



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS  
DEL NOROESTE, S.C.

---

---

Programa de Estudios de Posgrado

**ESTIMULACIÓN TEMPRANA DE LA MADURACIÓN  
DIGESTIVA EN LARVAS DE *Lutjanus guttatus*  
(STEINDACHNER, 1869)**

**TESIS**

Que para obtener el grado de

**Maestro en Ciencias**

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales  
(Orientación en Acuicultura)

P r e s e n t a

**YOO EDWARD LUCERO RIVERA**

La Paz, Baja California Sur, Agosto 2016

## ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 12:20 horas del día 22 del Mes de Agosto del 2016, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

**"ESTIMULACIÓN TEMPRANA DE LA MADURACIÓN DIGESTIVA EN LARVAS DE *Lutjanus guttatus* (STEINDACHNER, 1869)"**

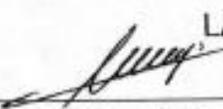
Presentada por el alumno:

**Yoo Edward Lucero Rivera**

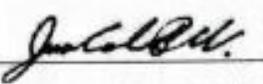
Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACIÓN DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACIÓN EN **Acuicultura**

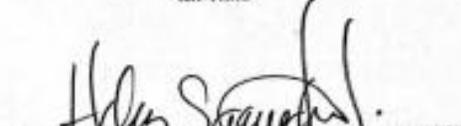
Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

  
Dr. Daríel Tovar Ramírez  
Director de Tesis

  
Dr. Leonardo Ibarra Castro  
Co-Tutor

  
Dr. Juan Carlos Pérez Urbola  
Co-Tutor

  
Dra. Norma Yolanda Hernández Saavedra,  
Directora de Estudios de Posgrado y  
Formación de Recursos Humanos

## **COMITÉ TUTORIAL**

### **Director de Tesis:**

Dr. Dariel Tovar Ramírez

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S. C.

### **Co-tutor:**

Dr. Leonardo Ibarra Castro

Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A. C.

### **Co-tutor:**

Dr. Juan Carlos Pérez Urbiola

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C.

### **Comité revisor de tesis:**

Dr. Dariel Tovar Ramírez

Dr. Leonardo Ibarra Castro

Dr. Juan Carlos Pérez Urbiola

### **Jurado de examen de grado:**

Dr. Dariel Tovar Ramírez

Dr. Leonardo Ibarra Castro

Dr. Juan Carlos Pérez Urbiola

### **Suplente:**

Dra. Minerva Concepción Maldonado García

## Resumen

El pargo flamenco, *Lutjanus guttatus* (Steindachner, 1869), también conocido como pargo lunarejo o pargo de la mancha, es un pez comestible, popular y de gran importancia comercial en las costas del pacífico de varios países de América, y una especie con gran potencial para cultivo. Actualmente, se ha considerado un buen candidato para la acuicultura y se ha encontrado como en muchas otras especies de peces marinos, los problemas de supervivencia y altas tasas de mortalidad durante los estadios larvarios, cuyo problema ha inducido a realizar investigaciones sobre tipos de alimentación: alimento vivo, probióticos, microparticulado, entre otros; así como su fisiología digestiva, donde se incluye la parte enzimática y hormonal. El objetivo del presente trabajo, fue conocer el efecto de la incorporación de hidrolizados solubles de pescado CPSP G y levadura *Debaryomyces hansenii* (CBS 8339) incorporada a rotíferos (*Brachionus rotundiformis*) de cepa SS, sobre la expresión de genes marcadores de la maduración digestiva en larvas de *L. guttatus*. Para ello, se utilizaron cultivos por triplicado (inanición, control, tratamiento con levadura y tratamiento con hidrolizado), donde, se analizó la calidad de huevos y larvas, tasa de crecimiento absoluta (TCA) y supervivencia. Asimismo, la expresión de genes codificantes de enzimas digestivas ( $\alpha$ -amilasa, lipasa, quimotripsina y tripsina) y hormonas del control alimenticio (Colecistoquinina; CCK, y Neuropéptido Y; NPY) en huevos y larvas de 1 y 4 días después de la eclosión (DDE). Los resultados obtenidos, mostraron un declive en la supervivencia a los 5 DDE en todos los cultivos y la muerte de larvas del cultivo inanición, sin embargo, el resto duró hasta los 7 DDE, lo que se sugirió a causa de la temperatura. La TCA mostró diferencia significativa en todos los tratamientos vs inanición. Por otro lado, la expresión de enzimas digestivas y hormonas, se presentaron desde huevos en bajos niveles. Las larvas de 1 DDE, presentaron diferencia significativa en el tratamiento de hidrolizado vs control en lipasa; también ambos tratamientos presentaron diferencia significativa contra cultivos control e inanición en CCK. A los 4 DDE, el tratamiento de levadura

mostró diferencia significativa contra el cultivo control e inanición en lipasa, asimismo, en  $\alpha$ -amilasa contra todos los cultivos. Por tanto, los tratamientos estimularon la expresión de enzimas digestivas y hormonas relacionadas a la digestión, lo que denota que las larvas al 1 y 4 DDE presentan los transcritos de enzimas digestivas para poder ser traducidos a la proteína, sin embargo, se requiere el estudio de las hormonas peptídicas de CCK y NPY para indicar la presencia en su forma activa en estas etapas.

Palabras clave: Larvas de *Lutjanus guttatus*, enzimas digestivas, CCK y NPY.

Vo. Bo.

  
Dr. Dariel Tovar Ramírez

## Abstract

Flamenco snapper, *Lutjanus guttatus* (Steindachner, 1869), also known as spotted rose snapper or snappers, is an edible, popular and of great commercial importance in the Pacific coast of several American countries. At present, it is considered a good candidate for aquaculture and as in many other species of marine fish, the problems of survival and high rates of mortality during the larval stages are well documented, the problem has led to research on types of food: live food, probiotics, microparticulated, among others; and its digestive physiology, where the enzymatic and hormonal part is included. The aim of this work was to determine the effect of the incorporation of soluble hydrolyzed fish CPSP G and live yeast *Debaryomyces hansenii* (CBS 8339) incorporated rotifers (*Brachionus rotundiformis*) strain SS, on the expression of molecular markers for digestive maturation genes in *L. guttatus* larvae. For this purpose, cultures were used in triplicate (starvation, control, treatment with hydrolyzed and treatment with yeast), where the quality of eggs and larvae, absolute growth rate (TCA) and survival were analyzed. Furthermore, the expression of genes encoding digestive enzymes ( $\alpha$ -amylase, lipase, chymotrypsin and trypsin) and hormones alimentary control (Cholecystokinin, CCK, and neuropeptide Y; NPY) in eggs and larvae of 1 and 4 days after hatching (DDE). The results showed a decline in the larviculture survival at 5 DDE in treatments and also the starvation group, however, the rest lasted until 7 DDE, it was suggested because of the temperature. The TCA showed significant difference in all treatments vs starvation. Furthermore, the expression of digestive enzymes and hormones, from eggs showed low levels. Larvae of 1 DDE, showed significant differences in hydrolyzed treatment vs control in lipase expression; also both treatments showed significant difference against control cultures and starvation in CCK. At 4 DDE, yeast treatment showed significant difference against to the control and starvation culture in lipase, also in  $\alpha$ -amylase against all cultures. Therefore, treatment stimulated expression of digestive enzymes and hormones related to digestion, which indicates that larvae 1 and 4 DDE present digestive enzymes transcripts to be translated to protein, however, the study required

studies to peptide hormones CCK and NPY to indicate the presence in its active form in these stages.

Keywords: *Lutjanus guttatus* larvae, digestive enzymes, CCK and NPY.

Vo. Bo.



---

Dr. Dariel Tovar Ramirez

## Dedicatoria

*A mi familia y en especial a ti madre, eres la mejor, gracias.*

## **Agradecimientos**

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada con el número 301984 para la obtención de mi grado de Maestro en Ciencias.

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C. (CIBNOR), al personal administrativo y docentes, por todas las facilidades prestadas durante mi estancia en la institución.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. (CIAD) Unidad Mazatlán, personal administrativo, personal docente, personal laboral de la planta de peces (gracias a todos muchachos).

A mi director de tesis, el Dr. Dariel Tovar Ramírez, por la paciencia, apoyo, enseñanzas, guiarme en el trabajo de licenciatura y este trayecto de investigación en la Maestría. Sobre todo la amistad ofrecida y la confianza. Mil gracias por todo, nunca cambie es una excelente persona. Espero que sigamos conviviendo juntos y sigamos trabajando.

A mi co-tutor, el Dr. Leonardo Ibarra Castro del CIAD de Mazatlán, por toda la paciencia, ayuda en los desvelos de trabajo durante el cultivo larvario, apoyo en el conocimiento, consejos, enseñanza de la cuestión laboral y darme la confianza para ser buenos amigos, muchas gracias, un fuerte abrazo.

A mi co-tutor, el Dr. Juan Carlos Pérez Urbiola por el apoyo incondicional, siempre estuvo ahí cuando se me complicaba algo o me surgía alguna duda, y no sólo en esta investigación, sino desde la licenciatura, muchísimas gracias espero que sigamos siendo amigos y estemos más adelante en otro trabajo.

A la Bióloga Patricia Hinojosa Baltazar indudablemente no tengo palabras para describir el apoyo en el laboratorio, la linda amistad y la gran persona que es, gracias por todo Paty.

Al Dr. Juan Manuel Martínez Brown, por enseñarme sobre la investigación, estructura de la tesis, en especial de la hipótesis, así como apoyarme con mi estancia en Mazatlán. Gracias por todo.

A la Dra. Laura Guzman y M. C. Adrian, muchas gracias por ser amigos míos, en verdad sin ustedes, mi estancia por Mazatlán hubiera sido muy complicada, los consejos, su casa para estar con ustedes. Gracias nuevamente, espero verlos pronto.

Al Dr. Héctor Nolasco Soria, en verdad que fue muy agradable conocerlo y me hubiera gustado haber trabajado alguna parte de la investigación en su ramo.

A la Dra. Cristina Escobedo y la Dra. Norma Yolanda Hernández, por su ayuda a solucionar las dudas en qPCR y el apoyo en las revisiones de mi tesis, respectivamente, muchas gracias.

Muchas gracias a la Dra. Martha Reyes, por apoyarme siempre con la refrigeración de mis muestras y a Horacio Sandoval, por el apoyo en los sistemas de cómputo, gracias.

Mis compañeros de laboratorio y de grupo, fue genial conocerlos, gracias.

Mis queridos amigos Alejandro Rodríguez, Mizuky Carballo, Denisse Mancilla, Brian González, Mahatma Fong, Alberto Casillas, creo que en toda mi trayectoria fue divertido pasarlo juntos, es un enorme gusto en verdad gracias.

Mis amados padres, Pedro Everardo y Elizabeth, gracias por todo el amor y apoyo, así como haberme dado la oportunidad de tomar por un determinado tiempo mi camino y conocer el mundo de fuera. Mis hermanos, Williams, Liliana, Gabriel, Mabel, y mis sobrinos hermosos, gracias por estar ahí, reír y convivir.

A ti amor mío por toda la paciencia Annel Juárez y por estar conmigo en las buenas y las malas, no sabes lo mucho que significa para mí que te hayas desvelado esperando, ayudando y haciéndome compañía. Te amo bebé.

Resumen.....	i
Abstract.....	iii
Dedicatoria.....	v
Agradecimientos.....	vi
Contenido.....	viii
Lista de figuras.....	xiii
Lista de tablas.....	xv
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	5
2.1 Generales.....	5
2.1.1 El pargo flamenco <i>Lutjanus guttatus</i> , distribución e importancia.....	5
2.1.2 Desarrollo embrionario del pargo flamenco <i>Lutjanus guttatus</i> .....	8
2.1.3 Larvas del pargo flamenco <i>Lutjanus guttatus</i> .....	11
2.1.4 Maduración digestiva.....	13
2.1.5 Enzimas digestivas durante el desarrollo larvario.....	19
2.1.6 Absorción de proteínas y lípidos en larvas.....	21
2.1.7 La CCK y NPY en el control hormonal del apetito y saciedad.....	22
2.1.8 Administración de hidrolizados solubles de pescado CPSP G.....	27
2.1.9 Uso de la levadura <i>Debaryomyces hansenii</i> como probiótico.....	30
2.1.10 Expresión de genes codificantes de enzimas digestivas y las hormonas CCK y NPY en larvas de <i>Lutjanus guttatus</i> .....	32

3. JUSTIFICACIÓN.....	34
4. HIPÓTESIS.....	35
4.1 Pregunta.....	35
4.2 Hipótesis .....	35
5. OBJETIVOS.....	36
5.1 Objetivo general.....	36
5.1.1 Objetivos particulares.....	36
6. MATERIAL Y MÉTODOS.....	37
6.1 Metodología del objetivo particular 1.....	37
6.1.1 Cultivo larvario experimental.....	37
6.1.2 Cultivos control, inanición y tratamientos .....	37
6.1.3 Preparación de alimento vivo para controles y tratamientos.....	37
6.1.4 Parámetros de calidad de agua en cultivos.....	38
6.1.5 Conteo de rotíferos en tanque.....	38
6.1.6 Diseño de cultivo larvario .....	39
6.1.7 Siembra y desarrollo del cultivo larvario.....	40
6.1.8 Calidad de huevos y larvas .....	41
6.1.9 Muestreo de los cultivos.....	41
6.1.10 Tasa de crecimiento absoluta .....	42
6.1.11 Supervivencia.....	42

6.2 Metodología de los objetivos particulares 2 y 3.....	42
6.2.1 Extracción de RNA total .....	42
6.2.2 Electroforésis de gel de agarosa.....	43
6.2.3 Tratamiento con DNase .....	44
6.2.4 Síntesis de cDNA .....	44
6.2.5 Diseño, validación y síntesis de <i>primers</i> degenerados de CCK .....	45
6.2.6 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR), electroforésis y purificación de bandas .....	46
6.2.7 Preparación de medio Luria-Bertani (LB) para clonación.....	47
6.2.8 Clonación .....	47
6.2.9 Purificación de plásmidos.....	48
6.2.10 Análisis de secuencia de los fragmentos clonados .....	49
6.2.11 Diseño, validación y síntesis de <i>primers</i> específicos de CCK.....	49
6.2.12 <i>Primers</i> específicos para PCR en tiempo real (qPCR).....	50
6.2.13 Curvas estándar para qPCR .....	50
6.2.14 Procesamiento de muestras mediante qPCR, análisis de expresión relativa y estadístico .....	52
7. RESULTADOS.....	53
7.1 Resultados del objetivo particular 1 .....	53
7.1.1 Cultivo larvario experimental .....	53
7.1.2 Siembra y desarrollo del cultivo larvario.....	53

7.1.3 Calidad de huevos y larvas .....	57
7.1.4 Tasa de crecimiento absoluta .....	58
7.1.5 Supervivencia.....	59
7.2 Resultados de los objetivos particulares 2 y 3 .....	59
7.2.1 Diseño, validación y síntesis de <i>primers</i> degenerados de CCK .....	59
7.2.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR), electroforésis y purificación de bandas .....	59
7.2.3 Clonación .....	60
7.2.4 Análisis de secuencia de los fragmentos clonados .....	62
7.2.5 Diseño, validación y síntesis de <i>primers</i> específicos de CCK .....	65
7.2.6 Curvas estándar para qPCR .....	65
7.2.7 Procesamiento de muestras mediante qPCR, análisis de expresión relativa y estadístico .....	66
8. DISCUSIÓN .....	69
8.1 Discusión sobre el objetivo particular 1 .....	69
8.2 Discusión sobre los objetivos particulares 2 y 3.....	73
9. CONCLUSIONES .....	79
9.1 Conclusión sobre el objetivo particular 1 .....	79
9.2 Conclusión sobre los objetivos particulares 2 y 3.....	79
9.3 Conclusión sobre la hipótesis.....	80
10. RECOMENDACIONES .....	81

11. LITERATURA.....	82
12. ANEXOS .....	94
12.1 Anexo A. Curvas de amplificación, disociación y estándar de los genes estudiados.....	94

### Lista de figuras

<b>Figura 1.</b> Producción acuícola y pesquería de <i>L. guttatus</i> del 2012 al 2014 .....	3
<b>Figura 2.</b> El pargo flamenco <i>L. guttatus</i> .....	5
<b>Figura 3.</b> Distribución de <i>L. guttatus</i> .....	7
<b>Figura 4.</b> 1) 4 células, 2) 8 células, 3) 16 células, 4) mórula .....	10
<b>Figura 5.</b> Larva de <i>L. guttatus</i> .....	13
<b>Figura 6.</b> Organización general de la pared del tracto digestivo.....	14
<b>Figura 7.</b> Factores endocrinos gastro-entero-pancreáticos .....	19
<b>Figura 8.</b> Esquema de absorción de proteínas, AA y AA libres .....	22
<b>Figura 9.</b> Estimulación del hígado, páncreas, esfínter pilórico .....	24
<b>Figura 10.</b> Tipos de intestino y su desarrollo en la eclosión y durante .....	25
<b>Figura 11.</b> Comparación de la regulación hormonal del apetito .....	27
<b>Figura 12.</b> Disposición de los 12 tanques de 600 L para el cultivo larvario .....	39
<b>Figura 13.</b> Protocolo establecido en el programa del termociclador.....	46
<b>Figura 14.</b> Programa utilizado en qPCR para curvas estándar .....	51
<b>Figura 15.</b> Huevos en el estadio para siembra, observados a 4X .....	53
<b>Figura 16.</b> Larva de 0.5 HDE observada en microscopio a 4X.....	54
<b>Figura 17.</b> Larvas de 19 HDE observadas en microscopio a 4X .....	55
<b>Figura 18.</b> Larva de 37 HDE observada en microscopio a 4X.....	55
<b>Figura 19.</b> Larva a las 72 HDE, observada en microscopio a 4X .....	56
<b>Figura 20.</b> Larvas de 96 HDE, observadas en microscopio a 4X .....	57
<b>Figura 21.</b> Bandas de CCK en electroforesis de gel de agarosa al 1.5%.....	60
<b>Figura 22.</b> Placas 12 horas después de incubación .....	61
<b>Figura 23.</b> Gel de electroforesis con bandas del producto de PCR.....	62

<b>Figura 24.</b> Secuencia de CCK de 380 bp .....	62
<b>Figura 25.</b> Información de la secuencia sometida de CCK en GenBank.....	63
<b>Figura 26.</b> Homología de secuencias de CCK confrontado a otros organismos ..	63
<b>Figura 27.</b> Alineamiento en BLAST de CCK en <i>L. guttatus</i> .....	64
<b>Figura 28.</b> Aminoácidos producidos por la secuencia de CCK de <i>L. guttatus</i> .....	65
<b>Figura 29.</b> Análisis de expresión de genes de estudio en 3 réplicas de huevo ....	66
<b>Figura 30.</b> Análisis de expresión entre los genes de estudio del día 1 .....	67
<b>Figura 31.</b> Análisis de expresión entre los genes de estudio del día 4 .....	68
<b>Figura 32.</b> Secuencia parcial de cDNA y AA del gen CCK.....	74
<b>Figura 33.</b> Secuencia de nucleótidos y AA de CCK .....	74

### Lista de tablas

<b>Tabla I.</b> Captura mundial máxima 2012 y 2013. ....	1
<b>Tabla II.</b> Taxonomía del pargo flamenco <i>L. guttatus</i> . ....	6
<b>Tabla III.</b> Descripción del desarrollo embrionario de <i>L. guttatus</i> . ....	9
<b>Tabla IV.</b> Enzimas digestivas del páncreas. ....	20
<b>Tabla V.</b> Familias de hormonas gastro-entero-pancreáticas en intestino... ..	23
<b>Tabla VI.</b> Perfil nutricional de hidrolizados CPSP G, Apligen. ....	28
<b>Tabla VII.</b> Equipos utilizados y parámetros obtenidos a lo largo de los cultivos...38	
<b>Tabla VIII.</b> Concentración de rotíferos que se mantuvo en cultivos... ..	41
<b>Tabla IX.</b> Componentes del Master Mix para síntesis de cDNA. ....	45
<b>Tabla X.</b> Protocolo de temperaturas ordenadas dentro del programa... ..	45
<b>Tabla XI.</b> Mix para PCR de punto final.....	46
<b>Tabla XII.</b> Secuencia de <i>primers</i> para qPCR y tamaño de los amplicones.....	50
<b>Tabla XIII.</b> Mix de 10 µL por reacción para qPCR. ....	51
<b>Tabla XIV.</b> Parámetros de calidad de los huevos utilizados en los cultivos.....	58
<b>Tabla XV.</b> Parámetros de calidad de larvas en mm, VSV en mm <sup>3</sup> . ....	58
<b>Tabla XVI.</b> Porcentajes de eclosión y supervivencia a las 24 y 48 horas... ..	58
<b>Tabla XVII.</b> TCA de los cultivos larvarios.....	58
<b>Tabla XVIII.</b> <i>Primers</i> degenerados para CCK de <i>L. guttatus</i> . ....	59
<b>Tabla XIX.</b> <i>Primers</i> específicos para CCK de <i>L. guttatus</i> . ....	65
<b>Tabla XX.</b> Valores de calidad de curvas estándar. ....	66

## 1. INTRODUCCIÓN

La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) indica que los recursos de la pesca de captura son muy diversos y su desarrollo sostenible depende de decisiones de gestión y prácticas responsables. En el año 2013 la producción mundial (Tabla I) de captura excluyendo a la anchoveta, marcó una nueva producción de 86.9 millones de toneladas lo que deja atrás los 86.6 del 2012 (FAO, 2015a). Las tres especies de mayor captura fueron la anchoveta *Engraulis ringens*, Alaska pollock *Theragra chalcogramma* y Skipjack tuna *Katsuwonus pelamis*, donde la primera tuvo un incremento significativo de 4.7 a 5.7 millones de toneladas (FAO, 2015a). Entre los 25 mayores países productores de captura marina, se encuentra México en el puesto 15, sin embargo en la captura de aguas internas está ubicado en el puesto 20 (FAO, 2015a).

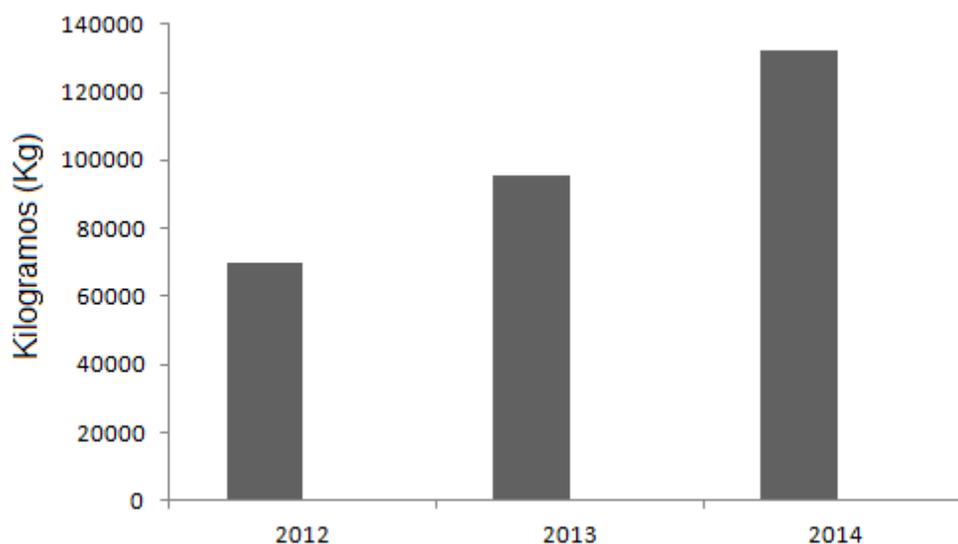
**Tabla I.** Captura mundial máxima de 2012 y 2013 (modificado de la FAO, 2015a).

	<b>2012</b>	<b>2013</b>	<b>VARIACIÓN</b>
	Millones de toneladas	Millones de toneladas	porcentaje
CAPTURA INTERNA	11.6	11.7	0.6
CAPTURA MARINA SIN ANCHOVETA	75.0	75.2	0.3
CAPTURA DE ANCHOVETA	4.7	5.7	20.9
CAPTURA MARINA	79.7	80.9	1.5
<b>MUNDIAL TOTAL</b>	<b>91.3</b>	<b>92.6</b>	<b>1.4</b>

En relación a la acuicultura, la FAO indica que abarca diversos sistemas de cultivo de plantas y cría de animales en zonas continentales, costeras y marítimas, que utilizan y producen una amplia variedad de diversas especies, además de que es posiblemente el sector de producción de alimentos con el crecimiento más acelerado y que hoy representa casi el 50% de los productos pesqueros mundiales destinados a la alimentación.

En acuicultura, la producción mundial continua en crecimiento, alcanzando los 97.2 millones de toneladas con un valor estimado de 157 billones de dólares, un total de 575 especies acuáticas y grupos de especies crecidas en agua dulce, agua de mar y agua salobre (FAO, 2015b). La producción de alimento por piscifactorías (peces, crustáceos, moluscos y otros animales acuáticos) fue de 70.2 millones de toneladas en el 2013, el cual supera por 5.6% los 66.5 millones de toneladas en el 2012, y específicamente en producción de peces pasó de 42.1% a 43.1% (FAO, 2015b). Actualmente, China se encuentra en el primer lugar de producción interna de peces con 24, 817, 311 toneladas (peso vivo) y ocupa el segundo lugar en la producción de maricultura con 1, 123, 576 toneladas, cuyo primer lugar lo tiene Noruega con 1, 245, 399 toneladas (FAO, 2015b). Por tanto, esto indica que la acuicultura es una fuente importante para obtener recursos alimentarios mediante diversas especies, aunque falta mayor investigación para establecer una producción más eficiente.

En México a pesar de su gran territorio en litorales y biodiversidad, no se encuentra entre los mayores productores acuícolas de peces, sin embargo, está en el séptimo lugar del mundo de maricultura de crustáceos (FAO, 2015b). Entre los peces cultivados en el país, los pargos de la familia *Lutjanidae* son peces que presentan una gran demanda y alcanzan un alto precio a nivel mundial, y por su importancia como recurso pesquero y deportivo, las poblaciones naturales se encuentran muy explotadas (Alvarez-Lajonchère, 2011). El pargo flamenco *Lutjanus guttatus* también conocido como pargo lunarejo o pargo de la mancha, es un pez comestible popular y de gran importancia comercial en varios países de América con costas al pacífico (Alvarez-Lajonchère, 2011). En México, la producción por la pesca y acuicultura (Fig. 1), durante los años 2012 al 2014 se ha incrementado considerablemente desde 69, 682 Kg a 132, 567.85 Kg respectivamente, al igual que el valor monetario en pesos mexicanos de 3, 022, 162.5 a 4, 219, 180.67 (SAGARPA, 2016).



**Figura 1.** Producción acuícola y pesquería de *L. guttatus* en peso vivo (Kg) del 2012 al 2014 en México (Datos obtenidos de SAGARPA, 2016).

El desarrollo del cultivo de peces es complicado, y debe de cumplir con varios requisitos, como un alto valor en el mercado, así como su establecimiento, desove en cautiverio, la facilidad de cultivar y alimentar, rápido crecimiento, manejo a altas densidades y que sea resistente a enfermedades (Riley, 2002). Asimismo, la variación en la calidad de huevos es uno de los factores limitantes para la producción de larvas de peces (Ibarra-Castro, 2005), el cual es de las partes fundamentales. No obstante, el dominio con reproductores en cautiverio permitirá llevar a cabo programas de mejoramiento y selección genética, que son base del desarrollo de la ganadería moderna (Alvarez-Lajonchère, 2011).

Uno de los principales problemas para el desarrollo del cultivo de larvas de peces es la obtención de valores de supervivencia en las primeras semanas, especialmente en el periodo de la primera alimentación; otro es el canibalismo, que el pargo flamenco presenta durante la segunda semana después de la eclosión (Alvarez-Lajonchère *et al.*, 2011a). La calidad ambiental tiene una gran importancia en el cultivo larval de peces marinos, así como del agua y los efectos del manejo ambiental, que influyen decisivamente en el crecimiento y la

supervivencia del pez (Alvarez-Lajonchère *et al.*, 2011b). Asimismo, el tiempo en el desarrollo de los órganos y sus funciones fisiológicas asociadas, son afectadas en general por la historia de vida de cada especie y un número de factores bióticos y abióticos, tales como la temperatura del agua, composición y disponibilidad de alimento durante los estadios tempranos de vida, donde estos cambios determinan la nutrición y el desempeño fisiológico de un pez (Zambonino-Infante *et al.*, 2008).

