similar al reportado para otros peces marinos provenientes de pequeños huevos pelágicos, particularmente al desarrollo de las corvinas *Sciaenops ocellatus* (Lazo 1999) y *Totoaba macdonaldi* (Lazo *et al.* 2002) y los escombridos *Thunnus thynnus y Thunnus albacares* (Kaji *et al.* 1996 y 1999). Todas estas especies tienen un tracto digestivo muy poco desarrollado al momento de la eclosión. El tracto digestivo experimenta grandes cambios durante la primer fase del desarrollo (0-3 DDE), por ejemplo la diferenciación de los enterocitos y la torsión y compartimentarización del intestino. Según Segner *et al.* (1994), la diferenciación citológica de los enterocitos hacen apto al intestino para la absorción inmediata de nutrientes al iniciar la alimentación exógena. En la corvina blanca, esta diferenciación coincidió con la torsión del tracto digestivo y su consecuente división en intestino anterior, medio y posterior. Según Govoni (1980), la torsión del tracto digestivo es común entre larvas de paracantopterigios y acantopterigios, pero el momento en que ocurre puede variar entre especies. Por ejemplo, en el lenguado *Pleuronectes ferruginea* la torsión se observa aproximadamente 5 días después de la diferenciación de los enterocitos y de la apertura de la boca (Baglole *et al.* 1997).

Durante la primer fase del desarrollo (0-3 DDE) también se formaron el páncreas, el hígado y la vesícula biliar. La presencia de granulosidades acidofílicas en el páncreas (zimógenos o precursores enzimáticos) de corvina blanca sugiere que éste ya es funcional a los 3 DDE. Igualmente, se ha reportado la presencia de zimógenos (visualizados en cortes histológicos) en otras especies antes de la primera alimentación (Segner *et al.* 1994, Sarasquete *et al.* 1995, Hamlin *et al.* 2000). Utilizando técnicas moleculares, Srivastava *et al.* (2002) demostraron la expresión de los precursores de varias enzimas (proteasas y

lipasas) en el páncreas de larvas del lenguado japonés *Paralichthys olivaceus* desde antes del inicio de la alimentación exógena. De manera que al final de la fase de eleuteroembrión (3 DDE, 3.5 mm LE), cuando casi se han agotado por completo las reservas vitelinas, las larvas de corvina blanca cuentan con todas las estructuras necesarias para digerir y asimilar el alimento exógeno. Además, los ojos están pigmentados, por lo que las larvas probablemente pueden detectar a sus presas.

Después de ocurrida la diferenciación y compartimentarización del tracto digestivo, no se observaron grandes cambios en la estructura de sus secciones media y posterior, a excepción del incremento en tamaño y área superficial (pliegues de la mucosa intestinal). Según Ferraris *et al.* (1987), las características histológicas de los enterocitos de estas secciones del tracto digestivo son muy similares entre varias especies de teleósteos, y esa similitud a lo largo de la ontogenia y entre especies está relacionada con la relativa homogeneidad de las partículas que recibe esta región del tracto digestivo (i.e., mono y disacáridos, péptidos cortos y aminoácidos libres). En contraste, existe mayor variación temporal e interespecífica en los patrones de desarrollo de la parte anterior del tracto digestivo, la cual está en mayor contacto con el medio externo y con una gran variedad de compuestos nutrimentales.

Durante la segunda y tercera fase del desarrollo (4-16 DDE, 3.7-4.6 mm LE), hubo un gran incremento en el tamaño y área superficial del intestino, particularmente en la región media. Según Govoni (1980), el ensanchamiento del intestino medio podría servir para almacenar alimento, lo cual sería una adaptación ventajosa para larvas pelágicas confrontadas a un abastecimiento irregular de alimento. Además de aumentar el área de

absorción, los pliegues intestinales podrían ayudar en la mezcla del quimo con las secreciones pancreáticas y biliares (Gawlicka *et al.* 1995).

La presencia de inclusiones densas (lipídicas) en el intestino medio y vacuolas supranucleares (proteicas) en los enterocitos del intestino posterior, un día después de la primera alimentación (6 DDE, 3.8 mm LE), indica que el alimento (*Artemia*) fue digerido y asimilado. Es probable que las inclusiones densas contuvieran también lípidos provenientes de la gota de aceite, la cual se absorbió totalmente a los 10 DDE (4.2 mm LE). Las larvas presentaron tanto inclusiones densas como vacuolas supranucleares hasta finalizado el estudio (31 DDE, 13.9 mm LE).

La diferenciación del tracto digestivo está relacionada con la especialización de cada sección en la digestión y absorción de determinados nutrientes. El intestino medio está mayormente relacionado con la digestión y absorción de lípidos y el intestino posterior con la de proteínas. Esto se ha demostrado mediante técnicas histoquímicas por la ubicación diferencial de determinadas enzimas (ej. lipasas, esterasas, fosfatasas y peptidasas) y productos de la degradación de lípidos y proteínas (Sarasquete *et al.* 1995, Baglole *et al.* 1998, Ribeiro *et al.* 1999).

Las inclusiones densas contienen triglicéridos, producto de la digestión extracelular de lípidos en el intestino por lipasas, difusión de ácidos grasos a las células epiteliales a través de la membrana y síntesis intracelular de triglicéridos (Gordon y Hecht 2002). La presencia de estas inclusiones en los enterocitos de peces es un proceso común que se ha observado en larvas y juveniles de varias especies (Fontagné *et al.* 1998). La acumulación de inclusiones densas en el citoplasma supranuclear de los enterocitos se conoce como esteatosis, y suele ocurrir principalmente en las células de la parte apical de los pliegues de

la mucosa del intestino medio. Las larvas de corvina blanca de 31 DDE presentaron esta condición. Su aparición en otras especies no ha sido asociada con una condición patológica, aunque se relacionó con la deficiencia dietaria de fosfolípidos en larvas de la carpa común, *Cyprinus carpio* (Fontagné *et al.* 1998, Crespo *et al.* 2001). La acumulación de inclusiones densas en el intestino podría interpretarse como una forma de almacenamiento temporal de ácidos grasos, la principal fuente energética para las larvas. Esto podría ocurrir cuando su asimilación excede a la capacidad de exportación al hígado en forma de quilomicrones o lipoproteínas de muy bajo peso molecular (Fontagné *et al.* 1998).

Las vacuolas supranucleares son producto de la absorción por pinocitosis de proteínas a lo largo de la membrana celular de los enterocitos del intestino posterior, y la fusión de las vesículas pinocitóticas durante su migración hacia el núcleo celular (Watanabe 1984). Dentro de estas vacuolas se localizan las catepsinas E (de acción comparable a pepsina) y D (comparable a papaína) y la fosfatasa ácida. Según Georgopoulou (1985) y Vernier (1990), las vacuolas supranucleares son realmente fagolisosomas, ya que contienen tanto un sustrato externo (proteínas) como las enzimas necesarias para degradarlo.

Durante las primeras fases del desarrollo, la absorción de proteínas por pinocitosis y digestión intracelular podría compensar la ausencia de estómago, permitiendo la asimilación de macromoléculas proteicas, ya que las proteasas presentes en las larvas sólo digieren parcialmente las proteínas (Govoni 1980, Gordon y Hecht 2002). Generalmente, al desarrollarse el estómago este tipo de digestión disminuye simultáneamente con un incremento en la digestión extracelular, aunque algunas especies conservan ambas estrategias pasado el período de transformación (Govoni 1980, Govoni *et al.* 1986,

Georgopoulou 1985, García-Hernández *et al.* 2001). Este parece ser el caso en corvina blanca.

Doce DDE (4.3 mm LE) se observaron células mucosas en el esófago de las larvas, que incrementaron en número con la edad. Según Anderson (1986), las secreciones mucosas de estas células podrían contener compuestos involucrados en la lubricación del esófago, enzimas digestivas y cofactores de hidrólisis enzimática. La presencia de estas células podría indicar la capacidad de digerir un mayor espectro de alimentos.

