

Avances en la Fisiología Digestiva y Nutrición de la Mojarra Tenguayaca *Petenia splendida*

Álvarez-González, C.A.^{1*}, Márquez-Couturier, G.¹, Arias-Rodríguez, L.¹,
Contreras-Sánchez, W.M.¹, Uscanga-Martínez, A.¹, Perales-García, N.¹, Moyano-
López, F.J.², Hernández-Jiménez, R.¹, Civera-Cerecedo, R.³, Goytortua-Bores, E.³,
Isidro-Olán, L.¹, Almeida-Madrugal, J.A.¹, Tovar-Ramírez, D.³, Gutiérrez-Ribera,
J.N.³, Arévalo-Galán, L.M.¹, Enric, G.⁴, Treviño, L.^{3,4}, Morales-Sánchez, B.¹

¹ Lab. Acuicultura, División Académica de Ciencias Biológicas, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Carretera Villahermosa – Cárdenas Km. 0.5, Villahermosa, Tabasco 86039, México.

*E-mail: alvarez_alfonso@hotmail.com

² Departamento de Biología Aplicada, Escuela Politécnica Superior. La Cañada de San Urbano, Universidad de Almería, 04120, Almería, España

³ Laboratorio de Nutrición Acuícola, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR). Mar Bermejo 195, Col. Playa Palo de Santa Rita, 23090, La Paz, B.C.S., Méx.

⁴ IRTA – Sant Carles de la Ràpita, Crta. Poble Nou Km. 5.5, 43540 Sant Carles de la Rapita, (Tarragona), España

Resumen

La mojarra tenguayaca *Petenia splendida* es uno de los cíclidos nativos más apreciados en la región sureste de México, por lo que desde hace varios años, se han realizado varias investigaciones que han permitido cerrar el ciclo de vida de la especie e iniciar su cultivo a escala experimental. Sin embargo, durante el cultivo se ha utilizado ampliamente el alimento desarrollado para las truchas, por lo cual el crecimiento es lento provocando que hasta la fecha el cultivo a escala comercial no sea rentable. En este sentido, los estudios relacionados con la determinación de los requerimientos nutricionales y la evaluación de la capacidad digestiva en los periodos de vida de la especie son de vital importancia para lograr el diseño de alimentos específicos que permitan optimizar el cultivo. Es así que desde hace varios años, se iniciaron los estudios en relación al desarrollo de una línea de alimentos específicos que permitan fomentar el cultivo de esta especie en la región sureste de México. El presente trabajo se enfoca en los estudios realizados por la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco en colaboración con varias instituciones donde se ha investigado la fisiología digestiva durante la ontogenia inicial aplicando técnicas histológicas, bioquímicas y moleculares. Nuestros resultados muestran que esta especie tiene un patrón de desarrollo similar al de otros cíclidos con un desarrollo precoz del sistema digestivo y la aparición temprana de las enzimas digestivas. La caracterización

de las proteasas digestivas permitió determinar que esta especie presenta hábitos alimenticios carnívoros; al estudiarse diferentes ingredientes proteínicos por medio de la técnica de pH-STAT, se logró determinar que los mejores ingredientes para la alimentación de los juveniles fueron la harina de pescado, harina de jaiba, harina de cerdo, entre otras. Esto se corroboró ya que el requerimiento de proteínas es de 45.1 %, mientras que el requerimiento de lípidos es de 15%. Por su parte, la sustitución de harina de pescado con gluten de trigo es posible hasta en un 25%, aunque es necesario estudiar otros ingredientes que permitan no depender del uso de harina y aceite de pescado para la alimentación de *P. splendida*.

Palabras clave: Nutrición, Tenguayaca, *Petenia splendida*, Enzimas digestivas

Introducción

La piscicultura en México se ha sustentado desde hace muchos años en el cultivo de unas cuantas especies como las tilapias, bagres, carpas, truchas, entre otras, las cuales son exóticas, adaptando su tecnología a las condiciones específicas de nuestro país. Por este motivo, no se le ha dado el impulso necesario a los estudios para el desarrollo de la tecnología requerida para el cultivo de las especies de peces nativos (Mendoza *et al.*, 1993; Rojas y Mendoza, 2000). En este sentido, existen una gran cantidad de especies de importancia comercial, ya sea a nivel local, regional o nacional, que sustentan en buena medida el consumo de proteína de alta calidad para la población, pero que son capturadas a través de las pesquerías. De esta manera, se vislumbra un incremento en la extracción de estas especies, lo que ha provocado una caída en las poblaciones naturales, además de que existe un progresivo aumento de la población humana y la subsiguiente contaminación de los ecosistemas donde habitan estas especies (Welcomme, 1988).

De todas las especies de peces nativos, Tabasco cuenta con una gran variedad de ellas como son el pejelagarto, *Atractosteus tropicus*, la mojarra castarrica *Cichlasoma uruphthalmus*, la mojarra paleta *Vieja bifasciata* y la mojarra tenguayaca *Petenia splendida*, las cuales se han venido estudiando desde hace varios años. La mojarra tenguayaca pertenece a la familia Cichlidae, distribuyéndose en la región sureste de México y en Centroamérica, siendo una especie que soporta bajas concentraciones de oxígeno disuelto (desde 1.6 mg/L), de altas concentraciones de amonio (0.55 mg/L) y una buena capacidad para soportar las variaciones de temperatura (de 24 a 27 °C) (Caro *et al.*, 1994). Es considerado como de hábitos piscívoros, aunque también se alimenta de restos vegetales e insectos (Santiago *et al.*, 1997). Se puede capturar en ríos de poca corriente y lagunas, es un pez que tiene mucha carne y pocas espinas, alcanzando una talla y peso máximos de 40 cm y 1.5 kg (Reséndez-Medina y Salvadores, 1983). De los cíclidos nativos la tenguayaca es la especie más competitiva comercialmente y tiene una gran demanda en el mercado local (Velasco, 1976). De acuerdo con la SEMARNAP (2006) en Tabasco esta especie alcanzó una producción por pesca de 37.5 toneladas en 1996 disminuyendo gradualmente a 14.5 toneladas en el 2005, estando muy por debajo de otras especies de cíclidos nativos y la tilapia, lo que indica la necesidad de implementar técnicas para su producción. Todas estas características hacen que este pez sea un excelente candidato para su cultivo al ser fácil de domesticar y mantener en cautiverio. Sin embargo, como muchas de las especies de interés acuícola, presenta un periodo larvario, el cual puede ser crítico alcanzando mortalidades hasta del 90 %, debido a una serie de factores relacionados como, la naturaleza biológica de las larvas, tipos de sistemas utilizados, problemas genéticos, enfermedades y malnutrición entre muchas. Para comprender y resolver esta problemática, se deben realizar estudios específicos para cada uno de estos aspectos.

Fisiología digestiva en larvas de peces

En el momento de la eclosión de los embriones, el sistema digestivo esta compuesto de un tubo recto indiferenciado; al finalizar la absorción del saco vitelino y el glóbulo de aceite, el tubo se segmenta dando paso a la aparición de válvulas musculares, la bucofaringe y las porciones anterior, media y posterior que paulatinamente se irán diferenciando histológica y funcionalmente (Govoni, 1980). Además el hígado y el páncreas están presentes en el momento de la eclosión y son funcionales al finalizar la absorción vitelina. Es así, que al finalizar el periodo larvario el desarrollo del estómago, intestino, ciegos pilóricos y demás órganos que participan en el proceso de digestión están completos; aunque esta diferenciación puede tomar de 15 hasta 60 días dependiendo de la especie (Cousin *et al.*, 1987).

De esta manera, las técnicas desarrolladas para la cría de larvas de peces necesitan de la alimentación con presas vivas (exógena) durante los primeros días después de la eclosión, una vez que termina la absorción del saco vitelino, por lo que es preciso establecer a la par del cultivo larvario, cultivos anexos de fito y zooplancton para garantizar la alimentación de las larvas; este es uno de los tantos factores limitantes para la producción intensiva de semilla de peces marinos. De esta forma, el éxito durante esta etapa esta muy relacionada con la ingesta de un alimento exógeno adecuado, tanto en calidad como en cantidad (Izquierdo, 1996). Un problema adicional que se ha detectado durante la producción de semilla es el elevado costo de alimentación, que puede ser un factor más que afecte durante la crianza, ya que en algunos casos, el área necesaria para la producción del alimento vivo puede llegar a ser del orden de cuatro veces superior el tamaño del área para la producción de semilla (Tucker, 1998).

Una de las hipótesis que ha sido ampliamente mencionada en la literatura, es la referente a que durante el periodo larvario, el páncreas e hígado están completamente desarrollados y son funcionales, por lo que se asume que las enzimas digestivas están presentes. En este sentido, se debe considerar el momento en el que aparecen y son funcionales. De todas las enzimas digestivas, las proteasas son las más importantes ya que catalizan la hidrólisis de los enlaces peptídicos que forman la estructura primaria de las proteínas y están presentes en muchos organismos (Dixon y Webb, 1979). Algunas proteasas están implicadas en procesos como la digestión, la activación de proenzimas y prohormonas, y muchos otros (Stroud, 1975). La clasificación de las proteasas, al ser hidrolasas específicas de enlaces peptídicos se agrupan bajo el código EC 3.4. Dentro de ellas, existen dos subgrupos: las exopeptidasas que hidrolizan enlaces peptídicos entre aminoácidos terminales (extremo amino o carboxilo de la proteína) se agrupan bajo EC 3.4.11-19; y las endopeptidasas que hidrolizan enlaces peptídicos internos pertenecen a la categoría 3.4.21-24. Asimismo, se clasifican de acuerdo con su mecanismo de acción, donde se reconocen 4 grupos

principales: 1. Serina-proteasas (EC 3.4.21): que poseen un grupo serina en el centro activo, así como histidina y aspártico. 2. Cisteina-proteasas (EC 3.4.22): que se caracterizan por la presencia del grupo cisteína (-SH) en su centro catalítico. 3. Proteasas ácidas o aspárticas (EC 3.4.23): que se caracterizan por la presencia de ácido aspártico en el centro activo y poseen máxima actividad a pH ácido. 4. Metal-proteasas (EC 3.4.24): poseen un resto de ácido glutámico en el centro activo y requieren de un catión divalente (Zn, Ca o Mg) para catalizar la hidrólisis del enlace peptídico.

Dentro del grupo de las endoproteasas se encuentran, la pepsina (EC 3.4.23.1), gastricina (EC 3.4.23.3) y la quimosina o renina (EC 3.4.23.4) que son proteasas ácidas presentes en el jugo gástrico de muchos organismos. En el intestino de muchas especies se ha detectado otro tipo de enzimas que funcionan a pH alcalino como la tripsina (EC 3.4.21.4.) que es una endoproteasa pancreática que hidroliza los enlaces peptídicos constituidos por lisina y arginina. La quimotripsina (EC 3.4.21.1) también es una serina proteasa cuya especificidad de sustrato implica l-isómeros de tirosina, fenilalanina y triptófano. También actúa sobre amidas y ésteres. Las catepsinas que son enzimas relacionadas con los procesos de digestión intracelular.

En el caso de las exoproteasas se pueden mencionar las aminopeptidasas (EC 3.4.11) las cuales catalizan la hidrólisis de los restos aminoacídicos, concretamente desde el extremo amino de un péptido. Se clasifican en función de los requerimientos de iones metálicos (Mn^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} o Co^{2+}) y la especificidad por determinados dipéptidos (Behal *et al.*, 1965). Entre sus diversas funciones destacan: la maduración de proteínas, degradación terminal de proteínas, regulación hormonal y control del ciclo celular. En el caso concreto de la leucina aminopeptidasa, se ha relacionado su nivel de actividad en la membrana de los enterocitos con el estado nutricional de los organismos en estadios iniciales. Las carboxipeptidasas son enzimas que liberan residuos aminoacídicos del extremo carboxiterminal de los péptidos y proteínas. Se conocen dos familias de carboxipeptidasas: las serina carboxipeptidasas (EC 3.4.16), que contienen un residuo de serina en su centro activo y las metalo carboxipeptidasas (EC 3.4.17), que requieren de iones Zn para ser activas.

Por otra parte, existe otra enzima altamente necesaria denominada lipasa (EC 3.1.1.3), la cual se ha descrito en varios tejidos animales (páncreas, plasma sanguíneo, saliva y jugo pancreático). En organismos superiores, la lipasa pancreática actúa específicamente sobre los enlaces éster exteriores (enlaces α 1 y 3), por lo que se produce principalmente una mezcla de ácidos grasos y monoglicéridos. La hidrólisis digestiva de los triglicéridos es activada por el ion Ca^{2+} y en presencia de un factor llamado colipasa (Canioni *et al.*, 1977). La acción de la lipasa sobre su sustrato se ve enormemente favorecida por

la existencia de la interfase agua-lípido, la cual es formada en el intestino gracias a la acción emulsionante de las sales biliares o sus análogos. La colipasa actúa preservando la lipasa de la desnaturalización y favoreciendo su adsorción al sustrato. Algunas esterasas (EC 3.1.1.1), que preferentemente actúan sobre ésteres simples de ácidos grasos con bajo peso molecular, poseen la capacidad, al igual que las lipasas, de hidrolizar triglicéridos. Sin embargo, se distinguen de éstas porque hidrolizan sustratos solubles.

Otra enzima importante es la amilasa que cataliza la hidrólisis del enlace α 1-4 del almidón y glucógeno. Se dividen en alfa (α) y beta (β), o endo y exo amilasas. La α -amilasa (EC 3.2.1.1.) esta presente en el jugo pancreático de gran cantidad de animales (Archibal, 1987), ya que hidroliza indistintamente enlaces a lo largo de la cadena del polímero hidrocarbonado, liberando moléculas de glucosa y maltosa. Por su parte la β -amilasa hidroliza a los carbohidratos por el extremo no reductor y se restringen exclusivamente al reino vegetal (Hirikado *et al.*, 1994). Finalmente, las fosfatasas ácida y alcalina (EC 3.1.3.2 y 3.1.3.1) que catalizan la separación de P inorgánico a partir de fosfato orgánico. Se encuentran en los epitelios intestinales y en diferentes capas tisulares del estómago. Su papel fisiológico en los vertebrados superiores está relacionado con los procesos de mineralización de los huesos (Harris, 1989), así como en procesos de transporte a través de membrana. De hecho, ambas fosfatasas se asocian con el transporte activo de glucosa, proteína y lípidos, e incluso de agua e iones en el caso de la fosfatasa alcalina (Dupuis *et al.*, 1991).

En otro orden de ideas, el alimento vivo en muchas ocasiones, no es el más adecuado al carecer de algunos nutrientes esenciales (Versichelle *et al.*, 1989). En contraposición, las dietas inertes ofrecen una fácil disponibilidad, menores costos de producción y flexibilidad en el momento de formularlas (Rosenlaud *et al.*, 1997; Tacon, 1993). Sin embargo, para diseñar alimentos adecuados para las especies, es necesario estudiar la capacidad digestiva de las especies de interés.

Para estudiar la capacidad digestiva de los peces se requiere realizar la caracterización de las proteasas si se quiere entender los tipos y modos de acción, así como el nivel de actividad que representan. Para la caracterización, se pueden realizar diversos ensayos como: El efecto del pH y temperatura sobre la actividad y estabilidad de las enzimas y la caracterización mediante inhibidores específicos por medio de técnicas bioquímicas y electroforéticas.

Una vez realizados estos estudio, se puede determinar la digestibilidad para la proteína, con el objetivo principal de maximizar el crecimiento y la supervivencia de los organismos al mínimo costo y en el menor tiempo posible (Knights, 1985). Sin embargo, para la elaboración de alimentos para la acuicultura, son

innumerables las fuentes proteínicas que se utilizan; entre ellas destacan harinas y aceites de animales marinos, los cuales sirven de base para la formulación y fabricación de los pellets. Desafortunadamente, la mayoría de esas fuentes de proteína no son valoradas desde el punto de vista de la capacidad digestiva de los organismos que las consumen. La formulación y fabricación de los alimentos se base en los denominados análisis proximales que relacionan la cantidad de combustibles que presentan los alimentos y no en función de la cantidad que requiere el organismo respecto al tiempo. Una aproximación que permite valorar la capacidad digestiva de los organismos se da por la utilización de métodos “in vivo”, en los que se determina una serie de parámetros o índices relacionados con el grado de aprovechamiento de las dietas en relación con el combustible que las compone. Todos estos ensayos resultan costosos, tediosos y largos debido a la necesidad de instalaciones adecuadas, mantenimiento de los animales y el análisis de éstos y sus excretas. Por otra parte, el empleo de marcadores no digeribles (como el óxido de cromo), conlleva algunos problemas y solamente son una medida indirecta de la digestibilidad, lo cual resulta complicado debido al lento crecimiento de las especies, la dificultad de recolectar las heces en el medio acuático y la influencia de los niveles de inclusión de éstos sobre el aprovechamiento de algunos combustibles (March *et al.*, 1985; Shiau y Liang, 1995).

Debido a lo anterior, se han desarrollado métodos “in vitro” que simulan la digestión de los organismos y permitan predecir la digestibilidad de las diferentes harinas que son susceptibles de utilizarse en la formulación de alimentos. De esta manera, algunos investigadores recomiendan que los estudios se encaminen hacia el desarrollo de este tipo de técnicas (Tacon, 1995). Originalmente, se elaboraron métodos solamente que investigaban la fase de digestión alcalina con preparados sintéticos de tres y cuatro enzimas (Hsu *et al.*, 1977; Satterlee *et al.*, 1979), donde se valoraba la digestibilidad por medio de la caída de pH en la solución proteínica. A partir de los resultados obtenidos, se ha tratado de simular, en la medida de lo posible, el proceso de digestión completa, mediante sistemas con membrana permeables a modo de diálisis que permiten separar y cuantificar en continuo los productos de hidrólisis (Savoie y Gauthier, 1986). Actualmente, se mejoraron los métodos anteriores, con el desarrollo del sistema pH-STAT que permite una determinación rápida de la digestibilidad de la proteína de las diferentes materias primas, las cuales varían en función de la cantidad y tipo de enzimas utilizadas, condiciones de hidrólisis, métodos de fraccionamiento digestivo y estudio de los productos resultantes. Este sistema fue desarrollado por Pedersen y Eggum (1983), el cual se basa en la medición del consumo de álcali necesario para mantener constante el pH que tiende a descender al romperse los enlaces peptídicos. El parámetro determinado es el grado de hidrólisis (GH en %) que relaciona los enlaces peptídicos hidrolizados por las proteasas digestivas con el número total de enlaces peptídicos presentes en una proteína (Adler-Nissen, 1976). Al número de estos enlaces descompuestos en un proceso de hidrólisis se le denomina equivalentes

de hidrólisis (h) y se expresa como mequv/g proteína. El valor de enlaces totales en una proteína se determina a través de su composición aminoacídica, como la suma de mmoles de aminoácidos por gramo de proteína. Desgraciadamente, la mayoría de los estudios se han aplicado a organismos terrestres, algunas especies de ciprínidos (Eid y Matty, 1989) y salmónidos (Grabner, 1985; Dimes y Haard, 1994).

Antecedentes

El desarrollo de las herramientas bioquímicas en el estudio de organismos se ha venido dando desde hace más de 50 años, donde los primeros estudios permiten determinar las capacidades digestivas de animales de campo en función de sus hábitos alimenticios, como en los estudios de Sarbahi (1951) con *Carassius auratus* y *Micropterus salmoides*, donde se detectó una diferenciación de las enzimas en función de la región del tracto digestivo. De ese momento a la fecha, se ha continuado con los estudios en adultos los cuales han servido de base para desarrollar micrométodos en la detección, caracterización y purificación de enzimas digestivas para los diferentes estadios de los peces.

A la par de estudios en adultos, se comienzan con los estudios sobre la capacidad digestiva de larvas de peces, los cuales pueden ser divididos en dos tipos: 1) Aquellos en los que las aproximaciones se realizan basándose en el modelo de caja negra (causa-efecto), donde se ofrece a las larvas algún tipo de alimento y se observa únicamente la respuesta sobre el crecimiento y la supervivencia; y 2) los que estudian desde la perspectiva bioquímica y fisiológica, su capacidad digestiva y por ende, la posibilidad de desarrollar dietas que sustituyan la necesidad del uso de alimentos vivos (rotífero y artemia) durante el cultivo de estos organismos. Sin embargo, muchos de los estudios de caja negra han servido de sustento para la realización de los estudios finos.

Dentro de esos estudios de causa-efecto, se pueden resaltar los siguientes: El estudio de Bryant y Matty (1981), que se realizaron con *Cyprinus carpio* con una serie de experimentos de sustitución de Artemia por alimento particulado de trucha y donde aparentemente se lograron buenos resultados con este tipo de alimento. El trabajo realizado por Person-Le Ruyet *et al.* (1983), donde se estudia la alimentación con de pellets extruidos para larvas de 35 DDE de *Scophthalmus maximus*, determinando que el uso de este tipo de alimentos en el destete de esta especie es posible, obteniendo hasta un 83 % de supervivencia.

Dabrowski *et al.* (1986), que estudia la posibilidad de utilizar dietas artificiales en la alimentación de larvas de *Coregonus lavaretus* y *C. peled*, encontrando que el uso de alimentos vivos es mejor (> 85 % de supervivencia) que con las dietas artificiales. Sin embargo, esta es una especie que presenta ontogenia

directa por lo que la comparación con larvas de ontogenia indirecta no es fácil. La investigación de Ehrlich *et al.* (1989), con larvas de *Micropterus dolomieu* en el cual comparan la utilización de una dieta artificial, una mezcla de *Artemia* y dieta, y exclusivamente *Artemia*, determinando que el uso de alimento artificial disminuyó la supervivencia (39 %) comparado con los otros dos regímenes alimenticios (85 y 77 %).

Kanazawa *et al.* (1989), realizan la sustitución de alimento vivo por una dieta microencapsulada en larvas de 10 DDE de *Pagrus major* y *Paralichthys olivaceus*, obteniendo buenos resultados en la aceptación de la dieta y reflejándose en la supervivencia (75 % para *Pagrus major* y 60 % para *Paralichthys olivaceus*) con una dieta artificial y una mezcla de alimento vivo con dieta artificial respectivamente. El estudio de Verreth y Van Tongeren (1989), con larvas de *Clarias gariepinus*, en el cual se resalta la posibilidad de la sustitución de la alimentación con *Artemia* por dieta particulada para trucha, aunque cabe resaltar que esta especie también presenta ontogenia directa. La investigación de Barnabé y Guissi (1994) con larvas de *Dicentrarchus labrax*, donde se realiza el destete desde el punto de vista del comportamiento reproductivo al momento de adicionar una dieta artificial, observándose que es posible la sustitución de alimento vivo hasta en un 20 % al día 20 DDE, sin que se afecte la supervivencia de las larvas. Para ese mismo año, el estudio de Fernández-Díaz *et al.*, con larvas de *Sparus aurata* resaltan la posibilidad de sustituir en su mayor parte el uso de alimento vivo por dos tipos de microencapsulados (suaves y duros); sin embargo, este estudio se ve desde el punto de vista de la capacidad de ingestión por los alimentos artificiales y no se mencionan resultados sobre la supervivencia y el crecimiento obtenidos para esta especie.

Un estudio realizado por Kolkovski *et al.* (1997), donde se compara la necesidad de alimentos vivos para estimular la ingesta contra alimentos artificiales con larvas de *Sparus aurata*, concluyendo que la estimulación visual y química juegan un papel relevante, de forma sinérgica, para lograr la alimentación de las larvas, por lo que es posible realizar el destete temprano adicionando una mezcla de alimento vivo y dieta artificial. Otra investigación llevada a cabo por Rosenlaud *et al.* (1997) con larvas de *Hippoglossus hippoglossus*, demostraron que el uso de coalimentación utilizando *Artemia* y microdieta permiten incrementar la supervivencia de 24 % hasta un 59 %.

Cañavate y Fernández-Díaz (1999) realizaron un estudio con larvas de *Solea senegalensis* donde se logró aumentar la supervivencia durante el larvicultivo hasta un 78 % aplicando la coalimentación. El estudio de Kolkovski y Tandler (2000), en el cual utilizan microparticulados en la alimentación de larvas de 20 DDE de *Sparus aurata*, utilizando diferentes cantidades de harina de pescado e hidrolizados de calamar, y

obteniendo excelentes resultados tanto en la ingesta como en el crecimiento, utilizando menos del 50 % de sustitución del hidrolizado como fuente de proteína en la dieta.

Por otra parte, algunos de los estudios finos que sirven de base para el desarrollo de la presente investigación son: El estudio de Tanaka *et al.* (1972), con larvas de *Plecoglossus altivelis* en donde reconoce dos estadios principales, el primero en el que se observa no totalmente formado el sistema digestivo, y el segundo, en el cual ya está totalmente desarrollado como el de los adultos, donde a partir de los 25 mm de longitud se detectó un incremento en la actividad amilasa y pepsina, las cuales coinciden con la aparición de las glándulas gástricas. El trabajo realizado por Alliot *et al.* (1977), en el que determina la actividad de esterasas, α glucosidasa, tripsina, quimotripsina, leucina aminopeptidasa, y fosfatasa ácida y alcalina; donde determina que en larvas de *Dicentrarchus labrax*, donde determina que la actividad al momento de la eclosión es muy baja y se va incrementando hasta estabilizarse.

El estudio de Lauff y Hofer (1984), quienes determinaron la actividad tripsina, quimotripsina y aminopeptidasa de tres especies de peces que presentan ontogenia directa, *Coregonus sp.*, *Salmo gairdneri* (= *Onchorhynchus mykiss*) y *Rutilus rutilus*, determinando que el uso de alimentos vivos incrementa la actividad enzimática durante los primeros estadios y que es complicado la sustitución por alimento artificial. Luczynski *et al.* (1987) realizaron un estudio en dos especies de coregónidos, *Coregonus albula* y *C. lavaretus*, a fin de determinar la actividad proteolítica de corionasa al momento de la eclosión y su posterior disminución.

El estudio de Ueberchär (1993), el cual determina la actividad tripsina y pepsina en larvas de *Scophthalmus maximus* y *Clupea harengus*, determinando que la aparición y el incremento de tripsina son un indicador de la maduración del sistema digestivo utilizando organismos vivos como alimento, y además, detectan que la pepsina aparece en el momento del desarrollo completo del estómago. El trabajo de Waldford y Lam (1993), en el que realzan una detallada descripción de las enzimas digestivas de larvas de *Lates calcarifer*, donde se detectaron exclusivamente actividad proteolítica alcalina durante los primeros días de vida, y hasta el día 22 DDE que detectó la aparición de enzimas proteolíticas ácidas; en este estudio además, se menciona la posible contribución de los alimentos vivos en la activación de estas enzimas. El estudio de Kolkovski *et al.* (1993), con larvas de *Sparus aurata* donde se detectó el incremento de enzimas intestinales, influenciadas por el alimento exógeno.

Una serie de investigaciones realizadas por el grupo de Francia del IFREMER, los cuales estudiaron la aparición de la maquinaria enzimática (tripsina, quimotripsina, fosfatasa alcalina, leucina peptidasa,

leucina aminopeptidasa y γ -glutamil transpeptidasa) en larvas de *Dicentrarchus labrax* con miras, por un lado, a evaluar si era posible realizar la sustitución del alimento vivo por alimento artificial, incrementando la supervivencia y el crecimiento; y por el otro, desarrollar una dieta microparticulada adecuada que permitiera lograr la maduración temprana de las células intestinales. Como resultado de esta serie de investigaciones, se logró encontrar una dieta basada en ingredientes de origen marino, que mejoró la supervivencia en el periodo larvario hasta en un 65 % (Cahu y Zambonino-Infante, 1994; Zambonino-Infante y Cahu, 1994; Zambonino-Infante *et al.*, 1996; Cahu, 1996; Cahu y Zambonino-Infante, 1997). Otra investigación de Cahu *et al.* (1998) en el cual hacen una comparación entre la capacidad digestiva de las larvas de un pez omnívoro y las larvas de un pez carnívoro (*Cyprinus carpio* y *Dicentrarchus labrax*) a partir de la utilización de dietas artificiales con diferentes proporciones de hidrolizados de pescado y levadura, además de los datos previamente obtenidos acerca de la aparición de la maquinaria enzimática presente en ambas especies, concluyendo que la utilización de dietas basadas en hidrolizados y levadura incrementan la supervivencia de las larvas (35 % para *Dicentrarchus labrax* y 98 % para *Cyprinus carpio*), comparados con la dieta basada exclusivamente en harina de pescado.

Mientras que en España, otro grupo de investigadores estudió arduamente la aparición, actividad y caracterización de enzimas digestivas de larvas de *Sparus aurata* y *Dentex dentex* con el fin de lograr la sustitución parcial o total del uso de alimento vivo en el cultivo; además de la aplicación de estudios “*in vitro*” para probar la digestibilidad de las enzimas digestivas sobre diferentes fuentes proteicas y elaborar dietas adecuadas para estos estadios (Moyano *et al.*, 1996; Díaz *et al.*, 1997; Alarcón, 1997; Moyano *et al.*, 1998; Alarcón *et al.*, 1998).

Recientemente, se han realizado nuevas investigaciones que resaltan la necesidad de utilizar hidrolizados de organismos marinos y levaduras, como fuentes proteicas, en las dietas para las larvas de *Dicentrarchus labrax*, además de la necesidad de incrementar la cantidad de lípidos en la dieta (>20 %) para lograr la maduración de las células del tracto digestivo de la larva a fin de incrementar la supervivencia y el crecimiento (Cahu *et al.*, 1999; Zambonino-Infante y Cahu, 1999). Además, este grupo de investigadores están realizando estudios con especies de importancia comercial (*Solea senegalensis*) en otros países a fin de mejorar las condiciones del larvicultivo a partir del conocimiento de la maquinaria enzimática (Ribeiro *et al.*, 1999). Finalmente, la investigación de Gawlicka *et al.* (2000), con larvas de *Hippoglossus hippoglossus*, en el cual detectan el incremento de tripsina, lipasa, amilasa y fosfatasa alcalina en diferentes días hasta antes de la metamorfosis y resaltan la capacidad digestiva de esta especie, aunque su mayor capacidad se da después de la metamorfosis. De esta forma, se ha relacionado la aparición de las enzimas digestivas con los aspectos fisiológicos y nutricionales como en el Cuban gar *Atractosteus*

tristoechus, Adriatic sturgeon *Acipenser naccarii*, rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*, yellowtail kingfish *Seriola lalandi*, Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*, Pikeperch *Sander lucioperca*, Tambaqui *Colossoma macropomum*, Atlantic cod *Gadus morhua*, California halibut *Paralichthys californicus* (Furnè, 2005; Bolasina *et al.*, 2005; Comabella *et al.*, 2006; Ben *et al.*, 2006; Alvarez-González *et al.*, 2005; O'Brien-MacDonald *et al.*, 2006; Almeida *et al.*, 2006; Hamza, 2007).

En el aspecto del cultivo de peces nativo en Tabasco, desde hace más de 20 años los investigadores de la UJAT han logrando avances relevantes para su cultivo, especialmente en la reproducción controlada, desarrollar el cultivo de larvas en sistemas intensivos, evaluar la producción de crías monosexo, establecer las mejores condiciones de cultivo a través del manejo de fotoperiodo y temperatura, y determinar los requerimientos de proteína para juveniles (García, 2003; Real, 2003; Jiménez, 2004; Contreras, 2003; Martínez, 2004; Vidal, 2004; Chan, 2005; Guerrero, 2007; Jiménez, 2007), pero sin que hasta la fecha se haya logrado pasar de una escala experimental a piloto-comercial. De esta forma, la presente investigación tiene como objetivo, desarrollar una línea de alimentos específicos para el cultivo de cíclidos nativos en Tabasco y validar su utilización a nivel piloto comercial.

De esta manera, el objetivo de este proyecto contempló estudiar los requerimientos nutricionales y la capacidad digestiva de la tenguayaca *Petenia splendida* a fin de diseñar líneas de alimentos balanceados específicos que permitan optimizar su cultivo.

Estudios de Fisiología Digestiva

Desarrollo histológico del tracto digestivo

Materiales y Métodos

Se estudió la ontogénesis del sistema digestivo por medio de evaluaciones histológicas y morfológicas de *P. splendida* desde la eclosión (0 dde, días después de la eclosión) hasta el día 60 dde. Las larvas de la tenguayaca fueron obtenidas de un desove de los reproductores mantenidos en el laboratorio de acuicultura de la UJAT-DACBIOL. Después de la eclosión (3 días post fertilización, dpe), los eleuteroembriones fueron colocados en un tanque de 1000 l (0.75 larvas l⁻¹) conectado a un sistema abierto (29°C, 6.5 mg O₂ l⁻¹, pH 7.4). Las larvas fueron alimentadas a saciedad aparente cuatro veces al día con nauplios de *Artemia* desde la apertura de la boca (3 dpe) hasta el día 15 dde. Después fueron alimentadas tres veces al día con una dieta para trucha (Silver Cup, Nelson & Sons, Inc.) hasta el día 60 dde. Para las evaluaciones morfofisiológicas del desarrollo intestinal, cada dos días cinco larvas fueron colectadas con

una red de 500 µm de diámetro. Las larvas fueron anestesiadas con metasulfonato de tricaina (MS222), enjuagadas con agua destilada y fijadas con formol al 4% neutralizado con boratos hasta su análisis histológico. Las larvas y postlarvas fueron embebidas en bloques de parafina. Cada block contenía de 2 a 5 larvas, a las cuales se les realizaron cortes longitudinales y transversales en cada sección usando un microtomo rotatorio marca Leica RM 2155, con cortes de 3 a 5 µm de grosor. Todos los especímenes fueron colocados en portaobjetos de vidrio y secados a la estufa a 40 °C toda la noche. Subsecuentemente, fueron teñidas por la técnica general de Hematoxilina-Eosina para realizar las observaciones morfológicas. Los cortes fueron montados usando el Eukitt (Fluka 03989 BioChemika) y examinados y fotografiados con un microscopio óptico (Leica DMLB) a 40 y 100X.

Resultados

Nuestros resultados muestran que el crecimiento (Fig. 1) y el desarrollo del sistema digestivo de *Petenia splendida* basado en características morfológicas e histológicas se puede dividir en tres fases. 1a) Proliferación celular y morfogénesis de las estructuras digestivas (desde la eclosión hasta el día 11 después de la eclosión, Figs. 2 a 3), 2a) La completa morfogénesis de los órganos digestivos y glándulas accesorias (del día 13 al 19 después de la eclosión, Figs. 4 a 7), 3a) Incremento del crecimiento y ganancia en tamaño de los órganos y glándulas digestivas (a partir del día 19 hasta el día 60 después de la eclosión, Figs. 8 y 9).