La ontogenia del tracto digestivo de larvas de peces marinos ha sido el tema de numerosos estudios en las últimas dos décadas, donde el perfil de actividad de enzimas digestivas, la adaptación a dietas microparticuladas, la descripción e histología de los órganos iniciales, ha sido extensamente estudiado, mientras que otros aspectos de la fisiología del tracto digestivo de larvas (hormonas intestinales, transportadores, entre otros) son escasos (Zambonino-Infante *et al.*, 2008) sin excluir la parte genética y de genómica funcional.

Por tanto, con este estudio se pretende generar la información relacionada a la fisiología digestiva en larvas del pargo flamenco *L. guttatus* a un nivel de genómica funcional, durante los primeros días del desarrollo mediante el estudio de expresión de genes codificantes para la hormona Colecistoquinina (CCK) y Neuropeptido Y (NPY), así como para los genes codificantes para las principales enzimas digestivas ( $\alpha$ -Amilasa, Lipasa, Quimotripsina, Tripsina) de organismos retados a dos distintos aditivos (levaduras e hidrolizados) y en cultivos control e inanición. Por otro lado, contribuir para hacer más eficiente los cultivos aumentando la supervivencia, y sobre todo estimulando la maduración digestiva de las larvas para poder administrar alimento microparticulado en las etapas tempranas al desarrollo ontogénico y entender más los procesos fisiológicos digestivos en esa etapa.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Generales

#### 2.1.1 El pargo flamenco *Lutjanus guttatus*, distribución e importancia

El pargo flamenco, *Lutjanus guttatus* (Steindachner, 1869) también conocido como pargo lunarejo o pargo de la mancha (Fig. 2), es un pez comestible popular y de gran importancia comercial en las costas del pacífico de varios países de América (Alvarez-Lajonchère, 2011; Hernández *et al.*, 2015) y una especie con gran potencial para cultivo (Galaviz *et al.*, 2012).



**Figura 2.** El pargo flamenco *L. guttatus* (tomado de Allen y Robertson, 1994).

La taxonomía (Alvarez-Lajonchère e Ibarra-Castro, 2011) que posee el pargo flamenco se observa en la Tabla II.

**Tabla II.** Taxonomía del pargo flamenco *L. guttatus* (tomado de Alvarez-Lajonchère e Ibarra-Castro, 2011).

Phylum	<i>Vertebrata</i>
Clase	<i>Osteichthyes</i>
Superorden	<i>Actinopterygii</i>
Orden	<i>Peciformes</i>
Suborden	<i>Percoidei</i>
Familia	<i>Lutjanidae</i>
Genero	<i>Lutjanus</i>
Especie	<i>guttatus</i>

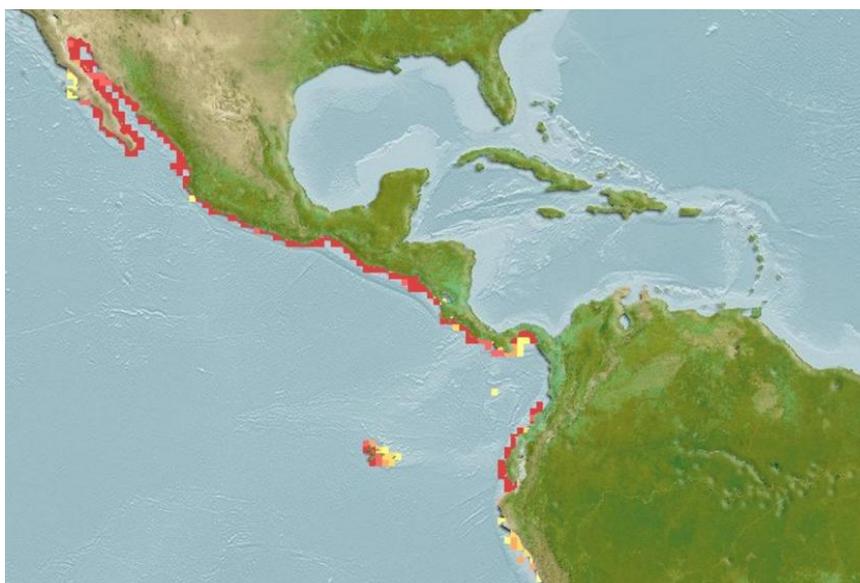
Anatómicamente el pargo flamenco posee 10 espinas dorsales, 12-13 radios blandos, 3 espinas anales, 8 radios blandos de la aleta anal; ranura preopercular ligera; filas de escamas en la parte ascendente en el lomo, elevándose diagonalmente encima de la línea lateral; escarlata pálido en los lados, a menudo con brillo plateado en filas horizontales de manchas azulosas, abdomen amarillo-dorado; cabeza con pequeñas manchas azulosas y líneas interrumpidas e irregulares, especialmente en el cachete; una gran mancha negruzca en la porción superior del lomo, con posterioridad a las espinas dorsales; aleta en ocasiones roja, excepto la anal y las pélvicas amarillas tenues; talla máxima de 80 cm de longitud, con peso máximo de 4 Kg (Allen y Robertson, 1994; Alvarez-Lajonchère e Ibarra-Castro, 2011).

Estos organismos habitan zonas costeras como arrecifes en profundidades no mayores a 30 metros, viven en pequeños grupos o solitarios y algunas veces forman grandes cardúmenes (Soto *et al.*, 2009; Herrera-Ulloa *et al.*, 2011; Alvarez-Lajonchère e Ibarra-Castro, 2011).

Es una especie con alto potencial para su cultivo ya que presenta alta demanda en los mercados de algunos países Latinoamericanos (Abdo-de la Parra *et al.*, 2015) y económicamente forma parte de la pesca artesanal en la parte noroeste de las costas mexicanas (Hernández *et al.*, 2015). Asimismo, SAGARPA indicó con sus datos obtenidos en el 2016, que en México la pesca y cultivo ha aumentado

considerablemente del 2012 al 2014 con 69, 682 Kg a 132, 567.85 Kg respectivamente.

La distribución (Fig. 3) abarca desde el Golfo de California hasta Perú (Allen y Robertson, 1994), zonas tropicales y subtropicales del Océano Pacífico (Larios-Soriano, 2014) y según Galaviz *et al.* (2012), indican que se distribuye a lo largo de las costas del pacífico del continente americano desde México hasta Perú (Grimes, 1987).



**Figura 3.** Distribución de *L. guttatus* (tomado de [www.aquamaps.org](http://www.aquamaps.org), 2013).

Según Abdo-de la Parra *et al.* (2015), por la importancia del organismo, se iniciaron las investigaciones sobre su reproducción artificial en Colombia (Valverde y Boza, 1999), Panamá (Cano, 2003), Costa Rica (Boza-Abarca *et al.*, 2008) y Ecuador (Benetti y Wilson, 1996). En México, las investigaciones sobre el cultivo de esta especie se iniciaron en el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, Unidad Mazatlán (CIAD) (Abdo-de la Parra *et al.*, 2015) y los protocolos para su reproducción en cautiverio, crianza larvaria y cultivo de juveniles se ha desarrollado y examinado cuidadosamente (Ibarra-Castro y Alvarez-Lajonchère, 2011). Aunado a ello, se han realizado investigaciones con

respecto a la inducción al desove en peces salvajes (Ibarra-Castro y Duncan, 2007) con la hormona liberadora de la gonadotropina (GnRHa); donde obtuvieron un mejor resultado en calidad de huevos cuando aplicaron 75  $\mu\text{g}$  de la hormona. Por otro lado se estudio el efecto de la densidad de siembra (Abdo-de la Parra *et al.*, 2010b) concluyendo que se obtiene buen nivel de crecimiento al llevar un cultivo a 30 huevos  $\text{L}^{-1}$  y un año después Ibarra-Castro y Alvarez-Lajonchère (2011) indicaron con sus resultados una sostenibilidad de la crianza comercial.

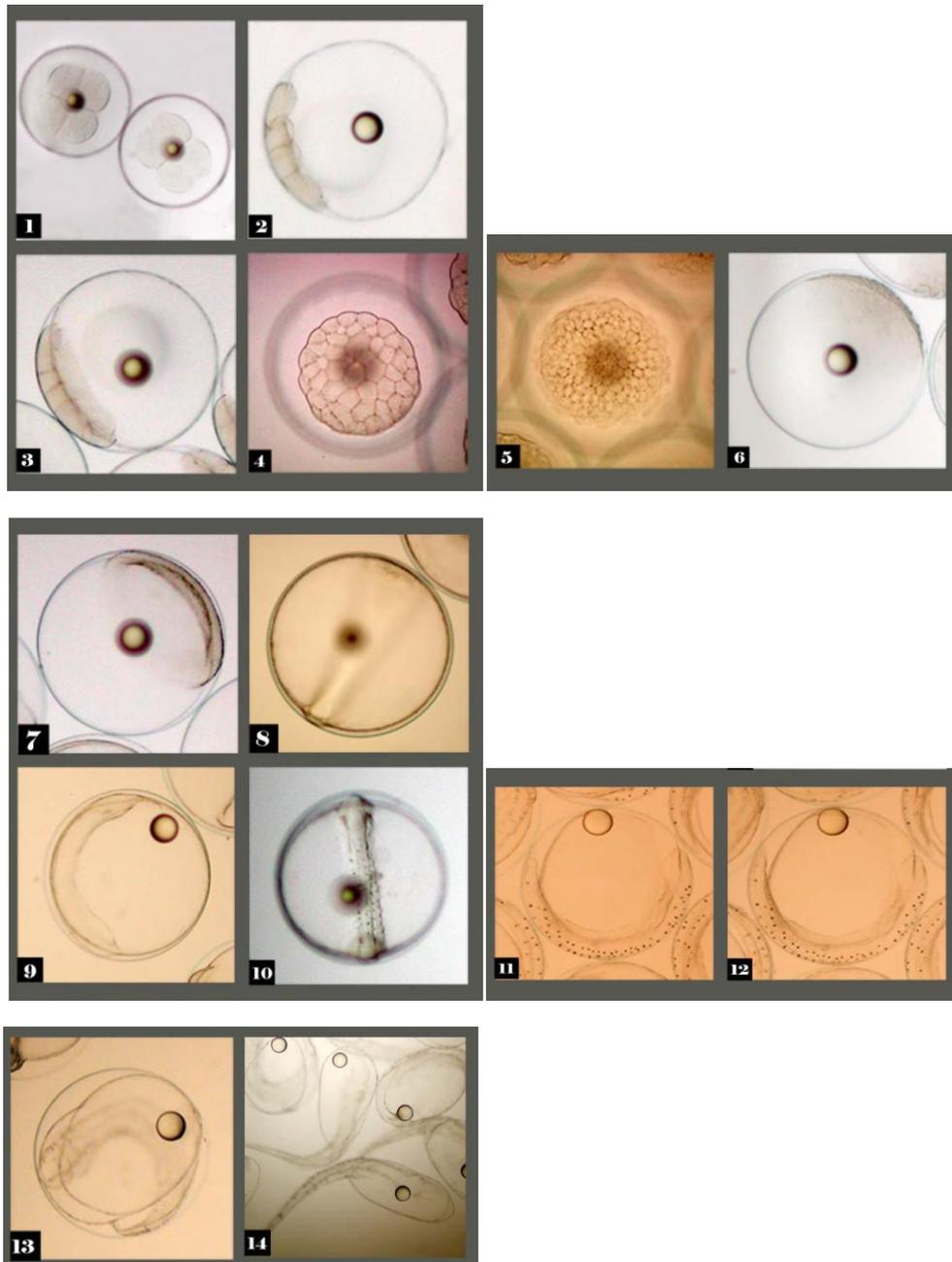
### **2.1.2 Desarrollo embrionario del pargo flamenco *Lutjanus guttatus***

Los huevos del pargo flamenco son pelágicos, flotan en la superficie del agua a una salinidad de 35‰, poseen un corion transparente y liso, esféricos, el vitelo homogéneo y transparente, deben de tener un diámetro aproximado de 724-728  $\mu\text{m}$  con una sola gota de aceite de 121-123  $\mu\text{m}$  de diámetro; la eclosión puede producirse a las 20-24 horas del momento estimado, a una temperatura de 26 a 30 °C y las larvas recién eclosionadas pueden medir desde 2.0 hasta 2.5 mm aproximadamente de longitud total (Alvarez-Lajonchère *et al.*, 2011a).

Una de las partes más importantes es el desarrollo embrionario de *L. guttatus* (Tabla III), fue descrito por Ibarra-Castro (2005) durante las etapas que suceden desde las primeras divisiones hasta la eclosión (Fig. 4), donde concluyó que todo el proceso desde la fertilización hasta eclosionar es entre 16-20 horas y depende de la temperatura del agua. Asimismo, obtuvo huevos al momento del desove con promedio de  $783 \pm 21 \mu\text{m}$  y larvas de  $2.14 \pm 0.26 \text{ mm}$ .

**Tabla III.** Descripción del desarrollo embrionario de *L. guttatus* (tomado de Ibarra-Castro, 2005).

<b>TIEMPO DESPUÉS DE LA FERTILIZACIÓN (h)</b>	<b>ESTADO DE DESARROLLO</b>	<b>NÚMERO DE FOTOGRAFÍA</b>
0:15-0:30	2 Y 4 células	1
0:45-0:55	8 células	2
1:10-1:30	16 células	3
1:40-1:50	Mórula	4
4:15-4:25	Blástula	5
6:15-6:25	Inicio del eje embrionario	6
7:15-7:25	Evolución del embrión	7
8:15-8:25	Segmentación del embrión	8
9:25	Continúa segmentación y formación de la cabeza	9
10:19	Continúa segmentación hasta la cola y aparecen los pigmentos	10
15:39	Formación de la aleta caudal y aparición de los órganos internos	11
16:44	Empieza a latir el corazón y hay movimiento	12
18:04	Los movimientos son más frecuentes	13
19:49	Eclosión del embrión	14



**Figura 4.** Etapas del desarrollo embrionario. 1) 4 células, 2) 8 células, 3) 16 células, 4) mórula, 5) blástula, 6) gástrula, 7) anillo embrionario, 8) primera segmentación del embrión, 9) formación de la cabeza, 10) segmentación de 4 miómeros y los primeros pigmentos, 11 y 12) cola diferenciada y aparecen los órganos internos como el corazón, una hora después y con un aspecto similar comienzan las contracciones musculares del embrión y los latidos del corazón, 13) se despega la cola, 14) eclosión del huevo (tomado de Ibarra-Castro, 2005).

Al respecto, los estadios de embrión y larva son muy delicados durante la vida de un pez (Turano *et al.*, 2000) y es fundamental controlar la temperatura, luz, calidad y flujo de agua (Alvarez-Lajonchère *et al.*, 2011b; Aviles, 2005; Mangor y Waiwood, 1995) es por ello, que es necesario un extremo cuidado durante los cultivos y acciones meticulosas, que no afecten los diversos factores.

En otras especies que han sido estudiadas, se ha descrito el desarrollo embrionario; Cucchi *et al.* (2011), describieron el desarrollo embrionario de la lubina Europea *Dicentrarchus labrax*, donde indican que la eclosión es entre las 92-93 horas después de la fertilización y los factores abióticos (temperatura, salinidad, fotoperiodos, densidad de población) afectan el desarrollo embrionario en condiciones de laboratorio. Asimismo, López *et al.* (2002), describieron el desarrollo embrionario del bolo *Diplectrum radiale*, donde la hora de eclosión después de la fertilización, fue a las 17 horas con 23 minutos. El desarrollo del pez zebra fue descrito por Kimmel *et al.* (1995), donde el tiempo de eclosión es entre las 48-72 horas debido a los tiempos esporádicos de eclosión en cada individuo. El pargo rojo *Lutjanus peru* fue descrito por Peña *et al.* (2014), donde a 26, 28 y 30°C, obtuvieron la hora de eclosión a las 23, 20 y 18 horas respectivamente, después de la fertilización, donde la temperatura es un factor que influye en la hora de eclosión.

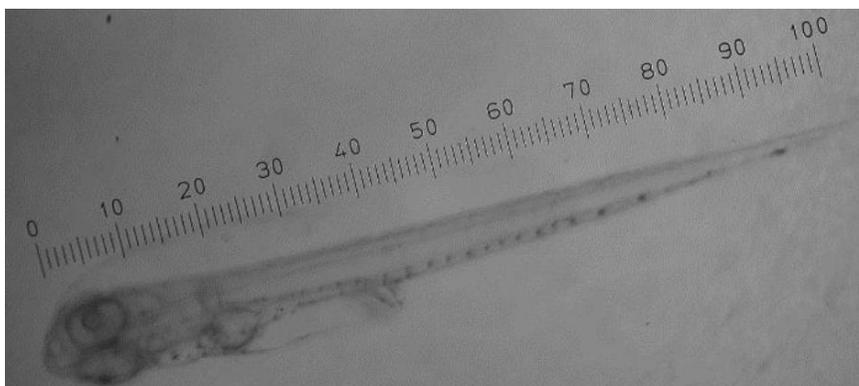
### **2.1.3 Larvas del pargo flamenco *Lutjanus guttatus***

Las larvas de peces son los vertebrados de vida libre de menor tamaño que existen, su periodo es considerado como una etapa crucial en el ciclo de vida de los peces, donde el patrón general y la secuencia de diferenciación de los órganos y sistemas, es muy similar entre las especies (Zavala-Leal *et al.*, 2011). El desarrollo ontogénico se clasifica en tres tipos, la indirecta que presenta la parte embrionaria, larvaria, juvenil, adulto y senectud; la ontogenia intermedia y directa, cuya última pasa directamente al periodo juvenil (Zavala-Leal *et al.*, 2011). Los peces con ontogenia indirecta presentan cambios fisiológicos y morfológicos de

gran importancia durante los primeros días (Izquierdo *et al.*, 2000; Zambonino-Infante *et al.*, 2008; Zavala-Leal *et al.*, 2011; Wilson y Castro, 2011), así como pasar de una alimentación endógena a una exógena (Zavala-Leal *et al.*, 2011). Por otra parte, existe una variedad de clasificación de larvas, entre ellas la clasificación de larvas pre-flexión que corresponde cuando han agotado sus reservas vitelinas y hasta el inicio de la curvatura del extremo superior de la notocorda; larvas flexión hasta la formación de la placa hipúrica; larvas post-flexión termina con la completa formación de los elementos de las aletas pares e impares (Kendall *et al.*, 1984).

En los estadios de larva vitelina y pre-flexión se caracterizan por presentar una gran cantidad de cambios en la morfología y anatomía larval; en el estadio flexión implica cambios estructurales dirigidos a incrementar la funcionalidad de las estructuras desarrolladas, durante los estadios anteriores, incrementa la talla y actividad, la demanda de oxígeno, cambia la respiración de cutánea a branquial por el desarrollo morfo-funcional de los elementos branquiales; en larvas post-flexión se presentan las glándulas gástricas en el estómago y la aparición de pepsina, desarrollo de los bastones en la retina; las diferencias que existen entre las especies o poblaciones en cuanto al tipo de ontogenia y la tasa de desarrollo, están determinadas por cuestiones genéticas y ambientales (Zavala-Leal *et al.*, 2011).

Las larvas de *L. guttatus* (Fig. 5) al eclosionar pueden medir entre 2.1 a 2.7 mm de longitud, el saco vitelino ocupa casi la mitad de la longitud del cuerpo; el tubo digestivo, la boca, los ojos y el ano se encuentran indiferenciados y no se distinguen; al tercer día, se observa la apertura del ano y la boca, los ojos pigmentados y el saco vitelino absorbido (Abdo-de la Parra *et al.*, 2015).



**Figura 5.** Larva de *L. guttatus* (tomado de Abdo-de la parra *et al.*, 2015).

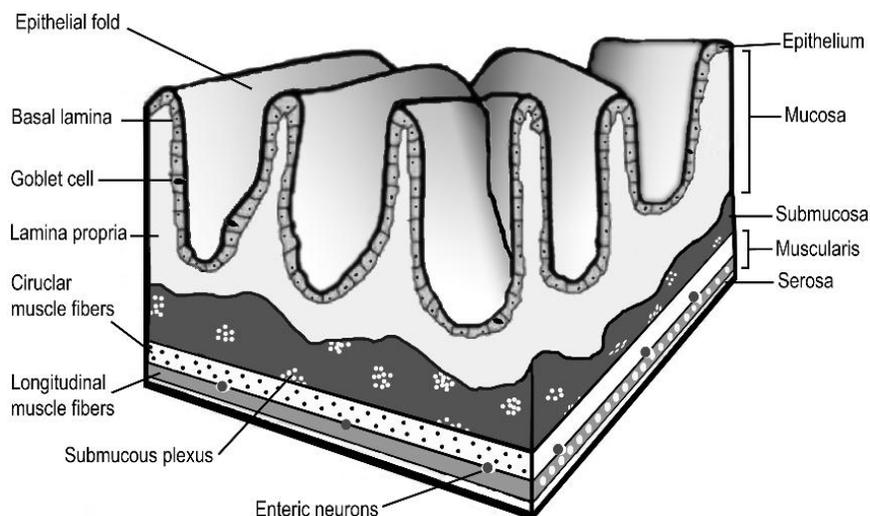
En larvas de *L. guttatus* las complicaciones en la supervivencia se presentan durante las primeras semanas, especialmente en el periodo de la primera alimentación y el canibalismo que empieza durante la segunda semana (Alvarez-Lajonchère *et al.*, 2011a). Un alimento vivo en la cantidad, calidad y momento requerido puede lograr que la larvicultura sea un éxito aún con las condiciones no adecuadas, sin embargo, si el alimento vivo no cumple con los requerimientos necesarios, esta no se logrará; algunos de los principales organismos utilizados son las microalgas, rotíferos (indispensables para alimentación), copépodos, y *Artemia* (Velasco-Blanco *et al.*, 2011). Asimismo, existe una gran variedad de factores que afectan el desarrollo larvario, entre estos, la temperatura controla procesos vitales e influencia el crecimiento (Alvarez-Lajonchère *et al.*, 2011b; Green y Brown, 2013; Izquierdo *et al.*, 2000; Zambonino-Infante *et al.*, 2008; Zavala-Leal *et al.*, 2011). Por tanto, el periodo larvario es un reto importante para obtener juveniles y adultos, donde los investigadores siguen aplicando sus conocimientos para lograr cerrar ciclos reproductivos y de producción, en diversas especies de interés.

#### **2.1.4 Maduración digestiva**

El conocimiento de diferenciación del tracto digestivo y glándulas accesorias durante el desarrollo larvario es esencial para entender la fisiología digestiva y

nutricional de larvas de peces, así como los estadios de desarrollo con la práctica de alimento y cultivo (Lazo *et al.*, 2011). Cuando en una larva el sistema digestivo está completamente funcional, esta se considera en un estadio juvenil (Lazo *et al.*, 2011). Durante el estadio lecitotrófico, las larvas sufren cambios muy rápidos enfocados en la diferenciación de varias regiones y órganos del sistema digestivo, bucofaríngea, esófago, intestino, páncreas e hígado, mientras que la morfogénesis del estómago depende de la especie (Lazo *et al.*, 2011) así, entre los cambios rápidos, los enterocitos del tracto gastrointestinal son funcionales al final del periodo lecitotrófico en larvas de diversas especies marinas (Izquierdo *et al.*, 2000).

Al respecto, el tracto digestivo de los peces está compuesto por cuatro capas (Fig. 6) mucosa, submucosa, muscular y serosa (Lazo *et al.*, 2011).



**Figura 6.** Organización general de la pared del tracto digestivo, esto puede variar según la región del mismo (tomado de Lazo *et al.*, 2011).

Al eclosionar, el esófago en larvas no está diferenciado y su morfogénesis toma lugar a estadios posteriores de desarrollo, justo antes de la primera alimentación exógena (Lazo *et al.*, 2011). El intestino es la porción más larga del tracto digestivo y es de los primeros órganos en diferenciarse; la mucosa es un tejido

muy dinámico y activo, y es el sitio de inicio de la digestión y absorción de los nutrientes, también está directamente involucrada en la activación hormonal y nerviosa de la síntesis de enzimas y bilis, y subsecuentemente, la secreción del páncreas e hígado (Lazo *et al.*, 2011). Cuanto más se desarrolla el intestino, éste se enrolla y los dobleces de mucosa incrementan, donde cuya área de absorción aumenta; en el epitelio intestinal se identifican cuatro tipos de células (enterocitos, entero-endocrinas, rodlet y caliciformes), los enterocitos son las más abundantes del epitelio intestinal y están involucradas en absorción de nutrientes, digestión intracelular y osmoregulación; las caliciformes son las segundas más abundantes y están dispersas en el epitelio intestinal, su función es formar una barrera entre el epitelio y el contenido del lumen con la producción de mucinas (barrera de mucopolisacáridos); las entero-endocrinas producen y secretan hormonas peptídicas que en colaboración con el sistema nervioso, controlan y coordinan las actividades musculares y secretoras del tracto gastrointestinal; y las rodlet son consideradas como elementos regulatorios relacionados a la osmoregulación, transportación de iones y respuesta inmune no específica (Lazo *et al.*, 2011).

Por otra parte, los ciegos pilóricos son considerados como una adaptación para incrementar la superficie intestinal, sin incrementar la longitud y grosor del intestino, y ayuda a la absorción; en conjunto con el estómago, son la última parte por diferenciar del canal alimentario; el estómago está separado del intestino por un esfínter pilórico, funciona como almacenamiento de alimentos ingeridos, secreción de pepsina y ácido clorhídrico (Lazo *et al.*, 2011). Las glándulas digestivas accesorias que se presentan son el hígado, la vesícula biliar y el páncreas (Lazo *et al.*, 2011; Zavala-Leal *et al.*, 2011). El hígado es el órgano central digestivo, no sólo para metabolismo de nutrientes, conversión, transferencia a tejidos periféricos, sino también para la producción de bilis y desintoxicación de toxinas; el páncreas secreta el jugo pancreático (enzimas digestivas) y en una porción endocrina, los islotes de Langerhans, se secretan hormonas como la insulina, somatostatina, polipéptidos pancreáticos y glucagón,

además, otro órgano asociado a la digestión es la vesícula biliar que secreta la bilis producida por el hígado y ayuda la emulsificación del alimento ingerido (lípidos) e incrementa el pH intestinal (Lazo *et al.*, 2011).

Al respecto, durante los estadios larvarios, al eclosionar el tubo digestivo presenta grandes variaciones en cuanto a su diferenciación y desarrollo según las especies, aunado a ello, el tracto digestivo aparece como un tubo recto e indiferenciado, situado en la parte dorsal del saco vitelino (Lazo *et al.*, 2011; Villeneuve *et al.*, 2006; Wilson y Castro, 2011; Zavala-Leal *et al.*, 2011), la boca y el ano permanecen cerrados, a este momento el epitelio digestivo no está diferenciado y consta de una sola capa de células; el tiempo de la apertura de la boca y ano varía según la especie y la temperatura; el esófago comunica la cavidad bucofaríngea con el intestino anterior (Zavala-Leal *et al.*, 2011). En los primeros 2-3 días después de la eclosión (DDE) se observa en la parte posterior del intestino un giro de 90° hacia la región ventral apareciendo una válvula intestinal (constricción de la mucosa intestinal) dividiendo al intestino en dos regiones, pre-valvular (intestino anterior) y post-valvular (intestino posterior) las cuales no presentan diferencias histológicas en este momento y ambas están recubiertas por un epitelio de columna con microvellosidades (Zavala-Leal *et al.*, 2011). Morfológicamente, el intestino posterior termina en una zona rectal corta cubierta por un epitelio coloidal, sin pliegues ni células caliciformes; el estómago se sitúa entre el esófago y el intestino, donde su diferenciación resulta de las constricciones del tracto digestivo (Zavala-Leal *et al.*, 2011). Se observa un esfínter pilórico que separa el estómago de la parte anterior del intestino, aquí las glándulas accesorias del sistema digestivo son el hígado y el páncreas. (Zavala-Leal *et al.*, 2011) y al momento de la eclosión no son evidentes (Gisbert *et al.*, 2004). El tejido pancreático se origina de la pared del tubo digestivo medio en las larvas recién eclosionadas, mientras que el hígado comienza a desarrollarse pocas horas después de la eclosión, a partir de un engrosamiento ventral del tubo digestivo posterior, asimismo, los hepatocitos son organizados en sinusoides y muestran un

prominente núcleo central, abundante glucógeno y glicoproteínas neutras (Zavala-Leal *et al.*, 2011). La vesícula biliar comienza a observarse durante los primeros DDE, y está constituida por un epitelio cúbico simple (Gisbert *et al.*, 2004). El hígado incrementa en talla y aumenta también la presencia de vacuolas y sinusoides hepáticas (Zavala-Leal *et al.*, 2011). Las células del páncreas exocrino (células piramidales) forman acinos y muestran un citoplasma con gránulos de zimógeno fuertemente ácido (Hachero-Cruzado *et al.*, 2009).