Hacia el final de la etapa larval (cuarta fase del desarrollo) se registró un segundo período de grandes cambios morfológicos, durante el cual el aparato digestivo adquirió la morfología del adulto. El aparato digestivo del adulto se caracteriza por la presencia de un estómago compuesto por una parte cardiaca (glandular) y una pilórica (muscular), y por la presencia de cinco grandes ciegos pilóricos. Durante este período de transformación (16-31 DDE, 4.6-13.9 mm LE), se observó la presencia de los dientes faríngeos, lo cual es probablemente un signo de que las larvas pueden digerir presas de mayor tamaño.

La similitud histológica de los ciegos pilóricos y el intestino anterior concuerda con la hipótesis de que el desarrollo de los ciegos pilóricos es una adaptación para incrementar el área intestinal y que no tienen un papel específico en la digestión (García-Hernández *et al.* 2001). Sin embargo, otros autores proponen que los ciegos pilóricos facilitan la digestión al transportar nutrientes susceptibles a ser absorbidos al torrente sanguíneo, antes del paso del quimo al intestino. También podrían neutralizar la acidez del quimo antes de ingresar al intestino, lo que se fundamenta en la ausencia de ciegos en peces agastros (Gawlicka *et al.* 1995).

En la corvina blanca, la formación de las glándulas gástricas fue bastante precoz (16 DDE, 4.6 mm LE) en comparación con otras especies de peces marinos como los sciaenidos *Leiostomus xanthurus* (10 mm LE, Govoni 1980) y *Sciaenops ocellatus* (20-22 DDE, 10.5 mm LE, Lazo 1999), el sabalote *Chanos chanos* (42 DDE, Ferraris *et al.* 1987), el bacalao *Melanogrammus aeglefinus* (33 DDE, 10 mm LE, Hamlin *et al.* 2000), la lobina europea *Dicentrarchus labrax* (55 DDE, García-Hernández *et al.* 2001), y los lenguados: *Scophthalmus maximus* (20 DDE, 17 mm LE, Segner *et al.* 1994), *Paralichthys dentatus* (31 DDE, 7.5 mm LE, Bisbal y Bengtson 1995), *Pleuronectes ferruginea* (29-36 DDE, Baglole *et al.* 1997) y *Solea senegalensis* (27 DDE, Ribeiro *et al.* 1999). Otras especies con un desarrollo muy temprano de las glándulas gástricas son: el sciaenido *Totoaba macdonaldi* (14 DDE, Lazo *et al.* 2002), los escombridos: *Thunnus thynnus* (11 DDE, 5.6 mm LE, Kaji *et al.* 1996) y *Thunnus albacares* (14 DDE, aproximadamente 6 mm LE, Kaji *et al.* 1999), y el róbalo australiano *Lates calcarifer* (13 DDE, 11.04 mm LT, Walford y Lam 1993).

Según Kaji *et al.* (1996 y 1999), en los escómbridos el desarrollo precoz del estómago podría ser una adaptación a la temprana aparición de hábitos piscívoros, el cual está asociado a una alta tasa de crecimiento. Ese podría ser el caso de la corvina blanca, ya que aproximadamente a partir de los 16 DDE se presenta una alta incidencia de canibalismo en los estanques de cultivo, el cual se trata de disminuir con la frecuente selección y separación por tallas de los organismos y el suministro de alimento *ad libitum*.

De acuerdo con Tanaka (1973), la formación de las glándulas gástricas (productoras de HCl y pepsinógeno) y los ciegos pilóricos señalan la transformación de larva a juvenil, y en algunas especies puede utilizarse como un indicador de que las larvas pueden ser

destetadas (Segner *et al.* 1993). Sin embargo, cuando se usan dietas adecuadas, el destete puede realizarse muy tempranamente. Por ejemplo, las larvas de la corvina dorada (*Sciaenops ocellatus*), pueden ser destetadas completamente con una dieta formulada a partir de los 8 DDE y las larvas de lobina europea (*Dicentrarchus labrax*) a partir de los 10 DDE, mucho antes de que aparezcan las primeras glándulas gástricas (Holt 1993, Cahu *et al.* 1999).

VII.2. Actividad proteolítica en larvas de corvina blanca

Complementando los estudios histológicos, se han reportado gran cantidad de trabajos acerca del desarrollo de las enzimas digestivas de larvas de peces marinos (Lauff y Hofer 1984, Baragi and Lovell 1986, Zambonino-Infante y Cahu 1994, Alarcón 1997, Zambonino-Infante y Cahu 1998, Gawlicka *et al.* 2000, Lazo *et al.* 2000a, Kim *et al.* 2001, Kurokawa *et al.* 2002, Cuvier-Péres y Kestemont 2002). Estos estudios han permitido determinar el grado de funcionalidad de los diferentes órganos digestivos a lo largo del período larval. Los reportes coinciden en que las larvas cuentan con un amplio espectro de enzimas digestivas antes del inicio de la alimentación exógena, y que sus niveles de actividad fluctúan durante el período larval en relación con cambios fisiológicos o alimenticios (Zambonino-Infante y Cahu 2001).

En relación a la fluctuación en los niveles de actividad enzimática, las actividad proteolítica alcalina de las larvas de corvina blanca de 25 DDE (12.5 mm LE) varió con la hora del día. Se observaron 2 picos de actividad, uno a las 12:00 p.m. y un segundo pico un poco más pequeño entre 8:00 p.m. y 12:00 a.m. Los valores más bajos de actividad se presentaron a las 4:00 p.m. y 4:00 a.m. El descenso en la actividad alcalina de las larvas a

las 4:00 a.m. podría deberse a que no se les brindó alimento ni luz durante la madrugada, pero no se encontró una razón evidente para el segundo descenso en la actividad, a las 4:00 p.m. Applebaum (2001) encontró que las larvas de corvina dorada (*Sciaenops ocellatus*) de 14 DDE presentan un ciclo circadiano de actividad de quimotripsina, con un solo pico de actividad. En ese caso el descenso en la actividad ocurrió en la noche y también se relacionó con ausencia de luz. Con base en la información obtenida, se eligió las 12:00 p.m. como la hora de muestreo para los ensayos de actividad enzimática, ya que a esta hora se encontró el mayor pico de actividad. El presente estudio no tuvo dentro de sus objetivos determinar si este patrón diario de actividad alcalina se debe al protocolo de alimentación utilizado, o corresponde a ritmos endógenos. Es necesario realizar estudios posteriores para elucidar este punto, utilizando larvas en ayunas, para evaluar el posible efecto producido por el protocolo de alimentación.