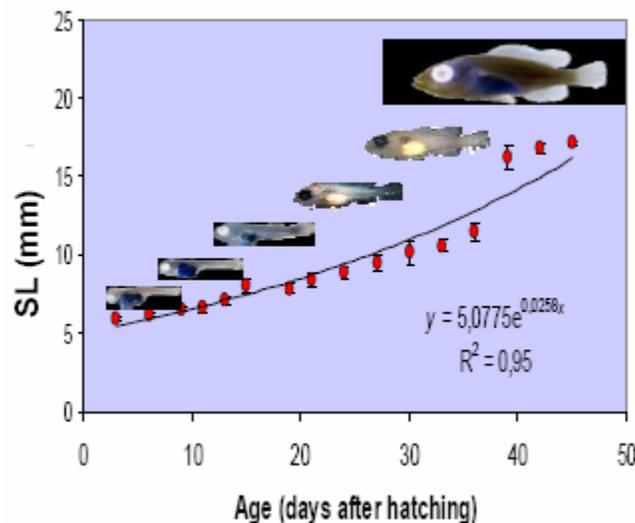


Figura 1. Crecimiento en longitud estándar de las larvas de *Petenia splendida*

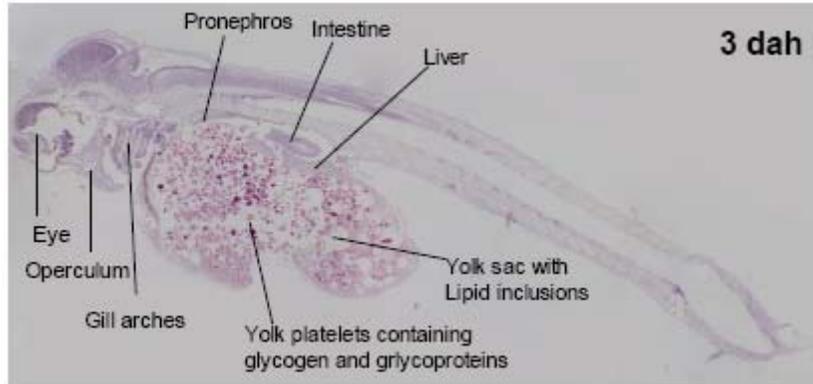


Figura 2. Corte longitudinal de una larva de 3 dde mostrando el intestino, hígado, saco vitelino, ojo, opérculo y arcos branquiales.

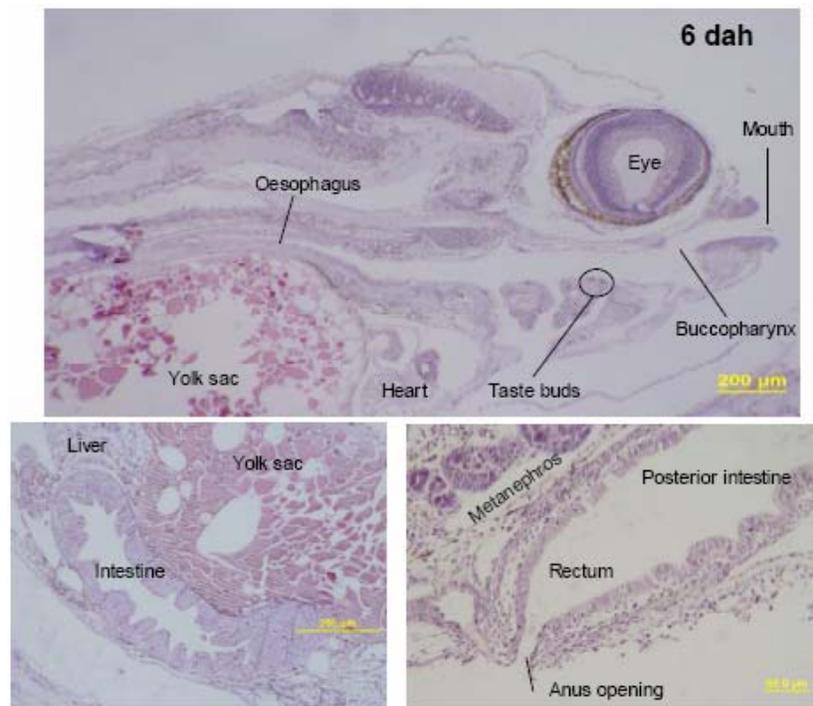


Figura 3. Corte longitudinal de una larva de 6 dde mostrando el inicio de la diferenciación del sistema digestivo en fase alimentación mixta.

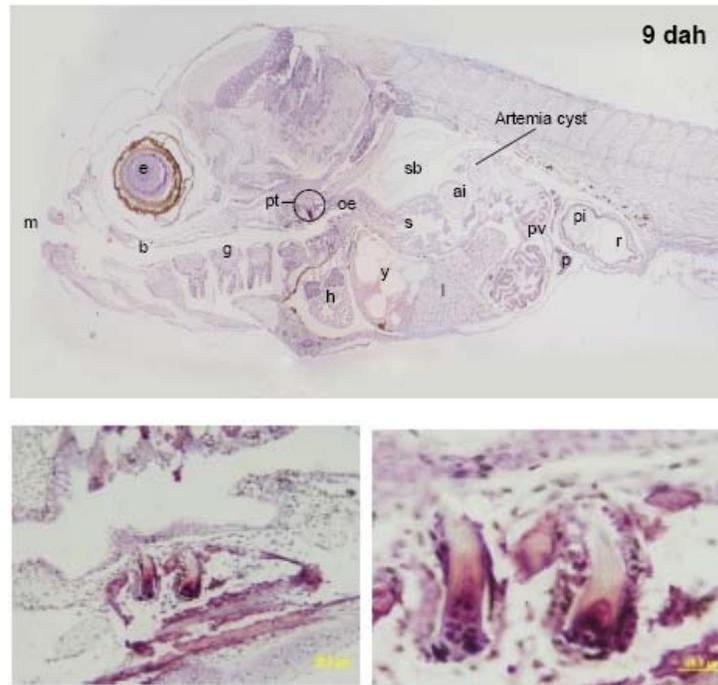


Figura 4. El vitelo está presente (alimentación mixta) para el día 9. Se observa el desarrollo de las células mucosas en el esófago posterior, una marcada proliferación y desarrollo de la mucosa intestinal. Se da un incremento de las inclusiones lipídicas en los enterocitos y hepatocitos. Aparecen las primeras glándulas gástricas rudimentarias.

Abreviaciones: a) ano; ai) intestino anterior; b) bucofaringe; g) arcos branquiales; h) corazón; ii) intestino intermedio; l) hígado; mn) metanefros; p) páncreas; pi) Intestino posterior; pt) dientes faríngeos; pv) válvula pilórica; s) estómago; sb) vejiga natatoria; r) recto; y) vitelo.

Entre los días 9 y 11, se da la absorción total del saco vitelino y el término de la alimentación mixta. Se observa el desarrollo de los dientes branquiales, un incremento importante de la cantidad de mucosa y pliegues gástricos. Se da un incremento en el crecimiento y el número de células gástricas en la región cardiaca del estómago.

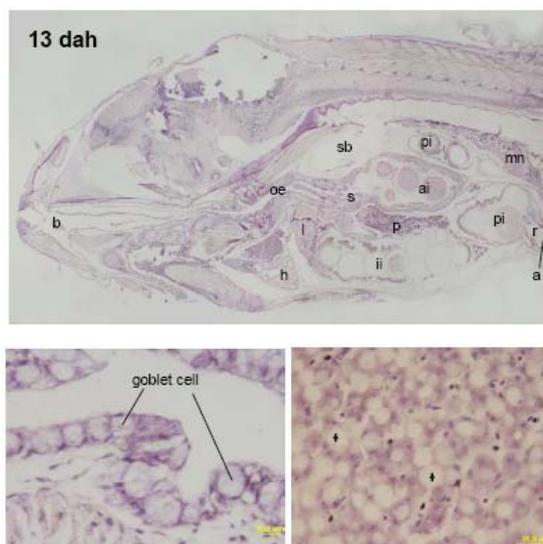


Figura 5. Micrografías de las larvas de 13 dde. Abreviaciones: a) ano; ai) intestino anterior; b) bucofaringe; h) corazón; ii) intestino intermedio; l) hígado; mn) metanefros; p) páncreas; pi) intestino posterior; s) estómago; sb) vejiga natatoria; r) recto. Se observa un incremento en el número de células goblet en el las regiones media y posterior de la bucofaringe y el esófago. Se da una importante acumulación de inclusiones lipídicas (⊕) en los hepatocitos.

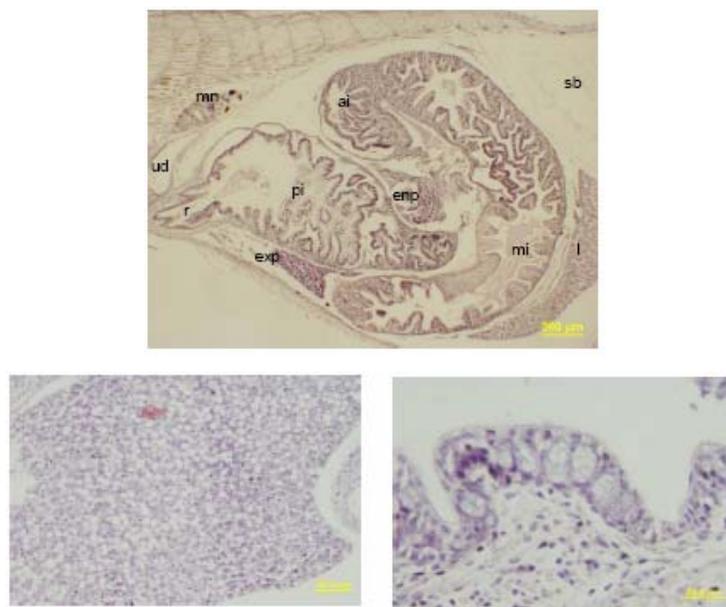


Figura 6. Micrografías de las larvas de 15 dde alimentadas con dieta artificial. Se observan tres segmentos en el intestino bien diferenciados, las secciones anterior, media y posterior. El intestino anterior presenta plegamientos leves, los cuales se incrementan en número y tamaño en las secciones media y posterior. Abreviaciones: a) ano; ai) intestino anterior; ii) intestino medio; l) hígado; mn) metanefros; enp) páncreas endócrino; exp) páncreas exocrino; pi) intestino posterior; sb) vejiga natatoria; ud) ducto urinario; r) recto. El hígado ocupa la mayoría de la parte anterior de la cavidad abdominal, se incrementa el número de células goblet en la parte media y posterior de la bucofaringe.

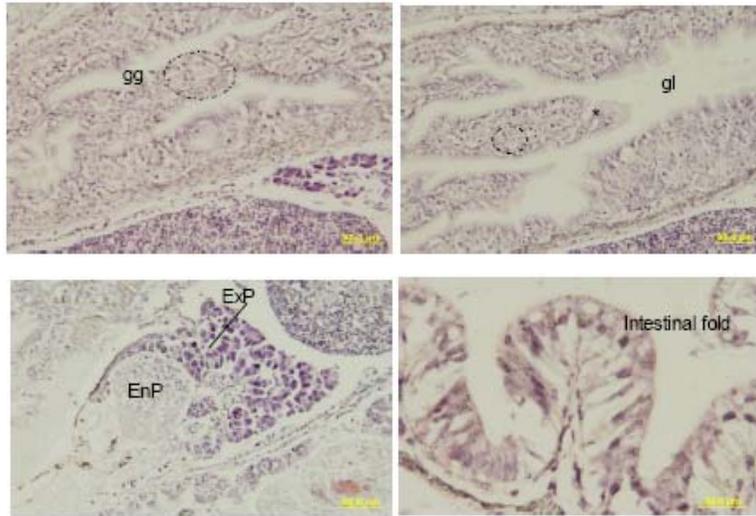


Figura 7. Micrografías de las larvas de 19 dde, donde se observa una importante proliferación de glándulas gástricas (gg) en las regiones cardiacas y pilóricas del estómago. La mucosa gástrica está alineada por un epitelio cúbico de células ciliadas cubiertas por mucinas neutrales (asterisco). Abreviaciones: gl) lumen gástrico; exp) páncreas exocrino; enp) páncreas endócrino.

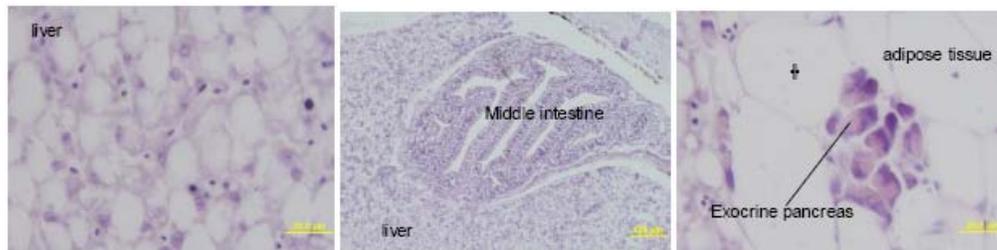


Figura 8. Micrografías de las larvas de 39 dde, se observa un incremento importante de inclusiones lipídicas (‡) en el hígado y tejido adiposo en la cavidad abdominal rodeando el páncreas.

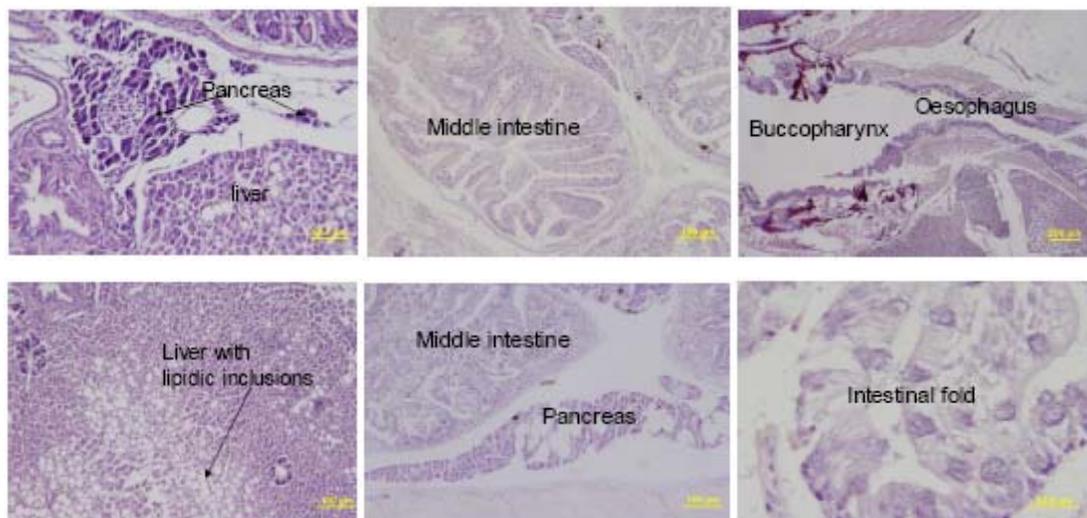


Figura 9. Micrografías de las larvas de los 42 a los 60 dde (fin del estudio), no se observan cambios morfológicos notables en la organización del tracto digestivo de *P. splendida*. Durante este periodo, el tracto digestivo y glándulas accesorias incrementan en tamaño, así como el nivel de inclusiones lipídicas en el hígado y el tejido adiposo del mesenterio.

Concluimos que la ontogenia del sistema digestivo de *P. splendida* (piscívoro de lagos) es muy rápido entre los días 15 y 19 dde, el tracto digestivo está completamente diferenciado en las regiones bucofaringe, esófago, estómago e intestino. Se observa un periodo de alimentación mixta entre los días 6 y 11 dde, durante los cuales los peces se alimentan principalmente con las reservas endógenas y parcialmente de *Artemia*. Los cambios en el grado de inclusiones lipídicas a lo largo del desarrollo reflejan un alto nivel de lípidos que contienen las dietas suministradas (nauplios de *Artemia* y dieta de trucha).

Ontogenia enzimática

Materiales y Métodos.

Crianza larvaria.

El cultivo de las larvas se realizó en un sistema cerrado de recirculación ubicado en el Laboratorio de Acuicultura de la División Académica de Ciencias Biológicas de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Los huevos se obtuvieron por medio del desove espontáneo de individuos mantenidos bajo condiciones controladas para su maduración sexual en el Laboratorio de Acuicultura. Los reproductores se mantienen en un sistema abierto que consta de 15 tanques circulares de plástico de 1.7 m³ de capacidad. En cada tanque se colocaron los nidos artificiales, los cuales fueron fabricados con un armazón de acero

inoxidable en forma de L de 35 cm de ancho por 60 cm de alto, que están forrados de plástico transparente y tienen un liner de acrílico de color blanco, colocado en posición diagonal para proveer de refugio a los reproductores. Se colocó un nido por hembra para favorecer la formación de las parejas y la puesta. Los peces fueron alimentados diariamente con pescado fresco una vez al día a razón del 5% de su biomasa. Una vez colocados los reproductores, se registraron la formación de parejas, se contabilizó el número de desoves por tanque, el número de crías producidas. Una vez obtenido los desoves, se esperó a la eclosión (24 h) en los mismos tanques de reproductores. Los eleuteroembriones fueron cosechados y sembrados en el sistema de crianza larvaria a una densidad inicial de 50 ind/l. Este sistema consta de 30 contenedores de plástico de 80 l de capacidad conectados a un filtro biológico, filtro mecánico, filtro de luz UV, un espumador de albúmina, un termostato de titanio y una columna aireadora. Se realizó el seguimiento diario del oxígeno disuelto, temperatura, amonio total y nitrito total del sistema en cada uno de los tanques utilizando los siguientes equipos: La temperatura (°C) y oxígeno disuelto (mg/l) usando un oxímetro digital (precisión de 0.1°C y 0.01 mg/l respectivamente), el amonio y nitritos totales (ppm) a través de métodos espectrofotométricos utilizando un multiparámetros HANNA.

Toma de muestras.

Las larvas fueron sembradas aleatoriamente en todos los tanques, siendo alimentadas cinco veces al día con nauplios de artemia (2-5 nauplios/ml) desde el momento de la apertura de la boca (día 7 después de la eclosión) hasta el día 20, y posteriormente fueron alimentadas con juveniles de artemia (3-6 ind/ml) hasta el día 30 después de la eclosión. A partir del día 27, se realizó una coalimentación por 3 días utilizando alimento comercial (Silver Cup) hasta sustituir a la artemia. Se tomaron muestras de larvas diariamente (desde 300 hasta 30 larvas totales), las cuales fueron anestesiadas con fenoxietanol y congeladas a -50 °C para su posterior análisis.

Preparación de muestras.

Las muestras de larvas se colocaron en una solución tampón de Tris HCl 50 mM, 20 mM de CaCl₂ a un pH de 7.5, homogenizándolas (Potter de vidrio) con un baño en hielo a 4 °C. Se centrifugó el homogenizado a 12000 rpm a 4 °C por 30 minutos y se recuperó el sobrenadante, el extracto obtenido se centrifugó a 2000 rpm por 2 minutos, se separaron en alícuotas y se almacenaron a -20 °C, para el análisis enzimático.

Determinación de la proteína soluble.

Para el cálculo de la concentración de proteína soluble de cada muestra, se utilizó la técnica de análisis Bradford (Bradford, 1976) Esta técnica esta fundamentada en el cambio de color del Azul Brillante de

Coomassie G-250. Su color rojo se convierte en azul después de formar un complejo con la proteína. El complejo presenta una absorbancia máxima a 595 nm.

Se determinó el contenido de proteína soluble de las distintas muestras de la siguiente manera: a 5 µl de extracto problema se le añadirá 1 ml de reactivo de Bradford. La densidad óptica (DO) será medida a 595 nm en un espectrofotómetro uv/visible entre los 15 y 60 minutos del comienzo de la reacción colorimétrica. Todas las medidas se realizarán por triplicado. La recta patrón o de calibrado se llevará a cabo con una solución estándar de albúmina bovina (1 mg/ml).

La actividad del extracto se determinó utilizando las *Ecuaciones 1, 2 y 3*.

Ecuación 1. Cálculo de la actividad en unidades por ml.

$$\text{Unidades/ml} = \frac{\Delta \text{ABS}_{280\text{nm}} \times \text{volumen final}_{\text{reacción}} (\text{ml})}{\text{CEM}_{\text{tirosina}} \times \text{tiempo} (\text{min}) \times \text{volumen extracto} (\text{ml})}$$

Ecuación 2. Cálculo de la actividad en unidades por mg de proteína soluble en el extracto.

$$\text{Unidades/mg proteína soluble} = \frac{\text{Unidades/ml}}{\text{mg proteína soluble/ml}}$$

Ecuación 3. Cálculo de la actividad en unidades por larva.

$$\text{Unidades/larva} = \frac{\text{Unidades/ml}}{\text{nº larvas/ml}}$$

Siendo;

$\Delta \text{ABS}_{280\text{nm}}$ el incremento de absorbancia a 280 nm; $\text{Volumen final}_{\text{reacción}}$, el volumen final de la reacción (1.52 ml); $\text{CEM}_{\text{tirosina}}$, el coeficiente de extinción molar de la tirosina.

Estudio de proteasas

Las proteasas se determinaron por medio de las siguientes técnicas: La actividad de proteasa ácida, donde se aplicó la técnica de Anson (1938) modificada, utilizando como sustrato hemoglobina (0.5%). La actividad de proteasa alcalina, la cual se realizó por el método de Kunitz (1947) modificado por Walter

(1984) usando como sustrato caseína al 5%. La actividad tripsina, que usa BAPNA (N α -Benzoil-DL-Arginina-P-NitroAnilida) como sustrato según el método de Erlanger *et al.*, (1961). La actividad quimotripsina se determinó por hidrólisis de SAAAPNA (N-Succinil-alanina-alanina-alanina P-Nitroanilida) a 25°C, según la metodología descrita por DelMar *et al.* (1979). La actividad leucina aminopeptidasa, donde se utilizará el método de Maraux (1973) utilizando como sustrato Leucina p-nitroanilida.

El efecto del pH sobre la actividad y estabilidad de las proteasas alcalina en los extractos se determinó usando tampón Universal (Stauffer, 1989) en el rango de pH de 3 a 11. El efecto del pH sobre la estabilidad de la actividad proteasas ácidas y alcalinas se determinará preincubando los extractos a diferentes pH (2-5-7-9-12) durante 180 minutos a 25°C. A intervalos regulares se realizarán por triplicado, la actividad residual con respecto a un control.

Para determinar el efecto de la temperatura sobre la actividad y estabilidad de las proteasas ácidas y alcalinas, los extractos se incubaron en los sustratos hemoglobina y caseína respectivamente, estabilizándolos durante 10 minutos a temperaturas comprendidas entre 10 y 70°C. La reacción se inició por adición del extracto.

La influencia de la temperatura sobre la estabilidad de la actividad enzimática se determinó preincubando los extractos a temperaturas crecientes (25, 30, 40, 50 y 60°C) durante 180 minutos. A intervalos de tiempo regulares, se tomará una pequeña muestra que será rápidamente enfriada en un baño de hielo a 4°C durante 5 minutos. A continuación, se determinó la actividad residual (%) frente a un control sin preincubar.

Los estudios de inhibición enzimática se realizaron por medio de la caracterización del mecanismo de acción enzimática de las distintas enzimas que componen los extractos de las larvas de acuerdo con el método descrito por Dunn (1989). Para la caracterización de la actividad proteasa alcalina se mezcló el extracto enzimático (20 μ l) con 0.5 ml de y 20 μ l de inhibidor (concentración stock), la mezcla será incubada durante 60 min a 25°C. A continuación, se midió la actividad proteasa usando 0.5 ml de sustrato caseína (1% pH 9) a 37°C, en la cual se expresó el porcentaje de inhibición como la pérdida de actividad con respecto a un control de actividad sin inhibidor (100% de actividad). En todos los casos cada ensayo se realizaron por triplicado.

Para la caracterización de la actividad proteasa ácida se incubaron los extractos con los inhibidores (PMSF, SBTI y pepstatin A) y el inactivador quelante (EDTA). En este caso, 5 μ l de la solución

concentrada de inhibidor se preincubaron con 20 ml del extracto enzimático durante 60 minutos a 25 °C. A continuación, se añadió 1 ml de sustrato (hemoglobina al 0.5% en 0.1 M Glicina/HCl, pH 2.0).

Estudio de lipasas.

La actividad lipasa se realizó a través del método de Versaw et al (1989), en el cual a 100 µl de tauracolato de sodio (100 mM) y a 1.9 ml de Tris HCl 50 mM (pH=7.2) se le agrega 20 µl de extracto enzimático, se incuba a temperatura ambiente por 5 min y se inicia la reacción con 20 µl de β-naftil caprilato (200mM) por 30 min a temperatura ambiente, se le agrega 20 µl de fast blue (100 mM) y se incuba por 5 min a temperatura ambiente. Se detiene la reacción con 200 µl de TCA (0.72 N), y se clarifica la reacción con 2.71 ml de etanol acetato de etilo (1:1 v/v). Se agita en el vortex y se lee la absorbancia a 540 nm en cubetas de vidrio o cuarzo.

Estudio de amilasas

La actividad α-amilasa (α1-4 glucán 4-glucanohidrolasa) de los extractos se valoró incubando a 37 y 25°C respectivamente, 50 ml de extracto con 0.25 ml de almidón soluble 1% (p/v) en 0.25 ml de tampón 0.1M citrato-fosfato pH 7.0. Después de un tiempo de incubación lineal (30 minutos), se medieron los azúcares reductores a 600nm usando el procedimiento descrito por Robyt y Whelan (1968). Para determinar el coeficiente de extinción molar de la maltosa se construyó una curva patrón con distintas concentraciones de maltosa. Se definió una unidad como la cantidad de enzima que libera 1 µg de maltosa por minuto.

Estudio de fosfatasas

La variación de la actividad fosfatasa ácida y alcalina, a lo largo del desarrollo ontogénico de las larvas, se ensayó utilizando como sustrato 4 nitrofenilfosfato. Para ello se incubó 0.1 ml de extracto larvario con 0.1 ml de 4 nitrofenilfosfato al 2% en tampón 41,6 mM citrato a pH 4.8, o en tampón 97.5 mM dietanolamina a pH 9.8, para la actividad fosfatasa ácida y alcalina respectivamente. Después de 30 minutos de incubación a 37°C se detuvo la reacción con NaOH 0.05 N y se midió la absorbancia a 405 nm. Se definió una Unidad como la cantidad de enzima que produce un $\Delta\text{ABS}_{405\text{nm}}$ de 0.01.

Caracterización enzimática

Con la técnica de electroforesis se caracterizaron proteínas hidrosolubles así como se visualizara su actividad enzimática (zimogramas). A partir de estos resultados se determinaron:

- 1.- El número de proteínas con actividad enzimática, así como su peso molecular.
- 2.- Mediante el uso de inhibidores específicos se caracterizó que enzimas componen un extracto enzimático bruto.
- 3.- Se determinaron cualitativamente cuando una larva pasa a su estadio juvenil.

La técnica de electroforesis fue desarrollada por Laemmli (1970) para estudiar proteínas en fagos, la cual se utilizó para la caracterización del equipamiento enzimático. En el caso de las enzimas, se utilizó la siguiente metodología:

Para el estudio de las proteasas alcalinas de los extractos se realizaron electroforesis en presencia de lauril (duodecil) sulfato sódico (SDS-PAGE), en condiciones desnaturalizantes, empleando un sistema discontinuo (gel almacenador preparativo y gel separador resolutivo), de acuerdo con la metodología descrita por Laemmli (1970) y adaptada para visualizar actividad proteasa alcalina por García-Carreño *et al.*, (1993).

Los extractos, una vez preparados los geles, se mezclaron a partes iguales con el tampón de muestra (0.125 Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS (p/v), 20% glicerol (v/v), 0.04% (p/v) azul de bromofenol (2X)), procurando que la concentración final de proteína soluble en la muestra sea de 1,5 a 3 mg/ml, para aplicar unos 35-40 µg de proteína réplica. El azul de bromofenol es un colorante trazador que permite visualizar el frente de electroforesis. En todas las electroforesis se utilizó un patrón comercial, LWM de Pharmacia Biotech.

El patrón se preparó disolviendo en un vial (aprox. 600 µg de proteína) con 100 µl de tampón que contenga 0.0625 M Tris-HCl, pH 6.8; 2.5% SDS; 0.04% azul de bromofenol y éste se hirvió durante 5 minutos a 100°C.

Una vez montados los geles en la cubeta, se vertió el tampón de electroforesis 0.025M Tris, 0.192 M glicina, pH 8.3; 0.1% SDS (p/v), y a continuación se aplicaron las muestras (máx. 35 µl por pocillo, excepto para el marcador de pesos moleculares que se aplicaron siempre 5 µl en cada gel). Una vez

dispensadas las muestras en los pocillos, se colocó la cubeta en una cámara a 4°C y se conectó a una fuente de alimentación desarrollándose la electroforesis a voltaje constante de 200 volts (100 voltios por gel) e intensidad de 120 mA (60 mA por gel) durante unos 45 minutos.

Se realizaron dos tratamientos en función del tipo de revelado de los geles. Por un lado, para detectar actividad proteasa, seguido a la electroforesis, se sumergieron los geles en una solución de caseína Hammerstein al 1% tamponada en 50 mM TRIS-HCl, pH 9, durante 30 minutos a 5°C y, a continuación se pasarán a otra solución similar a 25°C durante 90 minutos, en ambos casos sin agitación. Seguidamente, se lavaron con agua destilada y se fijaron en una solución de ácido tricloro acético (TCA) al 12%. La fijación después de la incubación es esencial ya que eliminará los productos de la degradación proteolítica (péptidos y aminoácidos) y precipitará la caseína no degradada en la matriz del gel.

Por otra parte, para la detección de proteínas totales se fijó, directamente después de la electroforesis, con TCA al 12%. Para la tinción se utilizó la metodología de Weber y Osborn, (1969) con algunas modificaciones. Los geles permanecieron durante toda la noche y a temperatura ambiente en la solución de tinción compuesta de 0.1% azul brillante de Coomassie (BBC R-250) en metanol: ácido acético y agua destilada (50:20:50). Para revelar los geles se utilizó una solución de metanol: ácido acético: agua (35:10:55). Durante este proceso pudo verse las bandas claras sobre un fondo azul intenso (caseína embebida en el gel) que corresponde a proteínas con actividad proteolítica. Una vez desteñidos después de varios lavados, los geles se sumergieron en agua destilada para que se hidraten. Finalmente los geles fueron escaneados para el análisis de las diferentes bandas.

Los parámetros que se emplearon para caracterizar las bandas de actividad proteasa presentes en los electroforegramas fueron las siguientes:

- a) Rmb o electromobilidad absoluta: es la distancia, en mm, desde el extremo catódico del electroforegrama (comienzo del gel separador) hasta el margen superior de la banda proteica (Igbokwe y Downe, 1978).
- b) Rf o electromovilidad relativa: se define como el cociente entre la electromovilidad absoluta (Rmb) y la distancia desde el origen hasta un punto de referencia (normalmente el frente de electroforesis).
- c) Masa molecular (Mr): La determinación de la masa molecular (en daltons o kilodaltons) se basa en la relación lineal entre la movilidad relativa de una proteína y el logaritmo decimal de su peso molecular (Laemmli, 1970). Para el cálculo del peso molecular se procederá a construir una recta de regresión lineal representando en abscisas la electromovilidad relativa de las proteínas patrón empleadas (LMW) frente al

logaritmo decimal de sus pesos moleculares. De este modo, se determinará la ecuación de la recta, así como los pesos moleculares de las proteasas presentes en los distintos extractos.

La actividad de proteasas ácidas por electroforesis se realizó en condiciones nativas (PAGE) se desarrollaron con los mismos tampones descritos pero con pH neutro, además el tampón de electroforesis no contiene SDS. De este modo, se estudiaron la estabilidad de la actividad proteolítica a estos tampones tanto en pepsina porcina como en los extractos. Para la detección de actividad proteolítica después de la electroforesis, los geles se sumergieron en una solución de HCl 0.1 M hasta reducir su pH a 2 (el marcador del tampón de muestra se pondrá amarillo). A continuación se colocaron en frío (4°C) en una solución de hemoglobina al 0.25% en tampón 0.1 M glicina-HCl, pH 2.0, transcurridos 30 minutos se pasaron a otra solución similar a 37°C por un tiempo de 90 minutos. Finalmente se lavaron con agua destilada y se fijaron en una solución de ácido tricloro acético (TCA 12%). Para la detección de proteínas se fijaron los geles directamente en TCA después de la electroforesis.

El procedimiento para la tinción, fotografiado y conservación de los geles fue similar al descrito para las proteasas alcalinas. Las bandas de actividad proteasa presentes en los electroforegramas serán caracterizadas por los mismos parámetros descritos en el párrafo anterior.

Los estudios de inhibición por técnicas electroforéticas, complementaron la información mediante electroforesis SDS-PAGE y el uso de inhibidores. Se estudió la evolución de las proteasas alcalinas con objetivo de cuantificar el número de bandas caseinolíticas, así como su masa molecular. Además de establecer los tipos de proteasas que componen los extractos.

Resultados

El crecimiento de las larvas fue relativamente lento durante los primeros 30 días después de la eclosión (DDE), para después incrementarse paulatinamente a partir del día 33 DDE hasta el día 42 y acelerarse a partir del día 45 y hasta el día 60 DDE (Fig. 10).

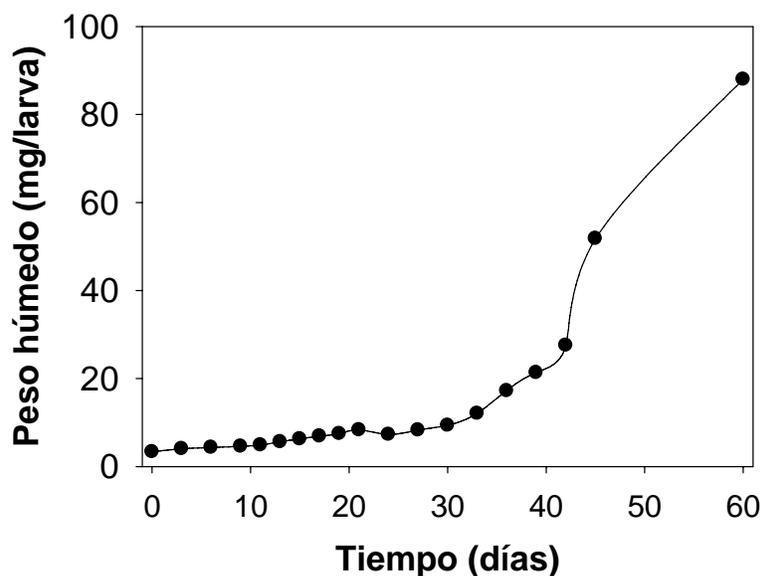


Figura 10. Crecimiento en peso (promedio \pm ES) de las larvas de la mojarra tenguayaca a lo largo de su ontogenia inicial.