En larvas flexión se observa un aumento en la longitud y complejidad a todo lo largo del tracto digestivo, la cavidad bucal presenta un incremento en tamaño y cantidad de estructuras especializadas, como papilas gustativas y células caliciformes (Zavala-Leal *et al.*, 2011). En el esófago se aprecian un mayor número de estas células, aunque no presenta cambios histológicos marcados (Gisbert *et al.*, 2004). Por otra parte, en el estómago se observa que el tejido conectivo rodea el epitelio cúbico, mientras que una capa circular de músculo estriado rodea la mucosa del estómago (Zavala-Leal *et al.*, 2011). Aunado a ello, al final de este estadio el hígado ocupa la mayor parte de la cavidad abdominal (Gisbert *et al.*, 2004).

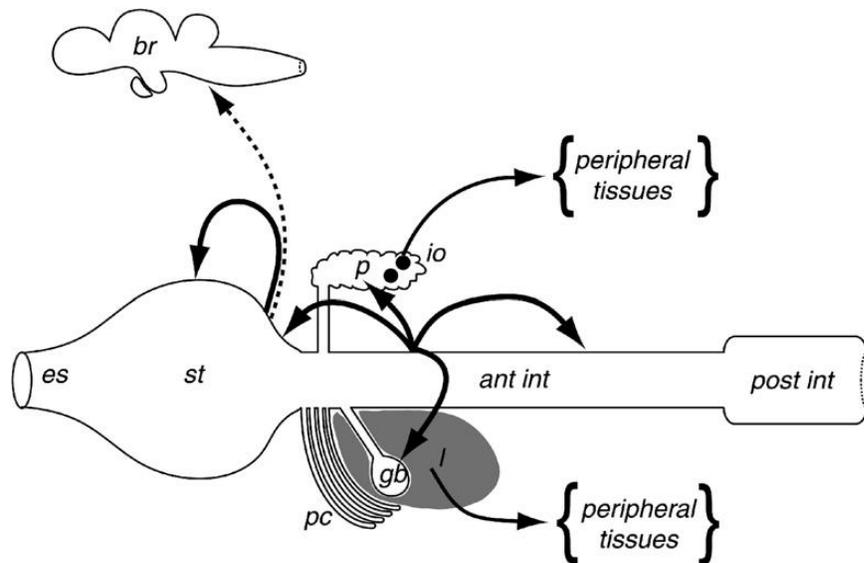
En larvas postflexión el sistema digestivo alcanza un desarrollo estructural y funcional similar al de un juvenil (Zavala-Leal *et al.*, 2011), donde el esófago no presenta cambios estructurales o funcionales notorios (Gisbert *et al.*, 2004). En el estómago las glándulas gástricas están revestidas por un epitelio cuboidal simple y están ubicadas en la parte anterior e intermedia del estómago, asimismo, este se divide en región cardiaca, gástrica y pilórica; el primero presenta varios pliegues de mucosa revestido de epitelio ciliado y ausencia de células caliciformes; en la parte gástrica el lumen está cubierto por un epitelio columnar con células caliciformes dispersas y glándulas gástricas; la región pilórica, está cubierta por un epitelio columnar corto y ciliado con pliegues en la mucosa sin glándulas gástricas (Zavala-Leal *et al.*, 2011). El estómago es separado del intestino anterior por el esfínter pilórico (Gisbert *et al.*, 2004). Por tanto esta etapa final larvaria está

caracterizada por la presencia de glándulas gástricas en el estómago y la mayor degradación de alimentos por la secreción de pepsina (Zavala-Leal *et al.*, 2011).

Otros autores como Wilson y Castro (2011) indican que el desarrollo posterior a la eclosión es dividido en cuatro fases, la primera termina cuando la boca y el ano se abren 6/7 DDE; la segunda fase el esófago, la región gástrica, el intestino y el recto se distinguen; el tercero inicia 13/15 DDE, donde el saco vitelino se ha absorbido completamente y aparecen las células de glándulas gástricas y los ciegos pilóricos; en la cuarta fase aparece a los 55 DDE, el intestino está desarrollado completamente, el estómago está diferenciado con su morfología definitiva. En *Paralichthys olivaceus* el primordio estómago se forma entre los 20/30 DDE, aunque la secreción de pepsinógeno comienza sólo en la metamorfosis a los 45 DDE (Kurokawa y Suzuki, 1995). En *Pagrus pagrus*, el gen codificante para pepsinógeno es detectado a los 30 DDE en las glándulas gástricas formadas, así como en la bomba de protones en estómago (Darias *et al.*, 2007).

Otra parte importante, es la aparición y establecimiento de una capacidad digestiva a lo largo del desarrollo larvario, que es regulada genéticamente e incluso por la alimentación (Lazo *et al.*, 2011); por otro lado, las poliaminas también están implicadas en este proceso de maduración (Tovar-Ramírez *et al.*, 2004). Estas últimas moléculas incluso ayudan a la diferenciación de los enterocitos, lo que permite la absorción de nutrientes (Lazo *et al.*, 2011). En el páncreas, el tripsinógeno es activado por la enteroquinasa de la mucosa intestinal a tripsina, cuya enzima activa la elastasa, carboxipeptidasa A y B, quimotripsina y colipasa, aunque también produce su autoactivación (Bakke *et al.*, 2011). Por otra parte, la hormona CCK es secretada vía señal neural de las células endocrinas que recubren el intestino (Bakke *et al.*, 2011). Asimismo, esta hormona estimula la secreción de enzimas digestivas del páncreas, así como la contracción de la vesícula biliar del tracto intestinal de larvas y la peristalsis (Bakke *et al.*, 2011;

Liddle, 1997; Rønnestad *et al.*, 2007). En la figura 7 se observa un esquema de la forma y organización de los factores en las funciones gastrointestinales.



**Figura 7.** Factores endocrinos gastro-entero-pancreáticos que pueden coordinar las funciones gastrointestinales por acción parácrina o controlar el metabolismo y crecimiento mediante la transmisión por el flujo de sangre de factores del intestino, hígado, páncreas o tejidos, así como indicar el estado por señales gastrointestinales al cerebro, donde puede influenciar el funcionamiento (alimentación o beber). Clave en estructuras: *es*, esófago, *st*, estómago, *pc*, ciegos pilóricos, *post int*, intestino posterior, *ant int*, intestino anterior, *gb*, vesícula biliar, *p*, páncreas, *io*, islote de órganos, *br*, cerebro, *l*, hígado (tomado de Takei y Loretz, 2011).

### 2.1.5 Enzimas digestivas durante el desarrollo larvario

Conocer el desarrollo del sistema digestivo y actividad enzimática en larvas, permite saber el momento adecuado para llevar una deshabitación alimentaria o destete, y qué tipo de alimento administrar en esta etapa del desarrollo de los peces (Zambonino-Infante y Cahu, 2001).

En el pargo flamenco *L. guttatus*, Peña *et al.* (2015), encontraron una tendencia al aumento de la actividad de las proteasas ácidas y alcalinas totales con el aumento de la edad, mientras que la actividad de tripsina disminuye. No obstante, la

actividad enzimática pancreática e intestinal están presentes al eclosionar (Moguel-Hernández *et al.*, 2013b) y la maduración de las funciones digestivas ocurre entre los 20-25 DDE con la secreción de pepsina por el estómago funcional (Galaviz *et al.*, 2012). Entonces, *L. guttatus* presenta una enorme batería de enzimas digestivas al eclosionar, tanto pancreáticas (tripsina, quimotripsina, amilasa y lipasa) como intestinales (fosfatasas alcalinas-ácidas y leucina aminopeptidasa) y su actividad digestiva y absorptiva incrementa con la edad debido al aumento del tamaño del tracto digestivo y el peso de la mucosa (Moguel-Hernández *et al.*, 2013b; Peña *et al.*, 2015), por ende su sistema digestivo es altamente eficiente para la degradación de proteínas (Peña *et al.*, 2015). Asimismo, tripsina, quimotripsina y amilasa son las enzimas pancreáticas más importantes que han sido encontradas en larvas de teleósteos (Parma *et al.*, 2013). En la Tabla IV se describen las principales enzimas secretadas por el páncreas.

**Tabla IV.** Enzimas digestivas del páncreas (modificado de Bakke *et al.*, 2011).

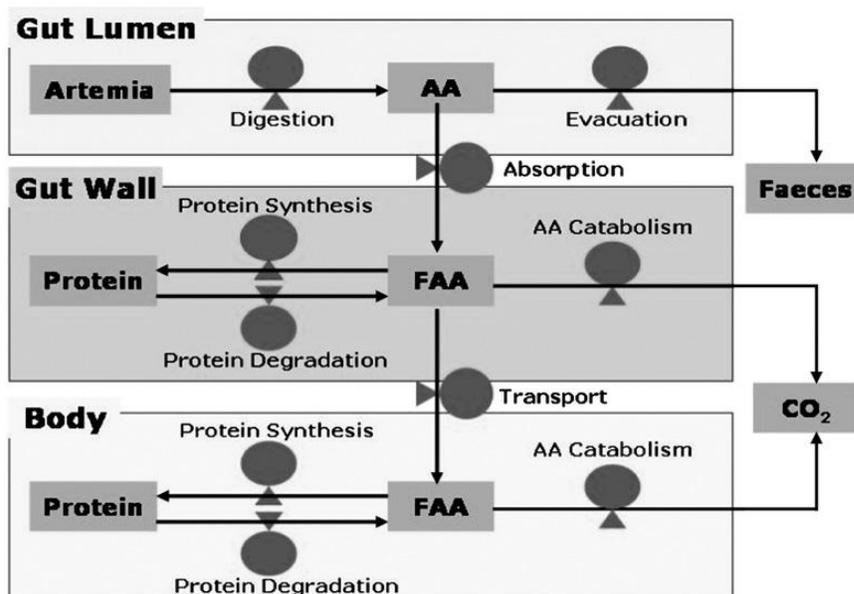
ORIGEN	ENZIMA	SUBSTRATO	PRODUCTO
Páncreas exocrino	Tripsina (tripsinógeno)	Proteínas y polipéptidos	Enlaces peptídicos adyacentes a arginina o lisina
	Quimotripsina (quimotripsinógeno)	Proteínas y polipéptidos	Enlaces peptídicos adyacentes a aminoácidos aromáticos
	Lipasa pancreática	Triglicéridos	Monoglicéridos y ácidos grasos
	$\alpha$ -amilasa pancreática	Almidón	Enlaces 1, 4, $\alpha$ , dextrinas, maltotriosas, maltosa

Moguel-Hernández *et al.* (2013b), en *L. guttatus* encontraron un incremento significativo en la actividad de las enzimas digestivas (tripsina, quimotripsina, amilasa, lipasa, fosfatasas alcalinas y ácidas, y leucina aminopeptidasa) en los 20 DDE y en el 25 DDE una digestión similar a la de un juvenil por la presencia de pepsina en el estómago, donde sugieren al igual que Galaviz *et al.* (2012), que la maduración digestiva está completa entre los 20-25 DDE.

### 2.1.6 Absorción de proteínas y lípidos en larvas

Debido a la ausencia de estómago en las larvas al inicio de la eclosión, es difícil que degraden y absorban proteínas, sin embargo, éstas pueden llevar una baja actividad proteolítica en el intestino medio y es compensada con la endocitosis de moléculas complejas en el mismo lugar (Rønnestad *et al.*, 2007) o a través de la pinocitosis (Izquierdo *et al.*, 2000; Lazo *et al.*, 2011).

La absorción de proteínas, aminoácidos (AA) y AA libres fue esquematizada (Fig. 8) y mejorada por Rønnestad *et al.* (2007), donde describen la posible forma de aprovechamiento en el lumen intestinal. En éste, existe una digestión del alimento, una parte de los AA se aprovecha y se absorben en el lumen, mientras que el resto pasa a excremento; posteriormente, en la pared intestinal se toman los AA libres absorbidos para síntesis de proteínas y una parte de AA no libres pasa al catabolismo (producción de energía, CO<sub>2</sub>, entre otros); asimismo, algunos AA libres por transporte pasan al cuerpo y hay una síntesis de proteínas y una parte para catabolismo; en el epitelio existen transportadores de aminoácidos (AAT), así como su expresión y producción en las membranas borde de cepillo de los enterocitos (Rønnestad *et al.*, 2007).



**Figura 8.** Esquema de absorción proteínas, AA y AA libres (tomado de Rønnestad *et al.*, 2007).

En relación a la absorción de lípidos en peces, esta se asemeja a los mamíferos, porque después de la hidrólisis intraluminal, la grasa dietética es incorporada a las células epiteliales del intestino por difusión de una forma de micelas de monoglicéridos y ácidos grasos libres, donde la reaclilación sucede en el retículo endoplasmático y sus productos son liberados en la submucosa como quilomicrones o lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) (Izquierdo *et al.*, 2000). Sin embargo, sólo una pequeña proporción de los lípidos absorbidos es incorporada en las lipoproteínas, lo que sugiere una reducida capacidad de transporte lipídico en esta etapa (Izquierdo *et al.*, 2000).

### 2.1.7 La CCK y NPY en el control hormonal del apetito y saciedad

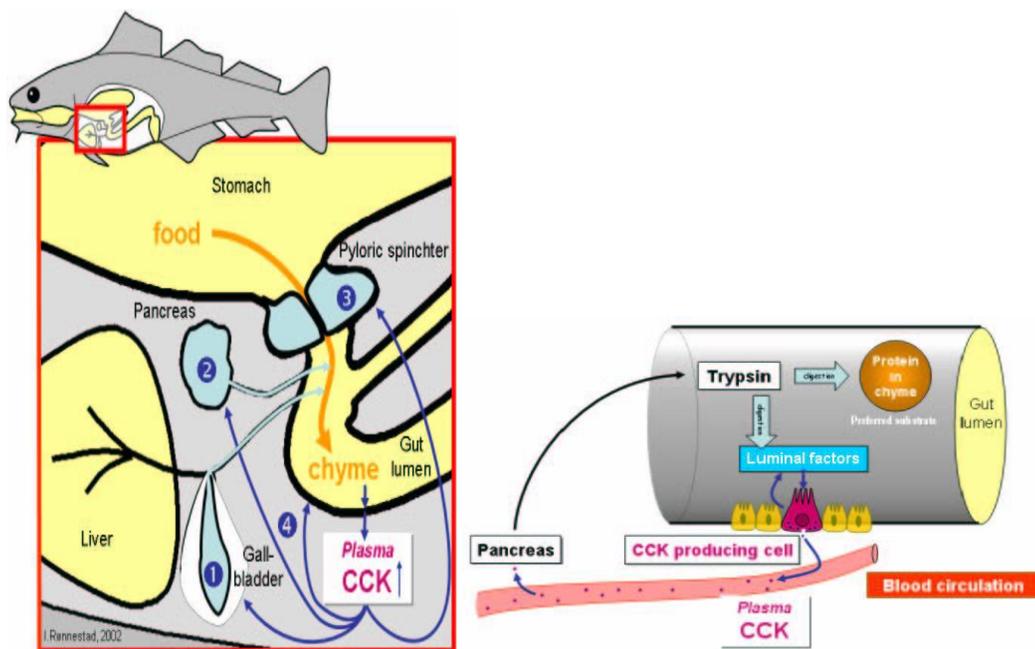
La función mayor del sistema digestivo es digerir/degradar macronutrientes de los alimentos para ser absorbidos fácilmente y suministrar los nutrientes a los tejidos del cuerpo (Rønnestad *et al.*, 2007). La digestión es compleja, donde se involucran enzimas y secreción de fluidos, y culmina en la absorción y evacuación (Rønnestad *et al.*, 2007; Wilson y Castro, 2011). En mamíferos es controlado por

un sistema endocrino y nervioso, así como factores luminales, donde se implican neurotransmisores, hormonas (Tabla V), señal parácrina, y factores de transcripción y transducción (Rønnestad *et al.*, 2007). Asimismo, la regulación hormonal del tracto gastrointestinal es conservada en teleósteos (Rønnestad *et al.*, 2007). Algunas hormonas gastrointestinales (Grelina, péptido YY y CCK) no sólo regulan la digestión sino que actúan en la saciedad/apetito donde modulan señales en el cerebro (Moran y Kinzig, 2004; Volkoff *et al.*, 2005).

**Tabla V.** Familias de hormonas gastro-entero-pancreáticas en intestino de peces (modificado de Takei y Loretz, 2011).

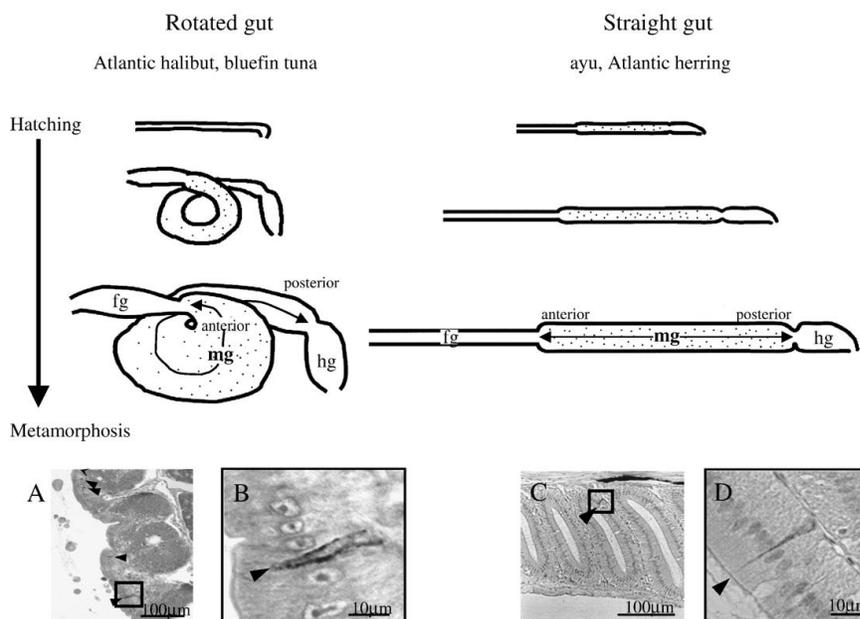
FAMILIA/MIEMBRO	ORIGEN	OBJETIVO/FUNCIÓN
Grelina		
Grelina (GLN)	Estómago	Estimula consumo de alimento, motilidad gástrica
Motilina	Intestino	Estimula la motilidad gástrica
Gastrina		
CCK	Intestino	Inhibe consumo de alimento, estimula secreción de enzimas pancreáticas y contracción de vesícula biliar
Gastrina	Células-G estómago	Estimula secreción de glándulas gástricas y motilidad gástrica
Neuropéptido Y		
NPY	Sistema nervioso	Estimula consumo de alimento
PYY	Páncreas endocrino	Estimula consumo de alimento
PP	Células-F de islotes pancreáticos	Desconocido
PY	Cerebro, intestino, islotes pancreáticos	Desconocido

La CCK es una importante hormona peptídica gastrointestinal de vertebrados superiores y juega un rol de llave (Fig. 9) en la estimulación de la secreción de enzimas pancreáticas, contracción de la vesícula biliar, peristalsis intestinal, vaciado gástrico lento y control de la entrada de alimento (Furutani *et al.*, 2012; Liddle, 1997; Rønnestad *et al.*, 2007). Además, es liberada por la presencia de proteínas, péptidos, lípidos e incluso carbohidratos (Furutani *et al.*, 2012; Murashita *et al.*, 2008)



**Figura 9.** Estimulación del hígado, páncreas, esfínter pilórico e intestino por acción de CCK a través del torrente sanguíneo. Asimismo, liberación de CCK a sangre por células productoras de CCK en el intestino por acción de factores luminales, proteínas, AA y ácidos grasos, así como liberación de enzimas como tripsina por páncreas (tomado de Rønnestad, 2002).

La CCK se ha demostrado que funciona como un neurotransmisor en el cerebro y está involucrada en el control del apetito como una señal de saciedad desde el intestino (Crawley y Corwin, 1994). La CCK es bien conservada en todos los vertebrados estudiados y en especial CCK-8 con los AA DYMGW MDF, con Metionina (M) en la sexta posición (Rønnestad *et al.*, 2007). Rønnestad *et al.* (2007), esquematizaron los intestinos con curvaturas y recto, cuando trabajaban para identificar las células productoras de CCK (Fig. 10). Asimismo, indican que el alimento permanece mayor tiempo en el curvado y menor tiempo en el recto.

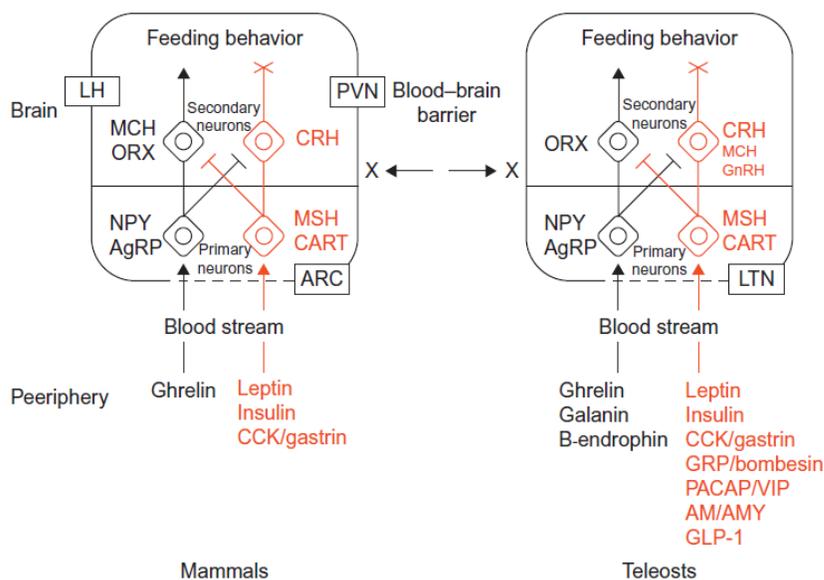


**Figura 10.** Tipos de intestinos y su desarrollo en la eclosión y durante la metamorfosis, los puntos negros indican la posición de las células productoras de CCK; fg intestino anterior, mg intestino medio, hg intestino grueso; se señala las células productoras de CCK en A intestino anterior de 66 DDE del pez halibut *Hippoglossus hippoglossus*, B es A aumentada, C intestino medio del pez ayu *Plecoglossus altivelis* 30 DDE y D es C aumentado (tomado de Rønnestad *et al.*, 2007).

La CCK y gastrina comprenden una pequeña familia de hormonas, ambas son sintetizadas como pre-pro-hormonas grandes (>100 residuos de AA) que son procesadas enzimáticamente del N-terminal dentro de múltiples formas cortas con el C-terminal de estas moléculas que contienen de 7-8 AA de núcleo activo para actividad biológica (Takei y Loretz, 2011; Vigna 1986; Vigna 2000). Dentro del núcleo bioactivo, el pentapéptido C-terminal con un C-terminal con amida es invariante entre dos hormonas y precede de un residuo sulfatado de tirosina (Takei y Loretz, 2011). La acción de ambas hormonas es mediada por dos receptores de CCK, CCK-AR y CCK-BR; el primero caracterizado en el tracto gastrointestinal y las células acinares del páncreas con mayor afinidad para CCK por su séptimo residuo tirosilo sulfatado, el segundo se encontró en el cerebro y posee la misma afinidad por los péptidos sulfatados de gastrina y CCK (Wank, 1998; Washington

*et al.*, 2016). El neuropéptido Y (NPY) es otra familia de hormonas, donde sólo NPY y PYY son las subfamilias presentes en peces, así como su expresión es limitada a cerebro y riñón (Takei y Lorentz, 2011), además está compuesto por 36 residuos de AA (Ji *et al.*, 2015). Actúa de forma contraria que CCK, es decir, estimula el apetito, y ambas en conjunto con la hormona grelina, son importantes factores endocrinos en la regulación del alimento, crecimiento y reproducción (Ji *et al.*, 2015). Asimismo, se ha demostrado que CCK estimula y el péptido Y (PY) es antagonista, donde inhibe la secreción de lipasa, amilasa y tripsina pancreática (Takei y Lorentz, 2011).

El control del apetito es de los mayores objetivos en endocrinología en relación al síndrome metabólico y obesidad, cuyas investigaciones han revelado la interacción de las hormonas orexígenas y anorexígenas que regulan el apetito (Takei y Lorentz, 2011), las primeras estimulan la alimentación y las segundas inhiben el estímulo. En la figura 11 se observa el esquema, donde el paso de las hormonas como grelina (hormonas orexígenas), pasan por una barrera de sangre cerebral insuficiente, cuya activación es específica con neuronas primarias (NPY, AgRP) y éstas simultáneamente activan neuronas secundarias en el hipotálamo (MCH, ORX; desconocido para teleósteos) para resultar los comportamientos de apetito, sin embargo, CCK/gastrina (hormonas anorexígenas) poseen el mismo proceso pero de forma inversa al inhibir la alimentación, así como la activación de diferentes neuronas primarias y secundarias que concluyen en el comportamiento de saciedad (Cooper, 2014; Takei y Lorentz, 2011). Al respecto, Lin *et al.* (2000) con el pez dorado revelaron un esquema de regulación muy similar entre mamíferos y teleósteos. En relación a lo anterior, NPY es expresada en núcleo tuberal lateral y CCK en intestino y en cerebro, esta última funciona como un neuropéptido al introducirse de manera periférica y central en su forma activa como octapéptido sulfatado CCK-8S para inhibir el apetito, y es considerada como la hormona gastrointestinal con mayor efecto para inhibir el apetito en peces (Takei y Lorentz, 2011).



**Figura 11.** Comparación de la regulación hormonal del apetito entre teleósteos y mamíferos. Hormonas orexígenas periféricas (letras negras) y anorexígenas (letras rojas) actúan en el núcleo tuberal lateral (LTN) o núcleo arqueado (ARC), donde la barrera de sangre cerebral es insuficiente. Las neuronas primarias orexígenas poseen el NPY y péptido relacionado agutí (AgRP), y neuronas anorexígenas la hormona estimulante  $\alpha$ -melanocito (MSH) y transcrito regulado de cocaína-anfetamina (CART), donde envían sus axones a neuronas secundarias al área lateral del hipotálamo (LH) y el núcleo paraventricular (PVN), respectivamente. Las neuronas secundarias están protegidas por una barrera de sangre cerebral. Sin embargo, en teleósteos la localización de neuronas secundarias es desconocida. ORX-Orexina, MCH-hormona concentradora de melanina, CRH-hormona liberadora de corticotropinas, GnRH-hormona liberadora de gonadotropinas (tomado de Takei y Lorentz, 2011).

### 2.1.8 Administración de hidrolizados solubles de pescado CPSP G

Los hidrolizados CPSP G (concentrado soluble de proteína de pescado), según la empresa Apligen (México), son el resultado de una hidrólisis con enzimas proteolíticas, donde se separan huesos y espinas, se realiza una purificación y extracción de grasas, se seca por aspersion y se reintegra la grasa para garantizar el producto. Asimismo, contiene bajos contenidos de aminas biogénicas (no hay proceso de putrefacción) y es excelente para pre-iniciaciones alimenticios por sus

elevados coeficientes de digestibilidad, palatabilidad y valor biológico. El perfil nutricional se observa en la Tabla VI. La presencia de *Salmonella* y *Escherichia coli* es negativo y la cantidad de gérmenes es máximo 5000 gr<sup>-1</sup>.

**Tabla VI.** Perfil nutricional de hidrolizados CPSP G, Apligen.

Lisina total	5.33%	Energía metabólica	3740 Kcal/ Kg
Lisina digestible ileal	4.89%	Humedad	5.0%
Metionina total	2.07%	Proteína cruda	72.0%
Metionina digestible ileal	1.87%	Grasa cruda	22.0%
Cistina total	0.66%	Cenizas	6.0%
Cistina digestible ileal	0.45%	Calcio	0.30%
Treonina total	2.74%	Fósforo	0.60%
Treonina digestible ileal	2.30%	Fósforo disponible	0.60%
Triptófano total	0.66%	Sodio	1.00%
Triptófano digestible ileal	0.50%		
Valina total	3.33%		
Valina digestible ileal	2.83%		

El hidrolizado de proteína es un componente esencial de dietas secas de iniciación para larvas de peces, como la promoción de un desarrollo saludable, además que los péptidos son sustratos adecuados para muchos microbios intestinales (Delcroix *et al.*, 2014). Asimismo, las proteínas del alimento pueden liberar péptidos biológicamente activos en consecuencia de la degradación enzimática, que como hidrolizados pueden afectar el balance de bacterias intestinales y su potencial adhesión (Świątecka *et al.*, 2012). El desarrollo de dietas microparticuladas de alta calidad, pueden potencialmente mejorar la calidad del agua y superar algunos problemas graves, como reducir los altos costos de producción de alimento vivo y el espacio para su enriquecimiento, mano de obra y el trabajo (Gisbert *et al.*, 2012). Además de su alto y constante valor nutricional, pueden almacenarse fácilmente y tienen bajo costo de producción (Gisbert *et al.*, 2012).