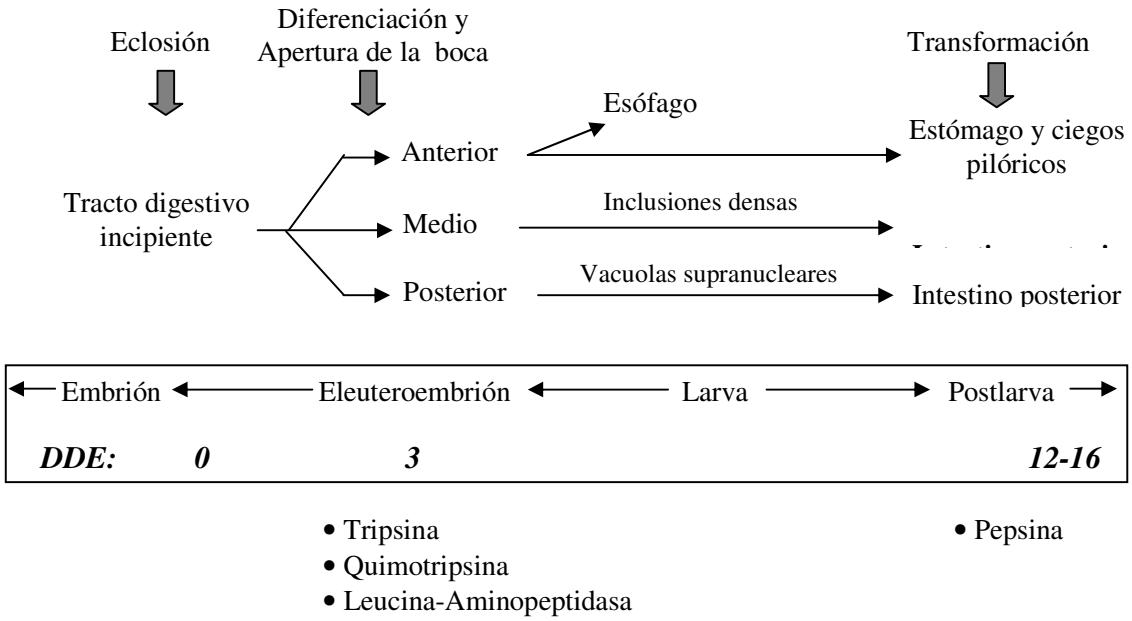


Figura 16. Diagrama de los principales eventos ocurridos durante la ontogenia del tracto digestivo de larvas de corvina blanca.

Las larvas de corvina blanca presentaron actividad de tripsina, quimotripsina y leucina-aminopeptidasa antes de la primera alimentación (fig. 16). Tripsina y quimotripsina son enzimas pancreáticas, responsables de la digestión luminal de macromoléculas, y leucina-aminopeptidasa es una enzima del borde en cepillo de los enterocitos, que completa el rompimiento de los péptidos hasta monómeros (Segner *et al.*1993). En especies con un largo período de eleuteroembrión, el desarrollo de actividad enzimática durante esta fase se ha tomado como un indicador de capacidad para iniciar la alimentación exógena (Gawlicka *et al.* 2000).

La actividad específica (U/mg P) de tripsina, aminopeptidasa y de las proteasas alcalinas totales fue muy alta en larvas de 3 DDE (3.5 mm LE). Se ha reportado que al inicio de la alimentación exógena se presenta un pico en la actividad específica (Zambonino-Infante y Cahu 1994, Alarcón 1997, Lazo *et al.* 2000a, Cuvier-Péres y Kestemont 2002), incluso en condiciones de ayuno (Moyano *et al.* 1996). Esto sugiere que la alta actividad específica inicial está programada genéticamente y no está únicamente determinada por la ingesta de alimento vivo. En el caso de quimotripsina, la actividad específica no fue muy alta inicialmente, al igual que en larvas de la perca *Perca fluviatilis* (Cuvier-Péres y Kestemont 2002) y la lobina rayada *Morone saxatilis* (Baragi y Lovell 1986).

La actividad específica de todas las proteasas alcalinas estudiadas disminuyó 9 DDE (4.4 mm LE). Este descenso no tiene relación aparente con cambios morfológicos del sistema digestivo. Sin embargo, ocurrió poco después de que la gota de aceite (fuente energética endógena) había sido totalmente absorbida (10 DDE, 4.2 mm LE) y justo antes de que iniciara la formación del estómago (16 DDE, 4.6 mm LE). Por lo tanto, el descenso

en la actividad específica podría estar relacionado con cambios en la fisiología de las larvas a otros niveles (por ejemplo hormonales), y que podrían ser preparatorios para el modo adulto de digestión. Este descenso también coincide con cambios en el protocolo de cultivo de esta especie, ya que es cuando se empezó a incrementar la temperatura del agua (1.3 ^{o}C/d) con el fin de acelerar el crecimiento de las larvas. A pesar de que la ontogenia de las enzimas digestivas está regulada genéticamente, puede ser modulada ligeramente por las características del alimento (“adaptación de la actividad pancreática”) (Zambonino-Infante y Cahu 1994b y 2001) y las condiciones ambientales (Kuz’mina y Gel’man 1998). Es probable que las características físico-químicas del agua también modulen en cierta medida los niveles de enzimas digestivas. Para aclarar este punto, es necesario realizar evaluaciones posteriores de la actividad enzimática de larvas bajo diferentes condiciones físico-químicas del agua.

Doce DDE (5.4 mm LE), se presentó un pico muy alto de activad específica de todas las enzimas estudiadas, incluyendo a las proteasas ácidas, las cuales se detectaron por primera vez en esa fecha. Este pico coincide con la formación del estómago, y nuevamente está también relacionado con cambios en el protocolo de cultivo. En esta fecha, las larvas fueron trasladadas de las incubadoras a estanques circulares e inició la suplementación de alimento formulado. Estas prácticas se realizan justo antes de que las larvas inicien la flexión del notocordio (13-15 DDE, ~5-6 mm LE), ya que se ha observado que la flexión constituye un período crítico en el desarrollo y supervivencia de las larvas (Curtis, com. pers.). La alta producción de enzimas digestivas podría ser una respuesta compensatoria ante el nuevo alimento, que probablemente es más difícil de digerir que el alimento vivo.

Según Zambonino-Infante y Cahu (1994a), la actividad de ciertas enzimas digestivas es inversamente proporcional a la digestibilidad de la dieta.

Posteriormente, la actividad específica de todas las proteasas estudiadas volvió a descender. Esto probablemente se debe a que durante esta etapa de transformación de larva a juvenil hay un gran incremento en el tamaño del estómago y del intestino. Consecuentemente, también hay un aumento en el contenido de proteínas estructurales en los extractos enzimáticos, y podría haber síntesis de otras enzimas digestivas, con lo cual disminuiría el aporte relativo de las enzimas estudiadas a la proteína disuelta total. Según Lazo (1999) y Zambonino-Infante y Cahu (2001), la disminución en la actividad específica (1-3 semanas después de la eclosión) es una característica común en larvas de peces y no se debe a una menor síntesis enzimática sino al incremento en las proteínas estructurales. De manera general, no hubo grandes cambios en la actividad enzimática específica pasado el período de transformación. Sin embargo, la actividad tipo quimotripsina presentó un segundo pico de actividad específica 22 DDE (9.9 mm LE).

La actividad enzimática también se expresó en términos de actividad total (U/larva). Al relacionar la actividad total con la edad y con la longitud de las larvas se obtuvo un patrón muy similar, ya que ambas variables estuvieron íntimamente asociadas (r^2= 0.99). En términos generales, la actividad total de todas las proteasas estudiadas tendió a incrementar en el tiempo, a excepción de la actividad de tripsina. Según Govoni *et al.* (1986), el incremento temporal en la actividad enzimática total de las larvas podría ser una respuesta a un mayor consumo de alimento.

El incremento en la actividad total de leucina-aminopeptidasa con la edad de las larvas indica un adecuado desarrollo y maduración del intestino, específicamente del borde

en cepillo de los enterocitos (Zambonino-Infante *et al.* 1997). La actividad ácida total (tipo pepsina) aumentó con la edad a partir de la formación del estómago, e indica un incremento en la funcionalidad de éste.

La similitud entre el patrón de actividad total de tripsina y las proteasas alcalinas totales, hasta 22 DDE, podría indicar que tripsina tiene gran importancia cuantitativa entre las proteasas alcalinas y que determina el patrón mostrado por éstas. Sin embargo, 31 DDE la actividad total tipo tripsina descendió, mientras que la actividad alcalina total continuó incrementando. Esto probablemente está asociado al incremento en la actividad tipo quimotripsina, la que presentó altos niveles a partir de 22 DDE. Esto se corroboró mediante el uso de inhibidores enzimáticos específicos. La contribución relativa de tripsina y quimotripsina a la actividad tipo serina (~95% de la actividad alcalina total) varió en larvas de 12 DDE (5.4 mm LE) y 25 DDE (12.5 mm LE). El aporte relativo de quimotripsina incrementó (de 12.3 a 22.8%) y el de tripsina descendió (de 68.9 a 48.4%) con la edad de las larvas, aunque en ambos casos tripsina aportó el mayor porcentaje de la actividad tipo serina. La suma de ambas enzimas representó un gran porcentaje (71-81%) de la actividad tipo serina, el porcentaje restante se debió a la acción de otras enzimas no evaluadas. De igual manera, durante el desarrollo larvario de la dorada (*Sparus aurata*) las proteasas tipo serina constituyeron la mayor parte de la actividad proteolítica alcalina total, pero en esta especie quimotripsina tuvo mayor importancia relativa que tripsina (Díaz *et al.* 1997).