La actividad específica para las proteasas alcalinas en las larvas de la *P. splendida* se detectó a partir del 11 DDE expresando su máxima actividad entre los días 30 y 40 DDE con una caída en la actividad a partir del día 42 hasta el día 60 DDE (Figs. 11). La actividad individual específica de las proteasas alcalinas fue detectada a partir del día 11 DAH, con un incremento gradual, hasta alcanzar la máxima actividad hasta el día 30 DDE mostrando un descenso a partir del día 35 DDE (Fig. 12). La actividad enzimática para las proteasa acidas fue detectada a partir del día 11 expresando su máxima actividad el día 20, manteniendo su actividad de manera fluctuante durante el periodo de larvicultivo (Fig. 13 y 14). El máximo nivel de actividad para la tripsina en lo específico como en lo individual se observó hasta el día 60 DDE (Figs. 15 y 16). La actividad específica e individual de la quimotripsina mostró un incremento a partir de del día 30 DDE manteniendo s nivel constante hasta el día 60 donde alcanzó su máxima actividad (Figs. 17 y 18). La actividad específica de la aminopeptidasa muestra alta actividad desde el inicio del cultivo incrementando progresivamente hasta alcanzar su máximo nivel de actividad entre los días 20 y 40 DDE con una caída a partir del día 45 (Fig. 19). La actividad individual para la leucina aminopeptidasa se observó desde el inicio del cultivo incrementando su actividad entre los días 35 y 45 DDE alcanzando su máxima actividad en el día 60 DDE (Fig. 20).

El máximo nivel de actividad de las lipasas se observó desde el inicio del cultivo alcanzando su máxima actividad a partir del día 40 DDE (Fig. 21), en el caso de la actividad individual de lipasas se presentó a partir del inicio del cultivo siendo fluctuante hasta los días 45 y alcanzando su máxima actividad en el 60

DDE (Fig. 22). La actividad de la α -amilasa se detectó a partir de los primeros días de cultivo manteniéndose de manera fluctuante y con baja actividad, sin embargo su máxima actividad se refleja entre los días 45 y 60 DDE (Fig. 23). El nivel de actividad individual para la alfa amilasa se muestra a partir de los días 0 DDE manteniendo su nivel de actividad hasta el día 45 y 60 donde presenta su más alto nivel de actividad (Fig. 24). En cuanto a la actividad específica de las fosfatasa alcalinas la máxima actividad se expreso desde el día 0 DDE con un ligero descenso en la actividad manteniéndose fluctuante a partir de los días 9 hasta el día 35, mostrando un descenso en la actividad para el día 40 DDE (Fig. 25). La actividad individual de la fosfatasa alcalina expresó su máxima actividad una actividad específica alta desde el día 0 DDE con un comportamiento fluctuante mostrando un descenso en la actividad hasta el día 60 DDE (Fig. 26). La actividad específica de la fosfatasa acida presenta un incremento gradual desde el 0 hasta el 10 DDE, alcanzando su máxima actividad hasta el días 35 DDE y mostrando un descenso en la actividad a partir del día 40 hasta el día 60 DDE (Fig. 27). La actividad individual muestra un comportamiento similar al inicio del cultivo expresando su máxima actividad hasta el día 35 DDE con un descenso en la actividad hasta el día 60 DDE (Fig. 28).

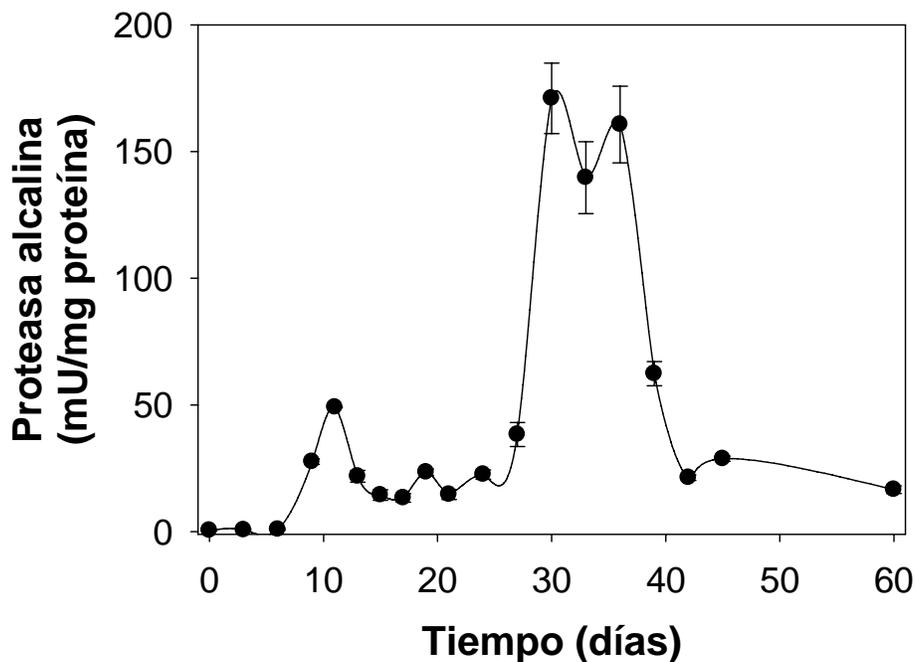


Figura 11. Actividad de proteasas alcalinas (promedio \pm DE) de la mojarra tenguayaca a lo largo de su ontogenia inicial.

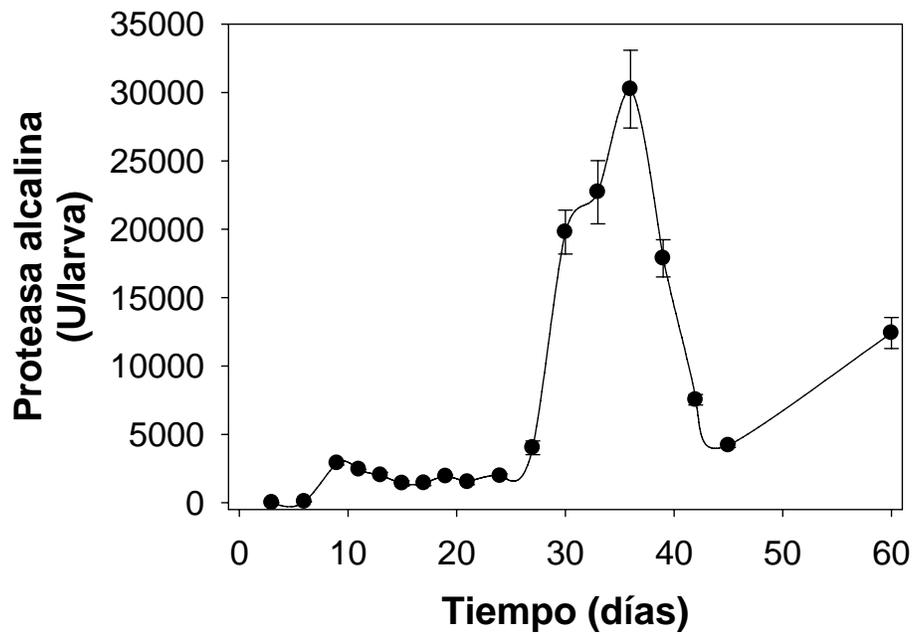


Figura 12. Actividad individual de proteasas alcalinas (promedio \pm DE) de la mojarra tenuyaca a lo largo de su ontogenia inicial.

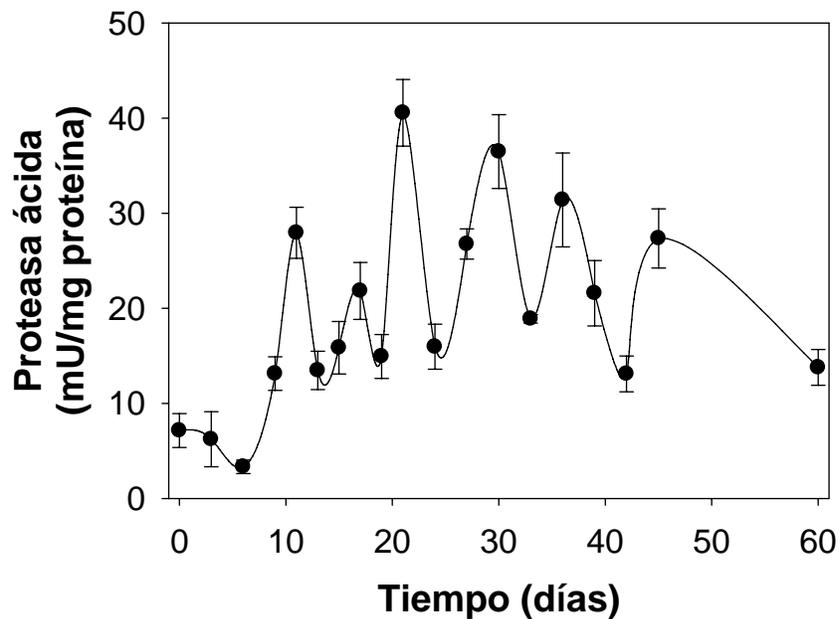


Figura 13. Actividad de proteasas ácidas (promedio \pm DE) de la mojarra tenuyaca a lo largo de su ontogenia inicial.

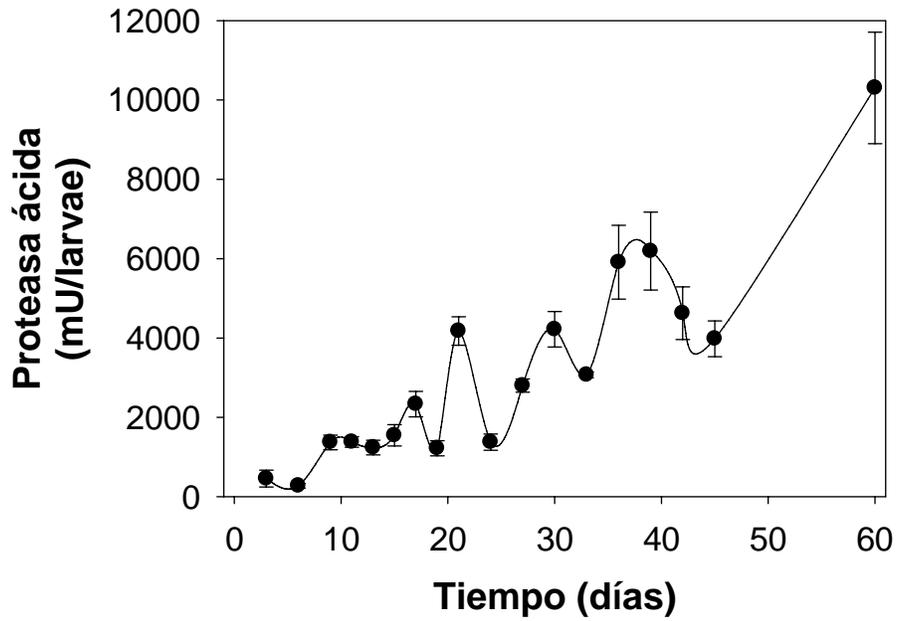


Figura 14. Actividad individual de proteasas ácidas (promedio \pm DE) de la mojarra tenuguyaca a lo largo de su ontogenia inicial.

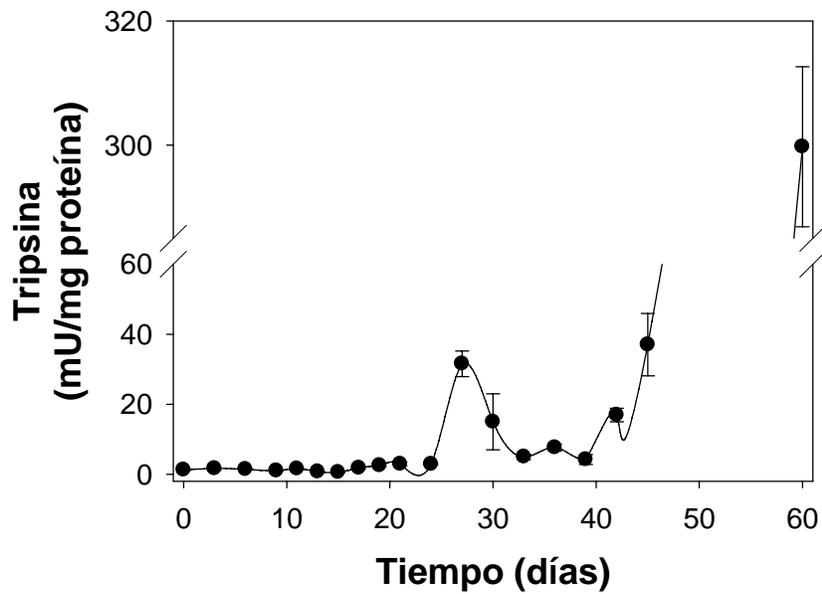


Figura 15. Actividad específica de tripsina (promedio \pm DE) de la mojarra tenuguyaca a lo largo de su ontogenia inicial.

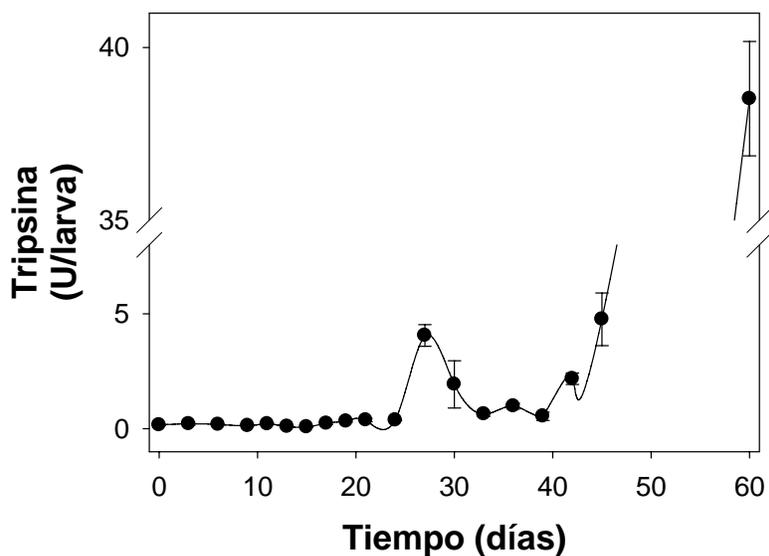


Figura 16. Actividad individual de tripsina (promedio \pm DE) de la mojarra tenguayaca a lo largo de su ontogenia inicial.

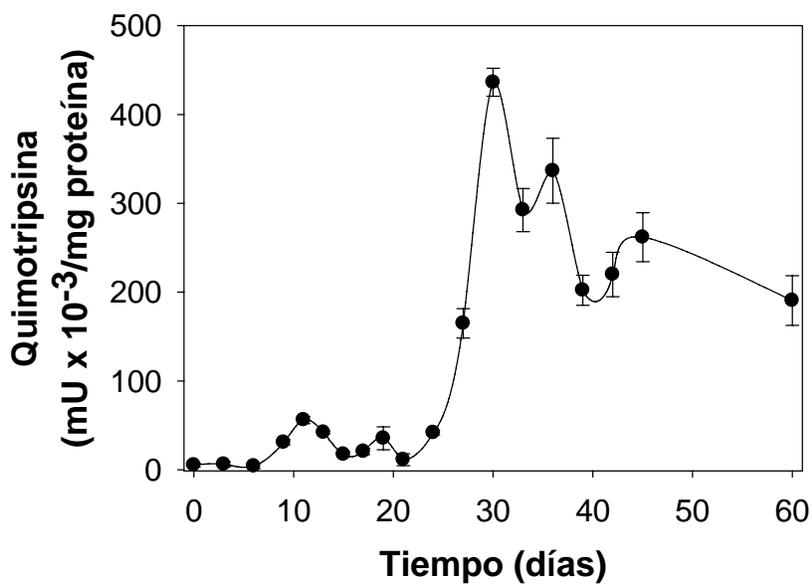


Figura 17. Actividad específica de quimotripsina (promedio \pm DE) de la mojarra tenguayaca a lo largo de su ontogenia inicial.

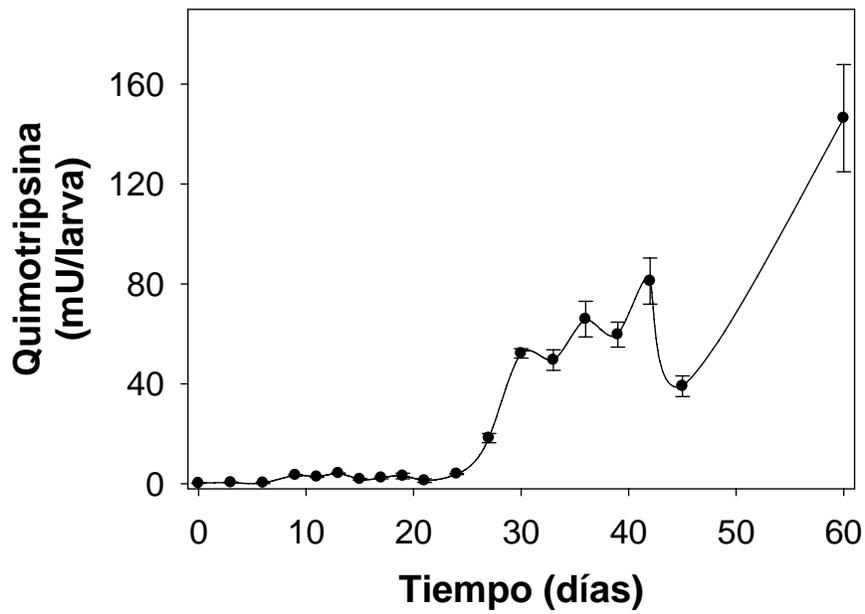


Figura 18. Actividad individual de quimotripsina (promedio \pm DE) de la mojarra tenguayaca a lo largo de su ontogenia inicial.

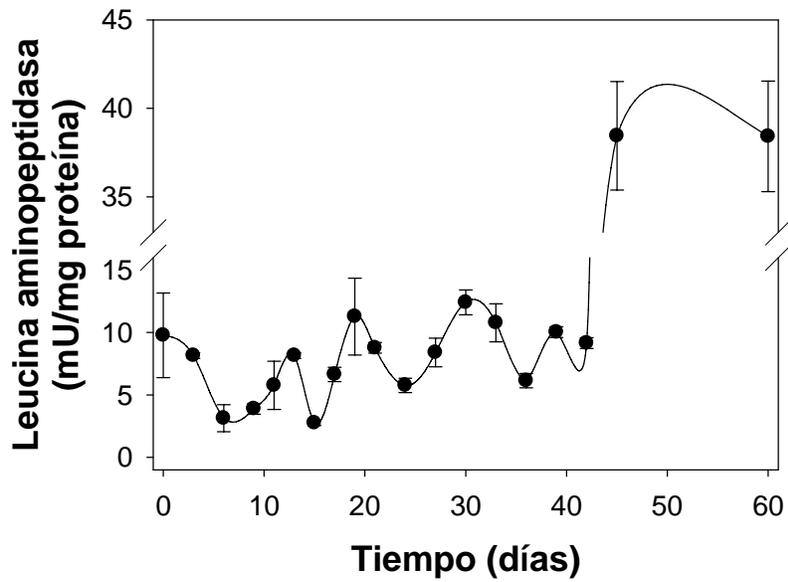


Figura 19. Actividad específica de leucina aminopeptidasa (promedio \pm DE) de la mojarra tenguayaca a lo largo de su ontogenia inicial.

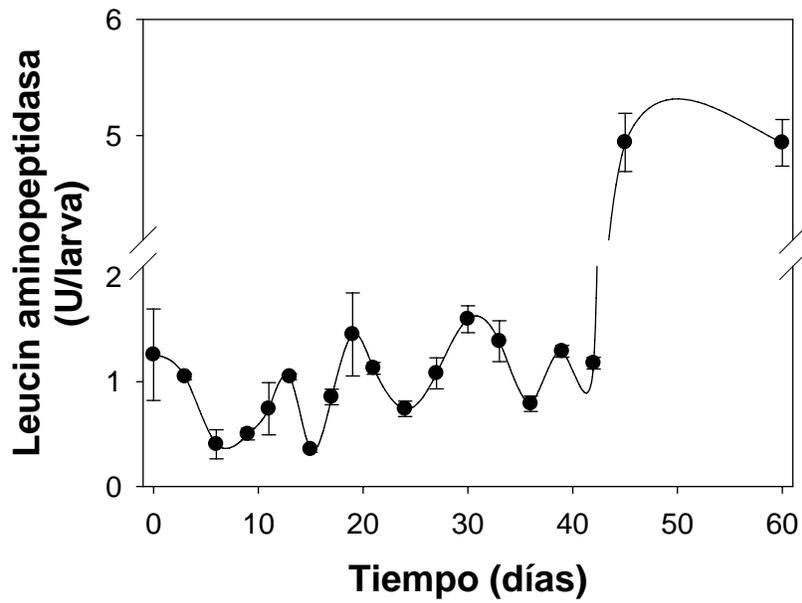


Figura 20. Actividad individual de leucina aminopeptidasa (promedio \pm DE) de la mojarra tenguayaca a lo largo de su ontogenia inicial.

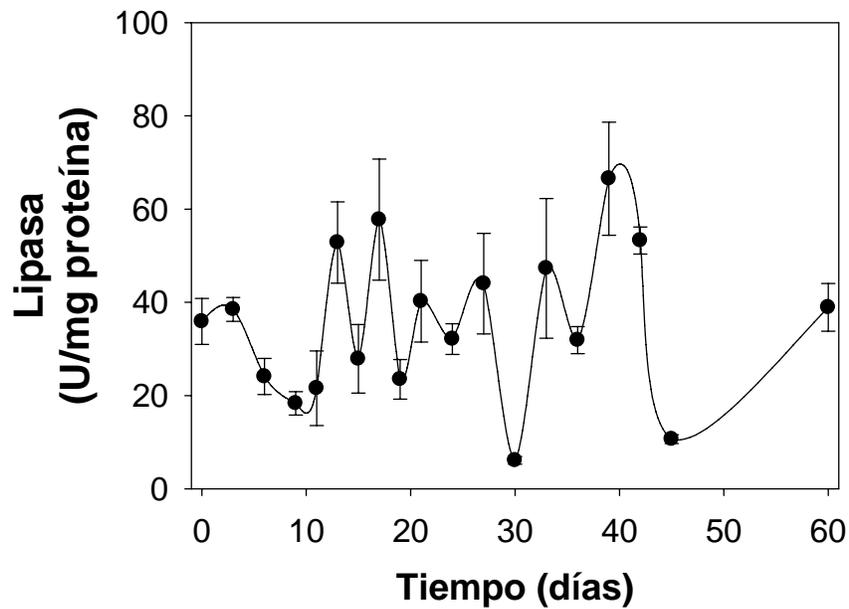


Figura 21. Actividad específica de la lipasa (promedio \pm DE) de la mojarra tenguayaca a lo largo de su ontogenia inicial.

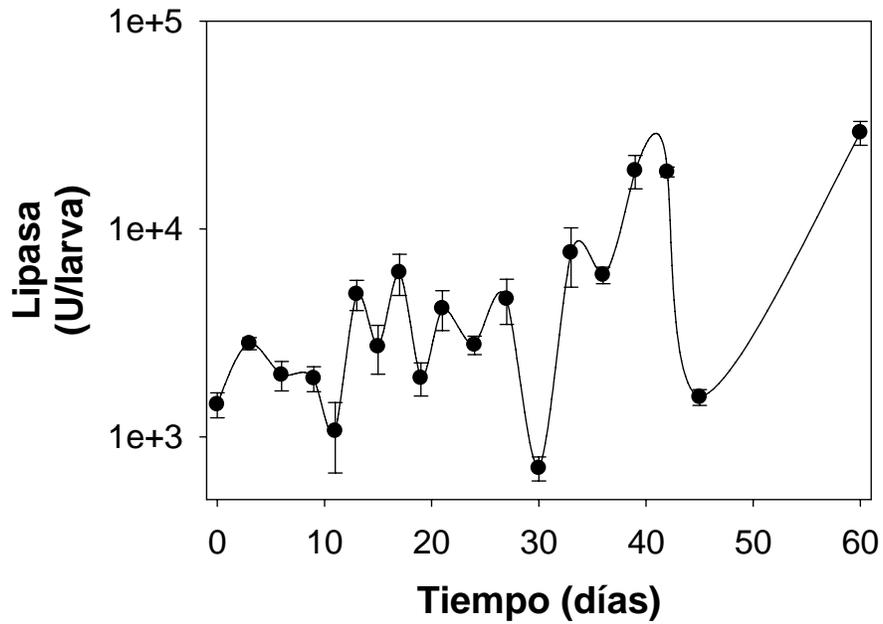


Figura 22. Actividad individual de la lipasa (promedio \pm DE) de la mojarra tenuguyaca a lo largo de su ontogenia inicial.

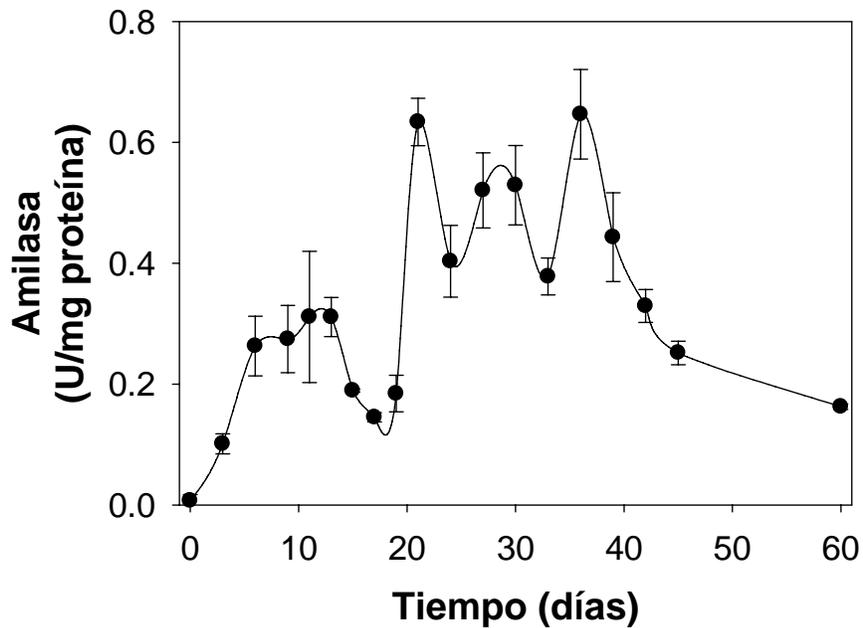


Figura 23. Actividad específica de la amilasa (promedio \pm DE) de la mojarra tenuguyaca a lo largo de su ontogenia inicial.

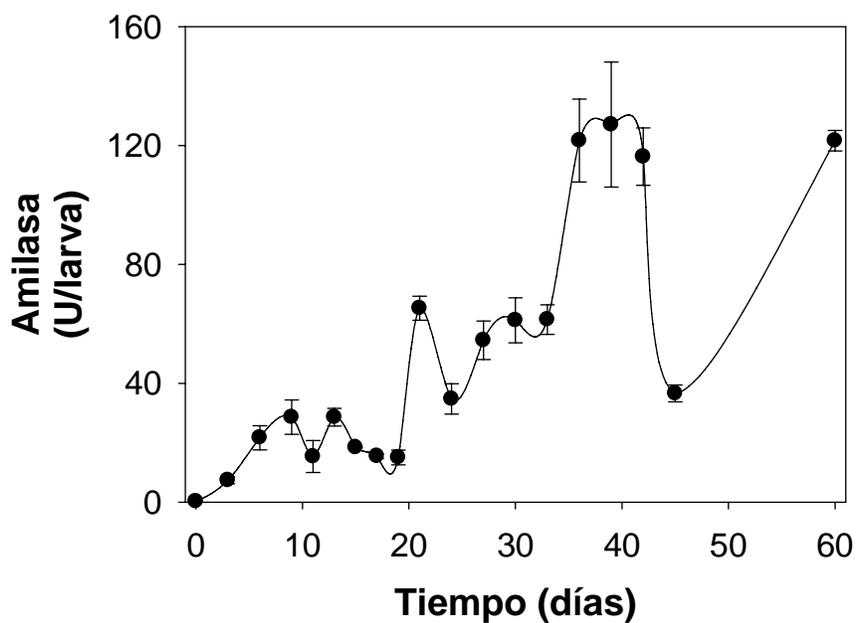


Figura 24. Actividad individual de la amilasa (promedio \pm DE) de la mojarra tenuguyaca a lo largo de su ontogenia inicial.

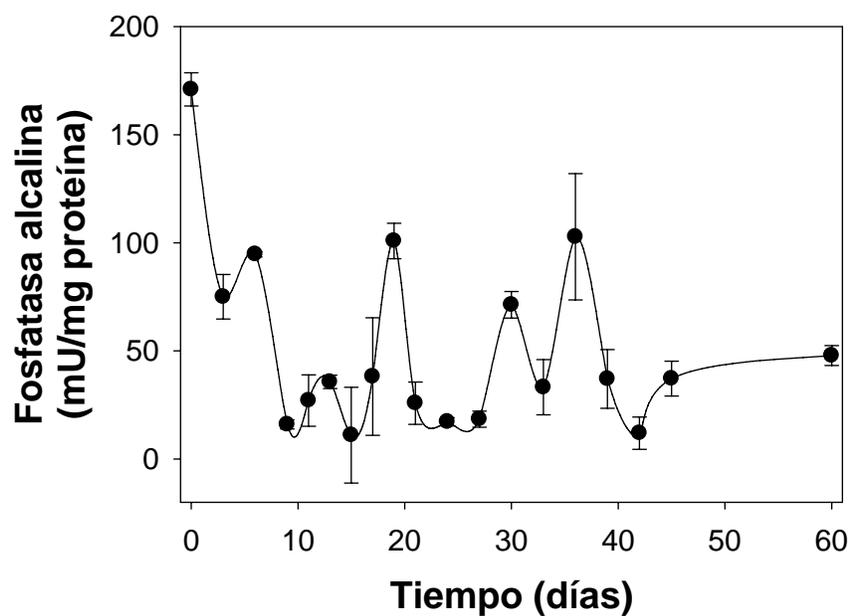


Figura 25. Actividad específica de la fosfatasa alcalina (promedio \pm DE) de la mojarra tenuguyaca a lo largo de su ontogenia inicial.

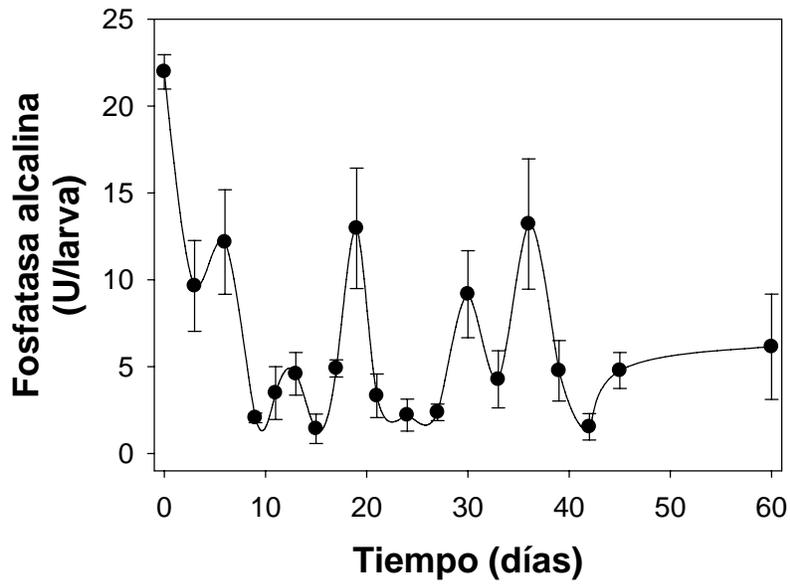


Figura 26. Actividad individual de la fosfatasa alcalina (promedio \pm DE) de la mojarra tenuguyaca a lo largo de su ontogenia inicial.

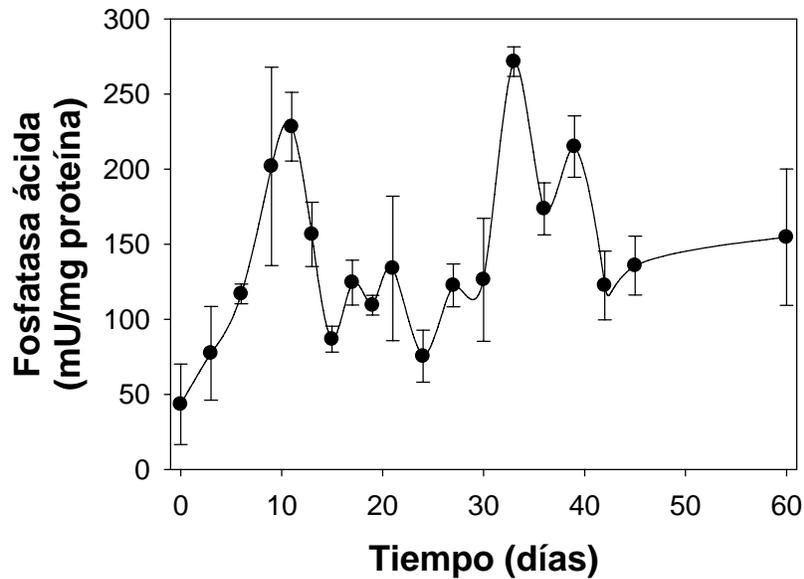


Figura 27. Actividad específica de la fosfatasa ácida (promedio \pm DE) de la mojarra tenuguyaca a lo largo de su ontogenia inicial.

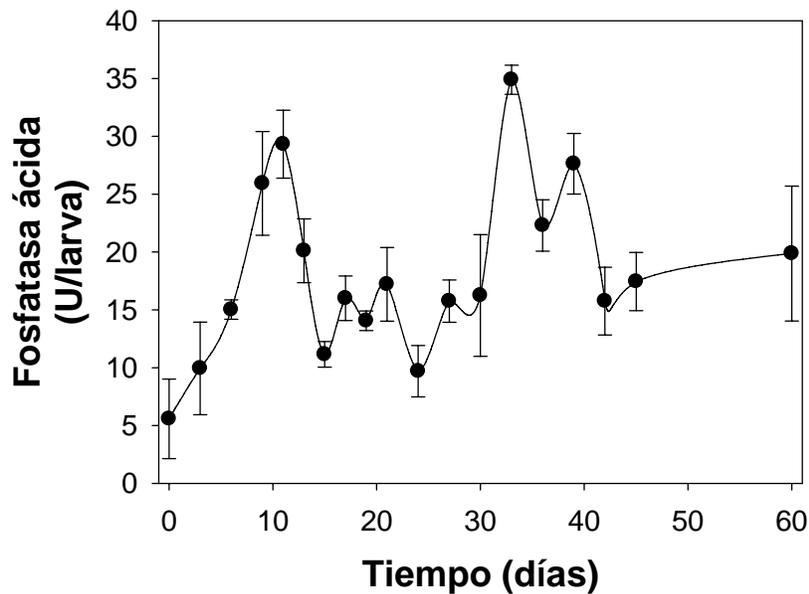


Figura 28. Actividad individual de la fosfatasa ácida (promedio \pm DE) de la mojarra tenguayaca a lo largo de su ontogenia inicial.