Al respecto, Delcroix *et al.* (2014), trabajaron con hidrolizados CPSP G como dieta control y cinco dietas experimentales en larvas de *D. labrax*, donde la proporción de di-péptidos y tri-péptidos varió al igual que el material de origen. Obtuvieron

resultados variados con respecto a la estimulación del crecimiento, secreción de enzimas, supervivencia, microbiota intestinal y concluyeron que la naturaleza de los hidrolizados de proteína marina es importante para la salud y desarrollo larvario, y aunque este posea una proporción alta de péptidos cortos, no es suficiente criterio para asegurar el valor nutricional. Asimismo, Gisbert *et al.* (2012), evaluaron dos hidrolizados de proteína (levaduras y sangre de porcino) en comparación con el de pescado en larvas de *Sparus aurata*, donde encontraron que la dieta experimental mejoró la maduración de los enterocitos, así como la actividad de enzimas citosólicas y del borde de cepillo. Sugieren, que los hidrolizados de pescado pueden sustituirse por una dieta formulada de hidrolizados como los de levadura y sangre de porcino, a pesar de estar por un 3% debajo del contenido de hidrolizado de proteína. Asimismo, la importancia de leucina, fenilalanina y valina en la esqueletogénesis y en la aparición de trastornos esqueléticos.

En el mismo año Świątecka *et al.* (2012), trabajaron con hidrolizados del chícharo para verificar la adhesión bacteriana a enterocitos, donde encontraron que se estimula la adhesión de *Lactobacillus/Enterococcus* y no influye con *Escherichia coli*. Por tanto, concluyen que puede ser un potencial modulador de la adhesión bacteriana.

Dos años antes Gisbert (2010) trabajó con hidrolizados de levadura y sangre porcina en *S. aurata*, donde obtuvo una reducción de deformidades a la mitad en comparación con el control.

Abdo-de la parra *et al.* (2010a), determinaron en el pargo flamenco *L. guttatus* los niveles de proteína (45 y 50%) y lípidos (9, 12, 15%) sobre el crecimiento y supervivencia de juveniles. Así, Hernández *et al.* (2015), se basaron en esos porcentajes para determinar el coeficiente de digestibilidad aparente en juveniles de *L. guttatus* con harinas de diverso origen, donde obtuvieron el mejor resultado en harina de aves.

Los hidrolizados ayudan a reducir la incidencia de deformidades en larvas de peces, así como promover el crecimiento y supervivencia, por su perfil de AA para los requerimientos del pez, y estos pueden ser explicados por la fisiología de la larva y la habilidad de absorber péptidos en menor tiempo que proteínas; la palatabilidad a causa de los AA libres proporciona aceptación por attractante y el peso de proteína y péptidos con efectos positivos está entre 1,000 a 10,000 y 200 a 2,500 Dalton respectivamente (Gisbert, 2010). Sin embargo, Kvåle *et al.* (2009), encontraron que en el *Gadus morhua* había un incremento en la supervivencia y en *H. hippoglossus* un decremento, lo que atribuyeron a una lixiviación durante la administración de la dieta.

Kotzamanis *et al.* (2007), trabajaron con larvas *D. labrax* y *Vibrio anguillarum*, donde encontraron que el peso molecular y concentración de péptidos solubles puede afectar el crecimiento y el estado inmunológico, así como una baja dosis de hidrolizados proteicos de pescado es adecuado para el desarrollo larvario y el medio bacteriano. Asimismo, Zambonino-Infante *et al.* (1996), encontraron que en grupos de larvas de *D. labrax* alimentadas con un 20% de di y tri-péptidos, mejoró la capacidad proteolítica del páncreas y a temprano desarrollo de la digestión intestinal. Por otra parte, se evaluó y encontró que los hidrolizados y proteínas estimulan la liberación de CCK y enzimas digestivas con larvas *D. labrax* en un trabajo de Cahu *et al.* (2004).

### **2.1.9 Uso de la levadura *Debaryomyces hansenii* como probiótico**

Uno de los mayores obstáculos en el desarrollo y sostenibilidad de la industria de acuicultura es la presencia de varias enfermedades en los sistemas de cultivo, la práctica de la intensificación de la acuicultura conduce a la aparición de varios organismos patógenos que poseen un rápido e incontrolado crecimiento en organismos acuáticos, lo que permite el uso de antibióticos para prevenir e inducir resistencia (Guzmán-Villanueva *et al.*, 2014). Asimismo, el uso de probióticos se ha demostrado en peces y organismos acuáticos que mejoran el balance

intestinal, digestión, respuesta inmune y la inhibición de microorganismos patógenos (Guzmán-Villanueva *et al.*, 2014). Por ello, es necesario el diseño de estrategias y alternativas como vacunas, el uso de probióticos en la alimentación, prebióticos e inmunoestimulantes que ayuden a reducir la susceptibilidad de peces a diversas enfermedades (Kiron, 2012). Así, Guzmán-Villanueva *et al.* (2014), trabajaron con  $\beta$ -1,3/1,6-glucano y la cepa *Shewanella putrefaciens* como probiótico en *S. aurata*, donde obtuvieron resultados de que éstos modulan la respuesta inmune y estimulan el crecimiento de *S. aurata*.

Las poliaminas, putrescina, espermidina y espermina son cationes orgánicas que están involucrados en muchos procesos celulares y juegan un rol importante en el control de respuesta inmune innata en vertebrados superiores, además son requeridos por animales no sólo para el crecimiento celular y diferenciación, sino también porque están presentes en varios pasos de síntesis de DNA, RNA y proteínas, y en la respuesta inflamatoria *in vitro* (Reyes-Becerril *et al.*, 2011b). *Debaryomyces hansenii* (CBS 8339) es una levadura marina productora de poliaminas capaz de adherirse al moco intestinal de peces (Tovar *et al.*, 2002; Tovar-Ramírez *et al.*, 2004) y contiene varios inmunoestimulantes como los  $\beta$ -glucanos (Santos *et al.*, 2004).

Reyes-Becerril *et al.* (2011b), estudiaron el efecto en leucocitos del riñón de *S. aurata*, donde encontraron una sobre-regulación de algunos genes relacionados a la respuesta inmune como *C3*, *MHCI*, *CD8*, *IgM* y *Hep* cuando los leucocitos se incubaron a altas concentraciones de poliaminas. Concluyeron que éstas están involucradas en la regulación de la expresión de mRNA de células innatas y humorales de la respuesta inmune. En el mismo año, Reyes-Becerril *et al.* (2011a), usaron a *D. hansenii* como probiótico y observaron sus efectos para contrarrestar la infección de *Mycteroperca rosacea* infectados con *Aeromonas hydrophila*; encontraron que la levadura mejoró el sistema inmune e incrementó la resistencia a la infección por *A. hydrophila*. Por tanto, *D. hansenii* mejora el rendimiento del crecimiento, el sistema inmune específico y antioxidante de

juveniles de *M. rosacea*, así como la regulación de la expresión de los genes codificantes para catalasa y proteína de choque térmico 70 (CAT y HSP70).

Tovar-Ramírez *et al.* (2010), encontraron que *D. hansenii* modula la actividad enzimática antioxidante y la expresión de genes en larvas *D. labrax*. Asimismo, seis años antes Tovar-Ramírez *et al.* (2004), habían encontrado que *D. hansenii* ayuda a minimizar el tiempo de maduración digestiva, donde incluye expresión de genes codificantes de enzimas digestivas y diferenciación celular. Y finalmente, Tovar *et al.* (2002), encontraron en el mismo organismo que también aumentaba la supervivencia, y estimulaba enzimas digestivas como amilasa y tripsina, sin embargo el crecimiento fue menor al control.

#### **2.1.10 Expresión de genes codificantes de enzimas digestivas y las hormonas CCK y NPY en larvas de *Lutjanus guttatus***

El estudio de la fisiología digestiva es un problema importante en especies introducidas en la acuicultura como *L. guttatus* (Moguel-Hernández *et al.*, 2016). El análisis de la actividad enzimática digestiva es un método bioquímico que puede proporcionar visión acerca de la fisiología digestiva en larvas de peces (Rønnestad *et al.*, 2013) y así conocer los cambios durante los estadios tempranos para la formulación de una dieta compuesta (Gisbert *et al.*, 2013). El conocimiento acerca de los niveles de expresión genética y patrones de producción de precursores de enzimas digestivas, constituye una herramienta complementaria para la información nutricional de un organismo (Moguel-Hernández *et al.*, 2016) y su fisiología (Galaviz *et al.*, 2012). Por otra parte, CCK en conjunto con NPY y grelina son factores importantes en la regulación de las funciones gastrointestinales (Furutani *et al.*, 2012; Ji *et al.*, 2015).

Ji *et al.* (2015), trabajaron con adultos *Megalobrama amblycephala* en la medición de expresión de grelina, CCK y NPY en cambios alimentación-inanición. Así, encontraron altos niveles de grelina en el intestino grueso, NPY en el hipotálamo y CCK en la pituitaria. En el reto Grelina y NPY incrementan su expresión en

intestino y cerebro después de la inanición, mientras que en CCK hay decremento. Por tanto, indican que esto demuestra el comportamiento en la alimentación y como se regula a un nivel molecular. Asimismo, Yuan *et al.* (2014), trabajaron de la misma manera en *Schizothorax prenanti*, donde obtuvieron un comportamiento similar en CCK en conjunto con leptina.

Moguel-Hernández *et al.* (2016), estudiaron los genes codificantes de enzimas digestivas (tripsinógeno, quimotripsinógeno,  $\alpha$ -amilasa, lipasa, fosfolipasa A y pepsinógeno) y de las hormonas CCK y NPY durante el desarrollo larvario de *L. guttatus* y los efectos en el destete. Los resultados muestran que al eclosionar están presentes los transcritos de las enzimas digestivas, NPY y CCK, excepto pepsinógeno. Asimismo, la expresión de todas las enzimas fue baja durante el estadio vitelino. Sin embargo, en la primera alimentación exógena, los niveles aumentaron. Por otra parte, al realizarse el destete encontraron un aumento de expresión relativa significativo en todas las enzimas, mientras quimotripsinógeno II y lipasa fueron estables. Al final, las expresiones mostraron niveles similares, lo que sugieren que las larvas pueden adaptar su capacidad digestiva a la microdieta. Al respecto, Galaviz *et al.* (2012), trabajaron con larvas de *L. guttatus* desde eclosionar hasta 40 DDE, donde encontraron que la expresión de tripsinógeno y la actividad de tripsina, se presentan a partir de la eclosión e incrementa de acuerdo al desarrollo y los cambios en el tipo de alimento. Asimismo, obtuvieron una máxima expresión de tripsinógeno en el 25 DDE, cuando se alimentó con nauplios de *Artemia*. Por otra parte, la expresión de pepsinógeno se detectó en 18 DDE, dos días antes la actividad y la aparición de glándulas gástricas.

Furutami *et al.* (2012), trabajaron con la expresión de los niveles de mRNA codificantes para CCK y enzimas digestivas en adultos de *Seriola quinqueradiata*, donde encontraron que en altas concentraciones de harina de pescado (origen de las proteínas) es más potente la estimulación de la síntesis de CCK y la secreción de enzimas digestivas.

### 3. JUSTIFICACIÓN

En muchas especies de peces marinos, el principal obstáculo para la obtención masiva de juveniles, se presenta durante el periodo larvario, se producen altas mortandades por diversos factores como el desconocimiento de los requerimientos nutricionales de la especie así como por las deficiencias y limitantes de su anatomía y fisiología digestiva para completar el proceso digestivo, desde la captura del alimento, digestión y absorción.

El cultivo de *L. guttatus* representa una alternativa muy viable para detonar el aprovechamiento y explotación de peces marinos, ya que su ciclo se ha cerrado (Alvarez-Lajonchère, 2011; Alvarez-Lajonchère e Ibarra-Castro, 2011; Alvarez-Lajonchère *et al.*, 2011a; Alvarez-Lajonchère *et al.*, 2011b) y actualmente ha mostrado ser un rendimiento favorable para inversionistas. Posee un buen valor en mercado, así como un buen alimento nutricional. Sin embargo, a pesar de las investigaciones que se han realizado, desde su fisiología digestiva a nivel enzimático hasta molecular, así como el control hormonal, es necesario el diseño de alimentos formulados y técnicas que se adecuen y permitan a la larva su consumo para un mejor desarrollo, supervivencia y en futuro obtener un gran número de juveniles y adultos. Además, esto permitirá reducir gastos de producción, que generalmente son los que limitan el desarrollo de cultivos a nivel masivo. Por tanto, el presente trabajo permitirá conocer aspectos de la fisiología digestiva, en función de las dietas administradas y la respuesta hormonal de CCK y NPY hacia diferentes inductores del estímulo alimenticio. De tal manera que se contribuya a comprender la evolución del proceso digestivo en los primeros días del desarrollo larvario y proporcionar una alimentación más adecuada durante su ontogenia temprana. Así, tratar de proporcionar información para el mejoramiento del cultivo de *L. guttatus*.

## 4. HIPÓTESIS

### 4.1 Pregunta

La presencia de hidrolizados solubles de pescado (CPSP G, Apligen) y de la levadura marina *Debaryomyces hansenii* (CBS 8339), incorporada a través del rotífero *Brachionus rotundiformis* (cepa SS), promueven una mayor velocidad en la maduración digestiva en larvas de *Lutjanus guttatus*.

### 4.2 Hipótesis

1. Si la secreción de hormonas digestivas es estimulada por la presencia de proteínas, péptidos cortos, aminoácidos libres y ácidos grasos, y éstas promueven la liberación de enzimas digestivas, entonces, la administración de hidrolizados solubles de pescado (di-péptidos, tri-péptidos, aminoácidos libres), promoverán un aumento en la expresión de genes relacionados a la digestión, y consecuentemente promoverán la velocidad de la maduración digestiva de larvas de *Lutjanus guttatus*, evidenciada a nivel de expresión de genes relacionados a la digestión.
2. Si la administración de *Debaryomyces hansenii* (CBS 8339) como probiótico, estimula la proliferación y diferenciación celular por efecto de la liberación de poliaminas *in situ*, entonces, éste promoverá una mayor velocidad en la maduración del tracto digestivo de larvas de *Lutjanus guttatus*, evidenciada a nivel de expresión de genes relacionados a la digestión.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo general

Conocer el efecto de la incorporación de hidrolizados solubles de pescado (CPSP G, Apligen) y levadura *Debaryomyces hansenii* (CBS 8339) incorporada a rotíferos (*Brachionus rotundiformis*) de cepa SS, sobre la maduración digestiva en larvas de *Lutjanus guttatus*.

#### 5.1.1 Objetivos particulares

1. Conocer el efecto de la incorporación de hidrolizados solubles de pescado (CPSP G, Apligen) y levadura *Debaryomyces hansenii* (CBS 8339) incorporada a rotíferos (*Brachionus rotundiformis*) de cepa SS, sobre la supervivencia y crecimiento de *Lutjanus guttatus*.
2. Cuantificar la expresión de los genes codificantes para las principales enzimas digestivas amilasa, lipasa, quimotripsinógeno y tripsina en huevos y larvas de *Lutjanus guttatus* alimentados con hidrolizados CPSP G, levaduras y dieta control.
3. Cuantificar la expresión de los genes codificantes para las hormonas Colecistoquinina (CCK) y Neuropeptido Y (NPY) en huevos y larvas de *Lutjanus guttatus*, alimentados con hidrolizados CPSP G, levaduras y dieta control.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Metodología del objetivo particular 1

#### 6.1.1 Cultivo larvario experimental

El experimento se realizó en el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A. C. (CIAD) Unidad Mazatlán en el área de experimentación larval.

#### 6.1.2 Cultivos control, inanición y tratamientos

Los cultivos larvarios utilizados por triplicado, fueron para control, inanición y dos tratamientos.

En cultivos control, se agregó rotíferos enriquecidos (descripción en Preparación de alimento vivo para controles y tratamientos) y en inanición ningún alimento.

En el primer tratamiento se adicionó levaduras marinas *D. hansenii* (CBS 8339) mediante rotíferos (*B. rotundiformis*) de cepa SS y el segundo hidrolizados CPSP G (Apligen S. A. de C. V., México) sobre la superficie del agua.

#### 6.1.3 Preparación de alimento vivo para controles y tratamientos

Los rotíferos *B. rotundiformis* de cepa SS (Velasco-Blanco *et al.*, 2011), proporcionados por el CIAD Unidad Mazatlán, fueron enriquecidos según el protocolo establecido, con DHA protein Selco (Inve aquaculture) a razón de 25 gr por 50 millones y Vitamina C (Argent Chemical laboratorios Inc.) 2 gr por 100 millones, 6 horas antes de la alimentación larvaria. Para ello, se mezclaron uniformemente las dos sustancias en 100 mL de agua dulce y la mezcla se agregó al contenedor del alimento vivo.

Las levaduras utilizadas para el re-enriquecimiento de rotíferos, fueron donadas por el Dr. Dariel Tovar Ramírez del Laboratorio de Fisiología Comparada y Genómica Funcional del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S. C. (CIBNOR). Se utilizaron a razón de 1 gr de levadura ( $10^6$  unidades formadoras de

colonia (UFC) (Tovar *et al.*, 2004) para 1 millón de rotíferos. Esto, consistió en depositar en un matraz de 1 L la cantidad requerida del alimento vivo enriquecido, el probiótico y una manguera con entrada de aire, y se mantuvieron en estas condiciones por 15 minutos. Por consiguiente, fueron depositados cuidadosamente en el tanque del tratamiento.

En el segundo tratamiento, se calculó, pesó y adicionó cuidadosamente 0.3 gr de hidrolizados por tanque cada 24 horas, basado en los estudios realizados por Kotzamanis *et al.* (2007), y Delcroix *et al.* (2014), con CPSP G (Apligen S. A. de C. V., México).

#### 6.1.4 Parámetros de calidad del agua en cultivos

Los parámetros de calidad del agua (Tabla VII) fueron medidos cada 4 horas mediante equipos calibrados y cada uno por triplicado. La concentración y saturación del oxígeno, permanecieron estables con un concentrador (ABS Technology Inside Millennium Mio Respironics) controlado. En el tratamiento con hidrolizados se aplicó ClorAm-X AquaScience para estabilizar el nivel de amonio.

**Tabla VII.** Equipos utilizados y parámetros obtenidos a lo largo de los cultivos larvarios.

EQUIPO UTILIZADO	PARÁMETRO	RESULTADO
Oxímetro (HACH HQ30D Flex)	Temperatura °C	26-22 °C
Oxímetro (HACH HQ30D Flex)	[Oxígeno]	6.0±0.5 mg/L
Oxímetro (HACH HQ30D Flex)	% Oxígeno saturado	90±5%
Oxímetro (HACH HQ30D Flex)	Salinidad	35 ‰
Luxómetro (HANNA HI 97500)	Intensidad luminosa	1,750±250 lux
Kit de amonio (LaMotte ammonia-nitrogen kit code 3304-01)	[NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ] Amonio	0.1±0.05 ppm
Potenciómetro (EcoSense pH 100)	pH	7.97±0.4

#### 6.1.5 Cuento de rotíferos en tanque

Los muestreos de rotíferos se hicieron con 20 mL de diferentes áreas de cada tanque. Por consiguiente, se colocaron en placas horizontales, se observaron

mediante un estereoscopio (Olympus SZ61) y se contaron con un contador manual.

### 6.1.6 Diseño del cultivo larvario

Los 12 tanques de fibra de vidrio utilizados, fueron de 600 L con pintura blanca epóxica aducto amínico (Prisa Pinturas Primetal EA K-4300 Blanco) en fondo y desinfectados con yodo-cloro, 12 horas antes de su uso. Se colocaron en dos filas de seis (Fig. 12) y la ubicación aleatoria de cada cultivo (control, levadura, hidrolizado e inanición) por triplicado. En el centro de cada uno, se colocó un tubo PVC con filtro de 100  $\mu\text{m}$  y en el interior piedras porosas para la entrada de aire. El agua de abastecimiento directo del mar, se filtró mediante un equipo de filtración de arena (Jacuzzi Laser Sand Filter 225L-S15LR6-HK6) con filtros (FSI Filter Specialist Inc. X-100) de 25  $\mu\text{m}$ , 5  $\mu\text{m}$  y 1 $\mu\text{m}$ , y un equipo UV (Smart UV Sterilizer model 02025).



**Figura 12.** Disposición de los 12 tanques de 600 L para el cultivo larvario.

### 6.1.7 Siembra y desarrollo del cultivo larvario

En la siembra se utilizaron huevos obtenidos de desoves naturales de peces reproductores de la planta piloto, durante el mes de noviembre del 2014. Para realizar el cultivo desde el sembrado, se siguió el protocolo establecido por el CIAD Unidad Mazatlán.

Brevemente, se llenaron los tanques con agua del mar a 200 L, en cada tratamiento se añadió un volumen de 30 mL de huevos flotantes con probeta graduada, para obtener una concentración aproximada de 2,000 individuos mL<sup>-1</sup>. Para ser adicionados, los cambios de temperatura se evitaron entre el agua del recipiente de origen del desove y el de siembra. No se aplicó aireación y se cubrieron con plástico negro. Al eclosionar las larvas, se ascendió a 300 L para obtener una cantidad de 200 individuos L<sup>-1</sup>. Se siguió con la ausencia de flujo de agua, aireación y luz hasta las 48 HDE. Para el seguimiento del desarrollo larvario, se recolectaron muestras de cada tanque y se observaron al microscopio a 4X.

La pasta (Instant Algae Nanno 3600) de *Nannochloropsis oculata* e *Isochrysis galbana* fue utilizada para obtener agua verde, se empleó a partir de las 48 HDE con un volumen de 2 mL por tanque, mientras que a las 72, 96 y 120 HDE se incrementó a 5 mL. Asimismo, se administró dos veces diariamente cada 12 horas. Por otra parte, la iluminación fue colocada a partir de las 48 HDE por 24 horas, mediante lámparas Led (PAR38-LED 19W TECPZA) hasta finalizar el cultivo a las 144 HDE.

La alimentación con rotíferos se efectuó en todos los cultivos (control, levaduras e hidrolizados) a partir de las 48 HDE, dos veces por día, cada 12 horas y hasta las 144 HDE. Asimismo, fueron adicionados con una concentración ascendente (Tabla VIII) y controlados mediante su conteo remanente por tanque. Sin embargo, el tratamiento de hidrolizados, fue el único que recibió el aditivo (CPSP G) a las 0 y 24 HDE hasta reincorporarse junto al resto a las 48 HDE.

**Tabla VIII.** Concentración de rotíferos que se mantuvo en cultivos larvarios por día.

HDE	CONCENTRACIÓN DE ROTÍFEROS
48	2 ind/mL
72	5 ind/mL
96, 120, 144	10 ind/mL

### 6.1.8 Calidad de huevos y larvas

La observación de la calidad de huevos se efectuó con 100 unidades mediante microscopio, probetas graduadas y matraces; se midió diámetro de huevo (DH), diámetro de gota lipídica (DGL), porcentaje de fertilización (%F), huevos flotantes (HF), huevos no flotantes (HNF) y huevos totales (HT). Asimismo, a 100 larvas recién eclosionadas se les midió el volumen de saco vitelino (VSV), DGL y longitud total (LTL).

Ecuación para VSV:

$$\text{VSV (mm)} = (\pi / 6) \times (\text{LH}^2) \quad (1)$$

Por otra parte, el porcentaje de eclosión (%E) y supervivencia a las 24 y 48 HDE, se realizó mediante 4 placas con 48 pozos, donde, se colocó un huevo por espacio y se observaron al estereoscopio. La incubación se efectuó a temperatura ambiente.

$$\%E = (\text{N}^{\circ} \text{larvas eclosionadas} / \text{N}^{\circ} \text{huevos totales}) \times 100 \quad (2)$$

$$\% \text{ Supervivencia 24 HDE} = (\text{N}^{\circ} \text{larvas 24 HDE} / \text{N}^{\circ} \text{larvas al inicio}) \times 100 \quad (3)$$

$$\% \text{ Supervivencia 48 HDE} = (\text{N}^{\circ} \text{larvas 48 HDE} / \text{N}^{\circ} \text{larvas al inicio}) \times 100 \quad (4)$$

### 6.1.9 Muestreos de los cultivos

Los muestreos se realizaron diariamente desde huevo a individuos del día 4 después de la eclosión (DDE) y 6 horas antes de la primera alimentación. Las larvas se recolectaron en tubos Eppendorf y se contaron de la misma forma que

los rotíferos. Sin embargo, sólo los análisis de expresión génica y la tasa de crecimiento absoluta (TCA) fueron desarrollados en el presente trabajo.

#### **6.1.10 Tasa de crecimiento absoluta**

La tasa de crecimiento absoluta se realizó con larvas del día 1 y 4 en cada tanque. Para ello, durante los muestreos se recolectaron 15 individuos por cultivo, se observaron mediante microscopio integrado con cámara y se midieron con el programa Motic Images Plus 2.0 ML. La ecuación utilizada:

$$TCA = ((\ln \text{ longitud final} - \ln \text{ longitud inicial}) / (\text{tiempo final} - \text{tiempo inicial})) \times 100 \quad (5)$$

Los análisis estadísticos se realizaron en Microsoft Excel 2007, donde, se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) de un factor, para determinar si hay diferencia significativa entre los tratamientos y una prueba de TUKEY para verificar entre cuáles.

#### **6.1.11 Supervivencia**

Se observaron los tanques y se tomaron muestras de diversas áreas con vaso de precipitado y sifoneo. Asimismo, fueron analizados en el microscopio.

### **6.2 Metodología de los objetivos particulares 2 y 3**

#### **6.2.1 Extracción de RNA total**

La extracción de RNA total, se efectuó por el método del reactivo de TRIzol Reagent (Thermo Fisher Scientific, USA). Para ello, se colocó a temperatura ambiente y se tomaron 100 mg de cada una de las 25 muestras (huevos y larvas del 1 y 4 DDE) previamente conservadas en RNA *later*® (Thermo Fisher Scientific, USA) de cada tanque de tratamiento. El proceso se dividió en 5 partes, la homogenización, la fase de separación, la precipitación del RNA, el lavado y la re-suspensión.

La homogenización, se efectuó en tubos Eppendorf, donde, se agregaron las muestras de 100 mg, se adicionó 1 mL del reactivo de Trizol y se maceró con pistilos de teflón previamente esterilizados. Por consiguiente, se incubó 5 minutos a temperatura ambiente y se prosiguió con la fase de separación.

Durante la fase de separación, se agregó 0.2 mL de cloroformo, se mezcló manualmente por 15 segundos y se incubó 3 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se centrifugó a 12,000 g por 15 minutos y se recuperó la fase acuosa en un nuevo tubo, que corresponde a la superior de las tres fases obtenidas (se evitó la contaminación de la fase intermedia).

La precipitación del RNA, se efectuó con 0.5 mL de alcohol isopropílico, se agitó manualmente, se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente y por 12 horas a 4°C. Por consiguiente, se centrifugó por 10 minutos a 12,000 g a 4°C y se desechó el sobrenadante cuidadosamente sin perder el pellet precipitado.

El lavado del RNA, se llevó a cabo con 1 mL de etanol al 75% (con agua DEPC), se agitó en vortex a la mitad de su intensidad máxima y se centrifugó a 7,500 g por 5 minutos a 4°C. Por consiguiente, se retiró el sobrenadante y los residuos se secaron en campana de extracción.

Para la re-suspensión del RNA, se adicionó 50 mL de agua DEPC, se mezcló manualmente, y se calentó a 55°C. Por consiguiente, se realizó una electroforésis de gel de agarosa al 1.5% para verificar la integridad del RNA y se prosiguió con el tratamiento con RQ1 DNase (Promega, USA).

### **6.2.2 Electroforésis de gel de agarosa**

Los geles de agarosa para electroforésis se hicieron al 1.5%. Para ello, en un matraz de vidrio de 100 mL, se agregó 50 mL de buffer TAE 1X y 0.75 gr de agarosa. Por consiguiente, se calentó en un microondas por 2 intervalos de 30 segundos, se adicionó 5 µL de fluoróforo Syber Safe (Thermo Fisher Scientific, USA) y se mezcló cuidadosamente. El líquido se vertió en molde y se colocó el

peine para pozos de muestra hasta su solidificación. La cámara de electroforesis Enduro, Gel XL (Labnet, USA) se armó, se introdujo el gel y se llenó con buffer TAE 1X hasta taparlo completamente.

Se tomó 1  $\mu$ L de muestras y marcador de peso molecular (Thermo Fisher Scientific, USA) de 50 pares de bases (bp), se mezclaron con 1  $\mu$ L de buffer BlueJuice (Thermo Fisher Scientific, USA), se adicionaron a los pozos y se procesó la muestra a 80 Volts por 50 minutos. Por consiguiente, se observaron al transiluminador Gel Doc Imaging System (Biorad, USA).