El PMSF resultó ser poco efectivo en la inhibición de las proteasas tipo serina, probablemente debido a que tiene una vida media muy corta (1 h a pH 7.5, tabla 3) y la metodología empleada en este trabajo utiliza largos tiempos de incubación. Otra razón

podría ser que este inhibidor presente baja especificidad por las enzimas de esta especie. Díaz *et al.* (1997) obtuvieron resultados similares y concluyeron que este inhibidor no es muy recomendado para caracterizar las proteasas de peces. Por otra parte, el EDTA resultó ser un inhibidor muy poco selectivo, y por lo tanto no fue útil en la determinación del mecanismo de acción de las proteasas alcalinas. Esto se debe a que varias enzimas con diferentes mecanismos de acción requieren de iones divalentes para ser funcionales o para su estabilidad, por ejemplo tripsina y quimotripsina, y el EDTA reduce su actividad al asociarse con esos iones.

En contraste, los inhibidores SBTI (inhibidor de serina proteasas), TLCK (tipo tripsina) y ZPCK (tipo quimotripsina), parecieron funcionar adecuadamente con el protocolo utilizado. Esto se comprobó utilizando enzimas comerciales. Sin embargo es recomendable utilizar varios inhibidores para caracterizar un mismo mecanismo de acción enzimática, ya que todos los inhibidores tienen limitaciones en cuanto a los rangos de tiempo, pH y temperatura en los cuales funcionan adecuadamente, y estos rangos suelen ser diferentes a los establecidos para las enzimas digestivas de peces y mamíferos.

Todas las determinaciones de la actividad alcalina total se realizaron a pH 8.8 y una temperatura de 37 °C, ya que se encontró mayor actividad bajo estas condiciones. Puede ser que el pH óptimo de acción de estas proteasas se encuentre por encima de 8.8, ya que no se evaluaron pHs más altos. Para determinar el pH óptimo de acción de las proteasas alcalinas de esta especie es necesario realizar nuevos estudios utilizando soluciones amortiguadoras que permitan trabajar a pHs mayores a los utilizados en este trabajo. De igual manera, la actividad proteolítica alcalina total de larvas de la corvina dorada (*Sciaenops ocellatus*) y la

dorada (*Sparus aurata*) incrementó con el pH, y fluctuó con la edad (pH 6-10), incrementando conforme crecieron las larvas (Moyano *et al.* 1996, Lazo 1999).

Se han reportado valores del pH intestinal de larvas de peces que van desde 6 hasta pH 9, dependiendo de la edad y la alimentación (Walford y Lam 1993, Bengtson *et al.* 1993, Hoehne-Reitan *et al.* 2001). Estos valores de pH son muy cercanos a los determinados como óptimos o de máxima actividad mediante pruebas *in vitro*, de modo que las enzimas trabajan muy cerca de su óptimo (Lazo 1999). Según Bengtson *et al.* (1993), el conocimiento del pH intestinal de las larvas podría ser útil en la elaboración de dietas formuladas, ya que al modificar el pH de las dietas de modo que asemeje el pH intestinal se promovería una digestión normal. Lo mismo podría aplicarse en cuanto al pH de máxima actividad (en el presente estudio se asumió que era 8.8). Su aplicación en el diseño de dietas formuladas podría mejorar la digestión de las mismas gracias a una mayor actividad de las proteasas alcalinas del organismo.

Con base en los resultados expuestos acerca del desarrollo temporal del sistema digestivo y la actividad proteolítica, es posible establecer que las larvas de corvina blanca cuentan con todas las estructuras y funciones esenciales para digerir el alimento exógeno a partir de los 3 DDE (3.5 mm LE) (fig. 16). Esto es 2 días antes con respecto al protocolo actual de cultivo. Así mismo, debido a que presentan un desarrollo precoz del estómago, probablemente pueden ser destetadas muy tempranamente (antes de los 5 mm LE) con respecto al protocolo actual de cultivo.

La capacidad digestiva de las larvas está adaptada al alimento existente en el medio natural, y la plasticidad fenotípica en la respuesta del sistema digestivo de las larvas parece ser limitada, sobre todo ante grandes cambios como es la alimentación con presas vivas o el

uso de microdietas (Segner *et al.* 1993). Las larvas presentan una rápida tasa de evacuación intestinal, por lo que es probable que tripsina y quimotripsina no logren hidrolizar completamente las proteínas presentes en las microdietas. Además, la absorción de macromoléculas por pinocitosis y digestión intracelular es un proceso relativamente lento y la digestión ácida no se presenta sino hasta avanzado el período larval. Una posible solución para lograr el destete temprano podría ser encapsular péptidos de bajo peso molecular y aminoácidos libres que sean fácilmente absorbidos en el intestino larval (Walford y Lam 1993). Por ejemplo, Zambonino-Infante y Cahu (1994) lograron el destete temprano (10 DDE) de larvas de la lobina europea (*Dicentrarchus labrax*) alimentadas con dietas formuladas que contenían hidrolizados de pescado.

Se ha postulado que las larvas de peces marinos tienen una baja capacidad digestiva durante las primeras fases del desarrollo y que hay un aporte importante de enzimas proteolíticas por las presas vivas (Lauff y Hofer 1984). Sin embargo, estudios recientes demuestran que el aporte de las presas vivas es mínimo (3-17% de la actividad de tripsina y 0.6% de la actividad proteolítica total) (Cahu y Zambonino-Infante 1997, Kurokawa *et al.* 1998, Gawlicka *et al.* 2000, Lazo *et al.* 2000). Además, estudios electroforéticos han revelado diferencias entre las enzimas proteolíticas de las larvas y las enzimas de las presas vivas; además de que estas últimas no se encuentran activas dentro del tracto digestivo de las larvas. Esto sugiere que el efecto de las enzimas exógenas es más cualitativo que cuantitativo, probablemente estimulando la secreción de las enzimas producidas en el páncreas (Moyano *et al.* 1996, Díaz *et al.* 1997, García-Ortega 1999).

VII.3. Digestibilidad proteica relativa de algunos ingredientes y microdietas para larvas de peces marinos

Las dietas formuladas para larvas de peces deben estar adecuadas a las especificidades del sistema digestivo, y a los cambios que se presentan durante la ontogenia (Moyano *et al.* 1996, Cahu y Zambonino-Infante 1997, Lazo *et al.* 2000a, Gordon y Hecht 2002). Debido al alto requerimiento proteico de las larvas (Watanabe y Kiron 1994) y a que durante la etapa larval se presentan altas mortalidades asociadas a problemas nutricionales, es importante realizar una correcta selección de los ingredientes utilizados en la elaboración de dietas formuladas para cada etapa de desarrollo.

A pesar de que el perfil de aminoácidos de una fuente proteica determina su calidad como nutriente, también es necesario que sea altamente digestible, ya que la digestibilidad de la proteína es la que indica la biodisponibilidad de los aminoácidos para ser aprovechados por el organismo (Lindner *et al.* 1995). Es por ello que la mayoría de estudios tendientes a evaluar ingredientes y/o dietas utilizan como primer recurso las pruebas de digestibilidad *in vitro*.