El zimograma de proteasas alcalinas muestra la aparición de series de bandas a partir del día 1 DDE, dos bandas para el día 3 y 6 DDE, la aparición de 3 bandas con actividad para el 9 DDE y en los días 11, 30 y 60 la aparición de cuatro bandas con actividad proteolítica (Fig. 29). En el caso del zimograma para proteasas ácidas, se observa la aparición de una sola banda con actividad proteolítica a partir del día 6 DDE, la cual cambia en intensidad pero permanece durante el resto de los días de muestreo (Fig. 30).

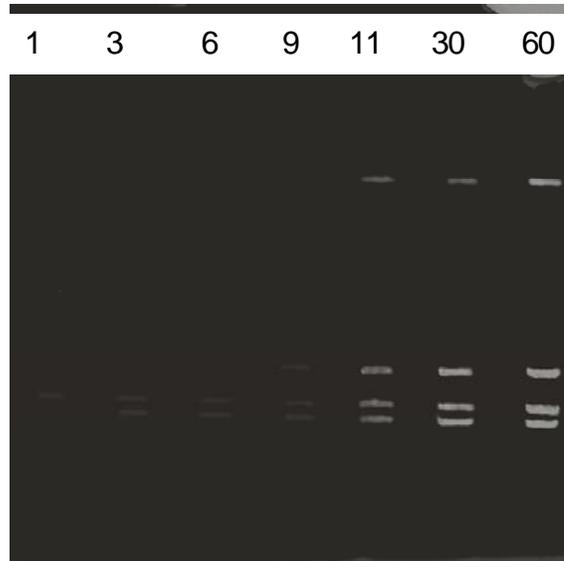


Figura 29. Ontogenia enzimática de proteasas alcalinas en tenguayaca usando SDS-PAGE discontinuo. Los números indican los días después de la eclosión.

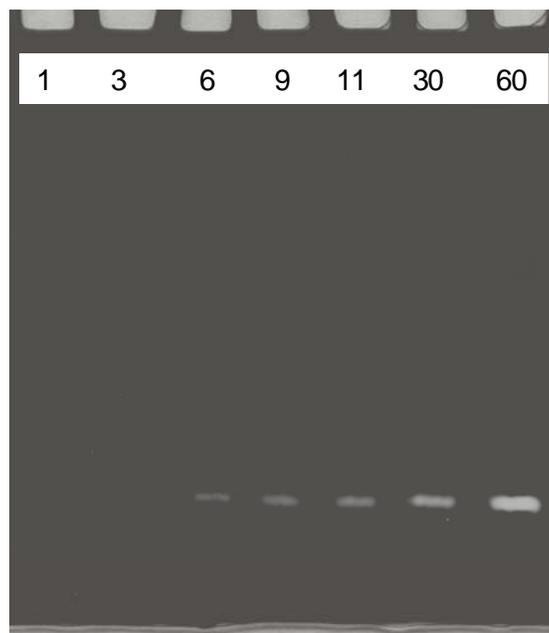


Figura 30. Ontogenia enzimática de proteasas ácidas tenguayaca usando PAGE continuo. Los números indican los días después de la eclosión.

Expresión molecular de enzimas en tenguayaca.

Materiales y Métodos.

Obtención de muestras.

Se obtuvieron las muestras de una serie de desoves consecutivos obtenidos de reproductores de la mojarra tenguayaca (*Petenia splendida*) del Laboratorio de Acuicultura de la UJAT. Se realizó un cultivo de larvas y se tomaron muestras diarias hasta el día 10 posteclosión y a partir de este momento se tomaron cada tercer día hasta el día 20 posteclosión para evaluar la expresión molecular de enzimas digestivas (tripsina y aminopeptidasa) usando RT-PCR.

Oligonucleótidos.

Antes de proceder a la extracción de RNA total de las larvas, se probaron los oligonucleótidos (“primers”) diseñados y validados para otras especies de peces marinos como la lubina europea (*Dicentrarchus labrax*) y un lenguado (*Pleuronectes americanus*) los cuales están registrados en GENE BANK (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Extracción de RNA.

La extracción de RNA total se efectuó usando aproximadamente 150mg de tejido (peso húmedo). La extracción se realizó de acuerdo al método del reactivo de TRIZOL Invitrogen, Life Technologies. Una vez obtenido, el RNA se almacenó en alícuotas de 40µl a -80 °C para la retro-transcripción. Para la obtención de RNA de buena calidad, éste se trató con DNase I, de acuerdo a las especificaciones del fabricante (Sigma, Chemical Co.). Del RNA total obtenido, se tomaron 5µl para ser retrotranscritos a cDNA utilizando el kit comercial Improm II de Promega de acuerdo a las especificaciones del fabricante.

La amplificación del cDNA se realizó en un termociclador Icycler, de BIO-RAD con sistema de gradiente de temperatura, optimizándose en términos de temperatura de alineamiento y concentración de Mg²⁺ (1.5 mM) y 60°C para ambos juegos de primers (Tabla 16). La calidad del cDNA fue cuantificado mediante absorbancia, con el biofotómetro, Eppendorf. Siendo el estándar de lectura de doble cadena (dsDNA) para un cDNA mayor a 1.6 y menor a 2.1. Los productos de amplificación fueron separados por electroforesis en agarosa 1.5% y posteriormente analizados en un fotodocumentador (Gel-Pro transiluminator) (Tabla 1).

Tabla 1. Concentraciones y cantidades utilizadas para la amplificación específica de los genes tripsina y aminopeptidasa.

Mezcla maestra	1 Reacción
H ₂ O para PCR	8.48µL
Buffer para PCR 10x	1.25µL
MgCl ₂ 25 mM	0.75µL
dNTP's	0.66µL
Taq polimerasa 5 unidades/µL	0.1µL
Primer Forward	0.13µL
Primer Reversa	0.13µL
Templado	1µL
TOTAL	12.5µL

Las condiciones de temperatura y tiempo para la amplificación fueron las siguientes (Tabla 2):

Tabla 2. Temperaturas y tiempos utilizados en el PCR de punto final, para la amplificación específica de tripsina y aminopeptidasa.

Desnaturalización	Desnaturalización	Alineamiento	Extensión	Extensión	
94°C	94°C	52°C	72°C	72°C	4°C
30 seg	1 minuto	1min 30 seg	2 minutos	7 minutos	∞
1 ciclo		35 ciclos		1ciclo	

La recuperación y purificación del cDNA se obtuvo cortando las bandas de interés con un bisturí estéril en un transiluminador y en base al protocolo del kit GENE CLEAN SPIN KIT (BIO 101 INC, CA USA). Finalmente, los segmentos amplificados por PCR fueron clonados de acuerdo al protocolo del kit TOPO TA CLONING (INVITROGENE, Life Technologies, utilizando células competentes de *E. coli* y el plásmido pCR 2.1 como vector. Una vez clonados, se obtuvieron los plásmidos de las células de *E. coli* usando el procedimiento del kit RPM (BIO 101 INC, CA USA) para enviarse a secuenciar y obtener sus homologías con los bancos de secuencias.

Cuantificación de los mRNA

Para conocer los niveles basales de mRNA se realizó una cuantificación relativa en un termociclador de tiempo real ABI Prism 7000 (Applied biosystems) generando un rango dinámico con una curva estándar de calibración usando diluciones seriadas de los plásmidos que contenían los fragmentos de tripsina y aminopeptidasa, de acuerdo a los parámetros siguientes (Fig. 31):

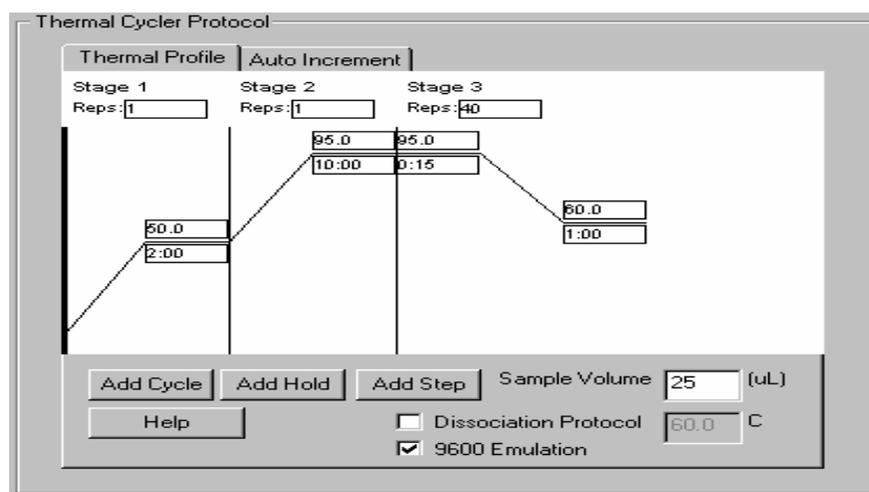


Figura 31. Condiciones de temperatura y tiempos para la amplificación específica de tripsina y aminopeptidasa en tiempo real.

Se realizó una curva estándar para cada uno de los genes estudiados. Cabe señalar que se seleccionó como control endógeno al gen 18s, el cual es comúnmente utilizado como referencia activa. Las amplificaciones se determinaron por cuadruplicado. A partir de estos resultados se construyó una gráfica con los valores de Ct (Cycle threshold o Umbral de detección) versus el logaritmo de la concentración, obteniendo así una figura que representa el incremento en el número de copias de DNA amplificado con respecto a cada ciclo. Si fijamos un nivel de fluorescencia dentro de la fase geométrica de la amplificación (es decir, si fijamos el número de moléculas de DNA finales, (P), entonces el número de ciclos (n) que son necesarios para que la fluorescencia alcance este valor fijo, será directamente proporcional a la concentración inicial (T). A este valor se le conoce como Ct o Threshold cycle. Para normalizar y asegurar que las variaciones observadas entre los valores de los genes blanco tripsina y aminopeptidasa y la referencia activa 18s sean realmente debidas a cambios de expresión y no a cantidad variable de muestra añadida entre dos ensayos se divide el valor obtenido del gen de interés entre el valor obtenido para la referencia activa.

Con estos resultados se procedió a hacer la cuantificación de cada una de las muestras amplificadas mediante PCR en tiempo real, hechas por triplicado y con los mismos rangos de temperatura y tiempo que los utilizados para la obtención de los datos iniciales utilizados para la elaboración de la curva estándar. Una vez normalizado el resultado de expresión de tripsina y aminopeptidasa con respecto control endógeno o referencia activa 18s, se divide este valor entre el valor de otro ensayo elegido como calibrador (en este caso elegimos el día 0 o etapa de huevo) lo que resulta en un orden de magnitud con respecto al

calibrador. Existen dos métodos gracias a los cuales se efectúa el análisis para cuantificación relativa: la realización de una curva de calibración estándar o bien el método de ΔCt (Delta Cycle Threshold). En el presente trabajo se utilizó el método de ΔCt . Se construyó una curva de rango dinámico para el gen blanco y el control endógeno, y se obtuvo ΔCt (Ct blanco-Ct control endógeno) para cada uno de los puntos. Este ΔCt se grafica versus la concentración de cada uno de los puntos, y la línea obtenida tiene que tener una pendiente menor o igual a 0.1, la cual valida la utilización del método de ΔCt que requiere que la eficiencia de amplificación de los genes (endógeno y blancos) sea la misma. La cuantificación relativa se obtuvo mediante el algoritmo de $2^{-\Delta\Delta Ct}$

Resultados

De los alineamientos con los primers específicos para tripsina y aminopeptidasa, se obtuvieron los fragmentos siguientes:

535 pares de bases con 91% de homología con la tripsina de *Oreochromis niloticus* (Fig. 32).

```
CAGGTGTCTCTGAACGCTGGCTACCACTTCTGTGGTGGCTCCCTGGTCAATCAGTACTGGGTTGTGTCA
GCTGCTCACTGCTACCAGTCTCGTCTGCAGGTGCGTCTGGGAGAGCACAAACATCGGGGTCAACGAGGG
AACTGAGCAGTTCATCGACTCCTCCCGTGCATCCGAAATCCTGGGTACGATTCCTGGACCATTGACAA
TGACATCATGCTGATCAAGCTGAGCCAGCCTGCCACCCTCAACAGTTATGTGCAGCCTGTGCCTCTGCC
CAGGAGCTGTGCTCCCCTGGCACCATGTGCAGGGTCTCTGGATGGGGCAACACCATGAGCCCCACTG
CTGATAGGAACAAGCTGCAGTGCCTGAACATCCCCATCCTGTCTGACAGTGACTGTAGGAACGCCTAT
CCTGGCATGATCACTGACTCCATGTTCTGTGCTGGATACCTGGAGGGAGGCAAGGACTCTTGCCAGGGT
GACTCTGGTGGCCCTGTTGTGTGCAATGGTGAGCTGCAGGGTGTGTGTCCTGGG
```

533 pares de bases con 73% de homología con la aminopeptidasa N de *Pleuronectes americanus*.

```
TTCCCCTGTTTTGATGAGCCAGACATGAAGGCCGTGTTTGTGCTCACCGTCATCCACAGACCAGAAACC
GAAGTTGTGGCAAATGCAAAAGCTCGTGACGACAACACAGATGGATGGAAATATACTTGGTTTGTGACC
GACACCAAAGATGTCGACCTACCTGTTTCGCCTTCATGGTGGTTCGATAACACCTTTGACTTTACCACCTC
TTCAGCTTCAGAGGGTCTTGTGACGATAAATACGTACGCTCGCCCTGAGGCTGTGAGTCCGGACACAC
TAACTATGCCAAAGACATTACAGGAAGGATCCTCGACTTCTACGAAGGGGAATTTAAAATTAATACA
AAATGAGAAAGTTAGACCAGACTGCGCTGCCAGACTTATATCCTGCAGGGATGGAAAATGGGGGATG
ATCACATAACCAGGAAGGAGTCTGCTCTATGAGGAAGGAGTCTCCTCCTTGTGACAAGGAAGAGAT
TGCCACTGTCATTGCACATGAACTGGCACACCAGTGGTTCGGCAACCTCGTCAC
```

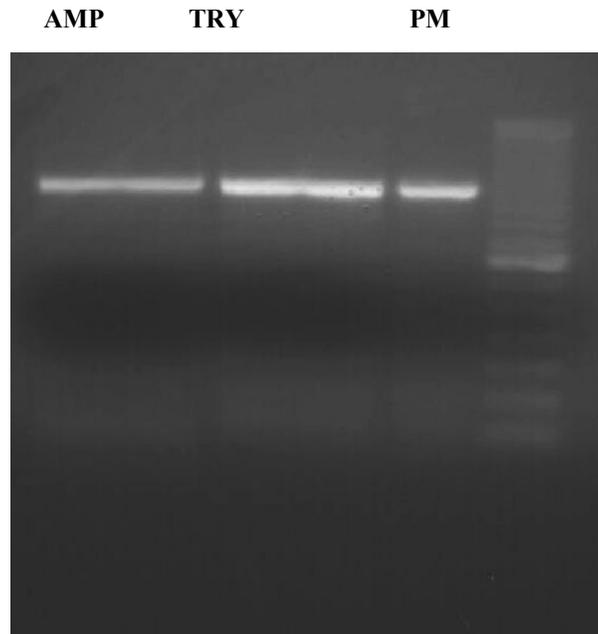


Figura 32. Gel de agarosa que muestra las bandas de aminopeptidasa y tripsina con tamaños de 533 y 535 pares de bases respectivamente de larvas de 30 días de edad de *P. splendida*. AM: Aminopeptidasa N; TRY: Tripsina; PM: Marcador de pesos moleculares.

La expresión para la tripsina a lo largo de la ontogenia de *P. splendida* muestra niveles bajos durante los primeros 4 DDE (fase de alimentación endógena) y después un incremento a partir del día 5 DDE, para decaer y mantener niveles bajos hasta el 18 DDE e incrementarse paulatinamente hasta alcanzar la máxima expresión en el día 35 DDE y disminuir nuevamente en los días 27 y 30 DDE (Fig. 33).

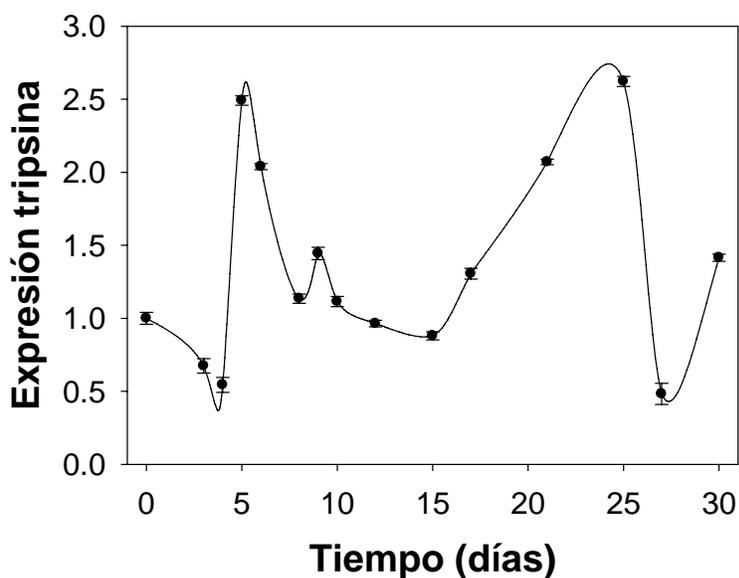


Figura 33. Niveles de expresión relativa de la tripsina a lo largo del desarrollo de la tenguayaca.

Caracterización de proteasas e inhibición enzimática en tenguayaca.

Para este estudio se capturaron 50 juveniles de *P. splendida* en la laguna El Viento en Centla, Tabasco, los cuales fueron transportados a las instalaciones del Laboratorio de Acuicultura de la UJAT-DACBIOL. Los peces fueron mantenidos en inanición por un periodo de 24 h para eliminar el alimento remanente y que este interfiriera en los análisis enzimáticos.

Los peces fueron sacrificados por medio de un shock térmico (2°C) colocándolos en un contenedor con agua y hielo. Una vez sacrificados, todos los peces fueron disecados extrayéndoles el estómago y el intestino, los cuales fueron congelados con nitrógeno líquido y manteniéndolos a -20°C hasta su procesamiento y análisis bioquímicos.

Con las secciones estomacales e intestinales se extrajeron las enzimas digestivas de acuerdo a lo mencionado en la sección de ontogenia enzimática, para la determinación de la actividad enzimática de proteasas ácidas y alcalinas.

Resultados

El pH óptimo del extracto multienzimático del intestino de juveniles de *P. splendida* muestra que el máximo de actividad enzimática se obtiene a pH 10 (Fig. 34). Para las proteasas ácidas obtenidas de los estómagos de los peces el óptimo de actividad se obtuvo a un intervalo de pH entre 3 y 5 (Fig. 35).

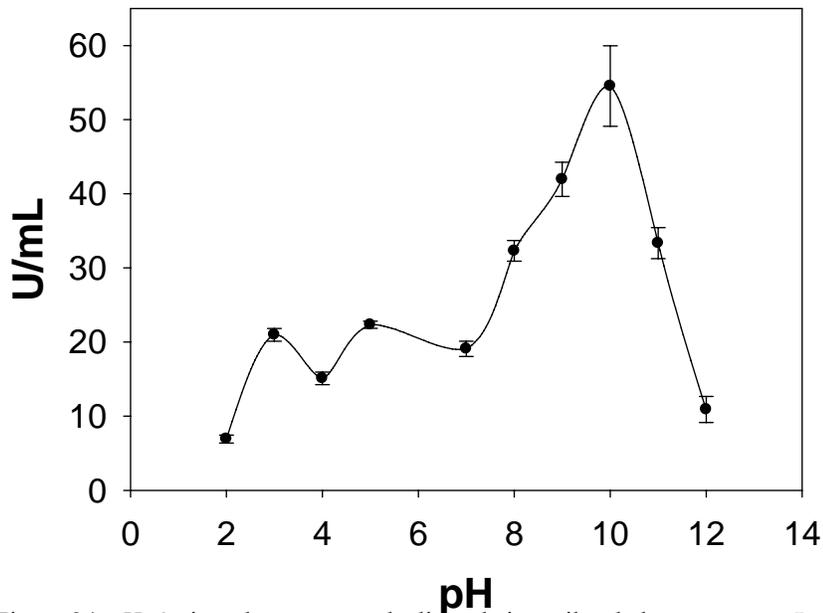


Figura 34. pH óptimo de proteasas alcalinas de juveniles de la tenguayaca *P. splendida*.

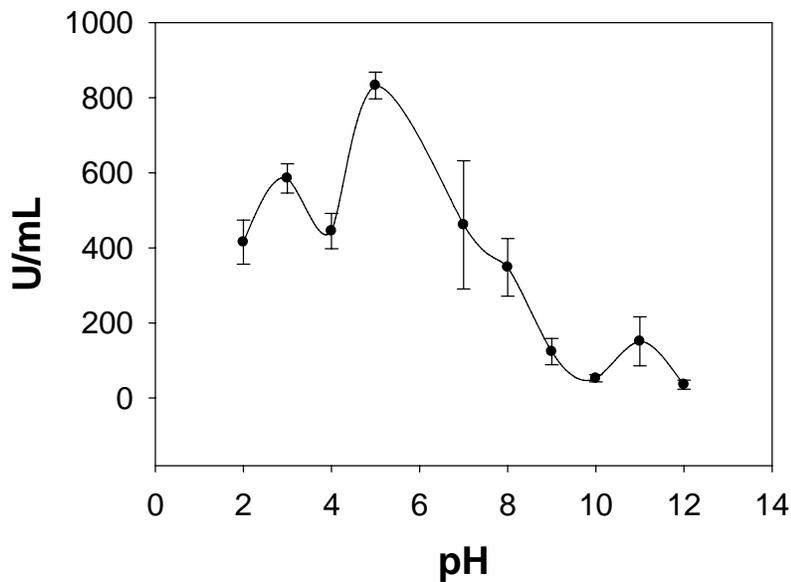


Figura 35. pH óptimo de proteasas ácidas de juveniles de la tenguayaca *P. splendida*.

La estabilidad de proteasas alcalinas mostró que las enzimas de juveniles de *P. splendida* incrementan su actividad enzimática desde el inicio de las preincubaciones y aumentan a partir de los 60 minutos para el intervalo de pH entre 6 y 10, siendo bajo para valores de 12, 2 y 4 (Fig. 36). De forma similar, la estabilidad de proteasas ácidas al cambio de pH muestra que la actividad relativa aumenta para el pH de 4 a partir de los 30 minutos de preincubación, disminuyendo gradualmente conforme se aumenta el tiempo y manteniéndose al mismo nivel que los extractos sin preincubar hasta los 90 minutos, excepto para la actividad de las enzimas a pH 10 en el cual el valor disminuye por debajo del control sin preincubar (Fig. 37).

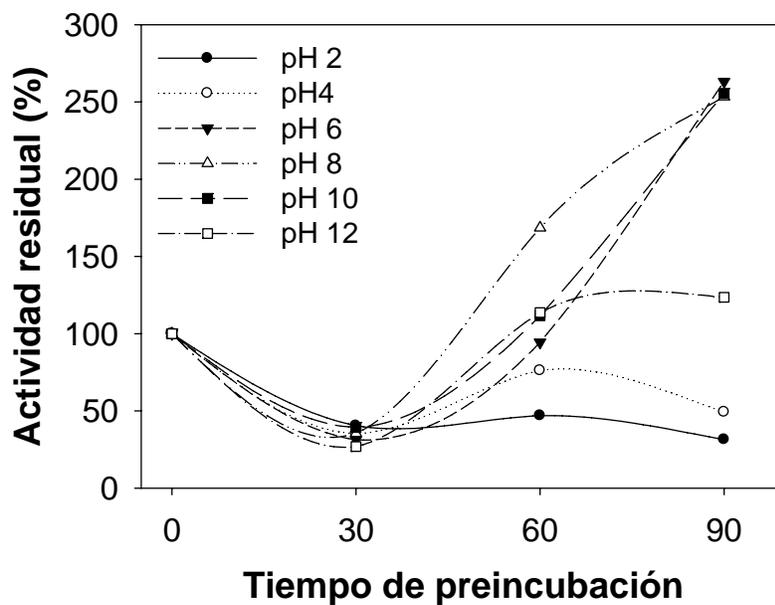


Figura 36. Estabilidad del pH de proteasas alcalinas de juveniles de la tenguayaca *P. splendida*.

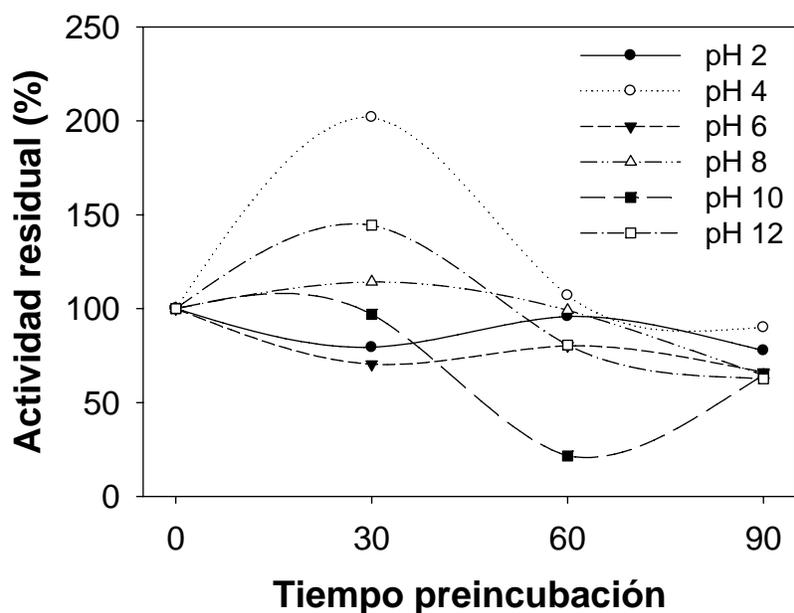


Figura 37. Estabilidad del pH de proteasas ácidas de juveniles de la tenguayaca *P. splendida*.

En el caso de las temperatura óptimas para proteasas alcalinas y ácidas (Figs. 38 y 39), se observó que ambas obtuvieron el valor más alto a los 55°C, disminuyendo a partir de los 65°C.

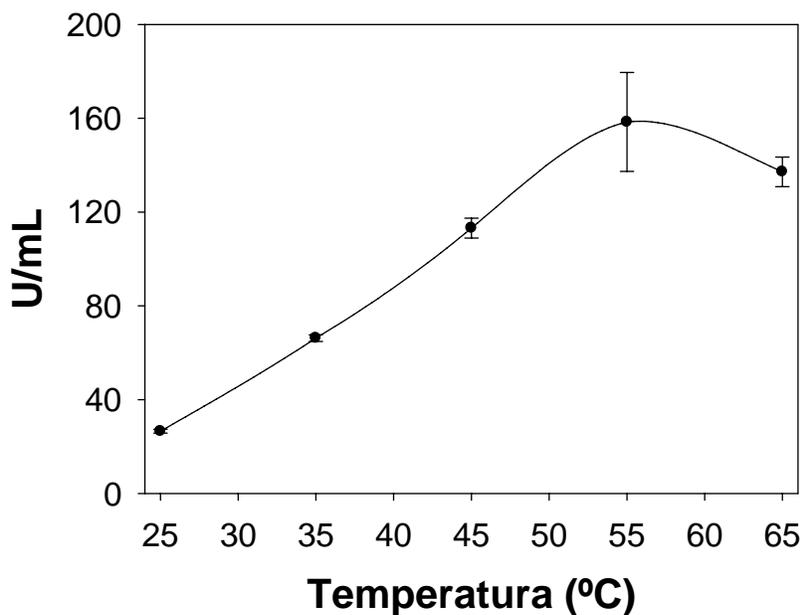


Figura 38. Temperatura óptima de proteasas alcalinas de juveniles de la tenguayaca *P. splendida*.

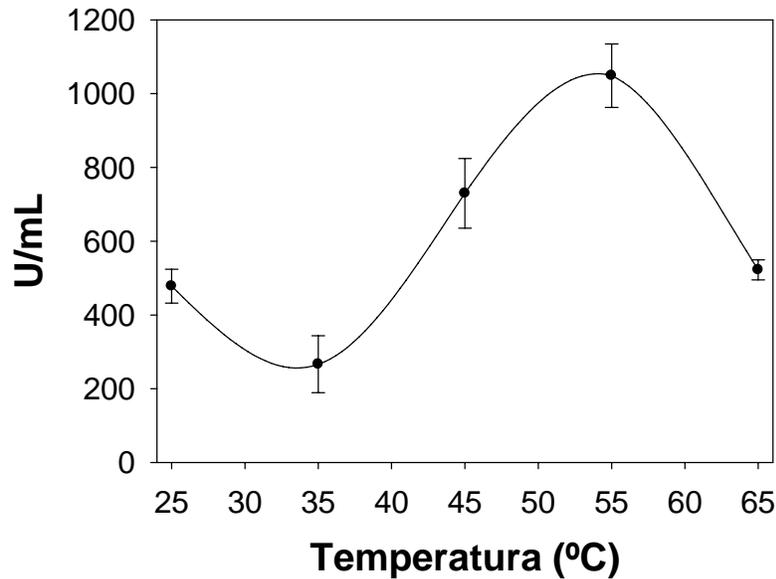


Figura 39. Temperatura óptima de proteasas ácidas de juveniles de la tenguayaca *P. splendida*.

Por otra parte, la estabilidad térmica de proteasas alcalinas es baja al observarse que en todas las temperaturas evaluadas disminuye fuertemente la actividad residual desde los primeros 30 minutos de preincubación hasta perderse entre un 60 hasta un 80% de actividad (Fig. 40). En el caso de la estabilidad térmica de proteasas ácidas se observó que estas son mucho más estables, aumentando durante los primeros 30 minutos de preincubación a temperaturas de 45 y 55°C, siendo la más estable hasta por 90 minutos 45°C (Fig. 41).

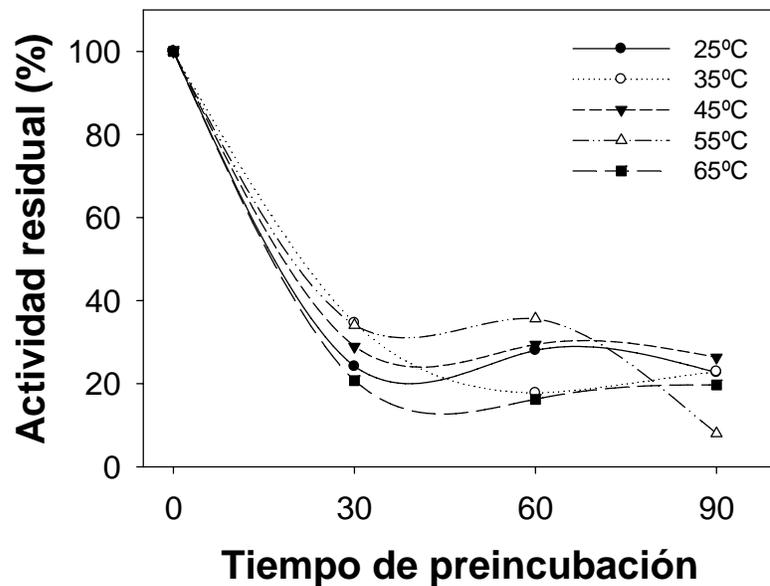


Figura 40. Estabilidad de la temperatura de proteasas alcalinas de juveniles de la tenguayaca *P. splendida*.

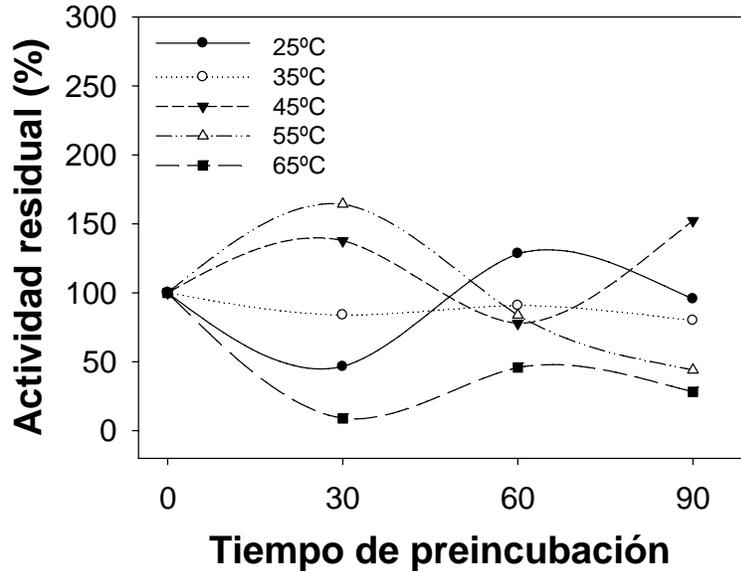


Figura 41. Estabilidad de la temperatura de proteasas ácidas de juveniles de la tenguayaca *P. splendida*.

En el caso de la caracterización por medio de inhibidores generales y específicos para proteasas alcalinas y ácidas de *P. splendida*, se observó que en general todos los inhibidores afectan de manera fuerte a las enzimas digestivas intestinales, siendo el efecto más alto con PMSF, SBT1, fenantrolina y ovoalbúmina (inhibidores de proteasas generales) afectando hasta el 70% de la actividad, que los específicos como TPCK, TLCK y el quelante EDTA, los cuales no afectaron las actividades de tripsina, quimitripsina y metalproteasas, disminuyendo su actividad de 15 a 30% (Fig. 42). Las proteasas ácidas se afectan en un 85% la actividad residual comparados con el control sin inhibir (Fig. 43).