### **6.2.3 Tratamiento con DNase**

El tratamiento con DNase, se efectuó mediante el Kit RQ1 RNase-Free DNase Promega, bajo las indicaciones del fabricante. Para ello, se adicionó por cada 1  $\mu$ g de RNA en agua DEPC, 1  $\mu$ L de RQ1 RNase-Free DNase 10X reaction buffer, 1  $\mu$ L de RQ1 RNase-Free DNase y se incubó a 37°C por 30 minutos. Por consiguiente, se adicionó 1  $\mu$ L de RQ1 DNase Stop Solution, se incubó a 65°C por 10 minutos y se prosiguió a la cuantificación.

La cuantificación de la concentración y pureza del RNA se verificó con 1  $\mu$ L de cada muestra mediante Nanodrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific). Por consiguiente, se resguardaron a -80°C.

### **6.2.4 Síntesis de cDNA**

Las 25 muestras de RNA tratadas con DNase, antes de procesarse, se descongelaron en hielo. La síntesis de cDNA se realizó mediante el Kit IMPROM II (Promega) Cat#A3802 bajo las indicaciones del fabricante. Para ello, se mezcló por muestra, 5  $\mu$ L de RNA (0.5  $\mu$ g) con 1  $\mu$ L de oligo dT, se incubó a 70°C por 10 minutos y se colocó en hielo. Por consiguiente, se adicionaron 14  $\mu$ L del Master Mix (Tabla IX).

**Tabla IX.** Componentes del Master Mix para síntesis de cDNA.

<b>SUSTANCIA</b>	<b>CANTIDAD (μL)</b>
Agua DEPC	5.3
5X buffer Improm II	4.0
25 mM MgCl <sub>2</sub>	2.4
10 mM dNTP's	1.0
RNAsin	0.5
Improm II	0.8

Posteriormente, se colocó en un termociclador Thermal cycler T100 (BIORAD) para su incubación a las diferentes temperaturas (Tabla X), se aplicó centrifugación rápida y se almacenaron a -20°C.

**Tabla X.** Protocolo de temperaturas ordenadas dentro del programa del termociclador.

<b>TEMPERATURA</b>	<b>TIEMPO (MINUTOS)</b>
(1) 25°C	10
(2) 45°C	60
(3) 90°C	5

### 6.2.5 Diseño, validación y síntesis de *primers* degenerados de CCK

Para el diseño de *primers* degenerados para el gen codificante de CCK de *L. guttatus*, se tomaron secuencias de *Pseudopleuronectes americanus* y *Paralichthys olivaceus* con acceso EU684055 y AB009281 respectivamente de la base de datos de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), se realizó un alineamiento y se tomaron los fragmentos más conservados. Por consiguiente, se ingresó la secuencia a *Primer3* versión 4.0 en <http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>, donde, se acotó las características del tamaño 18 a 22 bp, amplicón no mayor a 400 bp, T<sub>m</sub> 50°C a 60°C y porcentaje de GC 45% a 60%.

Para su validación, se ingresaron los *primers* en el programa *Oligo Calc* con el acceso <http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>. Los oligos obtenidos, se enviaron para sintetizar en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Autónoma de México (I. B. T. de la UNAM).

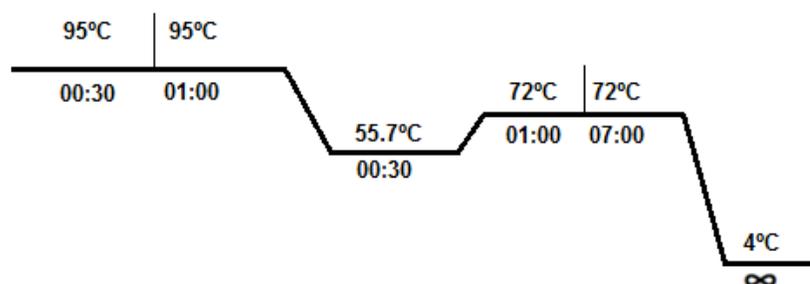
### 6.2.6 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR), electroforésis y purificación de bandas.

La PCR se realizó con un pool de los cDNA's de las 25 muestras con los *primers* de CCK, para ello, se preparó el Mix de reacción (Tabla XI) en tubos Eppendorf de 500  $\mu$ L, en una estación de trabajo UV PCR Workstation (UVP).

**Tabla XI.** Mix para PCR de punto final.

MEZCLA DE REACCIÓN	CANTIDAD ( $\mu$ L)
MgCl <sub>2</sub> 50 mM	1.5
cDNA	1.2
Taq Polimerasa	0.4
dNTP's 10 mM	1.0
Buffer MgCl <sub>2</sub> 10X	5.0
<i>Primer</i> F 100 pmol	1.0
<i>Primer</i> R 100 pmol	1.0
H <sub>2</sub> O Mili Q	38.9

El Mix se dividió en dos tubos de 500  $\mu$ L y se procesaron en el termociclador con el protocolo de la figura 13.



**Figura 13.** Protocolo establecido en el programa del termociclador para *primers* de CCK.

Posteriormente, se realizó una electroforésis en gel de agarosa al 1.5% y a 80 Volts. La banda obtenida, se cortó y se purificó mediante el GeneClean Spin Kit (BIO 101, ref. 1101-200) bajo las indicaciones del fabricante. Para ello, se agregó 400  $\mu$ L de GC Spin Glassmilk al tubo eppendorf con la banda cortada, se calentó 5

minutos a 55°C hasta derretir y se agitó cuidadosamente cada minuto. La solución se agregó al Spin Filter contenido en el kit, se centrifugó 1 minuto a 14,000 g a temperatura ambiente y se desechó el fluido. Por consiguiente, se adicionó 500 µL de GC Spin New Wash y se centrifugó por 3 minutos. Posteriormente, se cambió la columna a un nuevo tubo de fondo reducido contenido en el kit, se agregó 15 µL de GC Spin Elution, se agitó en vortex por 3 segundos a intensidad media de la máxima y se centrifugó por 30 segundos. La solución obtenida se resguardó en refrigeración a 4°C.

### **6.2.7 Preparación de medio Luria-Bertani (LB) para clonación**

Para medio LB líquido, se agregó en 1 L de agua destilada, 20 gr de LB Broth Base (SIGMA L3022), se colocó en autoclave por 20 minutos a 15 PSI y se enfrió en baño maría a 55°C. Durante el enfriamiento se adicionó 500 µL de ampicilina (SIGMA A0166) a una concentración de 100 mg/ mL, por consiguiente, se selló con papel parafilm (Senna) y conservó a 4°C.

Para medio LB sólido, se agregó 20 gr de LB Broth Base y 15 gr de agar (SIGMA A5054) en 1 L de agua destilada, se colocó en autoclave por 20 minutos a 15 PSI y se enfrió a baño maría a 55°C. Durante el enfriamiento se adicionó 500 µL de ampicilina a una concentración de 100 mg/ mL. Por consiguiente, se adicionaron a cajas petri (20 mL) y se dejaron solidificar.

Para hacer selectivo el medio sólido, se adicionó 40 µL de X-Gal (BIO 101 4063-102) a una concentración de 40 mg/ mL en cada caja petri, se esparció y se dejó secar por 20 minutos. Por consiguiente, se agregó 40 µL de IPTG (SIGMA 16758) a 100 mM y se resguardaron a 4°C hasta su uso.

### **6.2.8 Clonación**

La clonación se llevó a cabo por TOPO TA Cloning Kit (Thermo Fisher Scientific, USA) bajo las indicaciones del fabricante en 4 partes, preparación de medios y células, clonación, transformación y el análisis de clonas.

La preparación de medios y células, consistió en mantener a temperatura ambiente el medio SOC incluido en el kit y a 37°C las cajas con medio LB sólido, y descongelar sobre hielo las células competentes One Shot de un vial.

Para la clonación, se preparó una solución en un tubo de 500 µL, con 3 µL del producto reciente de PCR de CCK, 1 µL de H<sub>2</sub>O Mili Q, 1 µL del TOPO-Vector y 1 µL de salt incluida en el kit. Por consiguiente, se mezcló cuidadosamente, se reposó por 5 minutos a temperatura ambiente, y se colocó en hielo.

La transformación se realizó en el vial de células, donde, se adicionó 2 µL de la solución de clonación, se mezcló con la punta de la pipeta en círculos cuidadosamente, y se dejó en hielo por 30 minutos. Por consiguiente, se pasó a 42°C por 30 segundos, y rápidamente a hielo por 2 minutos. El medio SOC que se mantuvo a temperatura ambiente, se agregó en un volumen de 200 µL, se selló con papel parafilm y se dejó en agitación por 60 minutos a 37°C. Posteriormente, se vertió 100 µL a cada caja petri previamente calentada y se dejó a la misma temperatura por 12 horas.

El análisis de clonas se efectuó mediante una PCR de colonia positiva (blancas); el protocolo varió en el inicio a 95°C por 10 minutos y la temperatura de alineamiento (T<sub>m</sub>) a 55°C de los *primers* m13. Por consiguiente, se hizo una electroforesis al 1.5% y se procesó a 80 Volts por 50 minutos. Al haberse verificado la presencia del plásmido esperado, se cultivó la colonia positiva en 2 mL de medio LB líquido (anteriormente descrito) y se incubó a 37°C por 12 horas a 60 rpm. Ahora bien, se procedió a la purificación de plásmidos.

### **6.2.9 Purificación de plásmidos**

La purificación se realizó mediante Miniprep RPM kit (BIO 101, ref. 2070-400). Para ello, los medios LB cultivados, se centrifugaron a 10,000 rpm por 60 segundos, se desechó el sobrenadante y se procedió al uso de los reactivos incluidos. Para re-suspender, se adicionó 50 µL de Pre-lysis buffer, se homogenizó

con la pipeta, se agregó 100  $\mu$ L de Alkaline lysis solution, se mezcló y se reposó por 1 minuto. Al aparecer clara la solución, se añadió 100  $\mu$ L de Neutralizing solution, se colocó en vortex por 5 segundos y se centrifugó por 2 minutos.

En el Catch tube se colocó un Spin filter, ambos incluidos en el kit, donde, se vertió 250  $\mu$ L de Glassmilk spin buffer, se agitó y se adicionó el sobrenadante obtenido de la centrifugación de la muestra. Se succionó y soltó de 2-3 veces para mezclar adecuadamente y se centrifugó por 1 minuto.

Para el lavado, el fluido obtenido se desechó y se agregó 350  $\mu$ L de Wash solution, se centrifugó por 1 minuto, se pasó el filtro a un nuevo tubo y se agregó 50  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O Mili Q. Ahora bien, se agitó en vortex a la mitad de su intensidad máxima, se reposó por 5 minutos y se inició una rápida centrifugación por 30 segundos para eluir el DNA. Se cuantificó, se conservó a 4°C y se enviaron a secuenciar a GeneWiz U. S. A.

#### **6.2.10 Análisis de secuencia de los fragmentos clonados**

La secuencia obtenida de CCK por GeneWiz U. S. A., se ingresó al programa BLAST para obtener secuencias homologas, y se dedujo su secuencia de aminoácidos en el sitio <https://www.expasy.org/>. Por consiguiente, se sometió a NCBI como secuencia de CCK de *L. guttatus*, donde se generó un número de acceso.

#### **6.2.11 Diseño, validación y síntesis de *primers* específicos de CCK**

Para obtener los *primers* específicos de CCK para *L. guttatus*, la secuencia obtenida de GeneWiz, se trabajó en el programa *Primer3* para obtener los oligos, donde, se acotó el tamaño 18 a 22 bp y un tamaño del fragmento codificante no mayor a 200 bp, una T<sub>m</sub> 55°C a 60°C y un porcentaje de GC 50% a 60%, se validaron en el *Oligo Calc* y se enviaron a sintetizar al IBT.

### 6.2.12 *Primers* específicos para PCR en tiempo real (qPCR)

Los *primers* específicos utilizados en el análisis de expresión en qPCR de genes codificantes para amilasa, lipasa, quimotripsinógeno, neuropéptido Y, así como el de referencia, factor de elongación 1 (EF1), fueron proporcionados por los estudios generados por Moguel-Hernández *et al.* (2016), y estandarizados para este trabajo. En el caso de tripsina y 18s ribosomal se obtuvieron del trabajo de Galaviz *et al.* (2012). Estos, se observan en la Tabla XII.

**Tabla XII.** Secuencia de *primers* para qPCR y tamaño de los amplicones para *L. guttatus*.

GEN/ NCBI ACCESO	DIRECCIÓN	SECUENCIA	TAMAÑO (bp)
α-Amilasa/ KJ908179	Sentido	CACTCTTCATGTGGAAGCTGGTTC	110
	Antisentido	CCATAGTTCTCAATGTTGCCACTGC	
Lipasa/ KJ908180	Sentido	AAGCTGGTGTCTGCCCTCTACG	190
	Antisentido	AGCCACATGTGCTCCCAGACTG	
Tripsina/ HM754476	Sentido	ATGAGCTCCACTGCTGACAGAAAC	156
	Antisentido	AGAGTCACCCTGGCAAGAGTCCTT	
Quimotripsina / KJ908183	Sentido	CTCACTGCCGCGTGTCTCCAAG	105
	Antisentido	GCCCTGGAAATGGACTTGACCTG	
Neuropéptido Y (NPY)/ KJ908185	Sentido	GTACTACTCAGCCCTGAGACAC	105
	Antisentido	CCTTCAACAGCAGCTCTGAGAC	
Factor de elongación Iα (EF1)/ KJ908186	Sentido	GCATGGTCGTCACCTTCGCTCC	150
	Antisentido	CCACGTATCCACGACGGATTTCC	
18S rDNA/ HM754479	Sentido	CTGAACTGGGGCCATGATTAAGAG	165
	Antisentido	GGTATCTGATCGTCGTCGAACCTC	

### 6.2.13 Curvas estándar para qPCR

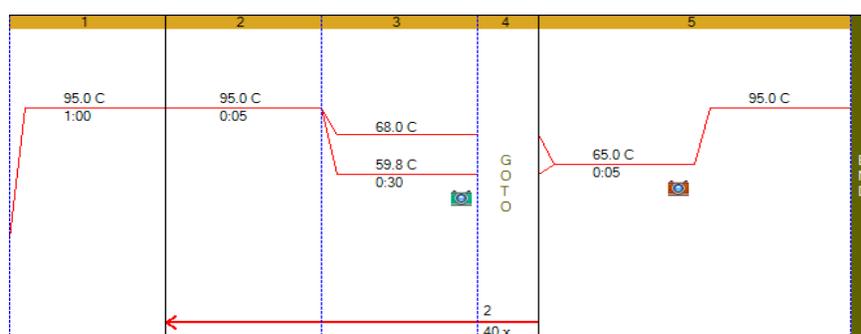
Para realizar las curvas estándar de cada gen, previamente se estandarizó el protocolo utilizado en cada par de *primers* a 100 pmol/ μL. Las 25 muestras de cDNA que se trabajaron, se les tomó 3 μL para realizar un pull y hacer diluciones 1:4, 1:16, 1:64 y 1:256. Además, se verificó y calculó el Mix de qPCR (Tabla XIII)

para cada reacción de 10  $\mu\text{L}$  y por cuadruplicado, sólo en el caso de CCK, se modificó la cantidad de cada *primer* a 0.04  $\mu\text{L}$  por reacción y los 0.05  $\mu\text{L}$  faltantes se abasteció con  $\text{H}_2\text{O}$  Mili Q. El reactivo, material, equipo y programa con el que se trabajó, fue el SsoAdvanced™ Syber® Green Supermix (BIORAD), placas de 96 pozos (BIORAD), termociclador CFX96™ Real-Time-System (BIORAD) y el programa para el análisis de las curvas fue el Bio-Rad CFX manager, respectivamente.

**Tabla XIII.** Mix de 10  $\mu\text{L}$  por reacción para qPCR.

SUSTANCIA	CANTIDAD ( $\mu\text{L}$ )
Sybr Green	5.0
cDNA	2.0
<i>Primer F</i>	0.1
<i>Primer R</i>	0.1
$\text{H}_2\text{O}$ Mili Q	2.8

Para hacer las curvas estándar, en una cámara estéril se preparó el Mix de qPCR, se hicieron 4 reacciones por gen-dilución, así como los controles No Template Control (NTC), se adicionó una reacción por cada pozo en placa, se selló cuidadosamente con el plástico adhesivo incluido, y se introdujo en el termociclador con el programa de la figura 14.



**Figura 14.** Programa utilizado en qPCR para curvas estándar.

El programa del termociclador, se usó para 40 ciclos, y la temperatura del paso 3 (la  $T_m$ ) varió para cada gen, 18s 57°C,  $\alpha$ -amilasa 68°C, CCK, lipasa y tripsina 60°C, EF1 58°C, y quimotripsinógeno y neuropéptido Y 64°C. Por último, las curvas estándar se analizaron en el programa del CFX manager V. 3. 1.

#### **6.2.14 Procesamiento de muestras mediante qPCR, análisis de expresión relativa y estadístico**

Después de conocer las condiciones adecuadas para procesar las muestras en qPCR, se calcularon y prepararon los Mix de cada gen, para hacer las reacciones por cuadruplicado de las 25 muestras.

Las muestras se trabajaron a diluciones de 1:4 para quimotripsinógeno y neuropéptido Y, y a 1:16 para el resto de genes. La concentración inicial de las muestras de cDNA fue de 0.5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ .

Después de analizar las curvas en el programa CFX manager, se realizó el análisis de expresión, mediante la función Gene Expression con  $\Delta\Delta\text{Cq}$ , normalizado a cero, para procesarse estadísticamente. Los genes de referencia utilizados, fueron EF1 y 18s.

Los resultados obtenidos, se analizaron de manera estadística con el análisis de ANOVA de una vía y con una prueba de Tukey en Microsoft Excel 2007. Se introdujo la expresión relativa de cada replica, ordenados por día huevo, día 1 y día 4. Asimismo, se aplicaron los dos análisis estadísticos por separado, para obtener si existe o no existe diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos por día y para tener conocimiento en que tratamiento se presentó.

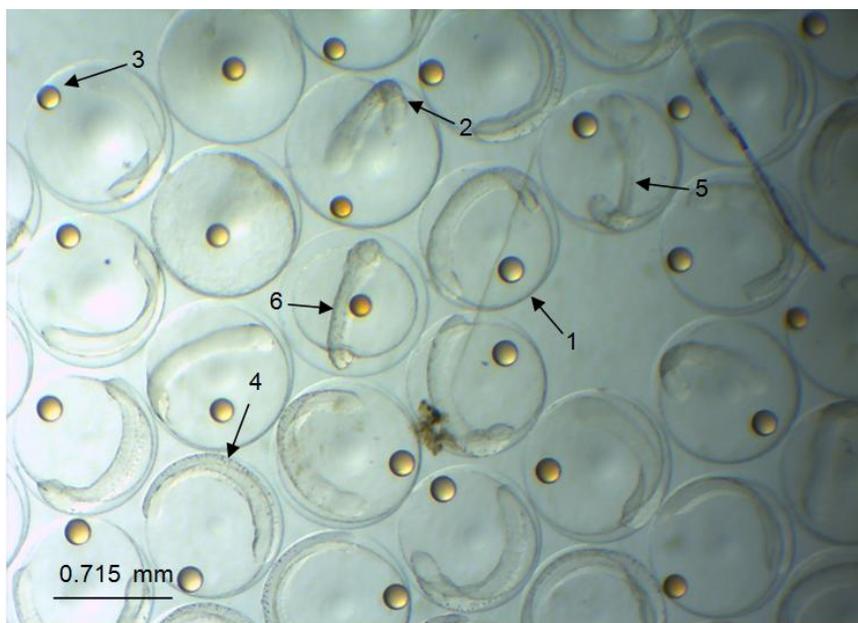
## 7. RESULTADOS

### 7.1 Resultados del objetivo particular 1

#### 7.1.1 Cultivo larvario experimental

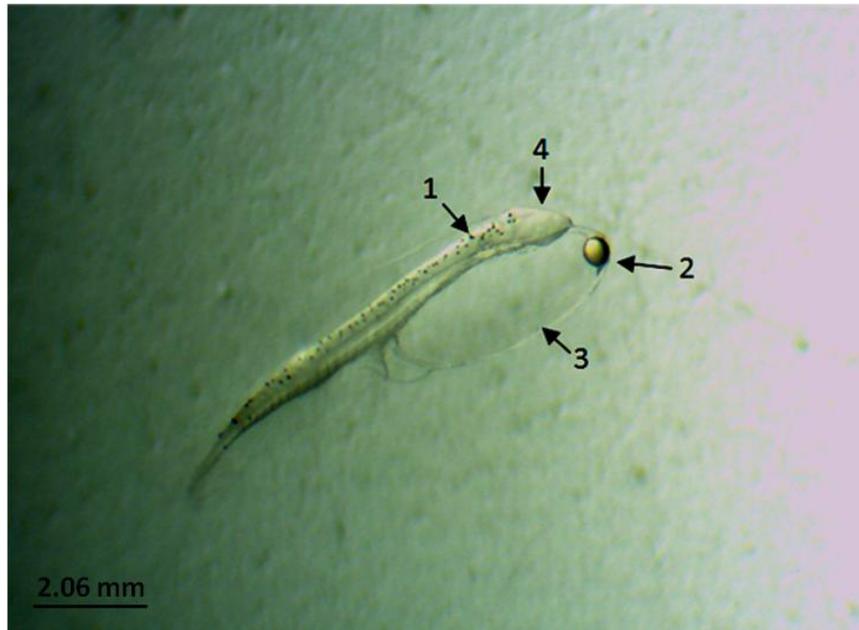
#### 7.1.2 Siembra y desarrollo del cultivo larvario

Parte de los huevos utilizados para la siembra se observan en la figura 15, en ellos se aprecia diferencias en cuanto estadio del desarrollo, algunos ya han cerrado su blastoporo. Asimismo, el embrión formado, la centralización de la gota lipídica, la pigmentación a causa de los cromatóforos, el tubo neural y los somitas (Cucchi *et al.*, 2011).



**Figura 15.** Huevos en el estadio para siembra, observados en microscopio a 4X. 1-blastoporo cerrado, 2-embrión formado, 3-centralización de gota lipídica, 4-cromatóforos, 5-tubo neural, 6-somitas.

La larva de 0.5 HDE (Fig. 16) observada, hace referencia al estadio temprano dentro del cultivo, se observa los pigmentos en el notocordio, la gota lipídica, saco vitelino y la falta de desarrollo visual.



**Figura 16.** Larva de 0.5 HDE observada en microscopio a 4X. 1-pigmentos, 2-gota lipídica, 3-saco vitelino, 4-área visual en desarrollo.

En la figura 17, se observan larvas de 19 HDE. En su estadio cuentan con la pigmentación del notocordio, la formación del ano, mayor desarrollo del área visual, formación de una aleta primaria, sin embargo, aún no tiene la apertura de la boca.



**Figura 17.** Larvas de 19 HDE observadas en microscopio a 4X. 1-pigmentación del notocordio, 2-formación del ano, 3-área visual en desarrollo, 4-aleta primaria.

Las larvas que se verificaron 37 HDE (Fig. 18) mostraron una gran diferencia en el consumo de nutrientes en el saco vitelino (gota lipídica y vitelo) y en la formación de órganos como el corazón, ojos, intestino y cartílago. Asimismo, la formación de la boca y las aletas mayormente diferenciadas.



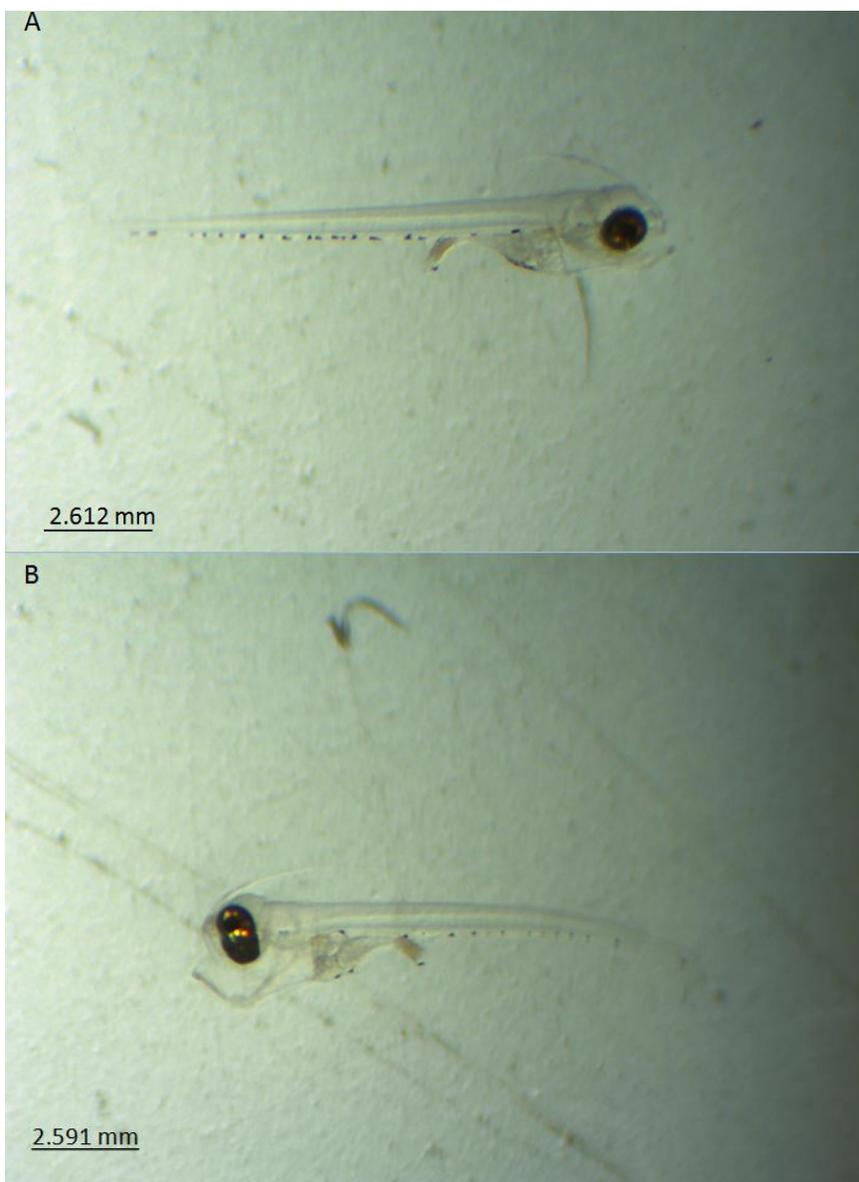
**Figura 18.** Larva de 37 HDE observada en microscopio a 4X.

Las larvas a las 72 HDE (Fig. 19) ya se observan con la pigmentación ocular y del cartilago, la boca abierta, diferenciación del ano e intestino, pero aún en fase de desarrollo. En este punto se observaron ya con consumo de alimento vivo y con un mejor sistema motriz.



**Figura 19.** Larva a las 72 HDE, observada en microscopio a 4X.

En larvas a las 96 HDE (Fig. 20) se observa el pigmento en cartílago y en ojos, en estos últimos se puede percibir la formación de conos oculares; el sistema digestivo más diferenciado y la cavidad anal. En este estadio ya fue posible observar un fuerte consumo de alimento vivo y longitudes entre 2.2 y 2.7 mm.



**Figura 20.** Larvas de 96 HDE, observadas en microscopio a 4X. A-larva de tratamiento de levaduras, B-larva de tratamiento de hidrolizados.

### 7.1.3 Calidad de huevos y larvas

Los parámetros para la calidad de huevos (Tabla XIV) mostraron alto porcentaje de fertilización, así como un gran número de huevos flotantes.

**Tabla XIV.** Parámetros de calidad de los huevos utilizados en los cultivos larvarios. DH y DGL en mm.

HT	HF	HNF	%F	DH	DGL
2,933,414	2,711,225	222,189	92.71%	0.715±0.013	0.117±0.010

Los parámetros de calidad de larvas (Tabla XV), obtenidos a partir de 100 organismos analizados individualmente, mostraron un DGL homogéneo y un LTL 2.063 mm con una desviación estándar de 0.132 mm.

**Tabla XV.** Parámetros de calidad de larvas en mm, VSV en mm<sup>3</sup>.

VSV	DGL	LTL
0.102±0.017	0.123±0.006	2.063±0.132

En las placas de 48 pozos cada una, se observó una supervivencia a las 24 y 48 horas en un bajo porcentaje (Tabla XVI).

**Tabla XVI.** Porcentajes de eclosión y supervivencia a las 24 y 48 horas en placas.

PLACAS	%E	24 HORAS (%)	48 HORAS (%)
1	63	35.7	35.7
2	72.92	57.9	57.9
3	78	44.1	44.1
4	87.23	45.5	45.5

#### 7.1.4 Tasa de crecimiento absoluta

Las TCA de los cultivos se observan en la Tabla XVII, donde se encontró diferencia significativa entre control, hidrolizados y levaduras confrontado a inanición.