En los ensayos de digestibilidad *in vitro*, resulta más apropiado utilizar extractos enzimáticos del propio organismo, en el estadío de desarrollo de interés para el estudio, en lugar de utilizar enzimas comerciales provenientes de otros organismos (i.e., bacterias, mamíferos). Esto se debe a que la digestión de una proteína es el resultado de la especificidad de las enzimas digestivas del organismo sobre el sustrato proteico y de la acción combinada de varias enzimas. Además de que existen diferencias temporales e inter-específicas en el perfil enzimático y en las propiedades mismas de las enzimas. Estudios recientes realizados en peces juveniles (Lindner *et al.* 1995, Alarcón *et al.* 2002, Chong *et*

al. 2002, Rungruangsak-Torrisen *et al.* 2002) han demostrado la efectividad del uso del extracto enzimático del propio organismo para predecir la calidad de un ingrediente/dieta.

Esta aproximación se ha utilizado para evaluar la digestibilidad de ingredientes y dietas para la alimentación de larvas de peces marinos en un mismo estadío de desarrollo (Ozkizilcik y Chu 1996, Alarcón 1997, Alarcón *et al.* 1999, Lazo *et al.* 2002). Lamentablemente, no es posible comparar los resultados obtenidos en esos trabajos, debido a que en todos ellos se evaluaron diferentes fuentes proteicas y se utilizaron diferentes metodologías, ya que todavía no existe un método estándar para cuantificar la digestibilidad en larvas de peces. Además, los resultados varían según el organismo (talla, especie) del cual se obtuvo el extracto enzimático para realizar el ensayo.

En este trabajo no se encontraron diferencias significativas en la digestibilidad proteica relativa (DPR) de los ingredientes evaluados para larvas de una misma edad. Sin embargo, en las larvas de 26 DDE (12.9 mm LE) la DPR de la albúmina fue mayor en comparación con las larvas de 12 DDE (5.4 mm LE). Esto probablemente se debió a un cambio en la capacidad digestiva de las larvas de mayor edad, asociado talvés al incremento en la producción de quimotripsina. Aparentemente, la harina de pescado utilizada no fue de alta calidad, ya que se esperaba una mayor digestibilidad con respecto a las fuentes proteicas de origen vegetal. La alta digestibilidad relativa obtenida con la harina de soya sugiere que podría ser un ingrediente adecuado para la elaboración de dietas para larvas de corvina blanca a partir de los 12 DDE.

En cuanto a la digestibilidad de las dietas evaluadas, el patrón fue muy similar para larvas de ambas edades. La dieta de uso actual en el H-SWRI (Silver cup) obtuvo el menor valor de DPR. Por otra parte, la dieta experimental ("dieta quistes"), que utiliza quistes de

Artemia como fuente proteica, obtuvo el mayor valor de DPR, lo que sugiere que podría ser adecuada para realizar el destete de las larvas de corvina blanca. Esta dieta ya ha probado promover un crecimiento adecuado en larvas del bagre *Clarias gariepinus* (García-Ortega 1999) y el botete diana *Sphoeroides annulatus* (García-Ortega *et al.* 2001).

La similitud en los patrones de digestibilidad proteica de las dietas formuladas evaluadas en larvas de ambas edades, probablemente se deba a que todos los ensayos se realizaron en condiciones alcalinas. Sin embargo, las larvas mayores contaban a esa edad con un estómago bien desarrollado y una alta actividad ácida total. Al no realizar una fase de digestión ácida, es probable que se estuviera subestimando la digestibilidad real de las dietas evaluadas con estos extractos. Alarcón (1997) encontró que una fase de digestión ácida previa a la alcalina, incrementa la hidrólisis de algunos ingredientes y de la mayoría de microcápsulas experimentales evaluadas con extractos de larvas de la dorada (*Sparus aurata*).

Varios factores afectan la digestibilidad y deben ser optimizados con el fin de realizar evaluaciones más certeras de la calidad de la proteína dietaria y para estandarizar la técnica. En futuros estudios, deben establecerse la concentración óptima de enzima (unidades de actividad proteolítica total) y sustrato (mg de proteína del ingrediente/dieta), el tiempo de incubación, la temperatura y el pH que más se asemejen a las condiciones en que naturalmente ocurre la digestión (Alarcón 1997). Por lo tanto, se requiere comprender la fisiología digestiva de las larvas para desarrollar técnicas de digestibilidad *in vitro* confiables.

Uno de los factores que afecta la digestibilidad de un ingrediente es la solubilidad de las proteínas, ya que las enzimas hidrolíticas solo pueden actuar sobre la fracción

disuelta. En este trabajo, se encontró que la proteína de los ingredientes/dietas evaluados se disolvió en diferente medida (anexo 2), aunque en la mayoría de los casos la solubilidad fue muy baja y no hubo una relación evidente con la digestibilidad proteica relativa. Esto implica la necesidad de buscar procesos químicos o físicos que aumenten la solubilidad de la proteína dietaria.

Es importante recalcar que el aprovechamiento de la microdieta por las larvas depende de muchos otros factores, además de la digestibilidad, por ejemplo: su estabilidad en el agua, aceptabilidad y composición nutricional (particularmente el perfil de aminoácidos y ácidos grasos poli-insaturados) (Nolting *et al.* 1999). Así mismo, la digestibilidad está determinada por una serie de factores físicos y biológicos, como la concentración de enzimas y tasa de evacuación intestinal (Lazo y Davis 2000). Las pruebas *in vivo* siguen siendo la estimación más exacta del valor nutricional de un ingrediente/dieta para el organismo. Sin embargo, los ensayos de digestibilidad *in vitro* pueden ser una herramienta bastante confiable cuando se acompañan de bioensayos en donde se evalúe su efectividad para predecir la calidad de un alimento. Además, son mucho más prácticos, rápidos y económicos que las pruebas *in vivo.*

LITERATURA CITADA

Anderson, T.A. 1986. Histological and citological structure of the gastrointestinal tract of the luderick, *Girella tricuspidata* (Pisces, Kyphosidae) in relation to diet. Journal of Morphology, 190: 109-119.

Alarcón, F.J. 1997. Procesos digestivos en peces marinos: caracterización y aplicaciones prácticas. Ph.D. Disertación, Universidad de Almería, España. 320 p.

Alarcón, F.J., F.J. Moyano, M. Díaz, C. Fernández-Díaz and M. Yúfera. 1999. Optimization of the protein fraction of microcapsules used in feeding of marine fish larvae using *in vitro* digestibility techniques. Aquaculture Nutrition, 5: 107-113.

Alarcón, F.J., F. H. Moyano and M. Díaz. 2002. Evaluation of different protein sources for aquafeeds by an optimised pH-stat system. J. Sci. Food Agric., 82: 697-704.

Appel, W. 1974. Leucine aminopeptidase determination with L-leucineamide as substrate. In: H.U. Bergmeyer (ed.). Methods of enzymatic analysis. Academic Press, New York. USA. 954-958 pp.

Appelbaum, S. 1985. Rearing of the dover sole, *Solea solea* (L), through its larval stages using artificial diets. Aquaculture, 49: 209-221.

Appelbaum, S. 2001. Evaluation of the digestive protease, chymotrypsin, as an indicator of nutritional condition in larval red drum (*Sciaenops ocellatus*). M.Sc. thesis. The University of Texas at Austin, USA. 84 p.

Baglole, C.J., H.M. Murray, G.P. Goff and G.M. Wright. 1997. Ontogeny of the digestive tract during larval development of yellowtail flounder: a light microscopic and mucous histochemical study. J. Fish Biol., 51: 120-134.

Baglole, C.J., G.P. Goff and G.M. Wright. 1998. Distribution and ontogeny of the digestive enzymes in larval yellowtail and winter flounder. J. Fish Biol., 53: 767-784.

Baragi, V. and R. Lovell. 1986. Digestive enzyme activities in striped bass from first feeding through larva development. Trans. Am. Fish. Soc., 115: 478-484.