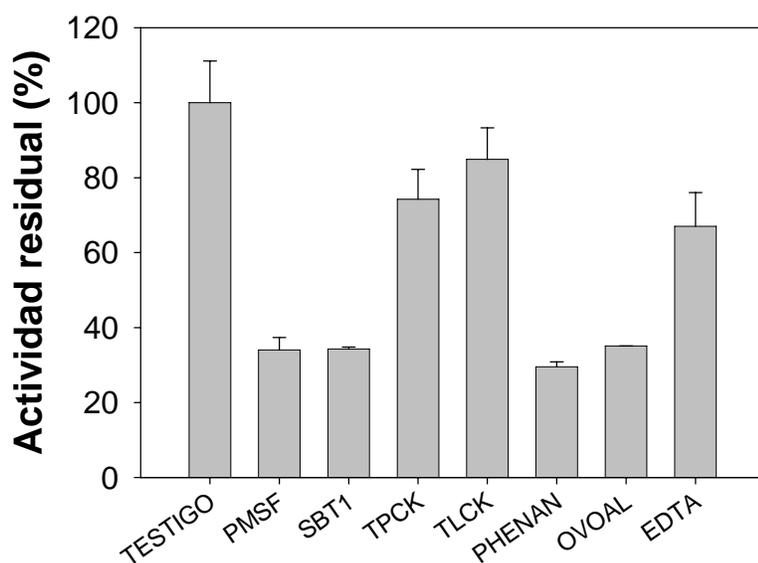


Figura 42. Efecto de inhibidores sobre la actividad de proteasas alcalinas de juveniles de la tenguayaca *P. splendida*

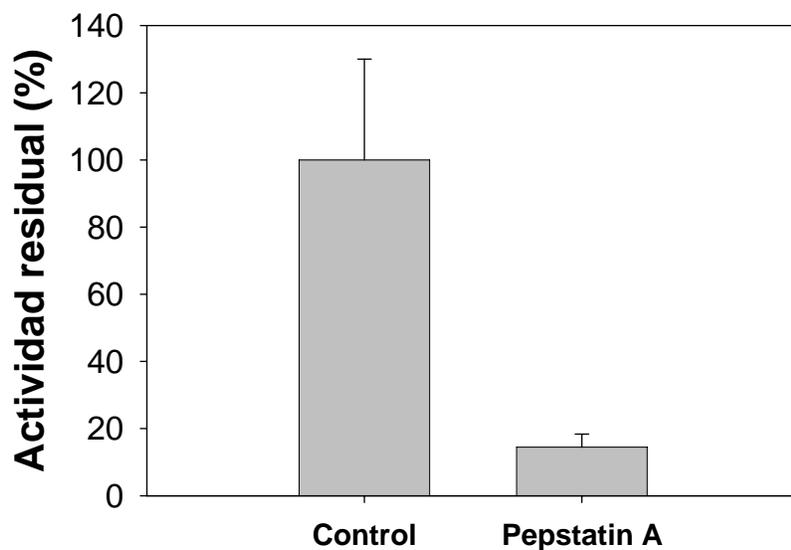


Figura 43. Efecto de inhibidores sobre la actividad de proteasas ácidas de juveniles de la tenguayaca *P. splendida*

La caracterización de proteasas de la mojarra tenguayaca muestra cuatro bandas de actividad proteolítica alcalina en el poso control (C), las cuales se ven inhibidas totalmente al usar fenantrolina (poso 5) y EDTA (poso 7), Inhibir una banda SBT1 (poso 2) y PMSF (poso 3); asimismo, se inhibe una sola banda al usar ovoalbúmina, aunque es una de alto peso molecular (poso 4), inhibir dos bandas al usar TLCK (poso 6) y solamente disminuir la actividad al usar TPCK (poso 1) (Fig. 44).

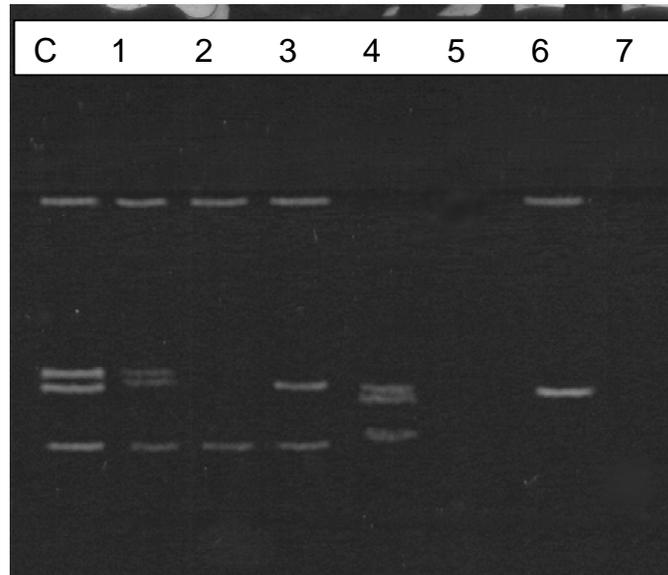


Figura 44. Efecto de inhibidores sobre la actividad de proteasas alcalinas de juveniles de *P. splendida* usando la técnica de SDS-PAGE discontinuo a pH alcalino. C: Control; 1: TPCK; 2: SBT1; 3: PMSF; 4: Ovoalbúmina; 5: Fenantrolina; 6: TLCK; 7: EDTA.

La inhibición de las proteasas ácidas de la tenguayaca muestran solamente la presencia de una sola banda, la cual se inhibe totalmente al usar Pepstatin A (Posos C y CI respectivamente). Asimismo, en los posos P y PI se muestra la pepsina porcina y la pepsina porcina inhibida con Pepstatin A (Fig. 45).

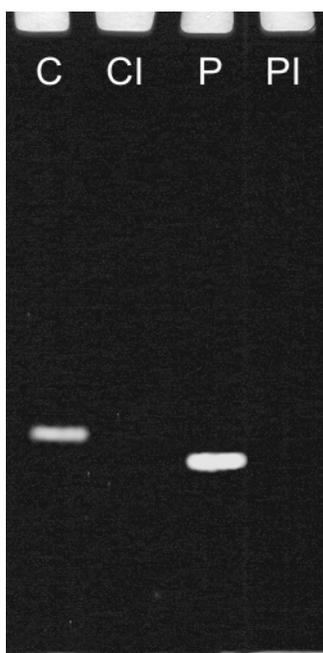


Figura 45. Efecto de inhibidores sobre la actividad de proteasas ácidas de juveniles de *P. splendida* usando la técnica de PAGE continuo a pH neutro. C: Extracto tenguayaca; CI: Extracto tenguayaca inhibido con Pepstatin A; P: Pepsina porcina; PI: Pepsina porcina inhibida con Pepstatin A.

Digestibilidad *in vitro*.

Materiales y Métodos.

Procesamiento de muestras.

Para este estudio se utilizaron los extractos previamente obtenidos de juveniles. El grado de hidrólisis de las materias primas proteínicas utilizadas en su fabricación se determinó a 37 °C durante 90 min en una solución que contenga 40 mg de proteína en un volumen final de 5 ml, utilizando 200 unidades de actividad alcalina del extracto enzimático previamente ajustado a pH 8.0 y de 50 unidades de actividad ácida del extracto previamente ajustado a pH 3.5.

Determinación del grado de hidrólisis de proteínas.

Por otra parte, antes de iniciar la reacción enzimática se determinó la concentración de proteína soluble de las distintas soluciones, así como su pH inicial y la cantidad de NaOH 0.1 N y HCl necesarias para ajustar la mezcla de reacción a pH 8.0 y 3,5 respectivamente. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

El grado de hidrólisis, se expresó como el porcentaje del número de enlaces peptídicos hidrolizados (h) con respecto al total de la proteína (h_{tot}), se calculó mediante el grado de hidrólisis de una reacción enzimática.

$$GH (\%) = \frac{h}{h_{tot}} \times 100$$

Siendo (h) el número de enlaces peptídicos hidrolizados.

$$h = V_b \times N_b \times \frac{1}{\alpha} \times \frac{1}{MP}$$

Siendo:

V_b ; el consumo de base en ml

N_b ; la normalidad de la base

α ; la constante de disociación de los grupos α -NH₂ (véase más abajo)

MP; la masa de proteína en la mezcla de reacción

h_{tot} ; el número de enlaces peptídicos totales del sustrato proteico

h; número de enlaces peptídicos hidrolizados.

En todos los casos, el grado de hidrólisis (GH%) se determinó automáticamente utilizando un pH-STAT en fase alcalina y ácida. Para ello se preparó una solución acuosa de materia prima que contendrán de 8 mg proteína/ml, a continuación se le ajustó el pH a 8.0 para la hidrólisis alcalina con NaOH 0.1 N y se mantuvo a 37°C durante 15 min antes de la adición de la preparación enzimática. En el caso de la hidrólisis ácida se ajustó el pH de la solución a 3.5 con HCl 0.1N y se mantuvo nuevamente a 37°C por 15 min para estabilizar la solución. La mezcla de reacción se mantuvo en agitación continua (500 rpm) y a 37°C durante todo el transcurso de las reacciones. El grado de hidrólisis se calculó a partir del volumen de NaOH 0.1 N y HCl 0.1 N necesarios para mantener el pH a 8.0 y 3.5 respectivamente.

De esta manera se determinó del valor de GH final en dos aspectos:

1) El nivel de autohidrólisis de las diferentes materias primas en ausencia de las proteasas digestivas. En todos los casos se determinó el valor de la hidrólisis (GH) en ausencia del extracto enzimático, que fue sustituido por un volumen equivalente de agua destilada.

2) El empleo de extractos enzimáticos para cuantificar la hidrólisis de las materias primas, para lo cual se preparó una solución que contuvo 80 mg de proteína en un volumen final de 10 ml. En este caso, el grado de hidrólisis (GH) se determinó en un sistema de digestión con dos fases, una ácida y otra alcalina, basado en la metodología propuesta por Saunders *et al.* (1972). Los valores de actividad ácida se estimaron teniendo en cuenta la relación existente entre la actividad proteasas totales. La fase alcalina se realizó por medio de una modificación de la metodología propuesta por Dimes y Haard (1994). Para ello se utilizó un extracto enzimático preparado según se indicó anteriormente. La reacción enzimática se inició una vez estabilizado el pH a 8.0 y la temperatura a 37 °C, mediante la adición de 200 UA de actividad alcalina y 50 UA de actividad ácida (en un volumen inferior a 0.3 ml) del extracto enzimático a la solución que contenía la materia prima. El grado de hidrólisis se determinó después de 2700 min en la fase alcalina y 900 minutos en la fase ácida, según se describió anteriormente. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

Una vez determinada la capacidad digestiva de los juveniles se seleccionaron los mejores ingredientes para diseñar y elaborar varios alimentos inertes, los cuales fueron evaluados utilizando nuevamente el sistema pH STAT conforme se describió anteriormente.

Análisis estadístico.

A todos los datos se les realizaron pruebas de normalidad y homoscedasticidad; en los casos donde estos postulados se cumplan se aplicaron análisis de varianza de una vía. En los casos donde no se cumplieron los postulados, se aplicaron pruebas no paramétricas. Para todos los estadísticos se utilizó el programa estadístico STATISTICA v 7.0.

Resultados

Las figuras 46 y 47 corresponden a la segunda parte del proyecto relacionada con la digestibilidad in Vitro de ingredientes proteínicos usando los extractos multienzimáticos de los juveniles de la mojarra tenguayaca. En este caso, la figura 83 muestra que de los 14 ingredientes evaluados utilizando el extracto estomacal (pepsina) en condiciones ácidas 3.5 la digestión de la mayoría de ellos es asintótica, incrementando paulatinamente el valor del grado de hidrólisis (% GH). Los ingredientes que mostraron la mayor hidrólisis corresponden a la harina de jaiba, seguida por la harina de pescado Pedregal, seguida de la harina de cerdo. En un segundo grupo se observan las harinas sardina, la harina de sangre de res del rastro y la harina sangre de res de Texcoco. Los ingredientes que menor grado de digestibilidad mostraron

son la pasta de soya, la harina de ave Premium, la hemoglobina usada como control, el hidrolizado de pescado, la harina de sangre de pollo y la harina de sangre de res Prieto (Tabla 3).

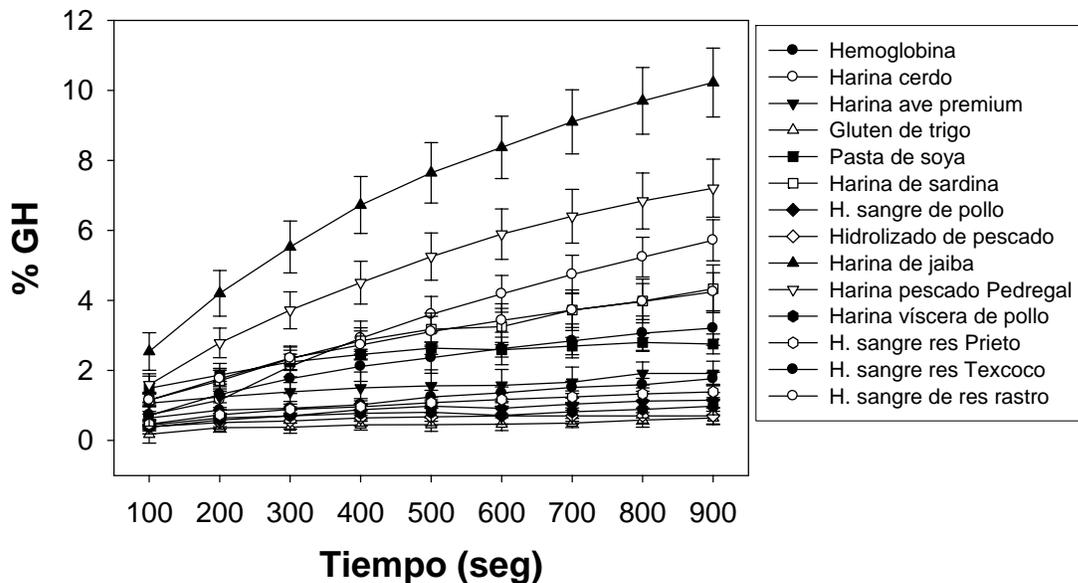


Figura 46. Digestión ácida (promedio \pm ES) de ingredientes proteínicos utilizando extracto estomacal de juveniles de la mojarra tenguayaca.

En la figura 47 correspondiente al % GH de extracto intestinal de los juveniles de la mojarra tenguayaca se observa un comportamiento diferentes a lo observado en la hidrólisis ácida, donde nuevamente se dividieron tres grupos principales, en el primer grupo destaca el % GH de la caseína (la cual es usada como control), seguida de la harina de víscera de pollo. En un segundo grupo con % GH medios se encuentran las harinas de ave Premium, harina de cerdo, harina de pescado Pedregal y gluten de trigo. Finalmente, el resto de los ingredientes son poco digeridos alcanzando niveles bajos (menores a 2) como por ejemplo la pasta de soya, la harina de jaiba y el hidrolizado de pescado.

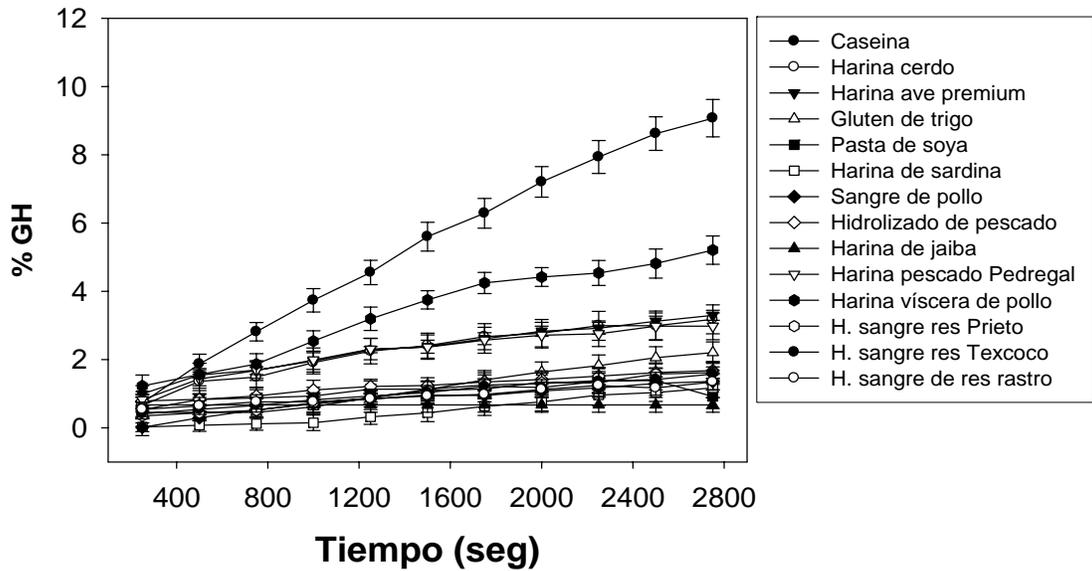


Figura 47. Digestión alcalina (promedio \pm ES) de ingredientes proteínicos utilizando extracto intestinal de juveniles de la mojarra tenguayaca.

Asimismo, en la Tabla 3 se puede observar además de los % GH ácido y alcalino para cada uno de los 14 ingredientes utilizados, la hidrólisis total (% GH total) y el % de digestibilidad tomando como 100% la suma de la hemoglobina más la caseína, donde los ingredientes de mayor % GH total son la harina de jaiba, la harina de pescado Pedregal, la harina de cerdo, la harina de víscera de pollo, la harina de sardina y la harina de sangre de res rastro; el resto de los ingredientes se consideran de baja digestibilidad.

En base a los resultados anteriormente expuestos se proponen los ingredientes antes mencionados para formular dietas prácticas las cuales serán la base para la realizar bioensayos zootécnicos con larvas, juveniles y adultos de la mojarra tenguayaca durante su cultivo.

Tabla 3. Grado de digestibilidad (promedio \pm ES) de ingredientes proteínicos usando extractos multienzimáticos de juveniles de la mojarra tenguayaca,

Ingrediente	Hidrólisis ácida	Hidrólisis alcalina	% GH Total	% Digest
	% GH	% GH		
Hemoglobina + caseína	1.76 \pm 0.18	9.07 \pm 0.55	10.84	100.00
Gluten de trigo	0.64 \pm 0.19	2.20 \pm 0.32	2.84	26.24
Harina de ave Premium	1.91 \pm 0.35	3.30 \pm 0.15	5.21	48.05
Harina de Cerdo (NRA)	5.72 \pm 0.59	3.18 \pm 0.42	8.90	82.10
Harina de jaiba	10.22 \pm 0.98	0.67 \pm 0.22	10.89	100.54
Harina de pescado (Pedregal)	7.20 \pm 0.83	2.98 \pm 0.39	10.18	93.94
Harina de sangre de pollo	1.15 \pm 0.22	1.36 \pm 0.25	2.51	23.15
Harina de sangre de res Rastro	4.24 \pm 0.54	1.34 \pm 0.23	5.59	51.55
Harina de sangre de res (Prieto)	1.39 \pm 0.22	1.62 \pm 0.30	3.00	27.73
Harina de sangre de res (Texcoco)	3.21 \pm 0.49	1.58 \pm 0.21	4.78	44.15
Harina de sardina	4.33 \pm 0.68	1.17 \pm 0.29	5.50	50.74
Harina de víscera de pollo	0.98 \pm 0.25	5.21 \pm 0.41	6.18	57.07
Hidrolizado de pescado	0.70 \pm 0.23	1.68 \pm 0.26	2.38	21.94
Pasta de soya	2.75 \pm 0.28	0.92 \pm 0.36	3.67	33.90

Estudios Nutricionales

Requerimiento de proteína y digestibilidad aparente

Materiales y métodos.

Las larvas de tenguayaca se obtuvieron de dos desoves simultáneos bajo condiciones controladas en el Laboratorio de Acuicultura de la DACBIOL para reunir una cantidad de 7,500 peces de la misma edad para lograr homogeneidad en los experimentos. Las larvas se masculinizaron empleando el esteroide 17 α -Metiltestosterona (MT), por un periodo de 45 días con una dosis de 20 mg MT/L, la masculinización se realizó por triplicado, siguiendo las recomendaciones de Vidal (2004). El sistema utilizado para la masculinización fueron tanques de plástico con una capacidad de 2,000 L. En cada tanque se colocaron 2500 organismos. Al final del tratamiento hormonal se sacrificaron 100 peces por tina con una sobredosis del anestésico MS-222 a los cuales se extrajeron las gónadas y se colocaron en portaobjetos, éstas se tiñeron con colorante de Wrigth y se les aplicó la técnica de aplastada propuesta por Contreras-Sánchez (2001) donde se determinó un 99% de machos.

Se utilizó un sistema de circulación cerrado que consta de 30 tinas redondas de plástico color rojo, pintadas del interior de color blanco para la mejor observación de los peces. Cada tina tiene una capacidad

de 80 L. Este sistema, incluye una bomba de recirculación tipo Jacuzzi modelo JWPA5D-230A marca Star-rite de $\frac{3}{4}$ HP, cuenta con un filtro de arena silica, un filtro biológico de concreto el cual tiene un separador de carbón activado y retazos de PVC y otro separador con bioesferas: La temperatura es regulada mediante un termostato de titanio marca PSA modelo R9CE37I. El sistema cuenta con una lámpara de luz UV marca Emperor aquatics modelo 02025 de 25 watts, una bomba sumergible marca Pedrollo modelo 3966/A de 0.50 HP y un reservorio de agua de concreto de 24 m³ de capacidad. Estos equipos se pusieron en operación antes de iniciar el experimento para asegurar su óptimo funcionamiento. El sistema fue alimentado por un blower de 1 HP marca Sweetwater modelo S-41. Los recambios de agua se realizaron parcial o totalmente según la calidad de agua.

Este experimento se diseñó para ser de un solo factor completamente al azar para evaluar cinco niveles de proteína (35, 40, 45, 50, y 55%), durante un periodo de 56 días. La asignación de los niveles de proteína en los tanques se realizó de manera aleatoria y por triplicado, los peces fueron distribuidos de manera aleatoria. Se colocaron 100 peces masculinizados por tina con un promedio de $(0.5 \pm 0.1 \text{ g})$. El alimento se suministró manualmente proporcionándose a saciedad aparente (Ad libitum) con una frecuencia de 4 veces al día, con una duración de 3 horas entre cada alimentación. El alimento se proporcionó en cantidades pequeñas para asegurarse de que fuera totalmente consumido, el excedente de alimento fue retirado de las tinas, almacenado, secado y pesado con una balanza marca Sartorius modelo BL310 con una precisión de 0.01 g. para contemplarlos en los cálculos de los índices de crecimiento y calidad del alimento. La temperatura ($30.69 \pm 1.07 \text{ }^\circ\text{C}$) y oxígeno disuelto ($6.47 \pm 0.37 \text{ mg/L}$) se monitorearon diariamente con un oxímetro marca YSI modelo 55 (precisión de 0.1°C y 0.01 mg/l respectivamente) y una vez a la semana se monitoreó el amonio total ($5.72 \pm 1.59 \text{ ppm}$), pH (7.46 ± 0.4), nitrito total ($0.27 \pm 0.19 \text{ ppm}$) y nitrato total ($0.13 \pm 0.07 \text{ ppm}$) utilizando un multiparámetro HANNA.

Previo a iniciar los experimentos a los ingredientes a utilizar para la elaboración de las dietas experimentales se les practicó análisis químico proximal. Una vez conocidos los resultados de los ingredientes, se elaboraron las dietas experimentales y se les realizaron los mismos análisis químicos proximales (Tabla 1). El análisis químico proximal constó de la determinación de proteína cruda, extracto etéreo, cenizas, humedad, fibra y energía bruta de acuerdo a las técnicas de la AOAC (1995) por medio de los siguientes procedimientos:

Humedad: Determinación por diferencia de peso a $70 \text{ }^\circ\text{C}$ / 24 hrs; usando horno de secado Terlab.

Cenizas: Determinación por diferencia de peso; calcinación a $550 \text{ }^\circ\text{C}$ / 24 hrs, empleando una mufla Thermolyne 6000.

Proteína: Método de micro Kjeldahl TECATOR (% N x 6.25); empelando destilador Foss Kjelttec 2300.

Extracto etéreo: Método Soxtec-Avanti 2050 TECATOR

Fibra cruda: Método de hidrólisis sucesiva (ácido / base) TECATOR; fibertec system

ELN: calculado por diferencia: 100 - (% Proteínas + % Lípidos + % F. Cruda, + % Cenizas) Energía:

Determinación por calorímetro de Parr 1261.

Las dietas experimentales se formularon como se muestra en la tabla 4, con la asesoría del personal del Laboratorio de Nutrición Acuícola del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. Para formular las dietas se utilizó el programa MIXIT versión 4 a las cuales adicionalmente se les agregó 1 % de óxido de cromo para la determinación de la digestibilidad aparente de los nutrientes.

Tabla 4. Formulación y análisis químico proximal de las dietas experimentales para juveniles de tenguayaca.

Ingredientes	55%	50%	45%	40%	35%
Caseína	55.63	49.09	42.58	36.07	29.59
Harina integral de sorgo	9.12	15.81	22.48	29.13	35.77
Harina de sardina	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00
Aceite de pescado	12.64	12.49	12.34	12.19	12.04
Lecitina Soya	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00
Carboximetil celulosa	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00
L-lisina Hcl	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
Premezcla de vitaminas y minerales	3.50	3.50	3.50	3.50	3.50
L-Metionina	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
Vitamina C	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
Oxido crómico	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
BHT	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004
Nutriente (g/100g MS)					
Humedad	8.12 ± 0.02	5.91 ± 0.16	6.67 ± 0.09	4.85 ± 0.06	7.72 ± 0.20
Proteína	34.85 ± 0.46	39.86 ± 0.46	45.24 ± 0.01	50.97 ± 0.42	55.59 ± 0.23
Lípidos	16.47 ± 0.47	17.23 ± 0.57	16.48 ± 0.23	16.31 ± 0.11	16.07 ± 0.11
Fibra	0.53 ± 0.07	0.46 ± 0.02	0.46 ± 0.10	0.48 ± 0.04	0.43 ± 0.01
Cenizas	4.79 ± 0.02	4.83 ± 0.02	4.74 ± 0.10	4.80 ± 0.07	4.79 ± 0.06
Energía (cal/g)	4527.25 ± 4.24	4071.24 ± 4.18	4127.94 ± 8.27	4218.71 ± 5.92	4452.76 ± 7.99
ELN	43.36	37.62	33.08	27.44	18.47

Caseína NZMP, Nueva Zelanda; Harina integral de sorgo, Pedregal; Harina de sardina, Pedregal; Aceite de pescado, Sigma-Aldrich; Lecitina de soya, Pedregal; Carboximetil celulosa, Sigma-Aldrich; L-lisina Hcl, Sigma-Aldrich; Premezcla de vitaminas y minerales, Pedregal para trucha; L-Metionina, Sigma-Aldrich; Vitamina C, Rovimix-Roche Stay 25; Oxido crómico, Jalmek; BHT, Sigma-Aldrich.

Los pellets se elaboraron de la siguiente manera: Los macroingredientes (caseína, harina de pescado, harina de sorgo) se tamizaron con una criba de 500 micras para homogeneizar el tamaño de las partículas. Como paso siguiente, se mezclaron estas de forma manual y después fueron mezcladas durante 30 minutos en la homogenizadora marca Bathmex modelo 178716.

De forma paralela, se pesaron y mezclaron los microingredientes (premezcla de vitaminas, premezcla de minerales, premezcla de aminoácidos, vitamina C, y óxido crómico), para después adicionarse a la mezcla de macroingredientes, continuándose con la homogeneización durante otros 30 minutos, posteriormente se pesaron los ingredientes líquidos (aceite de pescado y lecitina de soya), mezclándose manualmente durante 7 u 8 minutos hasta formar una emulsión, se mezcla con los macro y microingredientes por 15 minutos. Finalmente se agregó carboximetilcelulosa diluido en 700 ml de agua continuándose con el proceso de mezclado durante otros 10 minutos.

La mezcla fue pasada a través del molino de carne, fabricando los pellets utilizando un dado ACERLOT 22/4.5 mm INOX. Estos se cortaron manualmente y se tamizaron por diferentes cribas (300, 500 y 1000 micras), con el objetivo de obtener el tamaño adecuado de partícula conforme el incremento en talla de los peces. Los pellets fueron secados en una estufa de flujo de aire marca Coriat durante 8 h a 50°C.

Durante el desarrollo del experimento, se realizaron biometrías cada dos semanas, para determinar el crecimiento en peso y longitud total con una balanza marca Sartorius modelo BL310 con una precisión de 0.01 g y con un vernier digital marca Electronic Digital Caliper con una precisión de 0.1 cm.

La supervivencia fue calculada como el porcentaje de organismos vivos durante el tiempo de experimentación, registrándose el total de los peces.

$$S = (N_i / N_f) \times 100$$

Donde:

N_i = Número inicial de organismos

N_f = Número final de organismos

A partir de los datos de consumo, análisis químicos proximales de los peces y datos de crecimiento se calcularon los siguientes índices de crecimiento y de calidad del alimento:

Tasa específica de crecimiento en peso:

$$\text{SGR} = \frac{(\text{Ln Pf} - \text{Ln Po})}{\text{días}} \times 100$$

Donde:

Pf = Peso promedio de los peces en el día t

Po = Peso promedio de los peces al inicio

Esta relación indica el porcentaje de incremento en peso del organismo al día (Gracia-López y Castelló-Orvay, 1996).

Tasa de crecimiento absoluta:

$$\text{TCA} = \frac{(\text{Pf} - \text{Pi})}{\text{días}}$$

Donde:

Pf = Peso promedio final de los peces

Pi = Peso promedio inicial de los peces

Esta relación indica la ganancia en peso del organismo expresada en gramos al día (Gracia-López y Castelló-Orvay, op. cit.).

Tasa de eficiencia proteínica:

$$\text{PER} = \frac{\text{Pg}}{\text{Psp}}$$

Donde:

Pg = Peso fresco ganado por el pez

Psp = Peso seco de la proteína en el alimento suministrado

Se define como la razón entre la ganancia del peso del pez y la cantidad de proteína consumida. Esta relación evalúa el contenido de proteína en el alimento, mientras más grande sea PER, más eficiente será la asimilación de proteína en el alimento (Watanabe, 1988).

Valor proteínico productivo:

$$\text{PPV} = \frac{(\text{Pfp} - \text{Pip})}{\text{Pt}} \times 100$$

Donde:

Pfp = Proteína total final en los peces

Pip = Proteína total inicial en los peces

Pt = Peso total de la proteína del alimento suministrado

Este índice muestra la relación de la proteína retenida en los tejidos del pez y la consumida en el alimento. En este criterio se toma en cuenta la transformación de la proteína suministrada en la dieta, en proteína corporal (Hepher, 1993).

Factor de conversión alimenticia:

$$FCA = \frac{Pa}{Pg}$$

Donde:

Pa = Peso del alimento ingerido (calculado en base seca en este estudio)

Pg = Peso fresco ganado por el pez

Este factor se define como la ganancia en peso obtenida a partir de una unidad de peso del alimento. Entre más cercano al valor de 1, se requerirá menor cantidad de alimento para producir una unidad de biomasa de los organismos (Hepher, *op cit*).

Factor de condición:

$$FC = \frac{Pt}{Lt^3} \times 100$$

Donde:

Pt = Peso promedio de los peces al tiempo t

Lt = Longitud promedio de los peces al tiempo t

Este factor es considerado como un índice de robustez para peces de tipo fusiforme. Los valores iguales a 3 son considerados como un crecimiento homogéneo, valores mayores o menores son considerados como crecimiento heterogéneo (Weatherley y Gill, 1987; Steffens, 1989).

Al inicio y al final del experimento se tomaron muestras de 10 peces por tratamiento a los cuales se les determinó proteína cruda, extracto etéreo, cenizas, humedad y energía; para lo cual cada una de las muestras se congeló en nitrógeno líquido, posteriormente se liofilizaron y se aplicaron las técnicas convencionales mencionadas anteriormente.

Para determinar la digestibilidad aparente de los nutrientes las heces fueron colectadas tres veces al día dos horas después de cada alimentación. La colecta se realizó durante periodos de 14 días, mediante sifoneo manual, utilizando mangueras de ¼ pulgada de plástico transparente. Después de la colecta. Las heces se lavaron con agua destilada, siendo luego congeladas a - 40 °C para después ser liofilizadas.

Las heces liofilizadas fueron analizadas para determinar la concentración de oxido crómico (Cr₂O₃). Para la determinación de proteínas se utilizó el método de micro Kjeldhal según los métodos de la A.O.A.C. (1995). Para determinar el oxido crómico se empleó la técnica de Furukawa y Tsukahara (1966) y modificada por Olvera (1994) que a continuación se describe: Cincuenta mg de muestra finamente molida (< 500 micras) se colocaron en un tubo Tecator aforado a 100 ml, se le adicionó 5 ml de HNO₃ y se colocaron en un digestor Tecator. Al término de la reacción, indicada por el color verdoso claro de la solución, se dejo enfriar. Una vez fría la solución se le agregó 3 ml de acido perclórico y se sometió a un proceso de digestión hasta que la solución cambió de color verde a amarillo limón. La confirmación del final de la reacción se observó por un anillo rojo que se forma en la superficie de la solución una vez fría. La solución se pasa a un matraz volumétrico de 25 ml y se aforo con agua destilada, y de ahí se tomo una muestra para leer su absorbancia en un espectrofotómetro a 350 nm.

Cálculo del óxido crómico:

$$X = (Y - 0.0032) / 0.2089 / 4$$

Donde:

X = Cantidad de óxido de cromo presente en la muestra

Y = Absorbancia

0.0032, 0.2089 y 4 son constantes

Calculo de la digestibilidad aparente

$$C.U.D.A.(\%) = 100 - \left(\frac{\% \text{ de indicador en alimento} \quad \% \text{ de nutriente en heces}}{\% \text{ de indicador en heces} \quad \% \text{ de nutriente en alimento}} X - X \right) 100$$

C.U.D.A. = Coeficiente de digestibilidad aparente

Análisis estadístico.

Para determinar la existencia de diferencias significativas entre los tratamientos se empleó un análisis de covarianza (ANCOVA) incluyendo la supervivencia como covariable debido a que esta variable ha sido reportada como potencial variable de sesgo en los resultados del experimento. Previamente se comprobó la normalidad de los datos evaluados (longitud y peso). Se cumplió con el postulado de normalidad (prueba de Kolmogorov-Smirnov) para cada tiempo por lo cual se aplicó el análisis antes mencionado, excepto para el t=0 los datos para la longitud total no fueron normales a pesar de la transformación a log10 por lo cual después del análisis de covarianza (ANCOVA), se aplicó una prueba de poder donde $\beta < 0.05$, para comprobar de no caer en un error de tipo 2. Se aplicó la prueba de Levene (homogeneidad de varianza) para determinar la diferencia entre las réplicas de cada nivel del tratamiento, comparando los niveles de proteína para cada biometría ($P < 0.05$), cuando se detectaron diferencias significativas, se aplicó la prueba de diferencia mínima detectable (LSD) de comparación múltiple.

Los coeficientes de supervivencia de cada nivel de proteína se compararon ($P < 0.01$) con la prueba de hipótesis entre las proporciones de dos poblaciones para todas las combinaciones (Daniel, 1997). Se compararon los índices de crecimiento y de calidad del alimento (SGR, TCA, PER, PPV, FCA Y CF) y la digestibilidad aparente entre cada nivel de proteína ($P < 0.05$) por medio de la prueba de Kruskal-Wallis.