**Tabla XVII.** TCA de los cultivos larvarios. Las diferentes letras indican diferencia significativa ( $P \leq 0.05$ ).

CONTROL	HIDROLIZADOS	LEVADURAS	INANICIÓN
0.1765±0.0200 <sup>a</sup>	0.1843±0.0248 <sup>a</sup>	0.1889±0.0166 <sup>a</sup>	0.0474±0.0392 <sup>b</sup>

### 7.1.5 Supervivencia

La supervivencia de las larvas de inanición finalizó durante los 5 DDE, mientras que en los cultivos control y tratamientos a los 7 DDE.

## 7.2 Resultados de los objetivos particulares 2 y 3

### 7.2.1 Diseño, validación y síntesis de *primers* degenerados de CCK

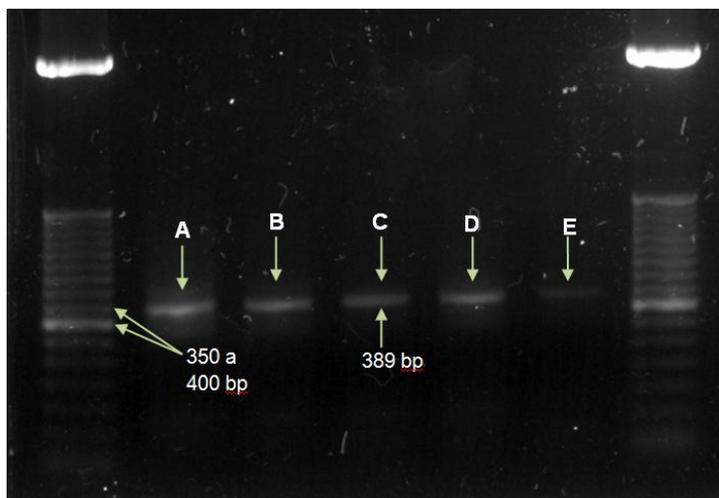
Los *primers* sentido y antisentido de CCK degenerados (Tabla XVIII) se obtuvieron con un porcentaje de GC de 35% y 66.7%, una Tm de 59.1°C y 59.38°C (55.7°C estandarizado) respectivamente, y un tamaño de codificación de 357 bp.

**Tabla XVIII.** *Primers* degenerados para CCK de *L. guttatus*

GEN	DIRECCIÓN	SECUENCIA	TAMAÑO (bp)
Colecistoquinina	Sentido	GCVGGSHTSTGYRYVTGTGT	20
	Antisentido	CYTCTGCRCTGCGGC	15

### 7.2.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR), electroforésis y purificación de bandas.

La electroforésis en gel de agarosa al 1.5%, se hizo en gradiente de 52°C a 57°C. En la escalera 50 bp se encontró la banda de CCK en el rango esperado de 350 a 400 bp, cuyo tamaño de amplicón fue de 389 bp (Fig. 21).

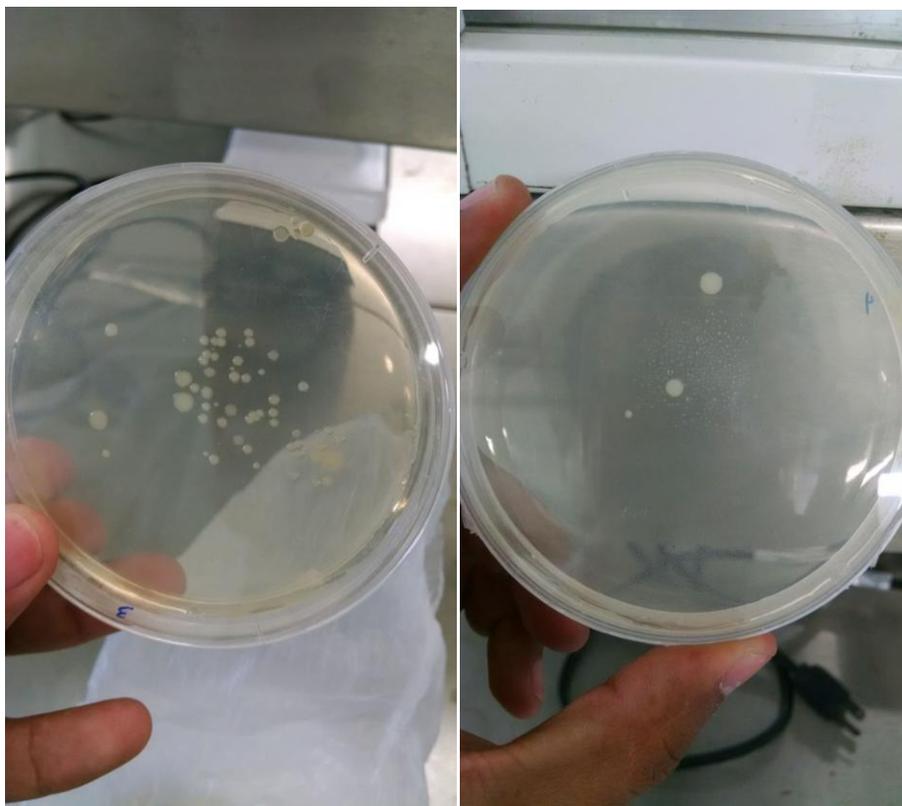


**Figura 21.** Bandas de CCK en electroforesis de gel de agarosa al 1.5% en gradiente de temperatura. A-52°C, B-54.3°C, C-55.7°C, D-56.8°C y E-57°C.

Las bandas obtenidas, se cortaron y purificaron; la de 55.7°C, cuya homogeneidad y cantidad no fue diferente al resto, aunque en número de amplicones fue limitado en mayor grado a sólo una. En 57°C, pareció una buena opción, sin embargo, fue muy tenue.

### 7.2.3 Clonación

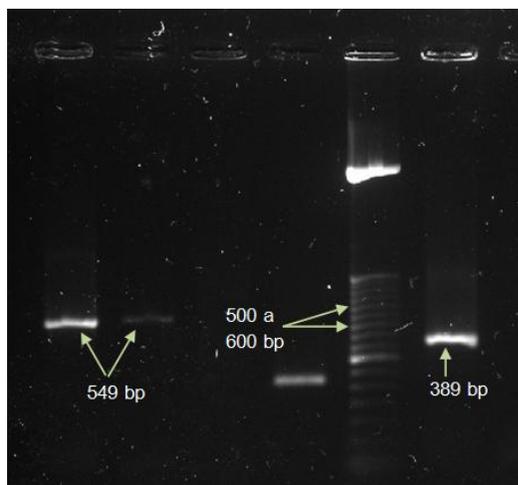
Durante la clonación, se sembraron 6 placas; se obtuvieron sólo dos con colonias blancas (Fig. 22) y posiblemente positivas, donde, el número de azules fue muy mínimo.



**Figura 22.** Placas 12 horas después de incubación.

Las colonias que se presentaron de color blanco, fueron utilizadas para amplificarlas por PCR con los *primers* m13 y CCK.

En la figura 23 se señala la banda de amplificación por los *primers* m13, estos poseen 160 bp y sumados a los 389 bp de CCK, están ubicados en el lugar que le corresponde en el rango de la escalera 500 y 600 bp. Asimismo, se observa la banda de CCK de 389 bp.



**Figura 23.** Gel de electroforésis con bandas del producto de PCR de colonias positivas con *primers* m13 (549) y CCK (389).

#### 7.2.4 Análisis de secuencia de los fragmentos clonados

El plásmido después de haber sido purificado y enviado a secuenciar, se recibió la secuencia, se analizó y cortó de 389 a 380 bp (Fig. 24) con respecto a los aminoácidos que codifica.

380 bp

```
TCTGTGTGTGTGTGTCGTGCTGGCAGTCCTGTGTACGAGCTGTTTGGGGCTCCCCCTTCTCCTC
CCAGCTCCTAGACGAGGGCCACCGCTCCCTCTCCGCTCCTTCTGAAGCTCTCCTCGAGGCGG
ACACCCACACCTTGGGAGAGCCTCACCTCCAACACCGCCGCTCTGCCCCCAGCTGAAGGCT
CTTCTCTGATTGAGGAGGATGCAGACTCCCGAGCCAACCTCAGCGAGCTGCTGGCAAGACT
CATCTCTCCAGGAAAGTTCTGTGCGCAGAACTCCACGGCAAACAGAGGCGCGGACTGA
GCACCAACCACCGGATAGCAGACAGGGACTACTTGGGGTGGATGGATTCGGCCGCCGCAGC
GCAGAGG
```

**Figura 24.** Secuencia de CCK de 380 bp.

La secuencia fue sometida a la página de información NCBI en GenBank y se generó el número de acceso KT692535 (Fig. 25).

**Lutjanus guttatus** cholecystokinin mRNA, partial cds

GenBank: KT692535.1

[FASTA](#) [Graphics](#)

[Go to:](#)

LOCUS KT692535 380 bp mRNA linear VRT 21-FEB-2016  
 DEFINITION *Lutjanus guttatus* cholecystokinin mRNA, partial cds.  
 ACCESSION KT692535  
 VERSION KT692535.1 GI:995922822  
 KEYWORDS  
 SOURCE *Lutjanus guttatus* (spotted rose snapper)  
 ORGANISM *Lutjanus guttatus*  
 Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;  
 Actinopterygii; Neopterygii; Teleostei; Neleleosteii;  
 Acanthomorpha; Eupercaria; Lutjanidae; Lutjanus.

REFERENCE 1 (bases 1 to 380)  
 AUTHORS Lucero Rivera, Y.E. and Tovar Ramirez, D.  
 TITLE The digestive enzyme ontogeny in *Lutjanus guttatus* larvae  
 JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 380)  
 AUTHORS Lucero Rivera, Y.E. and Tovar Ramirez, D.  
 TITLE Direct Submission  
 JOURNAL Submitted (31-AUG-2015) Fish Nutrition, Center for Biological Research of IM, Mar Bermejo 195, Col Playa Palo de Sta Rita, La Paz, BCS 23090, Mexico

FEATURES  
 Location/Qualifiers  
 source 1..380  
 /organism="Lutjanus guttatus"  
 /mol\_type="mRNA"  
 /db\_xref="taxon:855479"  
 <1..>380  
 /note="Hormone"  
 /codon\_start=2  
 /product="cholecystokinin"  
 /protein\_id="ABJ272862.1"  
 /db\_xref="GI:995922823"  
 /translation="LCVGVAVLCTSCLELPPSSQLDEHSLSHPSSEALLEATH  
 TLESPNQRHSAPKALPLIEEDSRHLSLLELRLSSKSGVRIKSTAIRGGS  
 LSTHRIADRDYLGMPFRSAAE"

ORIGIN  
 1 cctgtagtga tgtatcgtgc agcagctct gttgacagc tttttggac tccctcttc  
 61 cttccagctc ctgagcagag gccctcgttc cctctcgtc cttcttggag cttctcttga  
 121 ggcggcacc cacacctgg gtagcctca cttccaccac gccctctctg cccccagct  
 181 gaggctctt cctctgatt gtagagatc agactccga gccaccctca gccagctct  
 241 ggcagctc atctctcca ggcagcttc tggcgcga aactccagc caaacagag  
 301 cggcagctg agaccacc acggatgag agcagggac tcttggggt gtagattt  
 361 cggcgcctc agcgcagag  
 //

Customize view

Analyze this sequence

Run BLAST

Pick Primers

Highlight Sequence Features

Find in this Sequence

---

Related information

Protein

Taxonomy

---

Recent activity

Turn Off Clear

*Lutjanus guttatus* cholecystokinin mRNA, partial cds Nucleotide

*Lutjanus guttatus* (2812) Nucleotide

Ontogeny changes and weaning effects in gene expression patterns of digestiv PubMed

*Lutjanus guttatus* AND CCK (1) PubMed

*Lutjanus guttatus* AND (alive(prop)) (37) Gene

See more...

Figura 25. Información de la secuencia sometida de CCK en GenBank.

Asimismo, se realizó un BLAST en NCBI, para encontrar la homología con otros organismos (Fig. 26).

Sequences producing significant alignments:

Select: **All** None Selected: 0

[Alignments](#) [Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#)

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Sciaenops ocellatus cholecystokinin mRNA, complete cds</a>	566	566	100%	1e-157	93%	<a href="#">EU598150.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Larimichthys crocea cholecystokinin-like (LOC104931806). mRNA</a>	527	527	99%	7e-146	92%	<a href="#">NM_001303388.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Diplodus sargus cholecystokinin 1 mRNA, complete cds</a>	523	523	97%	8e-145	92%	<a href="#">JN210578.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">PREDICTED: Neolamprolopus brichardi cholecystokinin-like (LOC102780045). mRNA</a>	508	508	99%	2e-140	91%	<a href="#">XM_006795214.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">PREDICTED: Notothenia coniceps cholecystokinin-like (LOC104965666). mRNA</a>	503	503	98%	1e-138	91%	<a href="#">XM_010794665.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Oreochromis niloticus cholecystokinin (cck). mRNA</a>	503	503	99%	1e-137	91%	<a href="#">NM_001279730.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Seriola quinqueradiata CCK mRNA for cholecystokinin, partial cds</a>	499	499	98%	1e-137	91%	<a href="#">AB205406.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">PREDICTED: Mavilandia zebra cholecystokinin-like (LOC101483958). mRNA</a>	497	497	99%	5e-137	90%	<a href="#">XM_004574439.3</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">PREDICTED: Haplochromis burtoni cholecystokinin-like (LOC102294128). mRNA</a>	497	497	99%	5e-137	90%	<a href="#">XM_005940862.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">PREDICTED: Pundamilia nyererei cholecystokinin (cck). mRNA</a>	497	497	99%	5e-137	90%	<a href="#">XM_005728905.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Lutjanus guttatus cholecystokinin mRNA, partial cds</a>	490	490	72%	9e-135	99%	<a href="#">KJ908184.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">PREDICTED: Stegastes partitus cholecystokinin-like (LOC103370640). mRNA</a>	490	490	99%	9e-135	90%	<a href="#">XM_008299761.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Paralichthys olivaceus mRNA for cholecystokinin, complete cds</a>	470	470	99%	1e-128	89%	<a href="#">AB009281.1</a>

Figura 26. Homología de secuencias de CCK confrontado a otros organismos.

Entre ellos, se encontró en principio 3, por ejemplo, *Sciaenops ocellatus* con un 93% de identidad (Fig. 27).

Sciaenops ocellatus cholecystokinin mRNA, complete cds

Sequence ID: [gb|EU598150.1](#)|Length: 635|Number of Matches: 1

Related Information

Range 1: 72 to 454 [GenBankGraphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
566 bits(306)	1e-157	358/383(93%)	3/383(0%)	Plus/Plus
Query 8	TCTGTGTGTGTGTGTCGTGCTGGCAGTCCTGTGTACGAGCTGTTTGGGGCTCCCCCTTCTC	67		
Sbjct 72	TCTATGTGTGTGTGTCGTGCTGGCAGTCCTGTGTACAAGCTGTTTGGGGCTCCCCCTTCTC	131		
Query 68	CTCCCAGCTCCTAGACGAGGGCCACCGCTCCCTCTCOGCTCCTTCTGAAGCTCTCCTCGA	127		
Sbjct 132	CTCCCAGCTCCTAGACGAGGGCCACCGCTCCATCTCTGCTCCTTCTGAAGCTCTCCTTGA	191		
Query 128	GGCGGACACCCACACCTTGGGAGAGCCTCACCTCCAACACCGCCGCTCTGCCCCCGAGCT	187		
Sbjct 192	GGCTGACACCCACACCTTGGGAGAACCCACCTCCAACACAGCCGCTCTGCCCCCGAGCT	251		
Query 188	GAAGGCTCTTCCTCTGATTGAGGAGGATGCAGACTCCCGAGCCAACCTCAGCGAGCTGCT	247		
Sbjct 252	GAAAGCTCTTCCTCTGGCTGAGGAGGATGCAGACTCCCGAGCCAACCTCAGCGAGCTGCT	311		
Query 248	GGCAAGACTCATCTCCTCCAGGAAAGGTCTGTGCGCAGAACTCCACGGCAA---CAG	304		
Sbjct 312	GGCAAGACTCATCTCCTCCAGGAAAGGTCTGTGCGCAGAACTCCACGGCAAACAGCAG	371		
Query 305	AGGCGGCGGACTGAGCACCAACCACCGGATAGCAGACAGGACTACTTGGGGTGGATGGA	364		
Sbjct 372	AGGCAACGGACTGAGTGCCAACCATCGGATAGCAGACAGGACTACATGGGGTGGATGGA	431		
Query 365	TTCGGCCGCGCAGCGCAGAGG	387		
Sbjct 432	TTCGGCCGCGTAGTGACAGAGG	454		

**Figura 27.** Alineamiento en BLAST de CCK en *L. guttatus* confrontado a *S. ocellatus*.

En los aminoácidos que codifica la secuencia (Fig. 28) se observó la presencia de Metionina en una lectura de 5'3'.

[5'3' Frame 2](#)

LCVCVVLAVLCTSCGLPFPSSQLLDEGHRSLAPS  
 EALLEADHTLGEPLHQHRSAPQLKALPLIEEDA  
 DSRANLSELLARLISSRKGSVRRNSTANRGGGLS  
 TNHRIADRDYLGW **MetDFGRSAE**

**Figura 28.** Aminoácidos producidos por la secuencia de CCK de *L. guttatus*.

### 7.2.5 Diseño, validación y síntesis de *primers* específicos de CCK

Los *primers* específicos obtenidos para CCK mediante el programa *Primer3* se observan en la Tabla XIX, codifican para un amplicón de 159 bp y una Tm de 55 y 60°C.

**Tabla XIX.** *Primers* específicos para CCK de *L. guttatus*.

GEN/ NCBI ACCESO	DIRECCIÓN	SECUENCIA	TAMAÑO (bp)
Cholecystokinin/ KT692535	Sentido	CTGTGTGTGTGTGTCGTGCT	20
	Antisentido	GTGTTGGAGGTGAGGCTCTC	20

### 7.2.6 Curvas estándar para qPCR

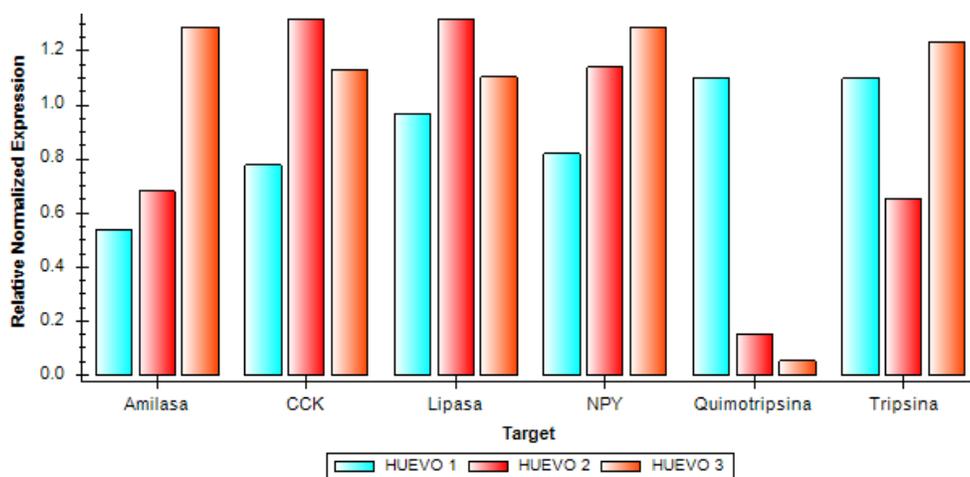
Las curvas estándar se obtuvieron en gran parte dentro de los rangos recomendados por el manual BIORAD de qPCR. En la Tabla XX se observan los valores de la eficiencia de la amplificación en porcentaje (E), el coeficiente de determinación ( $R^2$ ) para verificar si es óptima la curva con la linealidad de los datos y la pendiente (Slope) estandarizada para un valor cercano a -3.32 relacionada a la duplicación de amplicones por ciclo. En Anexo A, se observan las gráficas obtenidas para cada curva estándar.

**Tabla XX.** Valores de calidad de curvas estándar.

GENES	E	R <sup>2</sup>	Pendiente
18s	103.9	0.994	-3.232
$\alpha$ -Amilasa	99.7	0.993	-3.329
CCK	109.5	0.993	-3.114
EF1	100.0	0.998	-3.322
Lipasa	96.1	0.98	-3.42
Neuropéptido Y	108.6	0.961	-3.133
Quimotripsinógeno	103.4	0.991	-3.244
Tripsina	99.5	0.998	-3.334

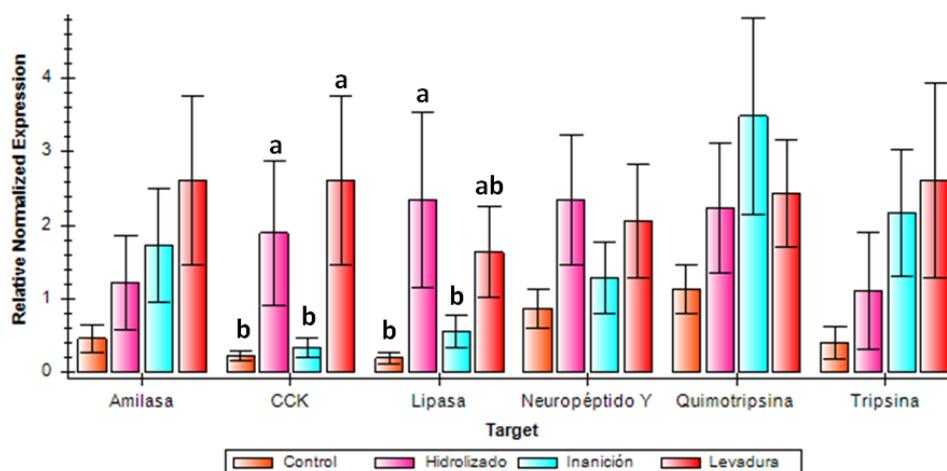
### 7.2.7 Procesamiento de muestras mediante qPCR, análisis de expresión relativa y estadístico

Después de procesar las muestras mediante qPCR, se realizó el análisis de expresión. En huevo se trabajó con réplicas de 3 por cada gen y no se presentó diferencia estadísticamente significativa (Fig. 29).



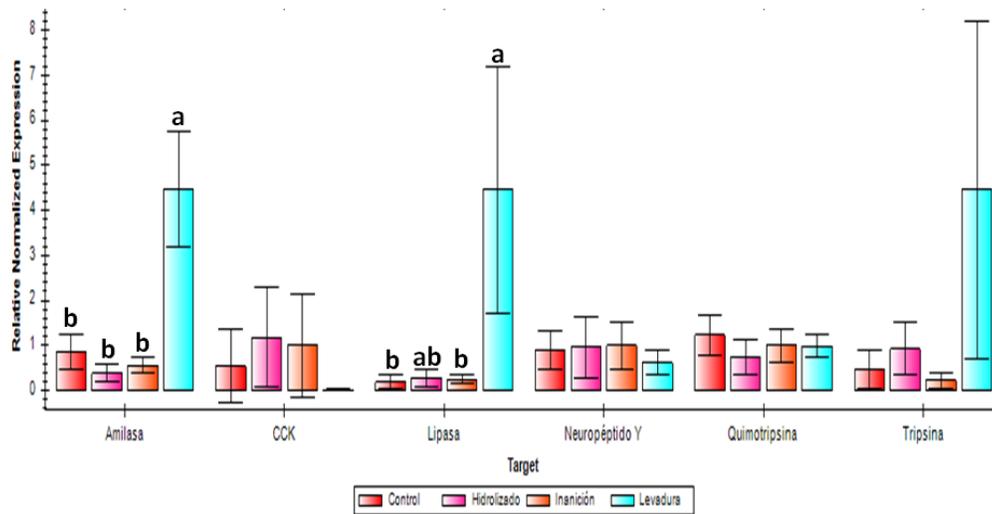
**Figura 29.** Análisis de expresión de genes de estudio, en 3 réplicas de huevos. Cada barra representa la medición de 1 replica por gen y están normalizadas con el gen de referencia EF1 y 18s.

En el día 1, se presentó diferencia estadísticamente significativa entre el tratamiento de hidrolizados y los controles, con el gen de lipasa. En CCK, los dos tratamientos presentaron diferencia significativa contra el control e inanición (Fig. 30).



**Figura 30.** Análisis de expresión entre los genes de estudio del día 1 por tratamiento. Cada barra representa la medición de 4 réplicas y están normalizadas con el gen de referencia EF1 y 18s, las barras representa el error estándar. Las diferentes letras indican diferencia significativa ( $P \leq 0.05$ ).

En el día 4, se obtuvo un resultado importante, el tratamiento con levaduras presentó diferencia estadísticamente significativa en el gen de lipasa contra control e inanición, y en  $\alpha$ -amilasa contra cultivos control, inanición e hidrolizados (Fig. 31).



**Figura 31.** Análisis de expresión entre los genes de estudio del día 4 por tratamiento. Cada barra representa la medición de 4 replicas y están normalizadas con el gen de referencia EF1 y 18s, las barras representan el error estándar. Las diferentes letras indican diferencia significativa ( $P \leq 0.05$ ).

## 8. DISCUSIÓN

### 8.1. Discusión sobre el objetivo particular 1

La calidad de huevos es definida como el potencial que poseen para obtener de ellos alevines viables (Kjørsvik *et al.*, 1990; Kjørsvik *et al.*, 2003), y subsecuentemente un desarrollo exitoso (Moguel-Hernández *et al.*, 2013a). Sin embargo, depende de su fisiología y el estado nutricional de los reproductores e incluso el protocolo de inducción al desove (Alvarez-Lajonchère *et al.*, 2011a). Otro factor importante, es la temperatura porque afecta tanto la calidad de huevos como los primeros estadios del desarrollo embrionario (Van der Kraak y Pankhurst, 1997). Antes de iniciar el presente trabajo, se tomaron los parámetros de calidad de huevos y larvas, dado que la variación, es uno de los factores limitantes para la producción de larvas de peces (Ibarra-Castro, 2005) y estos últimos, tuvieron una función muy importante para culminar la investigación. En este trabajo, se obtuvieron 2, 933, 414 HT, de los cuales, 2, 711, 225 fueron HF y 222, 189 HNF, el %F fue 92.71%, el DH  $0.715 \pm 0.013$  mm y el DGL  $0.117 \pm 0.010$  mm. Además, el espacio perivitelino fue estrecho en los huevos flotantes y el vitelo transparente-homogéneo con una gota lipídica. Asimismo, se obtuvo de 4 placas, el porcentaje de eclosión (63, 72.92, 78 y 87.23%), porcentaje de supervivencia a las 24 horas (35.7, 57.9, 44.1 y 45.5%) y 48 horas (35.7, 57.9, 44.1 y 45.5%). En larvas recién eclosionadas se obtuvo un VSV de  $0.102 \pm 0.017$  mm<sup>3</sup>, DGL de  $0.123 \pm 0.006$  y LTL de  $2.063 \pm 0.132$ . Estos resultados en contraste con los obtenidos por Ibarra-Castro (2005) con huevos y larvas de *L. guttatus* están dentro del intervalo estándar, así como los sugeridos por Alvarez-Lajonchère *et al.* (2011a), donde ambos indican que a una temperatura de 26 a 30°C deben de tener 0.650 a 0.775 mm DH, 0.121 a 0.123 mm DGL, >50% HF, >85% %F, >90% de porcentaje de eclosión y las larvas al eclosionar deben de medir de 2.0 a 2.5 mm, aunque pueden ser de 2.1 a 2.7 mm (Abdo-de la Parra *et al.*, 2015). Sin embargo, los porcentajes de eclosión estuvieron por debajo de lo indicado por ambos autores y visto que la temperatura juega un rol importante en el desarrollo

embrionario, es el factor que posiblemente debe de haber afectado, porque durante la incubación de las placas para observar la eclosión, no se utilizó una incubadora, sino la temperatura del ambiente que varió entre 26 a 22°C. Al respecto, Moguel-Hernández *et al.* (2013a), analizaron la calidad de huevos de *L. peru*, donde obtuvieron dos grupos con %F ( $69\pm 19.88$  y  $26\pm 34.37\%$ ), porcentaje de eclosión ( $87\pm 7.78$  y  $30\pm 18.34\%$ ) y supervivencia a la primera alimentación ( $65\pm 26.51$  y  $9\pm 16.16\%$ ). Aunado a ello, midieron parámetros bioquímicos como proteínas, carbohidratos e incluso actividad enzimática y concluyen que las anomalías durante las divisiones celulares en la segmentación del desarrollo embrionario, afectan negativamente la eclosión y los porcentajes de supervivencia, donde está involucrada la enzima glucosa-6-fosfatasa, pues participa en la gluconeogénesis y la producción de glucosa al retirar el grupo fosfato, y a su vez, éstos forman parte de la gran cantidad de monosacáridos que son necesarios para el desarrollo normal durante la embriogénesis. Asimismo, Kjørsvik *et al.* (2003), en larvas de *Scophthalmus maximus* L. se basaron en la calidad de huevos y larvas con la medición de %F, porcentaje de eclosión, divisiones celulares en el desarrollo embrionario, así como la supervivencia a la eclosión. Al final, indican que las anomalías en las divisiones celulares durante el desarrollo embrionario afectan negativamente la eclosión. Cucchi *et al.* (2011), describieron el desarrollo embrionario de *D. labrax*, donde el tamaño de huevo es de 1.3 mm, la eclosión es entre las 92-93 horas después de la fertilización y los factores abióticos (temperatura, salinidad, fotoperiodos, densidad de población) afectan el desarrollo embrionario en condiciones de laboratorio. Por otra parte, López *et al.* (2002), describieron el desarrollo embrionario de *D. radiale*, donde el %F fue  $86.92\pm 2.75\%$ , DH  $0.67\pm 0.02$  mm, DGL  $0.13\pm 0.01$  mm, la hora de eclosión después de la fertilización, fue a las 17 horas con 23 minutos y el tamaño de larvas al eclosionar  $1.33\pm 0.02$  mm. Sin embargo, por efecto de temperaturas altas para el organismo ( $>28^{\circ}\text{C}$ ) se producen altos porcentajes de huevos no viables. Además, el pargo rojo *L. peru* fue descrito por Peña *et al.* (2014), donde a 26, 28 y  $30^{\circ}\text{C}$ , obtuvieron la hora de eclosión a las 23, 20 y 18 horas respectivamente,

después de la fertilización, donde indican que la temperatura es un factor que influye el desarrollo embrionario y por tanto la hora de eclosión. En resumen, el desarrollo embrionario es afectado por los diversos factores abióticos, donde se incluye con mayor importancia a la temperatura y dado que los protocolos para la incubación de huevos de *L. guttatus* está en el rango de 26 a 30 °C, así como las causas reportadas por los anteriores autores, el resultado del porcentaje de eclosión posiblemente fue causado por la reducción de la temperatura durante la incubación, afectando el desarrollo embrionario e incluso la segmentación del embrión, así como la actividad de la enzima glucosa-6-fosfatasa sugerida por Moguel-Hernández *et al.* (2013a), dado que son sensibles a la temperatura, la eclosión y por ende la supervivencia a las 24 y 48 HDE. Donde esta última hora proporciona información sobre la viabilidad de larvas (Alvarez-Lajonchère *et al.*, 2011b).