Baskerville-Bridges, B. and L.J. Kling. 2000a. Early weaning of Atlantic cod (*Gadus morhua*) larvae onto a microparticulate diet. Aquaculture, 186: 109-117.

Baskerville-Bridges, B. and L.J. Kling. 2000b. Development and evaluation of microparticulate diets for early weaning of Atlantic cod *Gadus morhua* larvae. Aquaculture Nutrition, 6: 171-182.

Bengston, D.A. 1993. A comprehensive program for the evaluation of artificail diets. J. World Aquacult. Soc., 24: 285-293.

Bengtson, D.A., D.N. Borrus, H.E. Leibovitz and K.L. Simpson. 1993. Studies on structure and function of the digestive system of *Menidia Beryllina* (Pisces, Atherinidae). In: B. T. Walter and H.J. Fyhn (eds). Physiology and biochemistry of fish larval development. University of Berjen, Norway. pp 199-208.

Bisbal, G.A. and D.A. Bengtson. 1995. Development of the digestive tract in larval summer flounder. J. Fish Biol., 47: 277-291.

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analyt. Biochem., 72: 248-254.

Cahu, C.L. and J.L. Zambonino-Infante. 1997. Is the digestive capacity of marine fish larvae sufficient for compound diet feeding?. Aquaculture International, 5: 151-160.

Cahu, C.L., J.L. Zambonino-Infante, A. Peres, P. Quazuguel and M.M. Le Gall. 1998. Algal addition in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae rearing: effect on digestive enzymes. Aquaculture, 161: 479-489.

Cahu, C.L., J.L. Zambonino-Infante, P. Quazuguel and M.M. Le Gall. 1999. Protein hydrolysate vs. fish meal in compound diets for 10 day old sea bass *Dicentrarchus labrax* larvae. Aquaculture, 171: 109-119.

Cahu, C.L. and J.L. Zambonino-Infante. 2001. Substitution of live food by formulated diets in marine fish larvae. Aquaculture, 200: 161-180.

Chong, A.S.C., R. Hashim and A.B. Ali. 2002. Assessment of dry matter and protein digestibilities of selected raw ingredients by discus fish (*Symphysodon aequifasciata*) using *in vivo* and *in vitro* methods. Aquaculture Nutrition 8, 229-238.

Clark, J.M. 1964. Experimental biochemistry. W.H. Freemand and Company. San Francisco, USA. 227 p.

Crespo, S., M. Marín de Mateo, C.A. Santamaría, R. Sala, A. Grau and E. Pastor. 2001. Histopathological observations during larval rearing of common dentex *Dentex dentex* L. (Sparidae). Aquaculture, 192: 121-132.

Curtis, P. 2002. Manager of the Leon Raymond Hubbard, Jr., Marine Fish Hatchery. Hubbs Sea World Research Institute, California, USA.

Cuvier-Péres, A. and P. Kestemont. 2002. Development of some digestive enzymes in Eurasian perch larvae *Perca fluviatilis*. Fish Physiol. Biochem., 24: 279-285.

Díaz, M., F.J. Moyano, F.L. García-Carreño, F.J. Alarcón and M.C. Sarasquete. 1997. Substrate-SDS-PAGE determination of protease activity through larval development in sea bream. Aquaculture International, 5: 461-471.

Drawbridge, M.A. and D.B. Kent. 1997. The white seabass (*Atractoscion nobilis*) as a candidate species for open ocean culture: a review based on four years of culture in nearshore cages. In: Proceedings of the second international conference on open ocean aquaculture. Maui, Hawaii. April 23-25, 1997. 203-211 pp.

Dutton, P. 1989. The feeding ecology and growth of white seabass larvae, *Atractoscion nobilis*. M.Sc. thesis, San Diego State University, CA.

Dutton, P. 1992. Effects of experience on feeding success by larval white seabass, *Atractoscion nobilis*. J. Fish Biol., 41: 765-773.

Erlanger, B.F., Kokowsky, N. and W. Cohen. 1961. The preparation and properties of two new chromatogenic substrates of trypsin. Arch. Biochem. Biophysics, 95: 271-278.

FAO. 2000. Estado mundial de la pesca y la acuicultura. FAO, Roma.

Ferraris, R.P., J.D. Tan and M.C. de la Cruz. 1987. Development of the digestive tract of milkfish, *Chanos chanos* (Forsskal): Histology and histochemistry. Aquaculture, 61: 241-257.

Fontagné, S., I. Geurden, A.M. Escaffre and P. Bergot. 1998. Histological changes induced by dietary phospholipids in intestine and liver of common carp (*Cyprinus carpio* L.) larvae. Aquaculture, 161: 213-223.

Fuiman, L.A. and D.M. Higgs. Chapter eight. Ontogeny, growth and the recruitment process. In: R. C. Chambers and E. A. Trippel (eds.). Early life history and recruitment in fish populations. Chapman & Hall, London. London. 226-249 p.

García-Carreño, F.L., L.E. Dimes and N.F. Haard. 1993. Substrate-gel electrophoresis for composition and molecular weight of proteinases or proteinaceous proteinase inhibitors. Anal. Biochem., 214: 65-69.

García-Carreño, F.L. and N.F. Haard. 1993. Characterization of proteinase classes in langostilla (*Pleuroncodes planipes*) and crayfish (*Pacifastacus astacus*) extracts. J. Food Biochem., 17: 97-113.

García-Hernández, M.P., M.T. Lozano, M.T. Elbal and B. Agulleiro. 2001. Development of the digestive tract of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L). Light and electron microscopic studies. Anat. Embryol., 204: 39-57.

García-Ortega, A. 1999. Nutritional value of decapsulated cysts of Artemia and their use as protein source in experimental diets for fish larvae. Ph.D. thesis, Wageningen Institute of Animal Sciences, Wageningen University. Wageningen, The Netherlands. 147 p.

García-Ortega, A., I. Abdo de la Parra and C. Hernández. 2001. Weaning of mexican bullseye buffer (*Sphoeroides annulatus*) larvae from Atemia nauplii to artificial microdiets. In: C.I. Hendry, G. Van Stappen, M. Wille and P. Sorgeloos (eds.).

Larvi´01-Fish & shellfish larviculture symposium. European Aquaculture Society, special publication N. 30, Ostende, Belgium. 215-218 pp.

García-Ortega, A., J.A.J. Verreth, P. Coutteau, H. Segner, E.A. Huisman and P. Sorgeloos. 1998. Biochemical and enzymatic characterization of decapsulated cysts and nauplii of the brine shrimp *Artemia* at different developmental stages. Aquaculture, 161: 501-514.

Gawlicka, A., S.J. Teh, S.S.O. Hung, D.E. Hinton and J. de la Noúe. 1995. Histological and histochemical changes in the digestive tract of white sturgeon larvae during ontogeny. Fish Physiol. Biochem., 14: 357-371.

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

Georgopoulou, U. 1985. Macromolecular absorption of proteins by epithelial cells of the posterior intestinal segment and their intracellular digestion in the rainbow trout. Ultrastructural and biochemical study. Biol Cell, 53: 269-282.

Gordon, A. K. and T. Hecht. 2002. Histological studies on the development of the digestive system of the clownfish *Amphiprion percula* and the time of weaning. J. Appl. Ichthyol., 18: 113-117.

Govoni, J.J. 1980. Morphological, histological, and functional aspects of alimentary canal and associated organs development in larval *Leiostomus xanthurus*. Rev. Can. Biol., 39: 69-80.

Govoni, J.J., G.W. Boehlert and Y. Watanabe. 1986. The physiology of digestion in fish larvae. Environ. Biol. Fish., 16: 59-77.

Haard, N.F. 1993 . Digestibility and *in vitro* evaluation of plant protein for salmonid feed. 29 p. *In*: D.J. Sessa and C. Lim (eds.). Nutrition and utilization technology in aquaculture. AOCS monograph. American oil chemists society, Champaign, IL.