La composición química de los peces enteros se comparó entre los niveles de proteína ($P < 0.05$) utilizando un análisis de Kruskal- Wallis y donde hubo diferencias significativas, se utilizó la prueba de comparación múltiple de Kruskal-Wallis (Zar, 1996). Las pruebas estadísticas se realizaron con el programa STATISTICA V. 7 excepto en los casos donde se hace referencia de los autores.

Para determinar el nivel óptimo de proteína de los pesos promedios finales los datos fueron ajustados al modelo cinético de saturación de 5 parámetros para analizar la respuesta de los organismos a los diferentes niveles de proteína (Mercer *et al.*, 1989):

$$r = (b(K_{.5})^n + R_{\max}I^n + bI^{2n} / (K_s)^n) / ((K_{.5})^n + I^n + I^{2n} / (K_s)^n)$$

Donde r es la variable de respuesta de los organismos, I es la concentración de nutriente (proteína), b es el intercepto de r en el eje, R_{\max} es la respuesta teórica máxima, $K_{.5}$ es la concentración de proteína para $(R_{\max} + b)/2$, n es el orden cinético aparente y K_s es la constante de inhibición.

Resultados.

Los parámetros fisicoquímicos monitoreados del sistema permanecieron constantes durante todo el periodo que se mantuvo el experimento. Se observó una temperatura promedio de 30.69 °C; una concentración promedio de oxígeno disuelto de 6.47 mg/L; el pH registro un promedio de 7.46; el amonio se mantuvo con un promedio de 5.72 mg/L; los nitratos con 0.27 y nitritos de 0.13 mg/L.

Los resultados de crecimiento en peso húmedo de los peces masculinizados para cada nivel de proteína y mostrando las curvas de crecimiento obtenidas cada 14 días (Fig. 48), manifestando diferencias significativas ($P < 0.05$) para los días 14, 28 y 42.

El nivel de proteína afectó significativamente ($P < 0.05$) el crecimiento de la tenguayaca en peso y longitud total (Figs. 48 y 49). El mejor crecimiento observado en ganancia promedio del cuerpo de la tenguayaca se determinó con el nivel de proteína de 45%, con un peso de 3.31 g y una longitud de 6.5 cm, la dieta que presentó menor crecimiento es la de 35% (Figs. 50 y 51).

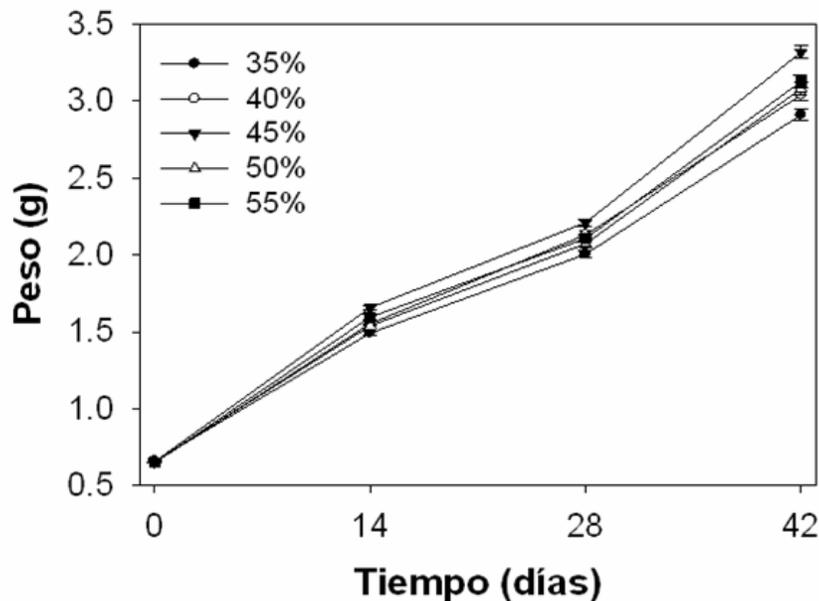


Figura 48. Crecimiento en peso (g) de juveniles de tenguayaca evaluando cinco niveles de proteína con respecto al tiempo.

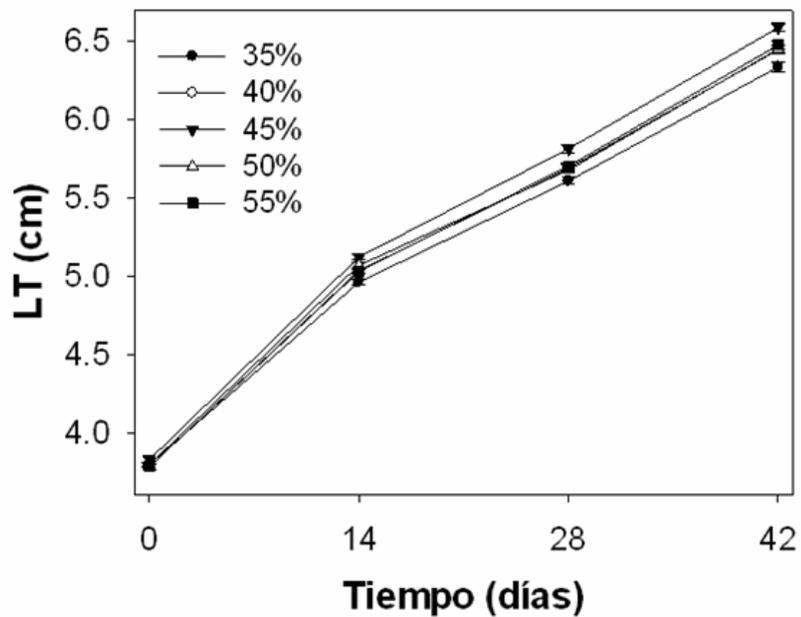


Figura 49. Crecimiento en longitud total (cm) por requerimiento de proteína de juveniles de tenguayaca con respecto al tiempo.

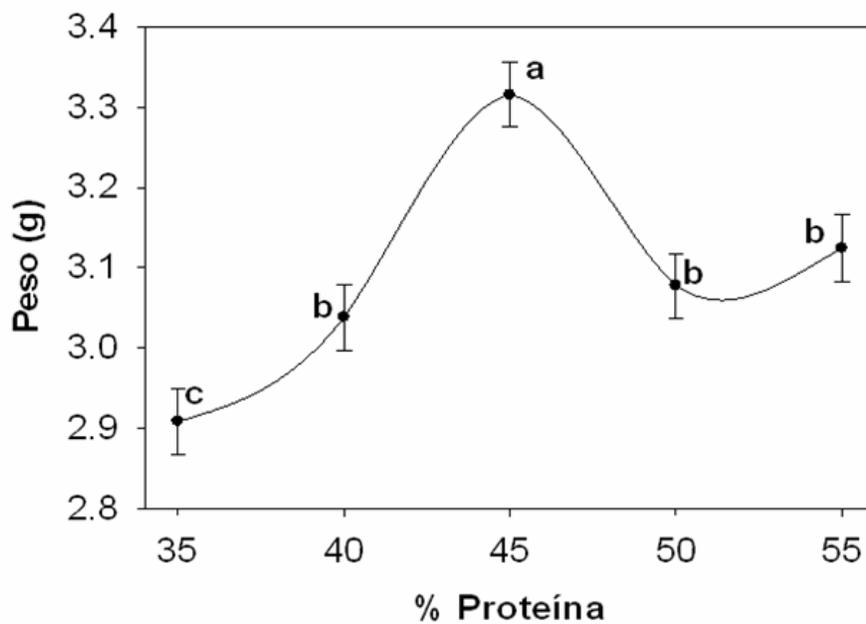


Figura 50. Comparación del crecimiento en peso (g) de juveniles de tenguayaca evaluando cinco niveles de proteína a los 42 días.

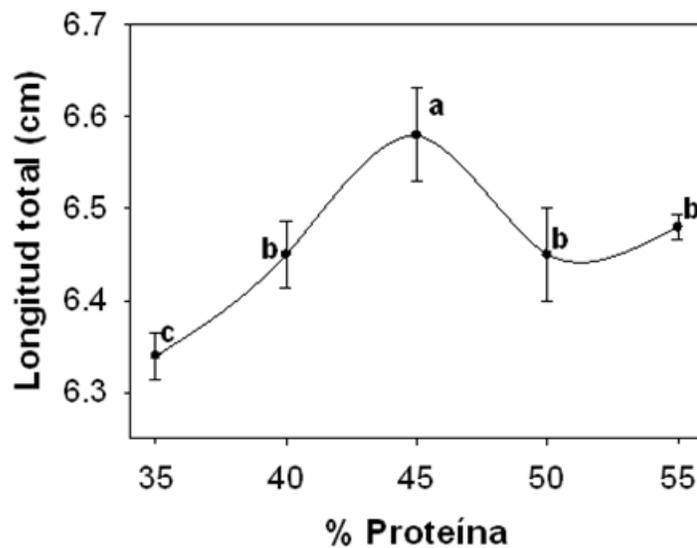


Figura 51. Comparación del crecimiento en peso (g) de juveniles de tenguayaca evaluando cinco niveles de proteína a los 42 días.

Se analizó la respuesta de los organismos a los diferentes niveles de inclusión 35, 40, 45, 50 y 55% de proteína respectivamente, donde los valores promedio del peso fueron ajustados al modelo de saturación de 5 parámetros donde se obtuvieron resultados significativos ($P < 0.05$), en el cual el nivel óptimo requerido de proteína por la tenguayaca en peces masculinizados de 45.3 como se muestra en la figura 52.

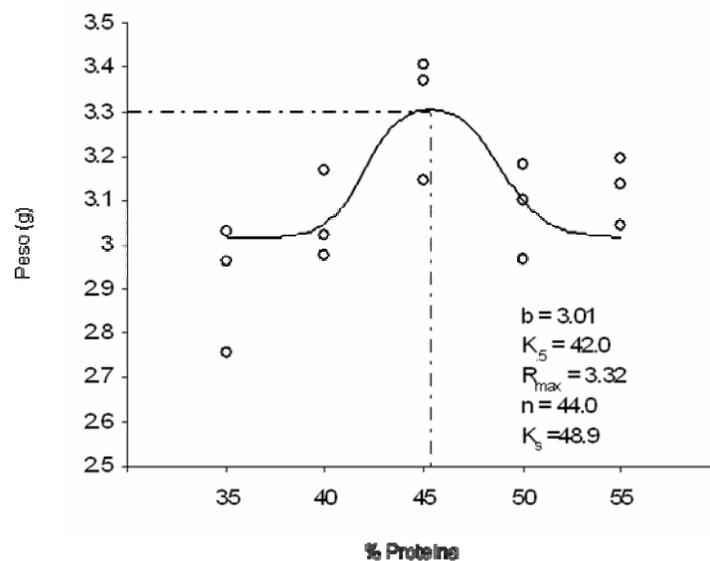


Figura 52. Efecto del nivel de proteína de la dieta sobre el peso final (g) (promedio \pm desv. std) de los juveniles tardíos de tenguayaca en peces masculinizados por nivel de proteína. Se estableció como un nivel de significancia de ($P < 0.05$).

Coefficiente de digestibilidad aparente de la proteína (CDAP).

Al valorar el efecto en el coeficiente de digestibilidad aparente de la proteína en los juveniles con la aplicación de la prueba de Kruskal – Wallis mostraron diferencias significativas ($P < 0.05$) para el CDAP entre las dietas suministradas con los diferentes niveles de inclusión de proteína dietaria (Tabla 5).

Se observó que el coeficiente de digestibilidad aparente de la proteína para los peces, fue mejor con la dieta que contiene 50% de proteína con un valor de (CDAP: 98.06), mientras que las dietas de 35, 40, 45 y 55% de proteína no presentaron diferencias estadísticas entre ellas y sus niveles de CDAP (96.75, 96.94, 94.49 y 97.63%, respectivamente).

Tabla 5. Coeficiente de digestibilidad aparente de la proteína obtenida de los juveniles de tenguayaca por nivel de proteína. (Promedio \pm desv. std). Superíndices desiguales indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

Proteína (%)	Digestibilidad aparente de la proteína
35	96.75 \pm 0.26 ^b
40	96.94 \pm 0.16 ^b
45	94.49 \pm 0.29 ^b
50	98.06 \pm 0.20 ^a
55	97.63 \pm 0.11 ^b

Índices de crecimiento y calidad del alimento

Para poder obtener los cálculos y posteriormente poder realizar las comparaciones entre los índices de calidad del alimento se calcularon los valores promedio de consumo del alimento para los peces durante todo el tiempo que se llevó a cabo el experimento.

Los índices que fueron significativamente diferentes ($P < 0.05$) durante el experimento son mostrados en la tabla 6. Donde se observa que los peces que fueron alimentados con la dieta de 45% de proteína presentan la mejor tasa específicas de crecimiento (SGR; 1.67 %/día). Este tratamiento también tuvo la mayor tasa de crecimiento absoluto (TCA: 0.063) y presenta el valor mas bajo en cuanto al factor de conversión alimenticia (1.10). También registra el valor más alto en lo que se refiere al valor proteínico productivo (PPV) y la máxima ganancia en peso (403.41%). Los peces que presentaron el valor más bajo con respecto a la tasa de eficiencia proteica (PER) fueron los peces que se alimentaron con la dieta de 55% de proteína con un valor de (1.49). Los peces que presentan el mayor factor de condición (FC) fueron los peces

alimentados con la dieta de 40% de proteína (1.00) comparado con los peces alimentados con 45% de proteína, que registraron el FC más bajo (0.86).

Tabla 6. Índices de crecimiento y calidad del alimento calculados durante el experimento para los juveniles de tenguayaca por nivel de proteína (Promedio \pm desv. std). Superíndices desiguales indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

Índices	% de proteína				
	35	40	45	50	55
SGR (%/día)	1.53 \pm 0.04 ^b	1.60 \pm 0.05 ^{ab}	1.67 \pm 0.03 ^a	1.60 \pm 0.03 ^{ab}	1.62 \pm 0.02 ^{ab}
TCA	0.054 \pm 0.003	0.057 \pm 0.003	0.063 \pm 0.003	0.058 \pm 0.002	0.059 \pm 0.002
PER	2.46 \pm 0.08 ^a	2.04 \pm 0.12 ^{ab}	2.17 \pm 0.15 ^{ab}	1.62 \pm 0.20 ^{ab}	1.49 \pm 0.10 ^b
PPV (%)	37.40 \pm 1.19 ^a	31.90 \pm 1.86 ^{ab}	34.76 \pm 2.39 ^{ab}	26.01 \pm 3.24 ^{ab}	27.73 \pm 1.63 ^b
FCA	1.26 \pm 0.04	1.29 \pm 0.08	1.10 \pm 0.07	1.28 \pm 0.17	1.24 \pm 0.08
FC	0.97 \pm 0.02	1.00 \pm 0.05	0.86 \pm 0.04	0.95 \pm 0.09	0.93 \pm 0.05
WG (%)	341.25 \pm 17.74 ^b	369.22 \pm 20.99 ^{ab}	403.41 \pm 15.61 ^a	370.15 \pm 11.70 ^{ab}	379.15 \pm 10.13 ^{ab}

Análisis químico proximal de los juveniles de tenguayaca.

La tabla 7 muestra la composición química proximal de los peces enteros de juveniles de tenguayaca en los cuales se detectaron diferencias significativas ($P < 0.05$) en el porcentaje de proteína entre los peces del inicio (55.40) con respecto a los peces que fueron alimentados con la dieta de 35% de proteína (51.74).

Tabla 7. Análisis químico proximal de los juveniles de tenguayaca enteros por nivel de proteína al inicio y al final del experimento (Promedio \pm desv. std). Superíndices desiguales indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

Proteína (%)	Proteína			
	Humedad	Proteína	Extracto etéreo	Cenizas
Inicio	31.77 \pm 0.01	55.40 \pm 0.30 ^a	27.83 \pm 0.55	10.31 \pm 0.26
35	44.34 \pm 8.25	51.74 \pm 1.36 ^b	39.82 \pm 3.32	8.88 \pm 0.16
40	18.27 \pm 12.74	52.79 \pm 0.78 ^{ab}	34.85 \pm 3.53	9.97 \pm 0.72
45	20.33 \pm 19.83	53.85 \pm 1.12 ^{ab}	37.91 \pm 2.38	8.75 \pm 1.45
50	18.18 \pm 27.98	53.92 \pm 0.30 ^{ab}	30.14 \pm 1.73	10.28 \pm 0.82
55	25.35 \pm 25.76	53.71 \pm 1.19 ^{ab}	30.50 \pm 6.88	10.24 \pm 0.75

Supervivencia.

Los porcentajes de supervivencia reportada durante el experimento con los juveniles alimentados con diferentes niveles de inclusión de proteína no se detectaron diferencias significativas ($P>0.05$), donde se observó una supervivencia en todos los tratamientos del 100%.

Requerimiento de lípidos.

Materiales y Métodos.

Para este experimento se utilizaron nuevamente juveniles de tenguayaca (0.6 ± 0.1 g) las cuales se obtuvieron y masculinizaron de la misma forma del experimento anterior.

Los peces fueron colocados (30 por tina) en el mismo sistema utilizado para el experimento de proteína, la manera de cultivo y alimentación fue el mismo descrito anteriormente.

Las formulaciones fueron diseñadas utilizando el programa WINMIXIT 5.0 y los alimentos fueron fabricados en el laboratorio de Acuicultura de la UJAT-DACBIOL (Tabla 8).

Tabla 8. Formulación y análisis químico proximal de las dietas experimentales con diferentes niveles de lípidos para

juveniles de tenguayaca.				
INGREDIENTES	5%	10%	15%	20%
Caseína	44.57	45.13	45.69	46.25
Harina de sorgo	37.00	31.15	25.30	19.39
Fish oil from menhaden	2.02	5.81	9.60	12.95
Lecitina de soya	1.00	2.50	4.00	6.00
Harina de sardina	10.00	10.00	10.00	10.00
Carboximetil celulosa	3.00	3.00	3.00	3.00
L-lisina HCL	0.50	0.50	0.50	0.50
Premezcla de Vitaminas	0.25	0.25	0.25	0.25
Minerales	0.15	0.15	0.15	0.15
L-Metionina	0.50	0.50	0.50	0.50
Vitamina C	0.05	0.05	0.05	0.05
Oxido cromico	1.00	1.00	1.00	1.00
BHT	0.004	0.004	0.004	0.004
NUTRIENTES				
Proteína cruda	45.00	45.00	45.00	45.00
Extracto etereo	5.00	10.00	15.00	20.00
Fibra cruda	3.58	3.49	3.41	3.32
Cenizas	3.47	3.41	3.34	3.27
E.L.N.	42.95	38.10	33.25	28.41

El experimento duró un total de 60 días para lo cual se realizaron biometrías cada 15 días evaluando el crecimiento en peso y longitud total como se mencionó en el experimento anterior. Al final del experimento se tomaron muestras de 10 peces los cuales serán congelados, liofilizados y analizados para la determinación de proteína, lípidos y energía. Asimismo, se evaluarán los mismos índices de crecimiento y de calidad del alimento como se describió anteriormente. El análisis de digestibilidad de nutrientes se realizó por medio de la recolección de heces y la determinación de la concentración de óxido crómico de acuerdo al apartado anterior.

Resultados.

El crecimiento de los juveniles de tenguayaca en relación al tiempo mostró diferencias significativas ($P < 0.05$) tanto para peso como longitud total (Figs. 53 y 54) donde los peces alimentados con las dietas que contienen 15 y 20 % de lípidos fueron mayores al resto de los tratamientos incluyendo los peces alimentados con la dieta comercial para trucha (usada como control, CD) e iguales entre ellos a partir de los 30 días y hasta el final del experimento.

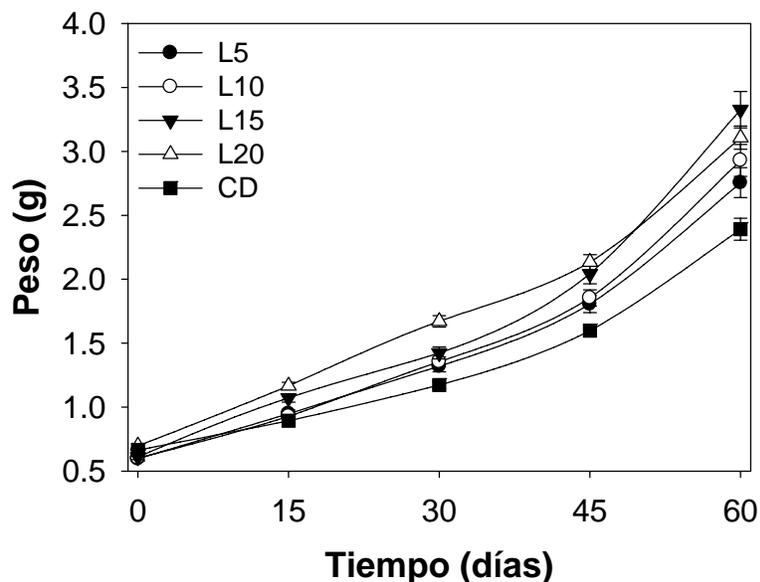


Figura 53. Crecimiento en peso ($g \pm DE$) de los juveniles de *P. splendida* alimentadas con las dietas semi-purificadas usando cuatro niveles de lípidos.

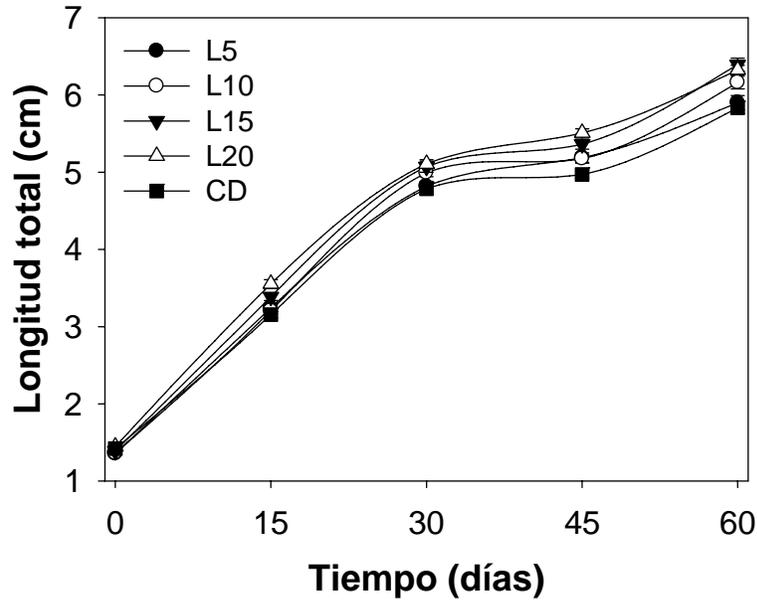


Figura 54. Crecimiento en longitud total (cm \pm DE) de los juveniles de *P. splendida* alimentadas con las dietas semi-purificadas usando cuatro niveles de lípidos.

La comparación al final del experimento (día 60) muestra diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) para el peso y la longitud total donde los peces alimentados con las dietas que contienen 15 y 20% de lípidos son los más grandes comparados con los peces alimentados con las dietas de 5, 10% de lípidos y la dieta comercial para trucha (16% de lípidos) (Figs. 55 y 56).

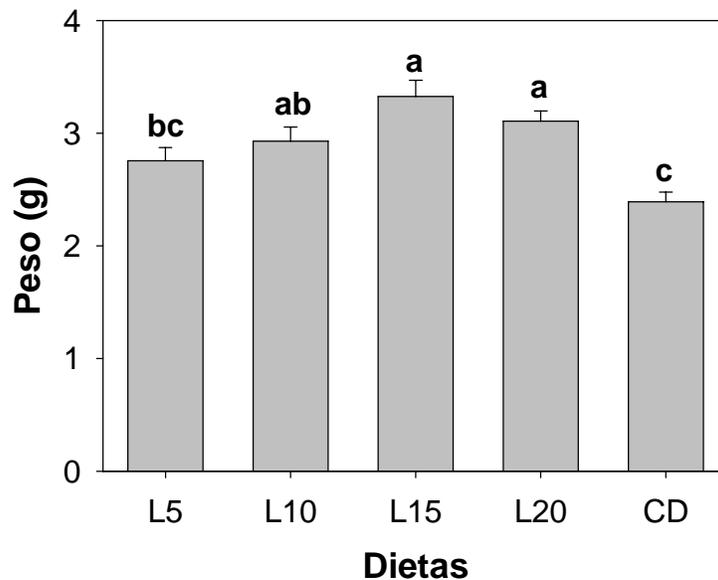


Figura 55. Comparación del peso (g \pm DE) de las larvas de *P. splendida* alimentadas con las dietas semi-purificadas usando cuatro niveles de lípidos.

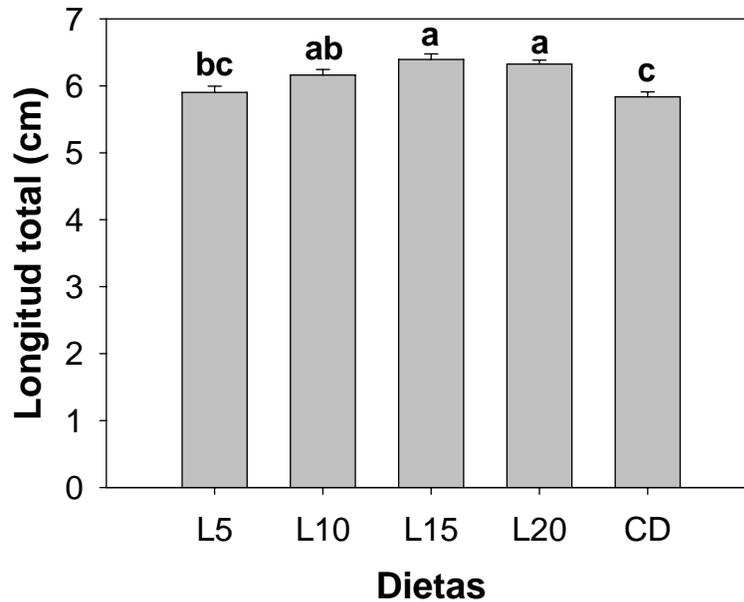


Figura 56. Comparación del longitud total (cm \pm DE) de las larvas de *P. splendida* alimentadas con las dietas semi-purificadas usando cuatro niveles de lípidos.

Los índices de crecimiento y de calidad del alimento muestran diferencias significativas para el FCR y WG donde los peces alimentados con las dietas de 15 y 20% fueron más eficientes en la utilización del alimento y crecimiento; mientras que la mayor tasa de aprovechamiento lipídico se obtuvo para los peces alimentados con la dieta de 5% de lípidos (LER), siendo significativamente más alta que los peces alimentados con las otras dietas experimentales y el alimento comercial. Para los otros índices (CF, DFI y DLI) y la supervivencia no se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos (Tabla 9).

Tabla 9. Índices de crecimiento y de calidad del alimento (Promedio \pm DE) de juveniles de *P. splendida* alimentados con cuatro niveles de lípidos.

Índices	5	10	15	20	DC
FCR	0.44 \pm 0.10b	0.41 \pm 0.05b	0.36 \pm 0.05a	0.41 \pm 0.10b	0.52 \pm 0.01c
CF	1.35 \pm 0.11	1.25 \pm 0.03	1.27 \pm 0.00	1.23 \pm 0.01	1.20 \pm 0.00
DFI	0.041 \pm 0.003	0.040 \pm 0.002	0.041 \pm 0.003	0.042 \pm 0.006	0.039 \pm 0.001
DLI	0.002 \pm 0.000	0.004 \pm 0.000	0.006 \pm 0.000	0.008 \pm 0.001	0.006 \pm 0.000
LER	45.7 \pm 5.8a	24.8 \pm 2.6b	18.8 \pm 2.4c	12.4 \pm 1.9c	12.1 \pm 0.2c
WG%	361.1 \pm 8.5b	386.6 \pm 38.9b	444.4 \pm 8.3a	346.3 \pm 26.3b	267.3 \pm 10.9c
Supervivencia	88.9 \pm 8.4	88.3 \pm 10.0	84.4 \pm 5.1	91.1 \pm 6.9	100.0 \pm 0.0

Desarrollo De Dietas Prácticas

Sustitución de harina de pescado por gluten de trigo en alimentos prácticos.

Materiales y métodos.

Este estudio fue dividido en tres experimentos donde se evaluó la sustitución de harina de pescado por gluten de trigo en dietas prácticas en larvas, juveniles y adultos de la mojarra tenguayaca.

Experimento 1 (LARVAS).

Para este primer experimento las larvas fueron obtenidas del lote de reproductores de *P. splendida* en el Laboratorio de Acuicultura. Los huevos fertilizados fueron colectados del nido por medio de sifoneo y colocados en un sistema de recirculación hasta la eclosión y absorción de vitelo. Después de la eclosión las larvas fueron contadas y se inició la alimentación con nauplios de *Artemia* enriquecida con la hormona 17 α -metiltestosterona (20 mg/L) en agua de mar por 15 días. A partir del día 16, se seleccionaron y sembraron las larvas en el sistema de recirculación anteriormente descrito y colocando 100 larvas por tina (70L); asimismo, se inició el proceso de adaptación a los alimentos experimentales, los cuales fueron enriquecidos con el mismo esteroide para lograr su masculinización.

El diseño experimental consistió en la aplicación de siete tratamientos los cuales se describen a continuación.

- 1) Larvas de tenguayaca alimentadas con una dieta control con 100% de harina de pescado y 0% de gluten de trigo.
- 2) Larvas de tenguayaca alimentadas con una dieta con 75% de harina de pescado y 25% de gluten de trigo.
- 3) Larvas de tenguayaca alimentadas con una dieta con 50% de harina de pescado y 50% de gluten de trigo.
- 4) Larvas de tenguayaca alimentadas con una dieta con 25% de harina de pescado y 75% de gluten de trigo.
- 5) Larvas de tenguayaca alimentadas con una dieta con 0% de harina de pescado y 100% de gluten de trigo.
- 6) Larvas de tenguayaca alimentadas con nauplios de artemia. (Control No. 1).
- 7) Larvas de tenguayaca alimentadas con una dieta de trucha Silver Cup (Control No. 2).

Para este experimento cada tratamiento fue evaluado por triplicado por un periodo de 30 días a partir de la adaptación a las dietas experimentales (día 18 post alimentación). La alimentación se suministró cuatro veces al día (8:00, 12:00, 16:00, and 20:00 h). Las dietas fueron diseñadas con el programa WINMIXIT 5.0 y fabricadas en el Laboratorio de Acuicultura de la UJAT-DACBIOL (Tabla 10).

Tabla 10. Formulaciones de las dietas prácticas usadas para los experimentos de larvas, juveniles y adultos de la mojarra tenguayaca.

Ingrediente (g/Kg MS)	100%HP	75%HP	50%HP	25%HP	0%HP
	0%GT	25%GT	50%GT	75%GT	100%GT
Harina de sardina	650.3	504.8	300.0	150.0	0
Gluten de trigo	0	155.0	300.0	470.0	566.9
Pasta de soya	112.7	67.7	141.5	89.4	156.8
Harina de sorgo	150.0	160.0	135.0	140.0	120.0
Aceite de Menhaden	32.0	50.0	49.0	80.0	81.8
Lecitina de soya	20.5	28.0	40.0	36.1	40.0
Grenetina	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0
Vit Premix	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
Min. Premix.	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
Vitamina C	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Composición proximal (g/100g dieta MS)					
Proteína	45.1	45.3	44.9	45.2	45.1
Extracto etéreo	8.3	8.2	8.2	8.2	8.0

El método de muestreo consistió en el registro del peso y longitud total de toda la población cada 15 días. La supervivencia se registró al final del experimento por conteo total.

Diariamente se monitoreo la calidad del agua (oxígeno disuelto, temperatura, pH diariamente y nitrato, nitrato y amonio cada semana) de la misma manera como se mencionó anteriormente.

Análisis estadístico.

Para la comparación entre el crecimiento en peso y supervivencia de las diferentes dietas se comprobó la normalidad (Prueba Kolmogorov-Smirnov) y se aplicó una ANOVA. Para detectar las diferencias entre los tratamientos se aplicó una prueba a posteriori (Tukey). La supervivencia se evaluó por medio de un análisis no paramétrico de comparación de rangos de Kruskal-Wallis, además de utilizar la prueba de Nemenyi para detectar las diferencias entre los tratamientos. Para todas las pruebas se utilizó un nivel de confianza de 0.05 con el programa STATISTICA 7.0

Resultados.

El mejor resultado en cuanto al crecimiento en peso y longitud total (Figs. 57 y 58) y supervivencia fue obtenido para las larvas alimentadas con la dieta que contiene un 25% de gluten de trigo y 75 % de harina de pescado comparado con el resto de los tratamientos (incluyendo ambos controles).

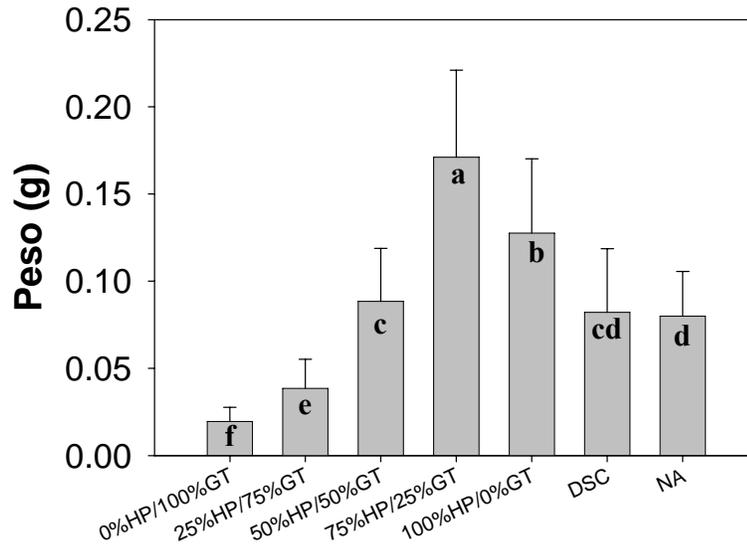


Figura 57. Comparación del peso ($g \pm DE$) de las larvas de *P. splendida* alimentadas con las dietas prácticas conteniendo diferentes proporciones de gluten de trigo y harina de pescado.