El desarrollo larvario presenta diversas complicaciones durante la primera semana, donde la supervivencia y crecimiento se ven abatidos principalmente a causa de la primera alimentación (Alvarez-Lajonchère *et al.*, 2011a; Turano *et al.*, 2000; Velasco-Blanco *et al.*, 2011), la calidad ambiental (factores abióticos; Alvarez-Lajonchère *et al.*, 2011b; Aviles 2005; Mangor y Waywood, 1995). También la temperatura controla procesos vitales e influye en el desarrollo, pero a altas temperaturas la larva consume rápidamente el vitelo y la gota de aceite; por otro lado, aumenta los procesos fisiológicos y morfológicos, la alimentación es más activa, pero la solubilidad de oxígeno disminuye, lo que puede tener efectos en la calidad de agua por el incremento del metabolismo, y por ende los desechos metabólicos y disminución del oxígeno disuelto (Alvarez-Lajonchère *et al.*, 2011b). Inversamente, al disminuir la temperatura, disminuye el crecimiento y el consumo de alimento (Tucker, 1998). En el presente trabajo, la temperatura varió de 26 a 22°C y esto influyó en el crecimiento y supervivencia larvaria.

En cuanto a la duración del experimento, nuestros cultivos larvarios en inanición culminaron a los 5 DDE y los cultivos control, donde fueron alimentados con

hidrolizados y levadura, a los 7 DDE. Es importante remarcar que los factores abióticos (pH, amonio, oxígeno, saturación de oxígeno, entre otros) se mantuvieron bajo las condiciones que fueron descritas por Alvarez-Lajonchère *et al.* (2011b), e Ibarra-Castro (2005), sin embargo la temperatura gradualmente empezó a disminuir, es decir, se redujo diariamente hasta llegar a 22°C a los 5 DDE y no se logró controlar. De esta manera, las larvas de los cultivos con alimento, mostraron al igual que los de inanición, una notable mortalidad a los 5 DDE, al observarse al microscopio larvas vivas y muertas; mientras que a las vivas se les observó consumiendo alimento, por otro lado, a las muertas su tracto digestivo vacío, lo que ocasionó su muerte como lo indica Tucker (1998) que sólo aquellas que permanecieron hasta los 7 DDE, son las que posiblemente se alimentaron con anterioridad y evitaron el punto de no retorno. Aunado a una temperatura adecuada, los factores abióticos, la administración de alimento vivo en cantidad, calidad, frecuencia y cuidadosamente, puede evitar la inanición y el primer periodo crítico de muerte de larvas, durante la primera alimentación exógena (Alvarez-Lajonchère *et al.*, 2011b).

La TCA es como se esperó, mostró diferencia significativa entre los cultivos alimentados a los de inanición desde la eclosión a los 4 días posteriores. Por otra parte, a pesar de las propiedades que poseen los hidrolizados para mejorar el desarrollo larvario ya descritos por Delcroix *et al.* (2014), Kotzamanis *et al.* (2007), Cahu *et al.* (2004), y Zambonino-Infante *et al.* (1996), en *D. labrax*, Gisbert *et al.* (2012), y Gisbert (2010) en *S. aurata*, Kvåle *et al.* (2009), con *G. morhua* y Hernández *et al.* (2015), juveniles de *L. guttatus*, así como las levaduras *D. hansenii* descrito por Reyes-Becerril *et al.* (2011a), con *M. rosacea*, Tovar *et al.* (2010), Tovar *et al.* (2004), y Tovar *et al.* (2002), con larvas de *D. labrax*, es necesario haber seguido con el cultivo más días y observar la comparación contra controles, porque los días para verificar la TCA no se observó diferencia significativa, dada la corta duración de administración del alimento.

## 8.2. Discusión sobre los objetivos particulares 2 Y 3

La hormona CCK es sintetizada como pre-pro-hormona (>100 residuos de AA) que son procesados enzimáticamente del N-terminal dentro de múltiples formas cortas con el C-terminal de esta molécula que contienen de 7-8 AA de núcleo activo para su actividad biológica (Takei and Loretz, 2011; Vigna 1986; Vigna 2000), además es bien conservada en todos los vertebrados superiores estudiados y en especial CCK-8 con los AA DYMGWMDF, con Metionina (M) en la sexta posición (Rønnestad *et al.*, 2007) cuya forma de octapéptido es la más abundante (Ji *et al.*, 2015).

En el presente trabajo después de haberse realizado el diseño, validación y síntesis de *primers* degenerados para CCK de *L. guttatus*, así como PCR con muestras de larvas y huevos, clonación, electroforésis, secuenciación obtenida de GeneWiz U. S. A. y síntesis de *primers* específicos para qPCR, se obtuvo y analizó la secuencia de 389 bp del gen de CCK de *L. guttatus*, cuya homología se presentó con otras secuencias de CCK reportadas en otros organismos como *S. ocellatus* con identidad de 93% y 635 bp, *Larimichthys crocea* con 92% de 900 bp, *Diplodus sargus* 92% de 841 bp, *Oreochromis niloticus* 91% de 522 bp, *S. quinqueriata* 91% de 700 bp, entre otros. Sin embargo, la secuencia se cortó a 380 bp, visto que codifica una secuencia conservada de AA (MDFGRRSAE) a partir de Metionina a Ácido glutámico. Aunque, ésta no coincide con lo indicado por Rønnestad *et al.* (2007), si coincide con lo reportado por Ping *et al.* (2014), quienes reportaron la secuencia de aminoácidos de CCK en *M. amblycephala* (Fig. 32), donde no sólo posee la misma secuencia de los 9 AA conservados en *L. guttatus*, sino que posee similitud en 16 de ellos. Asimismo, Ji *et al.* (2015), determinaron la misma secuencia de AA en *M. amblycephala*.

```

TA TGC GTG CTG CTG GCT GCC CTC TCC ACC AGC AGT TGC ATT TCT CTC CAT ACA
  C V L L A A L S T S S C I S L H T
CAA TCA GAA GAT GGG GTT CAG TCT GAT CTC GGT ACC TTA GTG GAA CAC AAA CGC
  Q S E D G V Q S D L G T L V E H K R
CAC ACC CGT GCA GCG CCC TCC AGT GGA CAA CTG AGC CTG CTG TCT AAA CAA GAG
  H T R A A P S S G Q L S L L S K Q E
GAT GAG GAA GAA CCC CGC AGC AGC TTG ACT GAA CTA CTG GCC AGA ATC ATC TCC
  D E E E P R S S L T E L L A R I I S
ACC AAA GGT ACA TAC CGC AGA AGT TCC TCT CCG AAT AGC AGG TCC ATG GGT TCC
  T K G T Y R R S S S P N S R S M G S
ACT CAC AGA ATA AAG GAC AGA GAT TAC CTG GGA TGG ATG GAT TTT GGC CGA CGG
  T H R I K D R D Y L G W M D F G R R
AGC GCA GAA GAG TAT GAA TAC TCC TCA TAA
  S A E E Y E Y S S *
gaccattcaaccaatcaaccacttacatgaatcaacctgattagccaatcatctg

```

**Figura 32.** Secuencia parcial de cDNA y AA del gen CCK de *M. amblycephala*, la región no codificante se muestra en letras minúsculas, región codificante en letras mayúsculas, donde las mayúsculas superiores indican los nucleótidos y los inferiores los AA. El asterisco muestra el codón de paro (tomado de Ping *et al.*, 2014).

Aunado a ello, Yuan *et al.* (2014), trabajaron con *S. prenanti* y determinaron la secuencia de AA de CCK, donde coincide con la secuencia conservada y determinan la posición donde el octapéptido es sulfatado (Fig. 33).

```

1   ACATGGGGGAAGTTTCTCCAGCAGTCAGCGTGTGTTCTCCATCTCTCTCTCTCTCT  55
56  CCTCCTCTCTGCCAGAGTTTCACCTGAAGCC                               86
87  ATG AAC GCT GGA ATC TGT GTG CGY GTG CTG CTG GCT GCC CTC     128
    M N A G I C V C V L L A A L
129 TCC ACC AGC AGT TGC CTT TCT CTC CCC ACA CAC TCA GAA GAT     170
    S T S S C L S L P T H S E D
171 GGG GGT CAG TCT GAT CTC GGG ACC GTA GTG GAA CAC ACA CGC     212
    G G Q S D L G T V V E H T R
213 CAC ACC CGT GCA GCA CCC TCC AGT GGA CAA CTC AGC CTG CTG     254
    H T R A A P S S G Q L S L L
255 TCC AAA GCA GAG GAT GAT GAA GAA CCC CGC AGC AGC TTG ACT     296
    S K A E D D E E P R S S L T
297 GAR CTA CTG GCC AGA ATC ATC TCC ACC AAA GGT ACA TAT CGC     338
    E L L A R I I S T K G T Y R
339 AGA AGC CCC TCT CCA AAT AGC AGG TCC ATG GGC AAC AAT CAC     380
    R S P S P N S R S M G N N H
381 AGA ATA AAG GAC AGA GAT TAG YTG GGA TGG ATG GAT TTT GGC     422
    R I K D R D Y L G W M D F G
423 CGA CGG AGC GCA GAG GAG TAT GAA TAC TCC TCA TAA             458
    R R S A E E Y E Y S S *
459 GATCTCTTCAACAAATCATGTTAATCAACCAGATTAGCCAATCATCTGTACAGAGT  514
515 CACCCATTTAATGTCAATCAAATCACAGTCTGAGAGCTCGGTCTGATGTAATTT  570
571 GTTTGTACAATGGAGATAATGCAATATATAAATATATGTGTCCATCAATATATATT  626
627 TATTTTGAGAAAAAACGAGTGAGAATGTAGTCTCAACTGCTTTTATTCTCATAA  682
683 CTCATGTATATATGATTTGTGTCTCACTTTAGATATATCACAGGTGTCTACGAAT  738
739 AAATGATTGCCTTAACCTCACTCAAAAAAAAAAAAAAAAAA                776

```

**Figura 33.** Secuencia de nucleótidos y AA de CCK en *S. prenanti*, se señala en gris el octapéptido y la tirosina sulfatada en Y subrayado (tomado de Yuan *et al.*, 2014).

Por tanto, esto sugiere que la serie de AA encontrada en la secuencia nucleotídica determinada de CCK de *L. guttatus* forma parte de la cadena polipeptídica conservada en otros organismos como ya ha sido descrita por otros autores y la cual contiene el octapéptido funcional que es sulfatado para llevar sus funciones anorexígenas.

Para la parte funcional del presente trabajo, los resultados obtenidos en las curvas estándar utilizando los *primers* específicos de los genes de estudio para qPCR, se encuentran entre los rangos sugeridos por el manual Bio-Rad de qPCR, lo que demuestra que las cuantificaciones realizadas son confiables.

Al procesar las muestras de huevo para efectuar la cuantificación por qPCR, esta se llevó a cabo con 3 réplicas por gen y normalizados con los genes de referencia 18S y EF1, donde cada barra en la figura 29 representó el resultado por réplica, considerando que todos los huevos provenían de un desove en común y no podía compararse con un control o tratamiento. En el resultado obtenido, se encontró que los genes codificantes para enzimas digestivas ( $\alpha$ -amilasa, lipasa, quimotripsina y tripsina) y hormonas (CCK y NPY) se encuentran expresados desde la embriogénesis en el huevo. El análisis de datos se realizó mediante ANOVA de una vía y una prueba de Tuckey, para determinar si existe una diferencia significativa entre los genes estudiados y verificar entre cuáles. Sin embargo, no se encontró diferencia significativa. Moguel-Hernández *et al.* (2016), trabajaron con larvas de *L. guttatus*, analizando la expresión de todos los genes de estudio del presente trabajo, pero no determinaron la expresión en huevos. Galaviz *et al.* (2012), trabajaron sólo con larvas de la misma especie, donde analizaron la expresión de tripsinógeno y pepsinógeno. No obstante, Moguel-Hernández *et al.* (2013a), trabajaron con huevos de *L. peru* y determinaron la actividad enzimática de diversas enzimas digestivas, donde encontraron actividad de tripsina, amilasa, lipasa y catepsina, pero no de quimotripsina. Por otra parte, Ping *et al.* (2014), encontraron expresión de CCK, grelina y NPY durante el desarrollo embrionario y larvario de *M. amblycephala*. En el primero se

presentaron en menor grado que en el segundo. Además, sugieren que en base a estos resultados, NPY y CCK están involucrados en la regulación de la embriogénesis. Asimismo, Izquierdo *et al.* (2000), indican que en el desarrollo embrionario, a pesar de que los órganos endocrinos no son funcionales, existe la presencia de cantidades bajas de hormonas que ayudan a regular su desarrollo, así como la presencia de enzimas que permiten la absorción del vitelo y gota lipídica (Cucchi *et al.*, 2011). Por tanto, el resultado obtenido de la expresión en huevos de *L. guttatus* en el presente trabajo, indica que existe la presencia de transcritos de las hormonas y enzimas digestivas analizadas, y contrastado a lo descrito por los autores anteriores, posiblemente puede estar ya traducida la secuencia en proteína, sin embargo, se requiere determinar por otros métodos la presencia de las mismas mediante pruebas de actividad enzimática, usando sustratos específicos para cada una de ellas.

En qPCR de muestras del día 1 (Fig. 30), cada barra representó la expresión de 4 réplicas normalizadas con los genes de referencia 18S y EF1, donde se determinó el error estándar y al analizar los datos con ANOVA de una vía y prueba de Tuckey, se presentó diferencia significativa en lipasa de manera positiva en el tratamiento de hidrolizado contra control. En CCK se encontró diferencia significativa en favor del tratamiento de hidrolizado contra inanición y control, al igual que levadura contra inanición y control. Los valores de expresión de lipasa y CCK obtenidos con los peces alimentados con hidrolizados de pescado vs peces en inanición, sugiere que la hormona es estimulada por la presencia de péptidos, AA libres y ácidos grasos; sin embargo, con el tratamiento de levaduras, no se adicionó alimento desde el 1 DDE y éste presentó diferencia significativa en CCK contra inanición y control, por lo que deberían comprobarse dos hipótesis: 1) que no sea un factor nutricional sino genético, 2) que pueda deberse a que por equivocación se le haya administrado alimento a este tratamiento y por ende muestre un aumento en CCK. Al respecto, CCK es liberada por la presencia de proteínas, péptidos, lípidos y carbohidratos (Furutani *et al.*, 2012) y esta estimula al páncreas para la liberación

de enzimas digestivas como lipasa, amilasa, tripsina y quimotripsina que están presentes en *L. guttatus* desde el momento de la eclosión (Moguel-Hernández *et al.*, 2013b; Peña *et al.*, 2015).

Como se ha visto con anterioridad, las larvas al eclosionar, poseen su boca cerrada y el mecanismo receptor con el ambiente, es cutáneo, así como por papilas gustativas que en algunas larvas se presentan durante las primeras etapas en el tejido branquial o cavidad bucal (Gisbert *et al.*, 2004; Zavala-Leal *et al.*, 2011); sin embargo, esto no evita que pueda tener algún efecto producido por algún alimento inmerso en el medio, o quizás por estrés o algún otro factor no controlable. Por otra parte, estos resultados que indican la presencia de los transcritos al momento de la eclosión de las enzimas digestivas y hormonas, concuerdan con los resultados obtenidos por Moguel-Hernández *et al.* (2013b), con larvas de *L. guttatus*, donde indica que al eclosionar, las larvas poseen la maquinaria enzimática, así como los transcritos de las enzimas digestivas y hormonas (Galaviz *et al.*, 2012; Moguel-Hernández *et al.*, 2016) analizadas en el presente trabajo para la misma especie y el mismo estadio. Además, Delcroix *et al.* (2014), trabajaron con hidrolizados CPSP G como parte de la dieta control y cinco dietas experimentales en larvas de *D. labrax*, así observaron estímulos enzimáticos durante el desarrollo, crecimiento, supervivencia y microbiota intestinal, donde a diversas concentraciones de hidrolizados en relación al tamaño de los péptidos y origen material, hubo estímulos variados. Gisbert *et al.* (2012), también usó hidrolizados de sangre de porcino y levaduras en larvas de *S. aurata*, donde encontraron que la dieta experimental mejoró la maduración de los enterocitos, así como la actividad de enzimas citosólicas y del borde de cepillo. Otros autores como Cahu *et al.* (2004), Kotzamaniz *et al.* (2007), Kvåle *et al.* (2009), Zambonino-Infante *et al.* (1996), encontraron comportamientos similares en sus experimentos.

Los valores de expresión para larvas del día 4 (Fig. 30), presentaron un resultado muy importante, ya que el tratamiento con levadura mostró diferencia significativa

en el gen de lipasa contra control e inanición; en  $\alpha$ -amilasa contra control, inanición e hidrolizado, y en tripsina no se observó, pues los datos fueron muy variables. Esto sugiere que las levaduras tuvieron un efecto determinante en el desarrollo, así como en la expresión de los genes de lipasa y  $\alpha$ -amilasa, pues *D. hansenii* (CBS 8339) es una levadura marina productora de poliaminas cuyos mismos efectos se han observado en otras especies (Tovar *et al.*, 2002). Aunado a lo anterior, es capaz de adherirse al moco intestinal de peces (Tovar *et al.*, 2002; Tovar-Ramírez *et al.*, 2004) y contiene varios inmunoestimulantes como los  $\beta$ -glucanos (Santos *et al.*, 2004), y la presencia de poliaminas, putrescina, espermidina y espermina están involucrados en muchos procesos celulares, jugando también un rol importante en el control de respuesta inmune innata en vertebrados superiores (Reyes-Becerril *et al.*, 2011b).

Guzmán-Villanueva *et al.* (2014), trabajaron con  $\beta$ -1,3/1,6-glucano y la cepa *S. putrefaciens* como probiótico en *S. aurata*, donde obtuvieron resultados de que estos modulan la respuesta inmune y estimulan el crecimiento de *S. aurata*.

Desde el punto de vista de respuesta inmune, Reyes-Becerril *et al.* (2011a), administraron a *D. hansenii* como probiótico en peces *M. rosacea* infectados con *A. hydrophila*, encontrando que la levadura mejoró el sistema inmune e incrementó la resistencia a la infección. Tovar Ramírez *et al.* (2010), encontraron que *D. hansenii* modula la actividad enzimática antioxidante y la expresión de genes en larvas *D. labrax*. Finalmente, con el tratamiento de hidrolizados no se presentó diferencia en la expresión de alguna enzima u hormona. Esto se atribuyó a que durante la alimentación, la cantidad que se administró de hidrolizados fue constante desde el 1 DDE a 4 DDE. Entonces, durante este tiempo, hay un gran cambio morfológico y fisiológico y por ende un incremento en sus necesidades, lo que podría haber indicado una mayor cantidad por administrarse y así producir un efecto en el organismo.

## 9. CONCLUSIONES

### 9.1 Conclusión sobre el objetivo particular 1

No se logró determinar la supervivencia asociada a la temperatura adecuada (26 a 30°C) para el organismo, indicada por Alvarez-Lajonchère *et al.* (2011a) e Ibarra-Castro (2005), cuyo factor se redujo a 22°C por las condiciones del clima y no está entre los rangos adecuados para un buen desarrollo larvario. Sin embargo, a pesar de que no se logró pasar de los 7 DDE, se supo que las larvas que no se alimentaron, declinaron sus posibilidades de supervivencia desde los 5 DDE. Asimismo, se obtuvo un incremento en la TCA de todos los tratamientos, donde se observó que aunque las larvas hayan sido colocadas en inanición, estas pueden seguir creciendo hasta que sus reservas del vitelo son consumidas. No obstante, en supervivencia y TCA en los primeros DDE no hay diferencia significativa entre los cultivos de levadura, hidrolizado y control.

### 9.2 Conclusión sobre los objetivos particulares 2 y 3

Se detectó expresión de genes codificantes para las enzimas  $\alpha$ -amilasa, lipasa, quimotripsina y tripsina, así como para las hormonas CCK y NPY en huevos de *L. guttatus* en muy bajos niveles.

Se pudo comprobar que la administración de los hidrolizados (0.3 gr por tanque) durante la eclosión, estimula una mayor expresión de CCK y de lipasa. Sin embargo, se sugiere incrementar los niveles para futuros estudios con la finalidad de saber si la respuesta de expresión es directamente proporcional con el nivel de hidrolizado.

En relación al día 4, la larva puede consumir en gran medida alimento, lo que puede afectar directamente los niveles de expresión, y en el presente trabajo se incrementó en los tanques de tratamiento con levaduras *D. hansenii*, el cual mostró mayor expresión en  $\alpha$ -amilasa y lipasa, y este resultado se ha observado en otras especies con la misma levadura.

### 9.3 Conclusión sobre la hipótesis

Hipótesis 1. Debido a que se mostró diferencia estadística significativa en la expresión de CCK y lipasa, en los peces alimentados con hidrolizados en el día 1 después de la eclosión, y estos forman parte de genes relacionados a la digestión, por tanto la hipótesis no se rechaza.

Hipótesis 2. Debido a que las levaduras *D. hansenii* ayudaron a una mayor expresión en  $\alpha$ -amilasa y lipasa en larvas del día 4, y estas mostraron diferencias estadísticas significativas, donde ya estaban siendo alimentadas, por tanto la hipótesis no se rechaza.

## 10. RECOMENDACIONES

1. Llevar a cabo un seguimiento histológico de las larvas en ambos tratamientos para observar la diferenciación celular del sistema gastrointestinal.
2. Incrementar la dosis descrita en el presente trabajo de hidrolizados durante los días posteriores al día 1 después de eclosión.
3. Analizar la actividad enzimática en el estadio de huevo de *L. guttatus*.
4. Analizar las hormonas peptídicas de CCK y NPY para tener conocimiento si están presentes como proteínas activas en los diversos estadios larvarios y en huevo.

## 11. LITERATURA CITADA

Abdo-de la Parra, M. I., L. E. Rodríguez-Ibarra, C. Hernández, K. Hernández, B. González-Rodríguez, I. Martínez-Rodríguez, A. García-Ortega. 2010a. Efecto de diferentes niveles de proteína y lípidos totales en la dieta sobre el crecimiento y supervivencia de juveniles de pargo lunarejo *Lutjanus guttatus*. Rev. Biol. Mar. Oceanogr. 45: 433-439.

Abdo-de la Parra, M. I., L. E. Rodríguez-Ibarra, F. Capillo-Martínez, G. Velasco-Blanco, N. García-Aguilar, L. S. Alvarez-Lajonchère, D. Voltolina. 2010b. Efecto de la densidad de siembra sobre el crecimiento y supervivencia larval del pargo lunarejo *Lutjanus guttatus*. Revista de Biología Marina y Oceanografía. 45(1): 141-146.

Abdo-de la Parra, M. I., L. E. Rodríguez-Ibarra, G. Rodríguez-Montes de Oca, G. Velasco-Blanco, L. Ibarra-Castro. 2015. Estado actual del cultivo de larvas del pargo flamenco (*Lutjanus guttatus*). Lat. Am. J. Aquat. Res. 43(3): 415-423.

Allen, G. R. y D. R. Robertson. 1994. Fishes of the tropical eastern pacific. Crawford House Press Pty Ltd. First edition. Australia. 332pp.

Alvarez-Lajonchère, L. S. 2011. Introducción. En: Alvarez-Lajonchère, L. S. y Puello Cruz, A. C. (eds). El pargo flamenco: *Lutjanus guttatus*. Producción controlada de huevos, larvas y juveniles. Editorial AM editores, S. A. de C. V. Primera edición. México, D. F. 4p.

Alvarez-Lajonchère, L., L. Ibarra-Castro. 2011. Biología del pargo flamenco *Lutjanus guttatus*. En: Alvarez-Lajonchère, L. S. y Puello Cruz, A. C. (eds). El pargo flamenco: *Lutjanus guttatus*. Producción controlada de huevos, larvas y juveniles. Editorial AM editores, S. A. de C. V. Primera edición. México, D. F. 6p.

Alvarez-Lajonchère, L., L. Ibarra-Castro, N. García-Aguilar. 2011a. Reproducción controlada. En: Alvarez-Lajonchère, L. S. y Puello Cruz, A. C. (eds). El pargo

flamenco: *Lutjanus guttatus*. Producción controlada de huevos, larvas y juveniles. Editorial AM editores, S. A. de C. V. Primera edición. México, D. F. 38p.

Alvarez-Lajonchère, L., M. I. Abdo-de la Parra, L. E. Rodríguez-Ibarra, A. García-Ortega. 2011b. Larvicultura. En: Alvarez-Lajonchère, L. S. y Puello Cruz, A. C. (eds). El pargo flamenco: *Lutjanus guttatus*. Producción controlada de huevos, larvas y juveniles. Editorial AM editores, S. A. de C. V. Primera edición. México, D. F. 26p.

Avilés-Quevedo, A. 2005. Calidad de huevos y larvas según el manejo de los reproductores de la cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*, Pisces: Serranidae). Tesis Doctoral. Universidad de Barcelona, España. 187 pp.

Bakke, A. M., C. Glover, A. Krogh. 2011. Feeding, digestion and absorption of nutrients. In: Grosell, M., A. P. Farrell and C. J. Brauner (eds). The multifunctional gut of fish. Academic Press. First edition. UK. 55p.

Cooper, J. A. 2014. Factor affecting circulating levels of peptide YY in humans: a comprehensive review. Nutr. Res. Rev. 27: 186-197.

Crawley, J. N., R. L. Corwin. 1994. Biological actions of cholecystokinin. Peptides. 15: 731-755.

Cucchi, P., E. Sucré, R. Santos, J. Leclère, G. Charmantier, R. Castille. 2011. Embryonic development of the sea bass *Dicentrarchus labrax*. Helgol Mar Res. DOI 10.1007/s10152-011-0262-3.

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

Delcroix, J., F.-J. Gatesoupe, E. Desbruyères, C. Huelvan, H. Le Delliou, M.-M. Le Gall, P. Quazuguel, D. Mazurais, J. L. Zambonino-Infante. 2014. The effects of

dietary marine protein hydrolysates on the development of sea bass larvae, *Dicentrarchus labrax*, and associated microbiota. *Aquacult. Nutr.* 1-7.