Hamlin, H.J., I. Hunt von Herbing and L.J. Kling. 2000. Histological and morphological evaluations of the digestive tract and associated organs of haddock throughout post-hatching ontogeny. J. Fish Biol., 57: 716-732.

Hoehne-Reitan, K., E. Kjørsvik and K.I. Reitan. 2001. Development of the pH in the intestinal tract of larval turbot. Mar. Biol., 139: 1159-1164.

Holt, G.J. 1993. Feeding larval red drum on microparticulate diets in a closed recirculating water system. J. World Aquacult. Soc., 24: 225-230.

Humanson, G. 1979. Animal tissue techniques. 4th edition. W.H. Freeman and Co., San Francisco, CA.

Hummel, B.C.W. 1959. A modified specthophotometric determination of chymotrypsin, trypsin, and thrombin. Can. J. Biochem. Physiol., 37: 1393-1399.

Jones, D.A., M.S. Kamarudin and L. Le Vay. 1993. The potential for replacement of live feeds in larval culture. J. World Aquacult. Soc., 24: 199-210.

Kaji, T., M. Tanaka, Y. Takahashi, M. Oka and N. Ishibashi. 1996. Preliminary observations on development of pacific bluefin tuna *Tunnus thynnus* (Scombridae) larvae reared in the laboratory, with special reference to the digestive system. Mar. Freshwater Res., 47: 261-269.

Kaji, T., M. Tanaka, M. Oka, H. Takeuchi, S. Ohsumi, K. Teruya and J. Hirokawa. 1999. Growth and morphological development of laboratory-reared yellowfin *tuna Thunnus*

albacares larvae and early juveniles, with special emphasis on the digestive system. Fisheries Science, 65: 700-7007.

Kanazawa, A., S. Koshio and S. Teshima. 1989. Growth and survival of larval red sea bream *Pagrus major* and Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* fed microbound diets. J. World Aquacult. Soc., 20: 31-37.

Kent, D.B. and M.A. Drawbridge. 1995. Accomplishments and roadblocks of a marine stock enhancement program for white seabass in California. Am. Fish. Soc. Symp., 15: 492-498.

Kim, B.G. 1987. Effects of stocking density and food concentration on survival and growth of larval white seabass (*Atractoscion nobilis*). M.S. thesis, San Diego State University, CA. 110 p.

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

Kolkovski, S., A. Tandler and M.S. Izquierdo. 1997. Effects of live food and dietary digestive enzymes on the efficiency of microdiets for seabass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. Aquaculture, 148: 313-322.

Kolkovski, S., W. Koven and A. Tandler. 1997. The mode of action of *Artemia* in enhancing utilization of microdiet by gilthead seabream *Sparus aurata* larvae. Aquaculture, 155: 193-205.

Koven, W., S. Kolkovski, E. Hadas, K. Gamsiz and A. Tandler. 2001. Advances in the development of microdiets for gilthead seabream, *Sparus aurata*: a review. Aquaculture, 194: 107-121.

Kurokawa, T., M. Shiraishi and T. Suzuki. 1998. Quantification of exogenous protease derives from zooplankton in the intestine of Japanese sardine (*Sardinops melanoticus*) larvae. Aquaculture, 161: 491-499.

Kurokawa, T., T. Suzuki, H. Ohta, H. Kagawa, H. Tanaka and T. Unuma. 2002. Expresion of pancreatic enzyme genes during the early larval stage of Japanese eel *Anguilla japonica*. Fisheries Science, 68: 736-744.

Kuz'mina, V.V. and A.G. Gel'man. 1998. Traits in the development of the digestive function in fishes. J. Ichthyol., 38: 106-115.

Lan, C.C. and B.S. Pan. 1993. *In vitro* digestibility simulating the proteolysis of feed protein in the midgut gland of grass shrimp (*Penaeus monodon*). Aquaculture, 109: 59-70.

Lauff, M. and R. Hofer. 1984. Preoteolytic enzymes in fish development and the importance of dietary enzymes. Aquaculture, 37: 335-346.

Lavens, P. and P. Sorgeloos. 2000. The history, present status and prospects of the availability of *Artemia* cysts for aquaculture. Aquaculture, 181: 397-403.

Lazo, J.P., R.P. Romaire and R. Reigh. 1998. The evaluation of three *in vitro* enzymes assays for estimating protein digestibility in the Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*). J. World Aquacult. Soc., 29: 441-450.

Lazo, J.P. 1999. Development of the digestive system in red drum (*Sciaenops ocellatus*) larvae. P.h.D. Dissertation. The University of Texas at Austin, USA. 212 p.

Lazo, J.P. 2000. Conocimiento actual y nuevas perspectivas en el desarrollo de dietas para larvas de peces marinos. En: Cruz-Suárez, L.E., D. Ricque-Marie, M. Tapia-Salazar,

M.A. Olvera-Novoa y R. Civera-Cerecedo (eds.). Avances en nutrición acuícola V. Universidad Autónoma de Nuevo León, México.

Lazo, J.P. and D.A. 2000. Davis. Ingredient and feed evaluation. In: R.R. Stickney (ed.). Encyclopedia of aquaculture. John Wiley & sons, Inc. USA. 453-463 pp.

Lazo, J.P., G.J. Holt and C.R. Arnold. 2000a. Ontogeny of pancreatic enzymes in larval red drum *Sciaenops ocellatus*. Aquaculture Nutrition, 6: 183-192.

Lazo, J.P., M.T. Dinis, G.J. Holt, C. Faulk and C.R. Arnold. 2000b. Co-feeding microparticulate diets with algae: toward eliminating the need of zooplankton at first feeding in larval red drum (*Sciaenops ocellatus*). Aquaculture, 188: 339-351.

Lazo, J.P., G.J. Holt and C.R. Arnold. 2002. Towards the development of suitable microdiets for substitution of live prey in the rearing of red drum (*Sciaenops ocellatus*) larvae: Applications of studies on digestive physiology. [In press]. Fisheries Science.

Lazo, J.P., L. López, S. Valverde, C.D. True and J. Cáceres. 2002. Preliminary studies in the development of the digestive system of totoaba (*Totoaba macdonaldi*): histological evaluation. In: VIth International Symposium on Aquatic Nutrition. September 3-6 2002. Quintana Roo, Mexico. 84 pp.

Lindner, P., A. Eshel, S. Kolkovski, A. Tandler and S. Harpaz. 1995. Proteolysis by juvenile sea bass (*Dicentrarchus labrax*) gastrointestinal enzymes as a method for the evaluation of feed proteins. Fish Physiol. Biochem., 14: 399-407.

Morrison, C.M. 1993. Histology of the Atlantic cod, *Gadus morhua*: an atlas. Part four: eleutheroembryo and larva. Canadian Spec. Publ. Fish. Aquat. Sci., 119: 469 p.

Moser, H.G., D.A. Ambrose, M.S. Busby, J.L. Butler, E.M. Sandknop, B.Y. Sumida and E.G. Stevens. 1983. Description of early stages of white seabass *Atractoscion nobilis*, with notes on distribution. CalCOFI Rep., 24: 182-193.

Moyano, F.J., M. Díaz, F.J. Alarcón and M.C. Sarasquete. 1996. Characterization of digestive enzyme activity during larval development of gilthead seabream (*Sparus aurata*). Fish Physiol. Biochem., 15: 121-130.

Nolting, M., B. Ueberschär and H. Sosenthal. 1999. Trypsin activity and physiological aspects in larval rearing of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) using live prey and compound diets. J. Appl. Ichthyol., 15: 138-142.

Orhun, M.R. 1989. Early life history of white seabass, *Atractoscion noblilis*. M.S. thesis, San Diego State University, CA.

Ozkizilcik, S. and F-L. E. Chu. 1996. Preparation and characterization of a complex microencapsulated diet for striped bass *Morone saxatilis* larvae. Microencapsulation, 13: 331-343.