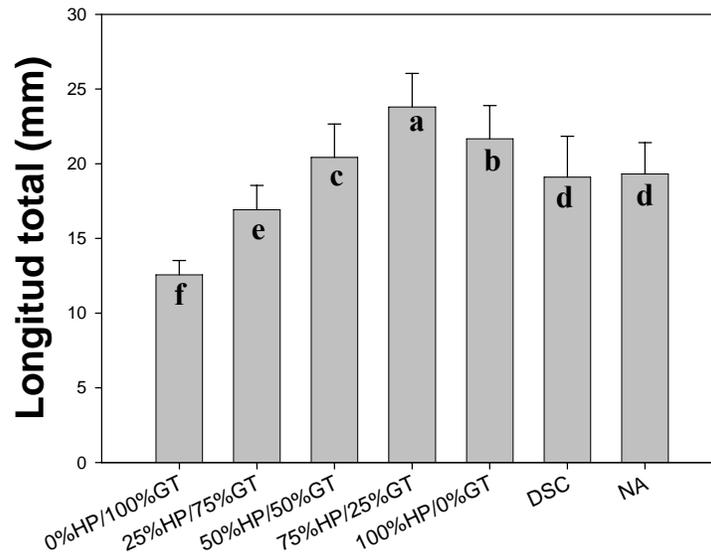


Figura 58. Comparación de la longitud total ($mm \pm DE$) de las larvas de *P. splendida* alimentadas con las dietas prácticas conteniendo diferentes proporciones de gluten de trigo y harina de pescado

Materiales y métodos.

Experimento 2 (JUVENILES).

Para este segundo experimento los juveniles fueron obtenidos a partir de una producción de larvas previamente masculinizadas (como se mencionó en el apartado anterior), hasta que los peces alcanzaron un peso promedio de 3 g. Los peces se seleccionaron y sembraron en el mismo sistema de recirculación anteriormente descrito y colocando 30 peces por tina (70L); asimismo, se inició el proceso de adaptación a los alimentos experimentales.

El diseño experimental consistió en la aplicación de seis tratamientos los cuales se describen a continuación.

- 1) Juveniles de tenguayaca alimentadas con una dieta control con 100% de harina de pescado y 0% de gluten de trigo.
- 2) Juveniles de tenguayaca alimentadas con una dieta con 75% de harina de pescado y 25% de gluten de trigo.
- 3) Juveniles de tenguayaca alimentadas con una dieta con 50% de harina de pescado y 50% de gluten de trigo.
- 4) Juveniles de tenguayaca alimentadas con una dieta con 25% de harina de pescado y 75% de gluten de trigo.
- 5) Juveniles de tenguayaca alimentadas con una dieta con 0% de harina de pescado y 100% de gluten de trigo.
- 6) Juveniles de tenguayaca alimentadas con una dieta de trucha Silver Cup (Control).

Para este experimento cada tratamiento fue evaluado por triplicado por un periodo de 56 días a partir del inicio de la adaptación a las dietas experimentales. La alimentación se suministró tres veces al día (8:00, 14:00 y 20:00 h). Se utilizaron las mismas dietas que en experimento anterior.

El método de muestreo consistió en el registro del peso y longitud total de toda la población cada 14 días. La supervivencia se registró al final del experimento por conteo total. Diariamente se monitoreo la calidad del agua (oxígeno disuelto, temperatura, pH diariamente y nitrito, nitrato y amonio cada semana) de la misma manera como se mencionó anteriormente. Al final del experimento se determinaron los índices de crecimiento y calidad del alimento a partir de los datos de consumo de acuerdo al las fórmulas anteriormente mostradas en el experimento de requerimiento de proteína. Asimismo, se tomaron muestras

de 10 peces por tina para la determinación de proteína, lípidos y energía los cuales se mandaron al CIBNOR en B.C.S.

Análisis estadístico.

Para la comparación entre el crecimiento en peso y supervivencia de las diferentes dietas se comprobó la normalidad (Prueba Kolmogorov-Smirnov) y se aplicó una ANOVA. Para detectar las diferencias entre los tratamientos se aplicó una prueba a posteriori (Tukey). La supervivencia, índices de crecimiento y calidad del alimento se evaluaron por medio de un análisis no paramétrico de comparación de rangos de Kruskal-Walis, además de utilizar la prueba de Nemenyi para detectar las diferencias entre los tratamientos. Para todas las pruebas se utilizó un nivel de confianza de 0.05 con el programa STATISTICA 7.0

Resultados.

Se observa que el peso de los juveniles de *P. splendida*, respondieron de manera similar a las larvas, encontrándose diferencias significativas ($P < 0.05$), donde los peces alimentados con la dieta que contenía una sustitución 25% de GT y 75% HP fueron mayores al resto de los tratamientos, incluyendo la dieta control para trucha (Fig. 59, Tabla 11) para la longitud total los peces alimentados con las dietas con sustitución de 25 y 50% de GT fueron mayores al resto de los tratamientos (Fig. 60, Tabla 12).

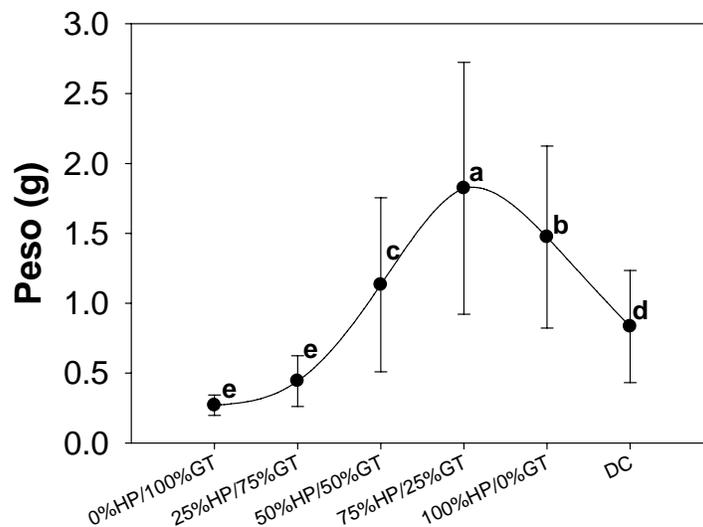


Figura 59. Comparación del peso ($g \pm DE$) de los juveniles de *P. splendida* alimentadas con las dietas prácticas conteniendo diferentes proporciones de gluten de trigo y harina de pescado.

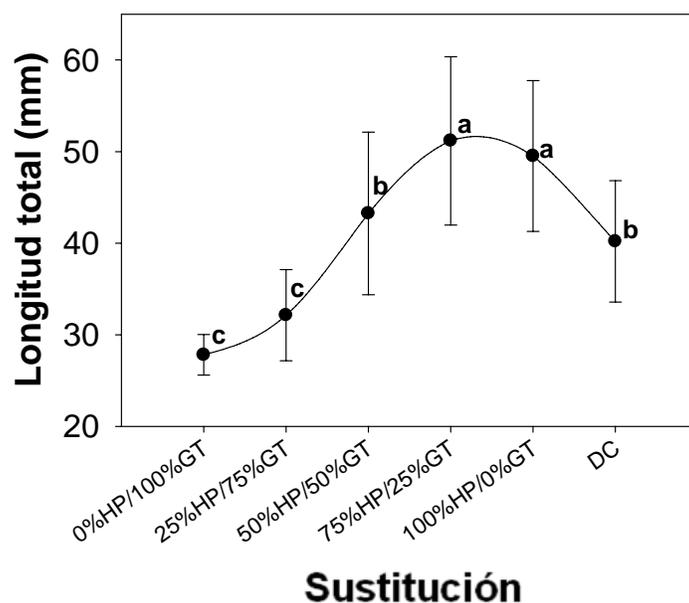


Figura 60. Comparación de la longitud total (mm \pm DE) de los juveniles de *P. splendida* alimentadas con las dietas prácticas conteniendo diferentes proporciones de gluten de trigo y harina de pescado.

Tabla 11. Peso (promedio, g \pm DE) de juveniles de *P. splendida* alimentados con las dietas prácticas sustituyendo harina de pescado con gluten de trigo por 56 días.

Tiempo (días)	Sustitución					DC
	0% HP 100% GT	25% HP 70% GT	50% HP 50% GT	75% HP 25% GT	100% HP 0% GT	
0	0.06 \pm 0.02	0.06 \pm 0.02	0.06 \pm 0.02	0.06 \pm 0.02	0.06 \pm 0.02	0.06 \pm 0.02
14	0.10 \pm 0.03 ^b	0.10 \pm 0.03 ^b	0.17 \pm 0.07 ^a	0.17 \pm 0.08 ^a	0.15 \pm 0.06 ^a	0.15 \pm 0.05 ^a
28	0.15 \pm 0.04 ^d	0.20 \pm 0.07 ^c	0.33 \pm 0.14 ^{ab}	0.38 \pm 0.18 ^a	0.33 \pm 0.15 ^{ab}	0.29 \pm 0.11 ^b
42	0.20 \pm 0.05 ^e	0.30 \pm 0.11 ^d	0.63 \pm 0.29 ^{ab}	0.81 \pm 0.39 ^a	0.70 \pm 0.32 ^{ab}	0.51 \pm 0.26 ^c
56	0.27 \pm 0.07 ^e	0.44 \pm 0.18 ^e	1.13 \pm 0.62 ^c	1.82 \pm 0.90 ^a	1.47 \pm 0.65 ^b	0.83 \pm 0.40 ^d

Tabla 12. Longitud total (promedio, mm \pm DE) de juveniles de *P. splendida* alimentados con las dietas prácticas sustituyendo harina de pescado con gluten de trigo por 56 días.

Tiempo (días)	Substitución					DC
	0% HP 100% GT	25% HP 70% GT	50% HP 50% GT	75% HP 25% GT	100% HP 0% GT	
0	0.06 \pm 0.02	0.06 \pm 0.02	0.06 \pm 0.02	0.06 \pm 0.02	0.06 \pm 0.02	0.06 \pm 0.02
14	0.10 \pm 0.03 ^b	0.10 \pm 0.03 ^b	0.17 \pm 0.07 ^a	0.17 \pm 0.08 ^a	0.15 \pm 0.06 ^a	0.15 \pm 0.05 ^a
28	0.15 \pm 0.04 ^d	0.20 \pm 0.07 ^c	0.33 \pm 0.14 ^{ab}	0.38 \pm 0.18 ^a	0.33 \pm 0.15 ^{ab}	0.29 \pm 0.11 ^b
42	0.20 \pm 0.05 ^e	0.30 \pm 0.11 ^d	0.63 \pm 0.29 ^{ab}	0.81 \pm 0.39 ^a	0.70 \pm 0.32 ^{ab}	0.51 \pm 0.26 ^c
56	0.27 \pm 0.07 ^e	0.44 \pm 0.18 ^e	1.13 \pm 0.62 ^c	1.82 \pm 0.90 ^a	1.47 \pm 0.65 ^b	0.83 \pm 0.40 ^d

Por otra parte, se detectaron diferencias significativas ($P < 0.05$) para todos los índices de calidad del alimento, excepto el factor de condición (FC) y la supervivencia, donde los peces alimentados con la dieta de 0% de harina de pescado y 100% de gluten de trigo mostraron los peores valores, mientras que el resto de los tratamientos fueron iguales (Tabla 13).

Tabla 13. Índices de crecimiento y de calidad del alimento (promedio \pm DE) de juveniles de *P. splendida* alimentados con las dietas prácticas sustituyendo harina de pescado con gluten de trigo.

Índices	Substitución					DC
	0% HP 100% GT	25% HP 70% GT	50% HP 50% GT	75% HP 25% GT	100% HP 0% GT	
Consumo (g MS)	17.1 \pm 1.6 ^b	19.1 \pm 1.0 ^{ab}	30.4 \pm 4.5 ^{ab}	41.2 \pm 0.9 ^a	36.3 \pm 0.3 ^{ab}	25.5 \pm 1.7 ^{ab}
FCA	2.6 \pm 0.4 ^b	1.5 \pm 0.2 ^{ab}	0.9 \pm 0.3 ^{ab}	0.7 \pm 0.0 ^a	0.8 \pm 0.1 ^{ab}	1.0 \pm 0.2 ^{ab}
Supervivencia (%)	48.9 \pm 22.7 ^b	82.2 \pm 3.5 ^{ab}	95.6 \pm 7.7 ^{ab}	98.9 \pm 1.9 ^a	86.7 \pm 8.8 ^{ab}	95.6 \pm 19 ^{ab}
TEC (%/día)	2.7 \pm 0.3 ^b	3.6 \pm 0.3 ^{ab}	5.2 \pm 0.4 ^{ab}	6.2 \pm 0.1 ^a	5.9 \pm 0.2 ^{ab}	4.6 \pm 0.3 ^{ab}
FC	1.3 \pm 0.0	1.3 \pm 0.1	1.4 \pm 0.0	1.4 \pm 0.1	1.2 \pm 0.0	1.3 \pm 0.0
TEP	0.9 \pm 0.1 ^b	1.5 \pm 0.2 ^{ab}	2.7 \pm 0.9 ^{ab}	3.1 \pm 0.2 ^a	2.9 \pm 0.5 ^{ab}	2.2 \pm 0.5 ^{ab}
GP (%)	354.6 \pm 62.4 ^b	647.7 \pm 110.0 ^{ab}	1721.1 \pm 374.9 ^{ab}	3140.6 \pm 130.9 ^a	2571.8 \pm 295.7 ^{ab}	1249.5 \pm 221.5 ^{ab}

FCA: Factor de Conversión alimenticia, TEC: Tasa Específica de Crecimiento, FC: Factor de Conversión, TEP: Tasa de Eficiencia Proteínica, GP: Ganancia en Peso.

Material y métodos.

Experimento 3 (ADULTOS)

Para este tercer experimento los adultos fueron obtenidos de un cultivo comercial en la Ranchería Chico Zapote, Nacajuca, Tabasco con un peso promedio de 60 g. Los peces se seleccionaron utilizando una proporción sexual de dos hembras por un macho y sembrados en un sistema de abierto que consta de 30

tinas de 2 m³ y colocando 9 peces por tina (6 hembras y 3 machos) e iniciando el proceso de adaptación a los alimentos experimentales.

El diseño experimental consistió en la aplicación de cinco tratamientos los cuales se describen a continuación.

- 1) Adultos de tenguayaca alimentadas con una dieta control con 100% de harina de pescado y 0% de gluten de trigo.
- 2) Adultos de tenguayaca alimentadas con una dieta con 75% de harina de pescado y 25% de gluten de trigo.
- 3) Adultos de tenguayaca alimentadas con una dieta con 50% de harina de pescado y 50% de gluten de trigo.
- 4) Adultos de tenguayaca alimentadas con una dieta con 25% de harina de pescado y 75% de gluten de trigo.
- 5) Adultos de tenguayaca alimentadas con una dieta con 0% de harina de pescado y 100% de gluten de trigo.

Para este experimento cada tratamiento fue evaluado por triplicado por un periodo de 84 días a partir del inicio de la adaptación a las dietas experimentales. La alimentación se suministró tres veces al día (8:00, 14:00 y 20:00 h). Se utilizaron las mismas dietas que en experimento anterior.

El método de muestreo consistió en el registro del peso y longitud total de toda la población cada 14 días. La supervivencia se registró al final del experimento por conteo total.

Diariamente se monitoreo la calidad del agua (oxígeno disuelto, temperatura, pH diariamente y nitrito, nitrato y amonio cada semana) de la misma manera como se mencionó anteriormente.

Al final del experimento se determinaron los índices de crecimiento y calidad del alimento a partir de los datos de consumo de acuerdo al las fórmulas anteriormente mostradas en el experimento de requerimiento de proteína.

Análisis estadístico.

Para la comparación entre el crecimiento en peso y supervivencia de las diferentes dietas se comprobó la normalidad (Prueba Kolmogorov-Smirnov) y se aplicó una ANOVA. Para detectar las diferencias entre los tratamientos se aplicó una prueba a posteriori (Tukey). La supervivencia, índices de crecimiento y

calidad del alimento se evaluaron por medio de un análisis no paramétrico de comparación de rangos de Kruskal-Walis, además de utilizar la prueba de Nemenyi para detectar las diferencias entre los tratamientos. Para todas las pruebas se utilizó un nivel de confianza de 0.05 con el programa STATISTICA 7.0

Resultados.

En general el crecimiento de los adultos de *P. splendida* fueron lentos para los 84 días que duró el experimento, tanto en la determinación del peso como de la longitud total. Se debe resaltar que solo se detectaron diferencias significativas para el peso a partir de los 42 días (Fig. 61), donde se corroboró la posibilidad de sustituir en un 25 % la harina de pescado. De esta manera, la comparación del peso al final de los 84 días mostro que los peces alimentados con las dietas que contienen sustituciones de 50% y 25% son estadísticamente iguales a la del control (0% GT) (Fig. 62). Para la longitud total no se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos (Fig. 63), aunque se observa una ligera tendencia a ser más largos los peces alimentados con la dieta que contiene una sustitución de 25% de gluten de trigo y 75% de harina de pescado (Fig. 64).

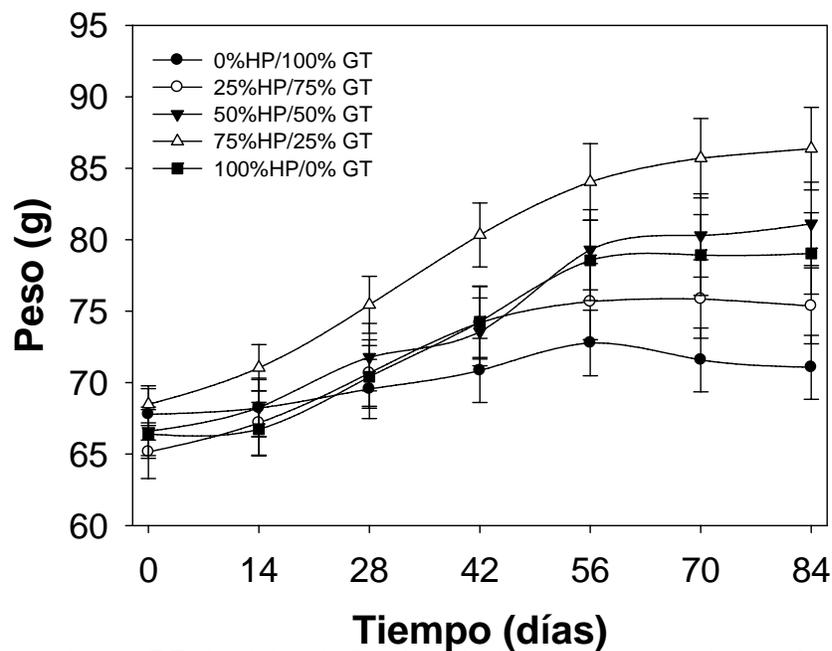


Figura 61. Peso (promedio, g \pm DE) de adultos de *P. splendida* alimentados con las dietas prácticas sustituyendo harina de pescado con gluten de trigo por 84 días.

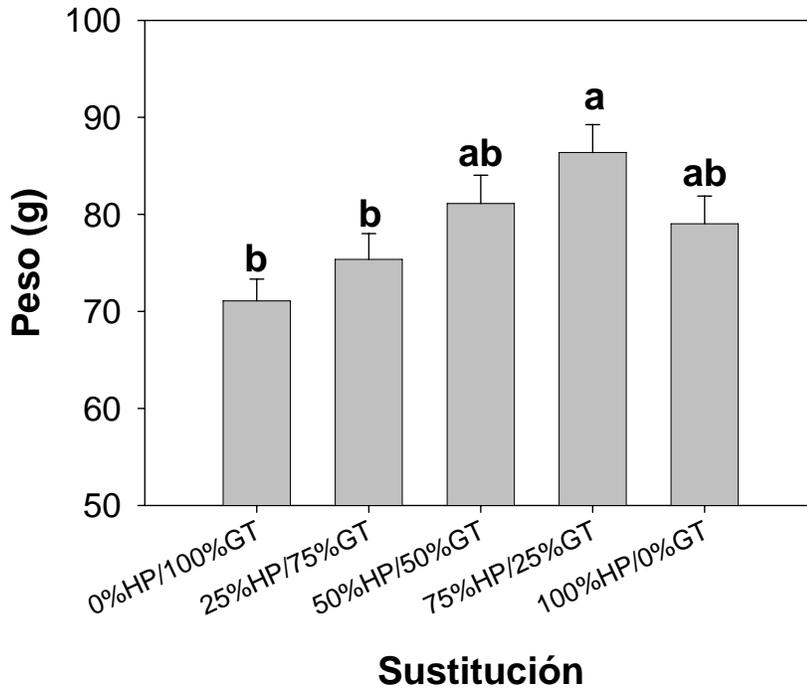


Figura 62. Comparación del peso ($g \pm DE$) de los adultos de *P. splendida* alimentadas con las dietas prácticas conteniendo diferentes proporciones de gluten de trigo y harina de pescado.

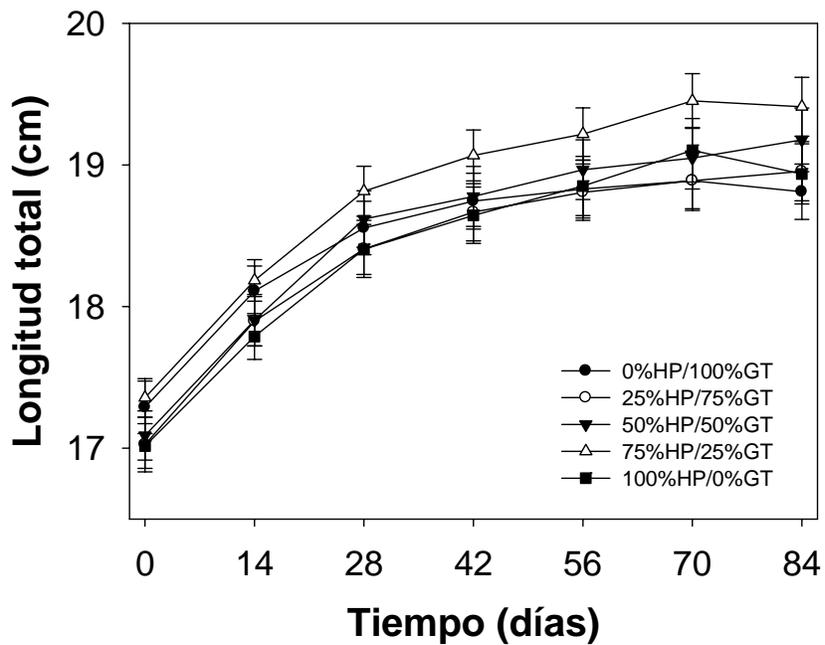


Figura 63. Longitud total (promedio, $g \pm DE$) de adultos de *P. splendida* alimentados con las dietas prácticas sustituyendo harina de pescado con gluten de trigo por 84 días.

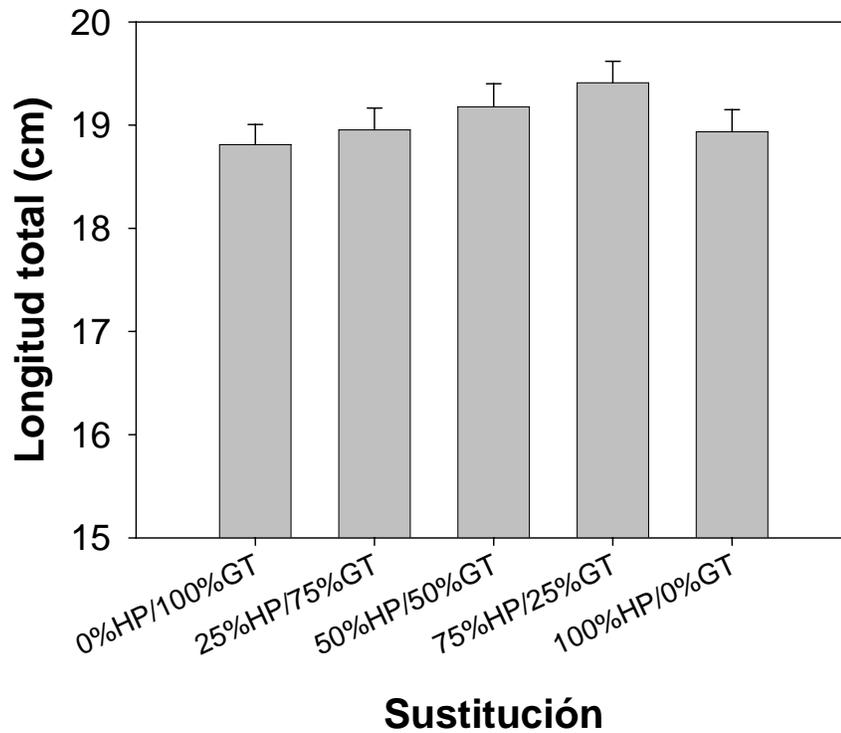


Figura 64. Comparación de la longitud total (cm \pm DE) de los adultos de *P. splendida* alimentadas con las dietas prácticas conteniendo diferentes proporciones de gluten de trigo y harina de pescado.

Se detectaron diferencias significativas ($P < 0.05$) para la TCE, FCA, GP y Consumo de alimento donde la única diferencia se observó para los peces alimentados con la dieta que contenía 100% de GT, donde los peces mostraron los peores valores (Tabla 14).

Tabla 14. Índices de crecimiento y de calidad del alimento (promedio \pm DE) de adultos de *P. splendida* alimentados con las dietas prácticas sustituyendo harina de pescado con gluten de trigo.

Índices	0% HP	25% HP	50% HP	75% HP	100% HP
	100% GT	70% GT	50% GT	25% GT	0% GT
Consumo (g MS)	341.1 \pm 5.5b	425.3 \pm 80.1a	405.8 \pm 51.4a	492.4 \pm 63.0a	472.0 \pm 16.0a
FCA	11.3 \pm 2.3b	5.1 \pm 1.5a	3.1 \pm 0.3a	3.4 \pm 1.2a	4.2 \pm 0.4 ^a
Supervivencia (%)	100	100	100	100	100
TEC (%/día)	0.2 \pm 0.0	0.3 \pm 0.1	0.4 \pm 0.1	0.5 \pm 0.1	0.3 \pm 0.0
FC	1.1 \pm 0.0	1.1 \pm 0.0	1.2 \pm 0.0	1.2 \pm 0.0	1.2 \pm 0.0
CDA	0.5 \pm 0.0	0.6 \pm 0.1	0.5 \pm 0.1	0.7 \pm 0.1	0.6 \pm 0.0
GP (%)	5.1 \pm 1.0b	15.8 \pm 8.1a	21.7 \pm 3.4a	25.9 \pm 10.2a	19.1 \pm 2.9a

FCA: Factor de Conversión alimenticia, TEC: Tasa Específica de Crecimiento, FC: Factor de Conversión, GP: Ganancia en Peso, CDA: Consumo Diario de Alimento.

Discusión

Desde el punto de vista de la capacidad digestiva de los organismos, es sumamente importante entender la manera en que las enzimas actúan durante su desarrollo. Esto conlleva a estudiar a lo largo de la ontogenia temprana la aparición u optimización de las enzimas digestivas lo cual ha sido ampliamente documentado para especies como *Paralichthys olivaceus*, donde el crecimiento de la larva es lento, hasta el día 27 después de la eclosión (DDE) donde además, el contenido de proteína soluble muestra un periodo de estancamiento entre los 27 y 33 DDE, y que incrementa hasta alcanzar la máxima actividad enzimática cuando inicia la metamorfosis (asentamiento). De igual manera, fue reportado para larvas de *Seriola lalandi* que el crecimiento en peso es lento durante los primeros 36 DDE, incrementándose cuando las larvas sufren cambios morfológicos para transformarse a juvenil (Bolasina *et al.*, 2006; Ben *et al.*, 2006). Es así que el entendimiento de la fisiología digestiva pone de manifiesto la posibilidad de crear dietas artificiales adecuadas (Moyano *et al.*, 1996), y a su vez permitan una disminución del costo de producción de alimentos vivos, a su vez que el crecimiento y supervivencia de las larvas sea mayor (Furné *et al.*, 2005). En el caso de los resultados obtenidos para *P. splendida* los resultados de la actividad enzimática muestran que las larvas están plenamente capacitadas para consumir inclusive, alimentos artificiales desde etapas tempranas, teniendo un desarrollo enzimático similar al de la tilapia *Oreochromis niloticus* (Tengjaroenkul *et al.*, 2000; Tengjaroenkul *et al.*, 2003), aunque con un menor crecimiento. Por otra parte, el desarrollo del tracto digestivo en las larvas de peces dulceacuícolas en ambientes tropicales es muy diferente, comparado con el desarrollo del tracto digestivo de larvas de peces marinos o de peces de aguas templadas, donde el estómago no es funcional en la primera alimentación y la digestión de las proteínas depende de la acción de secreciones de enzimas pancreáticas, como es el caso de las larvas de *Gadus morhua* y *Hippoglossus hippoglossus* que mejoran su digestión hasta varias semanas después cuando el estómago está completamente formado (Brien-MacDonald *et al.*, 2006; Murray *et al.*, 2006), mientras que en los peces tropicales el desarrollo del estómago se da tempranamente, inclusive antes o durante la absorción del vitelo como es el caso del manjuarí, *Atractosteus tristoechus* (Camabella *et al.*, 2006). En este sentido, la presencia de células productoras de ácido clorhídrico en el estómago son un indicador de una reacción mayor de la digestión de alimento, este aspecto ha sido ampliamente documentada en muchas especies y que en *P. splendida* se detectó desde los primeros días después de la eclosión, aun cuando se observaba la presencia de vitelo, lo que muestra que esta especie presenta una alimentación mixta (endo-exotrófica), para esta especie la actividad de la pepsina fue detectada a partir del día 9 DDE, esto sugiere que a partir de la primera alimentación, existe la presencia de células secretoras de ácido clorhídrico, las cuales fueron observadas por Treviño-Carrillo *et al.* (2008) y que conforme la larva crece

se maximiza la función del estómago, además de complementarse a partir del 20 DDE la diferenciación y aumento de la capacidad de digestión y absorción del intestino.

Desde otro punto de vista, la caracterización de enzimas digestivas, especialmente las proteasas, es uno de los aspectos más importantes a considerar cuando se trata de entender el tipo de hábitos alimenticios que presenta la especie y por su parte, por el alto costo que el uso de proteínas implica en la formulación de alimentos para acuicultura y los posibles ingredientes que deberán ser utilizados en el cultivo de los peces (Essed *et al.*, 2002). De esta manera, nuestros resultados con *P. splendida* para la caracterización de los parámetros operacionales (temperatura y pH) y uso de inhibidores, muestran características similares a las observadas para otras especies, tanto dulceacuícolas como marinas, como son el salmón del Atlántico (*Salmo salar*), la dorada (*Sparus aurata*), el dentón común (*Dentex dentex*) y el pez disco (*Symphysodon aequifasciata*) (Olli *et al.*, 1994; Moyano *et al.*, 1996; Alarcón *et al.*, 1998; Chong *et al.*, 2002), donde se observan temperaturas óptimas para proteasas alcalinas y ácidas similares (alrededor de 55 y 45°C respectivamente), valores de pH para proteasas ácidas y alcalinas de 2 a 3, y de 7 a 10 respectivamente. Mientras que en el caso de la estabilidad de estas enzimas a los cambios de temperatura y pH pueden fluctuar fuertemente dependiendo de la especie, aunque en general muestran una buena estabilidad e inclusive aumentando su actividad.

Con el uso de herramientas bioquímicas y electroforéticas tanto a lo largo de la ontogenia como en el proceso de caracterización se muestra baja resistencia al uso de Pepstatin A, la cual inhibe desde 80 hasta el 100 % la actividad de la pepsina en estas mismas especies. En el ensayo las proteasas alcalinas de los juveniles de *P. splendida* la tripsina fue inhibida en un 75 % usando PMSF y SBT1, siendo inhibida hasta el 95 % en especies como el atún la *T. thynnus* usando los mismos inhibidores pero en especies como la carpa plateada, la inhibición alcanza hasta el 83%. Sin embargo con el uso de TLCK la tripsina fue inhibida en un 35 %, y para quimotripsina fue de un 40 % utilizando TPCK, en *Paralabrax maculatofasciatus* la inhibición de la tripsina fue de un 95% con el uso de TLCK, y en *D. dentex* la quimotripsina se inhibió un 26 % con el uso de TPCK, mientras que las metaloproteasas fueron inhibidas en 75 % con fenantrolina y un 95% con EDTA. Caso parecido se reportó para el robalo blanco *Centropomus undecimalis* con una inhibición del 85 % con el uso de fenantrolina, pero para la trucha y el salmón se reporta que la actividad de las metaloproteasas es inhibida en un 20 y 11% con el uso de EDTA. Para la ovoalbúmina la inhibición fue de 75%, en contraste con lo reportado para *P. maculatofasciatus* donde la inhibición fue 59 % (Alarcón *et al.*, 1998; Essed *et al.*, 2001; Álvarez-González, 2003; Concha-Frías, 2008). En cuanto a la caracterización de las proteasas por medio de electroforesis para las proteasas alcalinas, muestra cuatro bandas de actividad proteolítica alcalina en el pozo control (C), estas se ven

inhibidas totalmente al usar fenantrolina y EDTA, y se inhibe una banda usando SBT1 y PMSF; asimismo, se inhibe una sola banda al usar ovoalbúmina, pero al usar TLCK se inhiben dos bandas y solamente se disminuye la actividad enzimática al usar TPCK. En *Catla catla*, *Labeo rohita* y *Hypophthalmichthys molitrix* los resultados muestran que usando como inhibidores (SBT1 Y PMSF) existe la presencia de serina proteasa, y de inhibidores como (TLCK Y TPCK), indican la presencia de tripsina y quimotripsina (Kumar *et al.* 2007), aunque el número de bandas con actividad proteolítica es muy superior a lo detectado en *P. splendida*, la cual muestra un patrón similar de bandas con actividad proteolítica que *Sciaenops ocellatus* (Lazo *et al.*, 2007) y *C. undecimalis* (Concha-Frías, 2008).