FAO. 2015b. FAO Global aquaculture production database update to 2013-summary information.

FAO. 2015a. FAO Global capture production database update to 2013-summary information.

Furutani, T., T. Masumoto, H. Fukada. 2012. Response of cholecystokinin and digestive enzyme mRNA levels to various feed ingredients in yellowtail *Seriola quinqueradiata*. *Fish Sci.* 78: 1075-1082.

Galaviz, M. A., A. García-Ortega, E. Gisbert, L. M. López, A. García-Gasca. 2012. Expression and activity of trypsin and pepsin during larval development of the spotted rose snapper *Lutjanus guttatus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 161B: 19-16.

Gisbert, E. 2010. Protein hydrolysates in larval fish nutrition: *Yeast, Pig Blood Hydrolysates Substitute For Fishmeal In Study*. *Glob. Aquacult. Advoc.* 73-74.

Gisbert, E., A. Skalli, I. Fernández, Y. Kotzamanis, J. L. Zambonino-Infante, R. Fabregat. 2012. Protein hydrolysates from yeast and pig blood as alternative raw materials in microdiets for gilthead sea bream (*Sparus aurata*) larvae. *Aquacult.* 338-341: 96-104.

Gisbert, E., R. H. Piedrahita, D. E. Conklin. 2004. Ontogenetic development of digestive system in California halibut (*Paralichthys californicus*) with notes on feeding practices. *Aquacult.* 232:455-470.

Gisbert, E., S. Morais, F. J. Moyano. 2013. Feeding and digestion. In: Qin, J. G. (ed). *Larval fish aquaculture*. Nova Publishers, New York. pp 73-124.

Green, C. C., C. A. Brown. 2013. Roles of temperature and salinity on early development and larval rearing. In: Qin, G. J. (ed). *Larval fish aquaculture*. Nova Science Publishers, Inc. First edition. New York. 24 p.

Grimes, C. 1987. Reproductive biology of the Lutjanidae: a review. In: Polovina, J. J., S. Ralston (eds.). Tropical Snapper and Groupers Biology and Fisheries Management. West View Press, Boulder, CO, USA, pp. 239-294.

Grosell, M., A. P. Farrel, C. J. Brauner. 2011. The multifunctional gut of fish. Academic Press. First edition. UK. 444 pp.

Guzmán-Villanueva, L. T., D. Tovar-Ramírez, E. Gisbert, H. Cordero, F. A. Guardiola, A. Cuesta, J. Meseguer, F. Ascencio-Valle, M. A. Esteban. 2014. Dietary administration of  $\beta$ -1,3/1,6-glucan and probiotic strain *Shewanella putrefaciens*, single or combined, on gilthead seabream growth, immune responses and gene expression. Fish Shellf. Immunol. 39: 34-41.

Hachero-Cruzado, I., J. B. Ortiz-Delgado, B. Borrega, M. Herrera, J. I. Navas, C. Sarasquete. 2009. Larval organogenesis of flatfish brill *Scophthalmus rhombus* L: Histological and histochemical aspects. Aquacult. 286: 138-149.

Hernández, C., R. W. Hardy, D. G. Márquez-Martínez, P. V. Domínguez-Jiménez, B. González-Rodríguez. 2015. Evaluation of apparent digestibility coefficients of individual feed ingredients in spotted rose snapper *Lutjanus guttatus* (Steindachner, 1869). Aquacult. Nutr. 21: 835-842.

Herrera-Ulloa, Á., J. Chacón-Guzmán, G. Zuñiga-Calero, O. Fajardo, R. Jiménez-Montealegre. 2011. Acuicultura de pargo la mancha *Lutjanus guttatus* (Steindachner, 1869) en Costa Rica dentro de un enfoque Ecosistémico. Rev. Mar. y Cost. 1: 197-213.

Ibarra-Castro, L. 2005. Desarrollo gonadal e inducción a la maduración final de *Lutjanus guttatus* (Steindachner, 1869), silvestres y de cautiverio por implante e inyección de la hormona LHRHa. Tesis de Maestría. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. 165 pp.

Ibarra-Castro, L., L. Alvarez-Lajonchère. 2011. GnRHa induced multiple spawns and voluntary spawning of captive spotted rose snapper (*Lutjanus guttatus*) at Mazatlan, Mexico. *J. World Aquacult. Soc.*, 42, 564-574.

Ibarra-Castro, L., N. J. Duncan. 2007. GnRHa-induced spawning of wild-caught spotted rose snapper *Lutjanus guttatus*. *Aquacult.* 272. 737-746.

Izquierdo, M. S., J. Socorro, L. Arantzamendi, C. M. Hernández-Cruz. 2000. Digestión, absorción y utilización de lípidos en larvas de peces marinos. pp 251-263. En: Civera-Cerecedo, R., C. J. Pérez-Estrada, D. Ricque-Marie y L. E. Cruz-Suárez (eds). *Avances en Nutrición Acuicola IV. Memorias de IV Simposium Internacional de Nutrición Acuicola*. 1998. La Paz, B. C. S., México.

Ji, W., H. C. Ping, K. J. Wei, G. R. Zhang, Z. C. Shi, R. B. Yang, G. W. Zou, W. M. Wang. 2015. Ghrelin, neuropeptide Y (NPY) and cholecystokinin (CCK) in blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*): cDNA cloning, tissue distribution and mRNA expression changes responding to fasting and refeeding. *Gen. Comp. Endocrinol.* 223: 108-119.

Kendall, Jr. A. W., E. H. Ahlstrom, H. G. Moser. 1984. Early life history stages of fishes and their characters. In: *Ontogeny and Systematics of Fishes*. (Ed. by H. G. Molser, W. J. Richards, D. M. Cohen, M. P. Fahay, A. W. Kendall & S. L. Richardson). Amer. Soc. Ichthyol. Herpetol. Allens Press Inc., Lawrence, Kansas. pp. 11-24.

Kimmel, C. B., W. W. Ballard, S. R. Kimmel, B. Ullmann, T. F. Schilling. 1995. Stages of Embryonic Development of the Zebrafish. *Develop. Dynam.* 203: 253-310.

Kiron, V. 2012. Fish immune system and its nutritional modulation for preventive health care. *Anim. Feed. Sci. Technol.* 173:111-133.

- Kjørsvik, E., A. Mangor-Jensen, I. Holmefjord. 1990. Egg quality in fishes. *Adv. Mar. Biol.* (26): 71-113.
- Kjørsvik, E., K. Hoehne-Reitan, K. I. Reitan. 2003. Egg and larval quality criteria as predictive measures for juvenile production in turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Aquacult.* 227: 9-20.
- Kotzamanis, Y. P., E. Gisbert, F. J. Gatesoupe, J. Zambonino-Infante, C. Cahu. 2007. Effects of different dietary levels of fish protein hydrolysates on growth, digestive enzymes, gut microbiota, and resistance to *Vibrio anguillarum* in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Comp. Biochem. Physiol.* 147A: 205-214.
- Kurokawa, T., T. Suzuki. 1995. Structure of the exocrine pancreas of flounder (*Paralichthys olivaceus*): Immunological localization of zymogen granules in the digestive tract using anti-trypsinogen antibody. *J. Fish Biol.* 46: 292-301.
- Kvåle, A., T. Harboe, A. Mangor-Jensen, K. Hamre. 2009. Effects of protein hydrolysates in weaning diets for Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) and Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Aquacult. Nutr.* 15: 218-227.
- Larios-Soriano, E. 2014. Temperatura preferida, temperaturas críticas y respuestas metabólicas de *Lutjanus guttatus* (Steindachner, 1869) ante diferentes temperaturas de aclimatación. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación y de Educación Superior de Ensenada, Baja California (CICESE). 73 pp.
- Lazo, J. P., M. J. Darias, E. Gisbert. 2011. Ontogeny of the digestive tract. In: Holt, G. J. (ed). *Larval Fish Nutrition*. John Wiley & Sons, Inc. First edition. UK. 41p.
- Liddle, R. A. 1997. Cholecystokinin cells. *Ann. Rev. Physiol.* 59: 221-242.

Lin, X., H. Volkoff, Y. Narnaware, N. J. Bernier, P. Peyon, R. E. Peter. 2000. Brain regulation of feeding behavior and food intake in fish. *Comp. Biochem. Physiol.* 126A: 415-434.

López, P., J. Rosas, A. Velásquez, T. Cabrera, C. Maneiro. 2002. Desarrollo embrionario y larval del bolo *Diplectrum radiale* Quoy y Gaimard, 1824 (Pisces: Serranidae). *Rev. Biol. Mar. Ocea.* 37(2): 127-137.

Mangor-Jensen, A., K. G. Waiwood. 1995. The effect of light exposure on buoyancy of halibut eggs. *J. Fish Biol.* 47: 18-25.

Moguel-Hernández, I. 2015. Fisiología digestiva durante el desarrollo larval del Pargo lunarejo *Lutjanus guttatus*. Tesis de Doctorado. Instituto Politécnico Nacional, Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas CICIMAR-IPN. La Paz, Baja California Sur. 120 pp.

Moguel-Hernández, I., R. Peña, H. Nolasco-Soria, S. Dumas, P. Hinojosa-Baltazar. 2013a. Egg quality criteria in Pacific red snapper (*Lutjanus peru*). *Aquacult. Res.* 1-9.

Moguel-Hernández, I., R. Peña, H. Nolasco-Soria, S. Dumas, I. Zavala-Leal. 2013b. Development of digestive enzyme activity in spotted rose snapper, *Lutjanus guttatus* (Steindachner, 1869) larvae. *Fish Physiol. Biochem.* 40: 839-848.

Moguel-Hernández, I., R. Pena, K. B. Andree, D. Tovar-Ramírez, K. Bonacic, S. Dumas, E. Gisbert. 2016. Ontogeny changes and weaning effects in gene expression patterns of digestive enzymes and regulatory digestive factors in spotted rose snapper (*Lutjanus guttatus*) larvae. *Fish Physiol. Biochem.* DOI:10.1007/s10695-016-0220-8.

Moran, T. H., K. P. Kinzig. 2004. Gastrointestinal satiety signals-II. Cholecystokinin. *Am. J. Physiol.: Gastrointest. Liver Physiol.* 286: G183-G188.

Murashita, K., H. Fukada, I. Rønnestad, T. Kurokawa, T. Masumoto. 2008. Nutrient control of release of pancreatic enzymes in yellowtail (*Seriola quinqueradiata*): Involvement of CCK and PY in the regulatory loop. *Comp. Bioch. Physiol. A*: 1-6.

Parma, L., A. Bonaldo, P. Massi, M. Yúfera, G. Martínez-Rodríguez, P. P. Gatta. 2013. Different early weaning protocols in common sole (*Solea solea* L.) larvae: Implications on the performances and molecular ontogeny of digestive enzyme precursors. *Aquacult.* 414-415: 26-35.

Peña, E., C. Hernández, C. A. Alvarez-González, L. Ibarra-Castro, A. Puello-Cruz, R. W. Hardy. 2015. Comparative characterization of protease activity in culture spotted rose snapper juveniles (*Lutjanus guttatus*). *Lat. Am. J. Aquat. Res.* 43(4): 641-650.

Peña, R., S. Dumas, I. Zavala-Leal, M. Contreras-Olguín. 2014. Effect of incubation temperature on the embryonic development and yolk-sac larvae of the Pacific red snapper *Lutjanus peru* (Nichols & Murphy, 1922). *Aquacult. Res.* 45: 519-527.

Ping, H.-C., K. Feng, G.-R. Zhang, K.-J. Wei, G.-W. Zou, W.-M. Wang. 2014. Ontogeny expression of ghrelin, neuropeptide Y and cholecystokinin in blut snout bream, *Megalobrama amblycephala*. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 98: 338-346.

Reyes-Becerril, M., D. Tovar-Ramírez, F. Ascencio-Valle, R. Civera-Cerecedo, V. Gracia-López, V. Barbosa-Solomieu, M. A. Esteban. 2011a. Effects of dietary supplementation with probiotic live yeast *Debaryomyces hansenii* on the immune and antioxidant systems of leopard grouper *Mycteroperca rosacea* infected with *Aeromonas hydrophila*. *Aquacult. Res.* 42: 1676-1686.

Reyes-Becerril, M., F. Ascencio-Valle, D. Tovar-Ramírez, J. Meseguer, M. A. Esteban. 2011b. Effects of polyamines on cellular innate immune response and expression of immune-relevant genes in gilthead seabream leucocytes. *Fish Shellf. Immunol.* 30: 248-254.

Riley, K. L. P. 2002. Refrigerated storage and cryopreservation of sperm for the production of red snapper and snapper hybrids. M. S. Thesis. Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College. Pp. 1-192.

Rønnestad, I. 2002. Control and Efficiency of Digestive Function of Marine Fish Larvae. In: Cruz-Suárez, L. E., D. Ricque-Marie, M. Tapia-Salazar, M. G. Gaxiola-Cortés, N. Simoes. (Eds.). Avances en Nutrición Acuícola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 3 al 6 de Septiembre del 2002. Cancún, Quintana Roo, México.

Rønnestad, I., M. Yúfera, B. Ueberschär, L. Ribeiro, Ø. Sæle, C. Boglione. 2013. Feeding behaviour and digestive physiology in larval fish: current knowledge, and gaps and bottlenecks in research. Rev. Aquacult. 5:59-98.

Rønnestad, I., Y. Kamisaka, L. E. C. Conceição, S. Morais, S. K. Tonheim. 2007. Digestive physiology of marine fish larvae: Hormonal control and processing capacity for proteins, peptides and amino acids. Aquacult. 268: 82-97.

Santos, A., D. Marquina, J. Barroso, J. M. Peinado. 2004. (1-6)- $\beta$ -D-glucan as the cell wall binding site for *Debaryomyces hansenii* killer toxin. Lett. Appl. Microbiol. 34: 95-99.

SAGARPA. 2016. Información estadística por especie y entidad.

Soto, R. L., F. Mejía-Arana, J. A. Palacios, K. Hiramatsu. 2009. Reproducción y crecimiento del pargo mancha *Lutjanus guttatus* (Pisces: Lutjanidae) en el Golfo de Nicoya, Costa Rica. Rev. Biol. Trop. 57(1-2): 125-131.

Świątecka, D., L. H. Markiewicz, B. Wróblewska. 2012. Pea protein hydrolysate as a factor modulating the adhesion of bacteria to enterocytes, epithelial proliferation and cytokine secretion- an *in vitro* study. Exper. Immunol. 37(3): 227-231.

Takei, Y., C. A. Loretz. 2011. The gastrointestinal tract as an endocrine/neuroendocrine/paracrine organ: organization, chemical messengers

and physiological targets. In: Grosell, M., A. P. Farrel and C. J. Brauner (eds). The multifunctional gut of fish. Academic Press. First edition. UK. 57p.

Tovar, D. J. Zambonino, C. Cahu, F. J. Gatesoupe, R. Vázquez-Juárez, R. Lésel. 2002. Effect of live yeast incorporation in compound diet on digestive enzyme activity in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Aquacult.* 204: 113-123.

Tovar-Ramírez, D., D. Mazurais, J. F. Gatesoupe, P. Quazuguel, C. L. Cahu, J. L. Zambonino-Infante. 2010. Dietary probiotic yeast modulates antioxidant enzyme activities and gene expression of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Aquacult.* 300: 142-147.

Tovar-Ramírez, D., J. Zambonino-Infante, C. Cahu, F. J. Gatesoupe, R. Vázquez-Juárez. 2004. Influence of dietary live yeast on European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larval development. *Aquacult.* 234(1-4): 415-427.

Turano, M. J., D. A. Davis, C. R. Arnold. 2000. Observations and techniques for maturation, spawning and larval rearing of the yellowtail snapper *Ocyurus chrysurus*. *J. World Aquacult. Soc.* 31(1): 59-68.

Van Der Kraak, G., N. W. Pankhurst. 1997. Temperature effects on the reproductive performance of fish. In: Wood, C. M. and D. G. McDonald (eds). *Global warming: Implications for freshwater and marine fish.* Cambridge University Press. First edition. UK. 18p.

Velasco-Blanco, G., A. C. Puello Cruz, L. Alvarez-Lajonchère, B. González Rodríguez, M. I. Abdo-de la Parra, L. E. Rodríguez-Ibarra y A. García-Ortega. 2011. Alimento vivo. En: Alvarez-Lajonchère, L. S. y Puello Cruz, A. C. (eds). *El pargo flamenco: Lutjanus guttatus.* Producción controlada de huevos, larvas y juveniles. Editorial AM editores, S. A. de C. V. Primera edición. México, D. F. 38p.

Vigna, S. R. 1986. Evolution of hormone and receptor diversity: cholecystokinin and gastrin. *Amer. Zool.* 26: 1033-1040.

Vigna, S. R. 2000. Evolution of the cholecystokinin and gastrin peptides and receptors. *Amer. Zool.* 40: 287-295.

Villeneuve, L. A., E. Gisbert, J. Moriceau, C. L. Cahu, J. L. Zambonino-Infante. 2006. Intake of high levels of vitamin A and polyunsaturated fatty acids during different developmental periods modifies the expression of morphogenesis gene in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Brit. J. Nutr.* 95(4): 677-687.

Volkoff, H., L. F. Canosa, S. Unniappan, J. M. Cerdá-Reverter, N. J. Bernier, S. P. Kelly, R. E. Peter. 2005. Neuropeptides and control of food intakes in fish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 142: 3-19.

Wank, S. A. 1998. G protein-coupled receptor in gastrointestinal physiology I. CCK receptors: an exemplary family. *Am. J. Physiol.* 274: G607-GG6013.

Washington, M. C., K. Williams, A. I. Sayegh. 2016. The feeding responses evoked by endogenous cholecystokinin are regulated by different gastrointestinal sites. *Horm. Behav.* 78: 79-85.

Wilson, J. M., L. F. C. Castro. 2011. MORPHOLOGICAL DIVERSITY OF THE GASTROINTESTINAL TRACT IN FISHES. In: Grosell, M., A. P. Farrel and C. J. Brauner (eds). *The multifunctional gut of fish*. Academic Press. First edition. UK. 56p.

Yuan, D., T. Wang, C. Zhou, F. Lin, H. Chen, H. Wu, R. Wei, Z. Xin, Z. Li. 2014. Leptin and cholecystokinin in *Schizothorax prenanti*: Molecular cloning, tissue expression, and mRNA expression responses to periprandial changes and fasting. *Gen. Comp. Endocrinol.* 204: 13-24.

Zambonino-Infante, J. L., C. L. Cahu, A. Peres. 1996. Partial Substitution of Di- and Tripeptides for Native Protein in Sea Bass Diet Improves *Dicentrarchus labrax* Larval Development. *Nutr. Metab.* 608-614.

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

Zambonino-Infante, J. L., E. Gisbert, S. Sarasquete, I. Navarro, J. Gutiérrez , C. L. Cahu. (2008). Ontogeny and physiology of the digestive system of marine fish larvae. In: Cyrino J. E. P., D. Bureau, B. G. Kapoor (eds). *Feeding and Digestive Functions in Fishes*, pp. 281–348. Science Publishers, Enfield, NH.

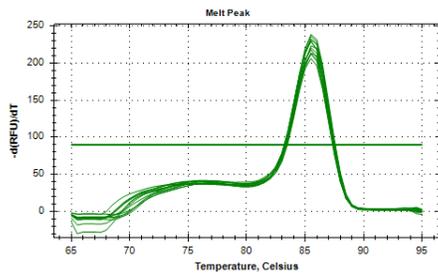
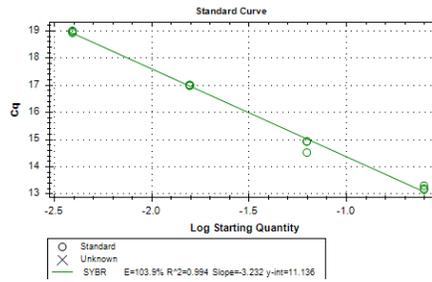
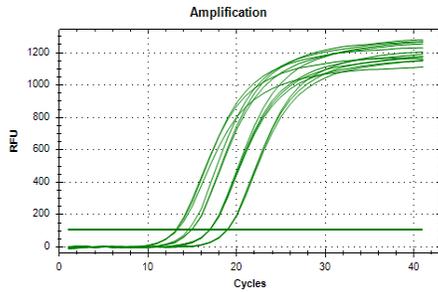
Zavala-Leal, I., S. Dumas-Lapage, R. Peña-Martínez. 2011. Organogénesis durante el periodo larval en peces. *CICIMAR Océánides*. 26(2): 19-30.

## 12. ANEXOS

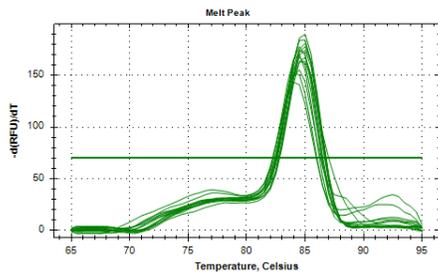
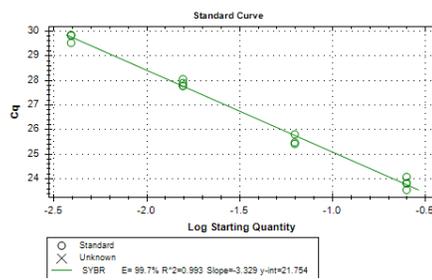
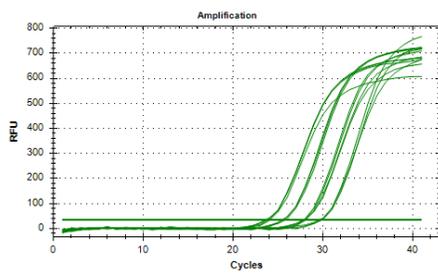
### 12.1 Anexo A

#### Curvas de amplificación, disociación y estándar de los genes estudiados.

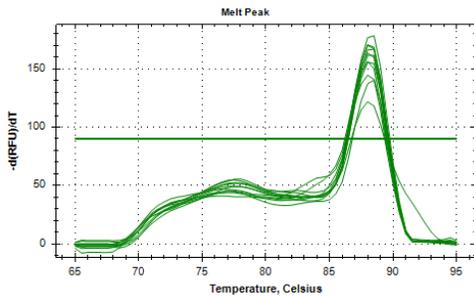
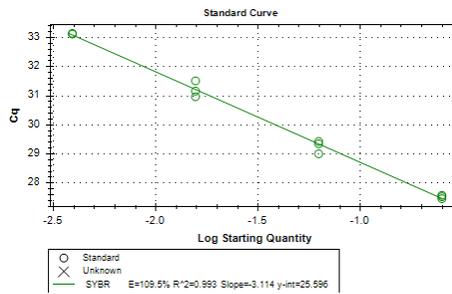
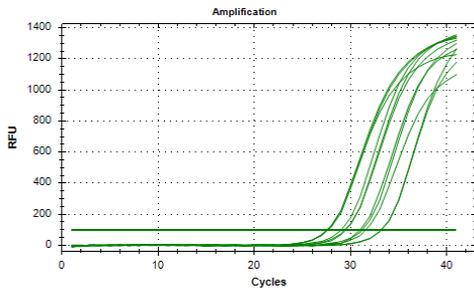
18s



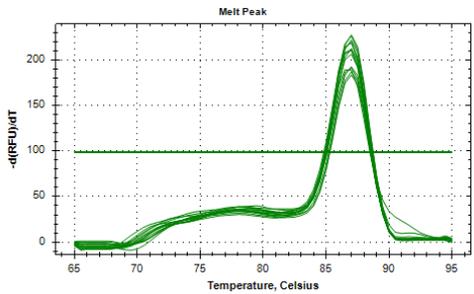
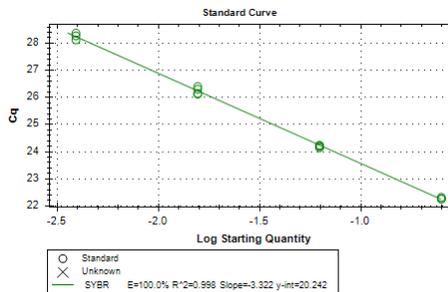
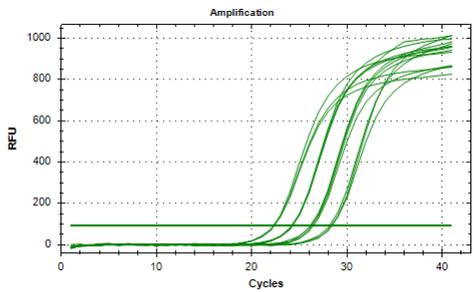
$\alpha$ -Amilasa



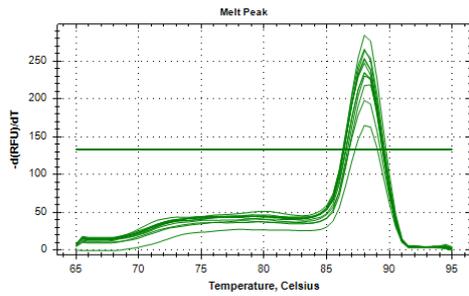
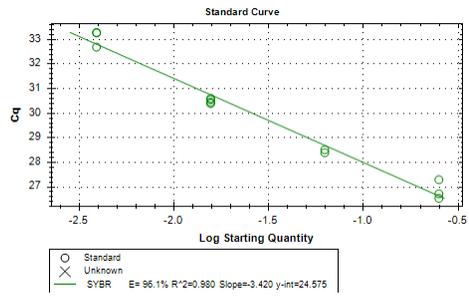
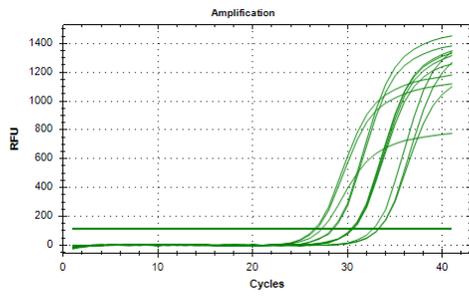
CCK



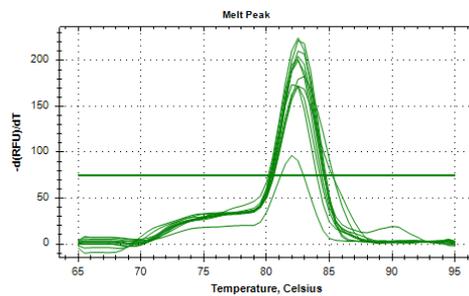
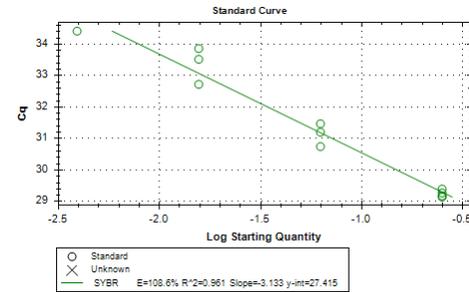
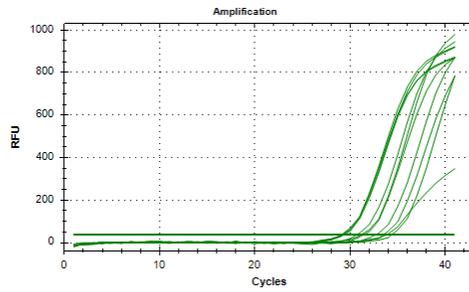
EF1



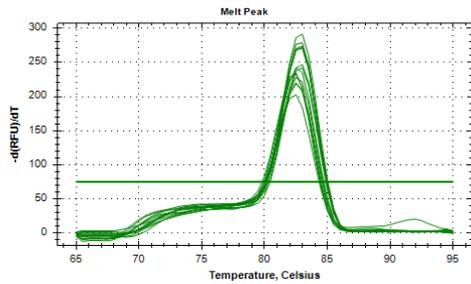
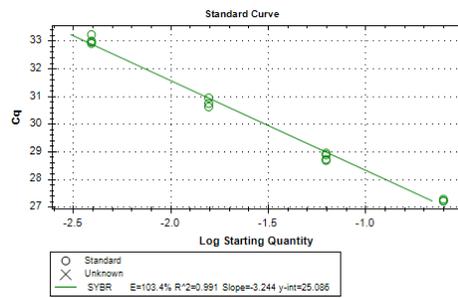
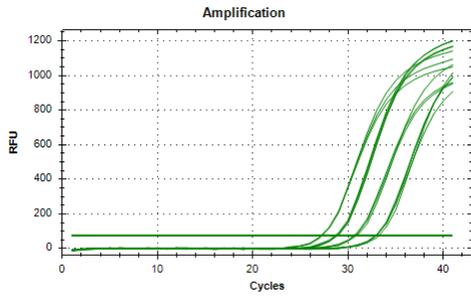
## Lipasa



## Neuropéptido Y



## Quimotripsinógeno



## Tripsina