Pedersen, B.H. and K.P. Andersen. 1992. Induction of trypsinogen secretion in herring larvae (*Clupea harengus*). Mar. Biol., 112: 559-565.

Person-Le Ruyet, J. 1989. Early weaning of marine fish larvae onto microdiets: constraints and perspectives. In: Advances in tropical aquaculture, Tahiti, Feb. 20 – March 4, 1989. AQUACOP. IFREMER. 625-642 pp.

Person-Le Ruyet, J., J.C. Alexandre, L. Thébaud and C. Mugnier. 1993. Marine fish larvae feeding: formulated diets or live prey?. J. World Aquacult. Soc., 24: 211-223.

Planas, M. and I. Cunha. 1999. Larviculture of marine fish: problems and perspectives. Aquaculture, 177: 171-190.

Reitan, K., J.R. Rainuzzo, G. Oie and Y. Olsen. 1997. A review of the nutritional effects of algae in marine fish larvae. Aquaculture, 155: 207-221.

Ribeiro, L., C. Sarasquete and M.T. Dinis. 1999. Histological and histochemical development of the digestive system of *Solea senegalensis* (Kaup, 1858) larvae. Aquaculture, 171: 293-308.

Rosenlund, G., J. Stoss and C. Talbot. 1997. Co-feeding marine fish larvae with inert and live diets. Aquaculture, 155: 183-191.

Rungruangsak-Torrisen, K., A. Rustad, J. Sunde, S.A. Eiane, H.B. Jensen, J. Opstvedt, E. Nygard, T.A. Samuelsen, H. Mundheim, U. Luzzana and G. Venturini. 2002. *In vitro* digestibility based on fish crude enzyme estract for prediction of feed quality in growth trials. J. Sci. Food Agric., 82: 644-654.

Sarasquete, M.C., A. Polo and M. Yúfera. 1995. Histology and histochemistry of the development of the digestive system of larval gilthead seabream, *Sparus aurata* L. Aquaculture, 130: 79-92.

Sarath, G., R.S. de la Motte and F.W. Wagner. 1989. Protease assay methods. In: R.J. Beynon and J.S. Bond (eds.). Proteolytic enzymes: a practical approach. Oxford University Press, New York. USA. 259 p.

Segner, H., R. Rösch, J. Verreth and U. Witt. 1993. Larval nutritional physiology: studies with *Clarias gariepinus*, *Coregonus lavaretus* and *Scophthalmus maximus*. J. World Aquacult. Soc., 24: 121-134.

Segner, H., V. Storch, M. Reinecke, W. Kloas and W. Hanke. 1994. The development of functional digestive and metabolic organs in turbot, *Scophthalmus maximus*. Mar. Biol., 119: 471-486.

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

Tanaka, M. 1973. Studies on the structure and function of the digestive system of teleost larvae. D. Agric. Thesis, Kyoto University, Japan. 136 p.

Vernier, J.M. 1990. Intestine ultrastructure in relation to lipid and protein absorption in teleost fish. In: J. Mellinger (ed.). Animal nutrition and transport processes. I. Nutrition in wild and domestic animals. Comp Physiol., vol. 5. 166-175 pp.

Vojkovich, M. and R.J. Reed. 1983. White seabass, *Atractoscion nobilis*, in California-Mexican waters: status of the fishery. CalCOFI Rep., 24: 79-83.

Walford, J. and T.J. Lam. 1993. Development of digestive tract and proteolytic enzyme activity in seabass (*Lates calcarifer*) larvae and juveniles. Aquaculture, 109: 187-205.

Watanabe, Y. 1984. An ultrastructural study of intracellular digestion of horseradish peroxidase by the rectal epithelium cells in larvae of a freshwater cottid fish *Cottus nowawae*. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 50: 409-416.

Watanabe, Y. and V. Kiron. 1994. Prospects in larval fish dietetics. Aquaculture, 124: 223-251.

Young, P.H. 1973. The status of the white seabass resource and its management. Technical report N. 15. Cal. Rept. Fish Game. 1-10 pp.

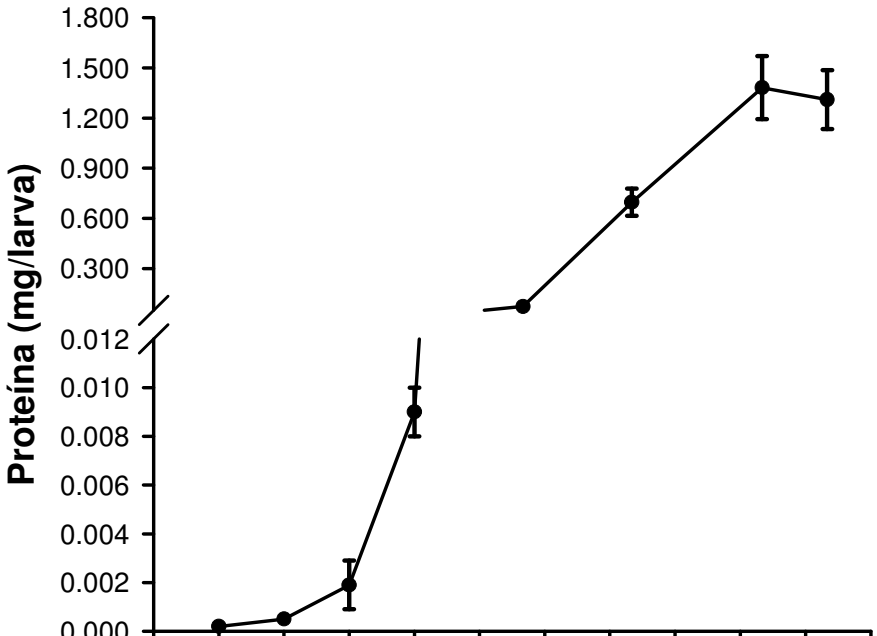
Yúfera, M., C. Fernández-Díaz, E. Pascual M.C. Sarasquete, F.J. Moyano, M. Díaz, F.J. Alarcón, M. García-Gallego and G. Parra. 2000. Towards an inert diet for first feeding gilthead seabream *Sparus aurata* L. larvae. Aquaculture Nutrition, 6: 143-152.

Yúfera, M., E. Pascual and C. Fernández-Díaz. 1999. A highly efficient microencapsulated food for rearing early larvae of marine fish. Aquaculture, 177: 249-256.

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

Zambonino-Infante, J.L. and C.L. Cahu. 1994b. Development and response to a diet change of some digestive enzymes in sea bass (Dicentrarchus labrax) larvae. Fish Physiol. Biochem., 12: 399-408.

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


Proteína (mg/larva)
1.800
1.500
1.200
0.900
0.600
0.300
0.012
0.010
0.008
0.006
0.004
0.002
0.000

Anexo 1. Concentración de proteína disuelta en los extractos enzimáticos de larvas de corvina blanca de diferentes edades.

Anexo 2. Contenido proteico de las fuentes proteicas evaluadas mediante un ensayo de digestibilidad *in vitro* y cantidad de proteína disuelta al añadir 6.25 mg P/ml.

Fuente proteica	***P bruta (%)*** [1]	***P disuelta (mg/ml)*** [2]
Ingredientes:		
Caseína	92.7	3.43 (0.159)
Albúmina	80	6.00 (0.114)

H. de pescado	68	0.25 (0.009)
H. de soya	49.9	0.48 (0.013)
Gluten de trigo	25	1.24 (0.080)
Microdietas:		
PROTON	62.4	0.25 (0.006)
Bio-Kyowa	51.1	0.19 (0.005)
Silver cup	65.6	0.22 (0.006)
Dieta cistos	52.7	0.25 (0.013

[1] En peso seco. Datos provenientes de la literatura
[2] En tampón 50 mM Trizma, 20 mM $CaCl_2$ y pH 8.8