De esta manera, el conocimiento de la capacidad digestiva de un pez se puede complementar con los estudios de digestibilidad *in vitro*, lo cual permitirá estudiar detalladamente el proceso de la hidrólisis de las proteínas durante la digestión. Las técnicas de digestibilidad *in Vitro*, pueden ser aplicadas no sólo para obtener información sobre la capacidad enzimática que tiene cada especie para degradar diferentes tipos de proteínas, sino también para realizar un seguimiento detallado de la hidrólisis de las distintas fracciones proteínicas durante el proceso de digestión (Oña *et al.*, 2003). La mayoría de los estudios aplicados a la digestibilidad *in Vitro*, para el mejoramiento de las dietas alimenticias, mediante la utilización del pH STAT, están siendo aplicados a especies acuáticas, por representar la forma más viable para generar conocimientos sobre los aspectos fisiológicos de organismos de importancia comercial donde los resultados obtenidos han sido determinantes al momento de formular las dietas alimenticias, economizando así los costos de producción. Es así que algunas de las harinas mostraron un 75% de hidrólisis final en los primeros 10 minutos de reacción, datos similares a los publicados por Oña *et al.* (2005), los cuales reportan un 60% de hidrólisis final en el mismo tiempo de reacción, para harinas de soya, maíz, guisante y pescado, expuestas a enzimas digestivas ácidas de *Dentex dentex*, *Pagrus pagrus* y *Dentex X Pagrus*. En este estudio las harinas de pescado de la empresa del Pedregal y la harina de jaiba y la harina de sangre, mostraron valores de GH por encima de los valores de la hemoglobina. Oña *et al.* (2003), reportan altos valores de GH para la harina de pescado en *Dentex X Pagrus*, similar a lo reportado por Alvarez-Gonzalez (2003), para la harina de sangre en *Paralabrax maculatofasciatus*, mientras Alarcon *et al.* (2002), también publicaron altos GH's en harina de sangre y pescado en *Sparus aurata* y por su parte, Concha-Frías (2008), reporta que *C. undecimalis* puede digerir ingredientes principalmente de origen de animales marinos, seguidos de los terrestres, donde la posibilidad de utilizar ingredientes vegetales para esta especie es limitada; estos resultados concuerdan con lo observado para *P. splendida* que es considerada una especie altamente carnívora similar a *C. undecimalis*. Los resultados del GH en la fase ácida de *P. splendida* fueron similares a los reportados por Alarcon *et al.* (2001), para el guisante verde y la semilla de lupina en *Sparus aurata*. En nuestro estudio, esto sucedió en casi la totalidad de las

harinas analizadas, sobre todo aquellas que estuvieron por encima del 100% de digestibilidad. La harina de sangre de res mostró un 137% de digestibilidad, valor similar al 132% mostrado en *Sparus aurata* (Aларcon *et al.*, 2002). Estos altos valores de digestibilidad para la harina de sangre también son mostrados en *Paralabrax maculatofasciatus* según Alvarez-González (2003) y en el róbalo blanco *C. undecimalis* la harina de pescado presento altos valores de GH totales, solo superada por la harina de jaiba (Concha-Frías, 2008).

Desde el punto de vista del requerimiento de proteína se pudo determinar que para *P. splendida* es de 45.3, lo cual es similar a lo reportado para la proteína por lo que describe Moon *et al.* (2001) en juveniles de *Nibeя japonica* donde el requerimiento de proteína para esta especie es del 45%. Lee *et al.* (2000), Kim *et al.* (2002) y Kim *et al.* (2005) concluyen en sus estudios que el mayor crecimiento para los juveniles de *Paralichthys olivaceus* lo alcanzan con un requerimiento de 46.4 a 51.2% de proteína. Kim y Lee (2005) indican que una dieta formulada con 42% de proteína y 19% de lípidos es favorable para el óptimo desarrollo y crecimiento de los juveniles de *Pseudobagrus fulvidraco*. Catacutan *et al.*, (2001) indica que el requerimiento óptimo de proteína para los juveniles de *Lutjanus argentimaculatus* es de 44%. Otros autores reportan altos requerimientos de proteína en cíclidos nativos como la mojarra *Cichlasoma synspilum* el nivel óptimo es de 40.81% de proteína (Olvera-Novoa y Gasca-Leyva 1996). Mientras que Martínez-Palacios y Ross (1988) reportan un requerimiento de proteína para *C. urophthalmus* de 45.33%. Martínez-Palacios *et al.*, (1996) bajo un régimen de alimentación ad limitum obtuvo un crecimiento óptimo en crías de *C. urophthalmus* con un nivel de proteína dietaria de 36.9%. El alto requerimiento de proteína en *P. splendida* se relaciona con sus hábitos alimenticios, ya que es una especie carnívora como lo describe Resendez y Salvadores (1983), Caro *et al.* (1994), Santiago *et al.*, (1997) y Valtierra (2000) donde establecen que esta especie en su ambiente natural es un pez esencialmente ictiófago y en menor proporción herbívoro.

Asimismo, la digestibilidad aparente reportada para los nutrientes muestra una alta dependencia a proteínas de alta calidad lo que implicaría que para la formulación de un alimento específico necesariamente requerirá del uso de ingredientes de origen animal marino y con cierto componente de ingredientes de origen de animales terrestres Al analizar los resultados del coeficiente de digestibilidad aparente de la proteína mostraron diferencias significativas con la dieta de 50% de proteína (CDAP: 98.06) con respecto a las dietas de 35, 40, 45 y 55% de inclusión de proteína respectivamente. La digestibilidad de las dietas fue bastante alta, ya que presentó un comportamiento directamente proporcional al aumentar el nivel de proteína aumentó la digestibilidad de los peces, lo cual indica que la calidad de la caseína fue buena y no afecta el uso de la proteína por los juveniles de *P. splendida*. Los

resultados de CDAP alcanzados coinciden con otras investigaciones realizadas anteriormente en otras especies (Lin *et al.*, 2004), ya que se determinó el coeficiente de digestibilidad aparente de la proteína (CDAP) de 94.23 a 98.5% en las dietas con diferentes niveles de inclusión de proteína. Estos resultados son confirmados en las investigaciones por Sklan *et al.*, (2004) con tilapia *Oreochromis niloticus* donde evaluaron harina de origen vegetal y de pescado como fuentes proteicas encontrando una digestibilidad aparente de la proteína cruda del 75 al 98%, siendo esta ligeramente menor que los resultados encontrados en los juveniles de *P. splendida*.

El conocimiento de la digestibilidad es un elemento interesante de apreciación de la calidad de la proteína, permitiendo mostrar el porcentaje del nutriente absorbido por el pez, optimiza los niveles de inclusión considerando una base real en función de las diferencias de digestibilidad de los ingredientes y de las particularidades de la especie (Mendoza *et al.*, 1993), ya que la formulación de dietas exitosas para peces debe de estar basado no solo en sus requerimientos nutricionales, sino también en los procesos químicos y características fisiológicas para la mejor digestibilidad de los peces, porque nutrientes bajos en digestibilidad son menos viables a soportar el crecimiento y metabolismo de los peces (Heizhao *et al.*, 2004). Al utilizar alimentos de alta digestibilidad hay mayor aprovechamiento de los nutrientes y esto se traduce en reducir los costos de operación (Smith, 1995; Lee, 2002). Aunque estos contrastes en la digestibilidad dependen principalmente de la calidad de la materia prima, el proceso, la forma, el tiempo de almacenamiento, las enzimas y eficiencia de su funcionamiento; eficiencia que a su vez depende de la edad, del estado de salud y de las condiciones ambientales de los peces (Hepher, 1993).

Para los lípidos, el requerimiento obtenido para *P. splendida* (15%) concuerda con los datos obtenidos para otras especies como el pejelagarto *Atractosteus tropicus* donde se obtuvo un requerimiento del 15% para prejuveniles de 0.5 g y de 10% para juveniles de 15 g. De esta manera, es muy importante determinar no solo la concentración de lípidos, sino también la fuente de origen (en este caso lecitina de soya y aceite de pescado, los cuales proveyeron la fuente de energía necesaria para un adecuado crecimiento de los peces, a la vez de determinar el nivel de lípidos adecuado para esta especie. De esta forma un nivel optimo de lípido permitirá al pez obtener la energía suficiente para incrementar la actividad muscular, mejorando el crecimiento y una mayor resistencia de los organismos al ataque de enfermedades y el estrés provocado por el manejo (Morais *et al.*, 2005). Otro aspecto que se atribuye a la correcta inclusión de lípidos en las dietas, es la posibilidad de sustituir cierta cantidad de proteína por lípido (protein sparing), y obtener un incremento en el metabolismo mejorando el crecimiento. La adecuada sustitución de la energía de la proteína por la energía de lípidos puede adicionalmente resultar en un decremento del costo del alimento

al disminuir la cantidad de proteína que generalmente se obtiene de la harina de pescado, las cuales se utilizan normalmente en la fabricación de alimentos en la acuicultura (Heller, 2006).

Un aspecto básico es la relación entre los índices de calidad de alimento y nivel de lípidos, observándose que el SGR, el CF y el FCR son más adecuados al incluir 15% de lípidos en la dieta de juveniles de *P. splendida*. Estos resultados concuerdan con los obtenidos para la anguila americana *Anguilla rostrata*, la anguila europea *Anguilla anguilla*, el salmón del atlántico *Salmo salar*, la lobina europea *Dicentrarchus labrax*, la merluza *Melanogrammus aeglefinus* y el robalo asiático *Lates calcarifer*, donde se recomienda el uso de niveles de lípidos entre 12 y 18% logrando CFR cercanos a 1 y los mayores crecimientos (Otwell *et al.*, 1981; Gallagher *et al.*, 1984; García-Gallego *et al.*, 1993; Nanton *et al.*, 2001; Peres y Oliva-Teles, 2001; Williams *et al.*, 2003). Sin embargo, se ha resaltado que un nivel inadecuado de lípidos provoca que el metabolismo de los lípidos disminuya o se detenga afectando la tasa de crecimiento. Se ha demostrado que cuando los peces ingieren una gran cantidad de lípidos estos se acumulan en el hígado y en los tejidos de la cavidad mesentérica, disminuyendo la calidad de la carne ocasionada principalmente por el incremento de los depósitos de grasa, provocando una mayor oxidación de los tejidos, donde el pescado adquiere una rápida rancidez de la carne, manifestándose en un menor tiempo de vida de anaquel (Ackman, 1980).

Finalmente, como una necesidad de estudiar la posibilidad de desarrollar un alimento práctico, donde se evaluó adicionalmente la capacidad de *P. splendida* para aceptar ingredientes de origen vegetal, se utilizó como sustituto el gluten de trigo (GT) por harina de pescado (HP), demostrando que su utilización deberá no ser mayor al 25% para no afectar el crecimiento y supervivencia de los peces. En este sentido, al comparar estos resultados con otras investigaciones como la de Regost *et al.*, (1999) quienes usaron gluten de maíz en dietas prácticas complementadas con aminoácidos (arginina y lisina) pudieron sustituir la harina de pescado en un 20% para juveniles de *Psetta máxima*. Por su parte, Glencross *et al.*, (2004) lograron sustituir la harina de pescado con harina de grano lupin amarillo hasta en un 50% sin verse efectos adversos sobre el crecimiento en trucha arcoíris. En la misma forma, Robaina *et al.*, (1997) lograron sustituir en un 30% la harina de pescado por gluten de de maíz en dietas para *Sparus aurata*. Day y Plascencia (2000), usaron una concentración de 25% de proteína de soya como fuente de proteína para *Scophthalmus maximus*. Chou *et al.*, (2004) y Zhou *et al.*, (2005), lograron una sustitución de un 16.9% de harina de pescado por pasta de soya en juveniles de *Rachycentron canadum* sin causar la reducción del crecimiento. Asimismo, Liti *et al.* (2006) evaluaron tres tipos de salvado (maíz, trigo y arroz) mostrando que el salvado de maíz es mejor económicamente en el crecimiento de *Oreochromis niloticus*.

En cuanto a los índices de crecimiento y calidad del alimento mostraron diferencias estadísticas en el experimento tanto con larvas, juveniles y adultos donde la sustitución en 25% GT es la más adecuada mostrando los mejores valores de FCR (1.9) y SGR (14.8) en larvas, en juveniles (FCR: 0.6, SGR: 6.9%/día, PER: 5.0, WG: 4662.2%) y en adultos de FCA: 3.4, TEC: 0.5, FC: 1.2 y GP 25.9. Algunos resultados similares han sido observados para *Scophthalmus maximus*, sustituyendo 25% la harina de pescado con pasta de soya (FCR: 0.72 y 0.77) (Day y Plascencia, 2000). Glencross *et al.* (2004) obtuvieron buenos valores de FCR (0.37) con la inclusión al 12.5% de pasta de soya en trucha arcoíris. Por su parte, Allan *et al.*, (2000) lograron sustituir solamente el 5% de harina de pescado por gluten de maíz en *Bidyanus bidyanus* obteniendo valores de FCR de 1.93, PER de 1.41 y WG% de 360.9, estando por debajo de los obtenidos en este estudio. Los estudios sustituyendo gluten de trigo concuerdan en relación a la inclusión alrededor del 17 y 30%, lo cual ha sido corroborado por diversos autores como Pferrer *et al.* (1992); Weede (1997) y Sugiura *et al.* (1998), aunque esto varía dependiendo del tipo, fabricación y origen del gluten de trigo, por lo que en algunos casos es necesario suplementar las formulaciones con lisina en al menos el 2.4%. Se debe resaltar que en este estudio no se complementó la formulación con aminoácidos. Al observar los resultados de Helland y Grisdale, (2006) para *Hippoglossus hippoglossus* los valores de SGR (1.15-1.28 %/día) no mostraron diferencias entre las inclusiones de GT y son menores a los obtenidos en este estudio.

Un aspecto adicional es el efecto a largo plazo del gluten de trigo si se compara el primer experimento (larvas) contra el segundo experimento (juveniles), ya que el efecto sobre la supervivencia de los juveniles fue afectado cuando se sustituyó en un 100% la harina de pescado con gluten de trigo (43%) durante los 56 días de experimento, mientras que para las larvas durante los 30 días que duró el experimento no hubo efecto en la supervivencia para ninguno de los porcentajes de sustitución usados. En este sentido, se ha reportado que gluten de trigo presenta dos grupos de proteínas, gliadinas y gluteninas las cuales tienen varias subunidades de mediano y alto peso molecular que se caracterizan por presentar altas concentraciones de aminoácidos azufrados (Weiser, 2007), por lo que se ha reportado un efecto nocivo (celiaquía) cuando el gluten es agregado en exceso dañando el epitelio intestinal (Humbert *et al.*, 2006). Esta pudo haber sido una de las razones por lo que los peces alimentados con 0% y 25% HP fueron los más pequeños, e inclusive la alta mortalidad obtenida en los peces de la dieta 0% HP.

Como conclusión este estudio ha permitido entender desde los aspectos básicos sobre la anatomía y fisiología digestiva de la tenguayaca *Petenia splendida*, por lo que se lograron aplicar los conocimientos en torno a la determinación de los requerimientos de proteína y lípidos como base para la formulación de un alimento artificial diseñado para esta especie y con ayuda de los métodos *in vitro* e *in vivo* sobre la

digestibilidad para la selección de ingredientes. Es así que se la tenguayaca, *P. splendida* se contempla como uno de los peces dulceacuícolas con mayor potencial para su cultivo en la región Sureste de México, y donde la necesidad de validar los estudios a nivel de granja son necesarios, como un paso consecuente para iniciar el cultivo comercial a mediano plazo de esta especie.

Agradecimientos

Esta investigación fue financiada por el proyecto de investigación “Identificación de ingredientes en alimentos balanceados y su digestibilidad en el cultivo de peces naticos en Tabasco” FOMIX Gobierno del Estado de Tabasco–CONACyT TAB-2005-C06-16260 y el proyecto de investigación “Incorporation of the Native Cichlid (*Petenia splendida*) into Sustainable Aquaculture: Reproduction Systems, Nutrient Requirements and Feeding Strategies Clave: 12ISD3, financiado por el Collaborative Research Support Program.

Referencias Bibliográficas

- Ackman RG (1980) Fish lipid. Parts I and II. Advances in Fish Science and Technology Fishing. New books. LTD. England
- Adler-Nissen J (1976) Enzymatic hydrolysis of proteins for increased solubility. J. Agric. Food Chem., 24,1090-1093.
- Alarcón FJ, Díaz M, Moyano JF, Abellán E (1998) Characterization and functional properties of digestive proteases in two sparids; gilthead seabream (*Sparus aurata*) and common dentex (*Dentex dentex*). Fish Physiol Biochem. 19,257-267.
- Alarcón FJ, Moyano FJ, Díaz M (2001) Use of SDS-page in the assessment of protein hydrolysis by fish digestive enzymes. Aquaculture International 9,255-267.
- Alarcón FJ, Moyano FJ, Díaz M (2002) Evaluation of different protein sources for aquafeeds by an optimised pH-STAT system. Journal of the Science of food and Agriculture 82:697-704.
- Almeida LC, Lundstedt LM, Morales G (2006) Digestive enzyme response of tambaqui (*Colossoma macropomum*) Fe don different levels of protein and lipid Aquaculture Nutrition 12,443-450.
- Alvarez-González CA, Cervantes-Trujano M, Tovar-Ramírez D (2006) Development of digestive enzyme in California Halibut (*Paralichthys californicus*) larvae. Fish Physiol Biochem. 31 (1),83-93.
- Álvarez-González CA (2003) Actividad Enzimática Digestiva y Evaluación de Dietas para el destete de Larvas de la Cabrilla Arenera *Paralabrax maculatofasciatus* (Percoidei: Serranidae). PhD Thesis, IPN-CICIMAR
- Alarcón FJ (1997) Procesos digestivos en peces marinos: Caracterización y aplicaciones prácticas. PhD Thesis, Universidad de Almería, España
- Alarcón FJ, Díaz M, Moyano FJ, Abellán E (1998) Characterization and functional properties of digestive proteases in two sparids; gilthead seabream (*Sparus aurata*) and common dentex (*Dentex dentex*). Fish Physiol Biochem. 19,257-267.
- Alliot E, Pastoreaud A, Trelu J (1977) Evolution des activités anzymatiques dans le tube digestif au cours de la vie larvaire du bar (*Dicentrarchus labrax*) variations des proteinogrammes et des zymogrammes. 3rd Meeting of the ICES Working group of Mariculture, Brest, France, May 10-13, Actes de Colloques du CNEXO, 4,85-91.
- Alvarez-González CA, Civera-Cerecedo R, Ortiz-Galindo JL, Dumas S, Moreno-Legorreta M, Grayeb-Del Alamo T (2001) Effect of dietary protein level on growth and body composition of juvenile spotted sand bass, *Paralabrax maculatofasciatus*, fed practical diets. Aquaculture 194, 151–159.
- Anson ML (1938) The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin. J. gen. Physiol., 22,79-89.
- Archibal AL (1987) Comparison of the serum amylases of farm animals. Biochem. Physiol., 88B,963-968.
- Ásgeirsson B, Bjarnasson JB (1991) Structural and kinetic properties of chymotrypsin from atlantic cod (*Gadus morhua*). Comparison with bovine chymotrypsin. Comp. Biochem. Physiol., 99B(2),327-335.
- Barnabé G, Guissi A (1994) Adaptations of the feeding behaviour of larvae of the sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.), to an alternating live-food/compound-food feeding regime. Aquacult. Fish. Manag. 25,573-546.

- Behal FJ, Asserson B, Dawson F, Hardman J (1965) A study of human tissue aminopeptidase components. Arch. Biochem. Biophys., 111,335-344.
- Ben NC, Jian GQ, Martin SK, Wayne GH, Steven MC (2006) Ontogenetic development of digestive enzymes in yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*) larvae Aquaculture 260,264–271.
- Bergmeyer HV (1974) Methods of Enzymatic Analysis. Vol 2. Phosphatases. Academic Press.
- Bolasina S, Pérez A, Yamashita Y (2005) Digestive enzymes activity during ontogenetic development and effect of starvation in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) Aquaculture 191,3332-342.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. Analytical Biochemistry. 72,248 254.
- Brien-MacDonald KO, Joseph A B, Christopher C P (2006) Growth, behavior, and digestive enzyme activity in larval Atlantic cod (*Gadus morhua*) in relation to rotifer lipid. Journal of Marine Science, 63: 275-284
- Bryant PL, Matty AJ (1981) Adaptation of carp (*Cyprinus carpio*) larvae to artificial diets: 1. Optimum feeding rate and adaptation age for a commercial diet. Aquaculture 23,275-286
- Cahu C (1996) Nutrition des larves de poisson; 1. Développement des enzymes digestives et modifications induites par l'aliment. Journées INRA-IFREMER, Nutrition des Poissons 21-22 fév. Saint-Pée-sur-Nivelle
- Cahu C, Zambonino-Infante JL (1997) Is the digestive capacity of marine fish larvae sufficient for compound diet feeding?. Acuacult. Int. 5,151-160
- Cahu C, Zambonino-Infante JL, Escaffre A-M, Bergot P, Kaushik S (1998) Preliminary results on sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae rearing with compound diet from first feeding. Comparison with carp (*Cyprinus carpio*) larvae. Aquaculture 169,1-7
- Cahu C, Zambonino-Infante JL, Quazuguel P, Le Gall MM (1999) Protein hydrolyzate vs. fish meal in compound diets for 10-day old sea bass *Dicentrarchus labrax* larvae. Aquaculture 171,109-119
- Cahu CL, Zambonino-Infante JL (1994) Early weaning of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae with a compound diet: effect on digestive enzymes. Comp. Biochem. Physiol. 109A(2),213-222
- Cañavate JP, Fernández-Díaz C (1999) Influence of co-feeding larvae with live and inert diets on weaning the sole *Solea senegalensis* onto commercial dry feeds. Aquaculture 174,255-263
- Canioni P, Julien R, J. Rathelot, Sarda L (1977) Pancreatic and microbial lipases: a comparison of the interaction of pancreatic colipase with lipases of various origins. Lipids, 12,393-397
- Caro C, Mendosa A, Sánchez M (1994) Caracterización del medio ambiente de *Petenia splendida* en lagunas del sur de Quintana Roo. En memorias del II seminario sobre peces nativos, con uso potencial en acuicultura, del 23 al 26 de mayo de 1994, Cárdenas, Tabasco, México.
- Catacutan MR, Pagador GE, Teshima S (2001) Effect of dietary protein and lipid levels and protein to energy ratios on growth, survival and body composition of the mangrove red snapper, *Lutjanus argentimaculatus* (Forsskal, 1775). Aquaculture Research 32,811-818
- Chan R (2004) Efecto de la temperatura sobre el consumo de oxígeno en la mojarra tenguayaca (*Petenia splendida*) Günter 1862. Under graduate Thesis. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, México
- Chou RL, Her BY, Su MS, Hwang G, Wu YH, Chen HY (2004) Substituting fish meal with soybean meal in diets of juvenile cobia *Rachycentron canadum*. Aquaculture. 229,325–333

- Chong ASC, Hashim R, Chow-Yang L and Ali AB (2002) Partial characterization and activities of proteases from the digestive tract of discus fish (*Symphysodon aequifasciata*). *Aquaculture* 203,321–333
- Comabella Y, Mendoza R, Aguilera C, Carrillo O, Hurtado A, García, T. 2006. Digestive enzyme activity during early larval development of the Cuban gar (*Atractosteus tristoechus*). *Fish Physiol. Biochem.* 32,147–157.
- Concha-Frias B (2008) evaluación de la capacidad digestiva de juveniles de *Centropomus undecimalis* (Bloch, 1792) sobre diferentes ingredientes proteínicos. MSc Thesis. Universidad Católica del Norte, Chile
- Contreras-García MJ (2003) Inversión sexual de mojarra nativas *Cichlasoma salvini* y *Petenia splendida*, mediante la administración oral de esteroides sintéticos. Under graduate Thesis. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, México
- Cousin JCB, Baudin Laurencin F, Gabaudan J (1987) Ontogeny of enzymatic activities in fed and fasting turbot, *Scophthalmus maximus* L. *J. Fish Biol.* 30,15 33
- Dabrowski K, Takashima F, Strüssmann C, Yamazaki T (1986). Rearing of coregonid larvae with live and artificial diets. *Bull. Jap. Soc. Scient. Fish.* 52(1),23-30
- Day OJ, Plascencia HG (2000) Soybean protein concentrate as a protein source for turbot *Scophthalmus maximus* L. *Aquacult. Nutr.* 6,221-228
- DelMar EG, Largman C, Brodrick JW, Geokas MC (1979) A sensitive new substrate for chymotrypsin. *Anal. Biochem.* 99,316-20
- Díaz M, Moyano FJ, García-Carreño LF, Alarcón FJ, Sarasquete MC (1997) Substrate SDS-PAGE determination of protease activity through larval development in sea bream. *Aquaculture International* 5,461-471
- Dimes LE, Haard NF (1994) Estimation of protein digestibility: I. Development of an in vitro method for estimating protein digestibility in salmonids. *Comp. Biochem. Physiol.* 108A(2-3),349-362
- Dixon M, Webb E (1979) *Enzymes*. Academic Press 3th. New York.
- Dunn BM (1989) Determination of protease mechanism. pp. 57-81. In *proteolytic Enzymes: A practical approach*, (R.J. Beynon y J.S. Bond, Eds.) I.R.L. Press, Oxford, England
- Dupuis Y, Tardival S, Poremska Z, Fournier P (1991) Effect of some alkaline phosphatase inhibitors of intestinal calcium transfer. *Int. J. Biochem.*, 23,175-180.
- Ehrlich KF, Catin M-C, Rust MB (1989) Growth and survival of larvae and postlarvae smallmouth bass fed a commercially prepared dry feed and/or *Artemia* nauplii. *J. World Aquacult. Soc.* 20,1-6
- Eid AE, Matty AJ (1989) A simple in vitro method for measuring protein digestibility. *Aquaculture*, 79,111-119
- Erlanger B, Kokowsky N, Cohen W (1961) The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Arch. Biochem. Biophys.* 95,271-278
- Eseed Z (2001) Caracterización de proteasas digestivas en atún rojo (*Thunnus thynnus*): aplicación en estudios de digestibilidad in vitro. Tesina de Master, Las Palmas de Gran Canaria, España
- Eseed Z, Fernández I, Alarcón FJ and Moyano FJ (2002) Caracterización de la actividad proteasa digestiva de atún rojo *Thunnus thynnus* (Linnaeus, 1758). *Bol. Inst. Esp. Oceanogr.* 18 (1-4),99-107
- Fernández-Díaz C, Pascual E, Yúfera M (1994) Feeding behavior and prey size selection of gilthead seabream, *Sparus aurata*, larvae fed on inert and live food. *Mar. Biol.* 118,323-328

- Furné M, Hidalgo M.C, López A, Garcia G.M , Morales A.E, Domezain A, Domezain E. J, Sanz A. 2005. Digestive enzyme activities in Adriatic sturgeon *Acipenser naccarii* and rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. A comparative study. *Aquaculture* 250,391-398
- García-Carreño FL, Dimes LE, Haard NF (1993) Substrate-gel electrophoresis for composition and molecular weight of proteinases or proteinaceous proteinase inhibitors. *Anal. Biochem.*, 214,65-69
- García-Gallegos EL, Ackman GJ (1993) Effect of cooking/ expansion of three legume seeds on growth and food utilization by European eel *Anguilla anguilla*. *Aquaculture*.119, 145-152
- García, M. 2003. Determinación de la temperatura preferencial y metabolismo de la rutina de la mojarra tenguayaca (*Petenia splendida*) Günter 1862. Under graduate Thesis. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, México.
- Gallagher ML, Kane E, Beringer R (1984) Effect of size on composition of the American eel *Anguilla rostrata*. *Comp. Biochem. Physiology*. 78,533-536
- Gawlicka A, Parent B, Horn MH, Ross N, Opstad I, Torrinsen OJ (2000) Activity of digestive enzymes in yolk-sac larvae of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*): indication of readiness for first feeding. *Aquaculture* 184,303-314
- Glencross B, Evans D, Hawkins W, Jones B (2004) Evaluation of dietary inclusion of yellow lupin (*Lupinus luteus*) kernel meal on the growth, feed utilisation and tissue histology of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 235,411-422
- Govoni JJ (1980) Morphological, histological and functional aspects of alimentary canal and associated organ development in larval *Leiostomus xanthurus*. *Rev. Can. Biol.*, 39,69-80
- Grabner M (1985) An in vitro method for measuring protein digestibility of fish feed components. *Aquaculture*. 48,97-110
- Guerrero R (2007) Efecto de la temperatura en la proporción de sexos de las mojarra nativas “castarrica” (*Cichlasoma urophthalmus*) y “tenguayaca” (*Petenia splendida*). Under graduate Thesis. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, México
- Hamza N (2007). Effect of waning age and diets on ontogeny of digestive activities and structures of pikeperch (*Sander lucioperca*) larvae. *Fish Physiol Biochem* 33,12-133
- Harris H (1989) The human alkaline phosphatases: what we know and what we don't know. *Clin. Chim. Acta*, 186,133-150
- Heizhao L, Yongjian L, Lixia T, Jieng W, Wenhui Z, Jiannan H, Peiji C (2004) Apparent digestibility coefficients of various feed ingredients for grouper *Epinephelus coioides*. *Journal of the world aquaculture society* 35(2),134-142
- Helland SJ, Grisdale-Helland B (2006) Replacement of fish meal with wheat gluten in diets for Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*): Effect on whole-body amino acid concentrations. *Aquaculture* 261,1363-1370
- Heller GH (2006) The effect of dietary lecithin and lipase, as a function of age, on n-9 fatty acid incorporation in the tissue lipids of *Sparus aurata*. *Fish Physiology. Biochemist* 10,357-364
- Hepher B (1993) Nutrición de peces comerciales en estanques. Editorial LIMUSA. México. pp. 193
- Hirikado M, Hirata K, Uemarsu Y, Hatooka Y, Kazama M (1994) Assay for activities of α -amylase and glucoamylase used in food processing. *J. Food Hyg. Soc. Japan*, 35(1),28-33

- Hsu HW, Vavak DL, Satterlee LD, Miller GA (1977) A multienzyme technique for estimating protein digestibility. *J. Food Sci.* 42,1269-1273
- Humbert P, Pelletier F, Dreno B, Puzenat E, Aubin F (2006) Gluten intolerance and skin diseases. *Eur. J. Dermatol.* 16(1),4-11
- Hummel BCW (1959) A modified spectrophotometric determination of chymotrypsin of chymotrypsin, trypsin ADN thrombin. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37,1393-1399
- Igbokwe EC, Downe AER (1978) Electrophoretic and histochemical comparison of three strains of *Aedes aegypti*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 60B,131-136
- Izquierdo MS (1996) Essential fatty acid requirements of culture marine fish larvae. *Aquaculture Nutrition* 2,183-191
- Jiménez C (2004) Efecto de la temperatura en el crecimiento de crías de mojarra tenguayaca (*Petenia splendida*) Günter 1862. Under graduate Thesis. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, México
- Jiménez LD (2007) Efecto de la densidad de siembra inicial de larvas de las mojarras nativas tenguayaca (*Petenia splendida*) y castarrica (*Cichlasoma urophthalmus*) en un sistema de recirculación. Under graduate Thesis. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, México
- Kanazawa A, Koshio S, Teshima SI (1989) Growth and survival of larvae red sea bream *Pagrus major* and japanese flounder *Paralichthys olivaceus* fed microbound diets. *J. World Aquacult. Soc.* 20,31-37
- Kim KW, Kang YJ, Choi SM, Wang X, Choi YH, Bai SC, Jo JY, Lee JY (2005) Optimum dietary protein levels and protein to energy ratios in olive flounder *Paralichthys olivaceus*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 36(2),165-178.
- Kim KW, Wang XJ, Bai SC (2002) Optimum dietary level for maximum growth of juvenile olive flounder *Paralichthys olivaceus* (Temminck and Schlegel). *Aquaculture Research*, 33, 673-679
- Kim OL, Lee SM (2005). Effects of the dietary protein and lipid levels on growth and body composition of bagrid catfish, *Pseudobagrus fulvidraco*. *Aquaculture* 2,323-329
- Knights M (1985) Energetics and fish farming. p. 309-340. In: *Fish Energetics, New Perspectives*. P. Tytler y P. Calow (Eds.) Cromm Helm. London and Sydney.
- Kolkovski S, Tandler A (2000) The use of squid protein hydrolysate as a protein source in microdiets for gilthead seabream *Sparus aurata* larvae. *Acuacult. Nutr.* 6,11-15
- Kolkovski S, Arieli A, Tandler A (1997) Visual and chemical cues stimulate microdiet ingestion in sea bream larvae. *Acuacult. Int.* 5,527-536
- Kolkovski S, Tandler A, Kissil GWm, Gertler A (1993) The effect of dietary exogenous enzymes on ingestion assimilation, growth and survival of gilthead seabream (*Sparus aurata*, Sparidae, Linnaeus) larvae. *Fish Physiology and Biochemistry.* 12(3),203-209
- Kumar S, Garcia-Carreño FL, Chakrabarti R, Toro MAN, Cordova-Murrieta JH (2007) Digestive proteases of three carps *Catla catla*, *Labeo rohita* and *Hypophthalmichthys molitrix*: partial characterization and protein hydrolysis efficiency. *Aquaculture Nutrition* 13,381-388
- Kunitz M (1947) Crystalline soybean trypsin inhibitor II. General properties. *J. Gen. Physiol.* 30,291 310

- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227,680-685
- Lauff M, Hofer R (1984) Proteolytic enzymes in fish development and the importance of dietary enzymes. *Aquaculture*. 37,335-346
- Lazo JP, Mendoza R, Holt GJ, Aguilera C, Arnold CR (2007) Characterization of digestive enzymes during larval development of red drum (*Sciaenops ocellatus*). *Aquaculture* 265:194-205
- Lee SM, Chon SH, Kim KD (2000) Effects of dietary protein and energy levels on growth and body composition of juvenile flounder *Paralichthys olivaceus*. *Journal of the World Aquaculture Society* 30,306-315
- Lee SM (2002) Apparent digestibility coefficients of various feed ingredients for juvenile and grower rockfish (*Sebastes schlegeli*). *Aquaculture* 207,79-95
- Lin H, Liu Y, Tian L, Wang J, Zheng W, Huang J, Chen P (2004) Apparent digestibility coefficients of various feed ingredients for grouper *Epinephelus coioides*. *Journal of the World Aquaculture* 35(2),134-142
- Liti DM, Mugo RM, Munguti JM, Waidbacher H (2006) Growth and economic performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) fed three grains (maize, wheat and rice) in fertilized ponds. *Aquacult. Nutr.* 12,239-245
- Luczynski M, Strzezck J, Brzuzan P (1987) Secretion of hatching enzyme and its proteolytic activity in coregoninae (*Coregonus albula* L and *C. lavaretus* L) embryos. *Fish Physiol. Biochem.* 4,57-62
- Maraux S, Louvard D, Baratti J (1973) The aminopeptidase from hog-intestinal brush border. *Biochim. Biophys. Acta* 321,282-295
- March BE, Macmillan C, Ming FW (1985) Techniques for evaluation of dietary protein quality for the rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Aquaculture* 47,275-292
- Martínez JL (2004) Desarrollo embrionario larval de la mojarra tenguayaca (*Petenia splendida*). Under graduate Thesis. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, México
- Martínez-Palacios C, Ross LG (1992) The reproductive biology and growth of the Central American Cichlid *Cichlasoma urophthalmus* (Günther). *J. Appl. Ichtiol.* 8,65-75
- Martínez-Palacios CA, Ross LG (1986) The effects of temperature, body weight and hypoxia on the oxygen consumption of the mexican mojarra, *Cichlasoma urophthalmus* (Günther). *Aquaculture and Fisheries Management*, 17,243-248
- Martínez-Palacios CA, Ross LG (1988) The feeding ecology of the Central American Cichlid *Cichlasoma urophthalmus* (Günther). *J. Fish Biol.* 33, 665-670
- Martínez-Palacios CA, Harfush-Melendez M, Chavez-Sanchez C (1996) The optimum dietary protein level for the Mexican cichlid *Cichlasoma urophthalmus* (Günther): a comparison of estimates derived from experiments using fixed-rate feeding and satiation feeding. *Aquaculture Nutrition* 2(1),11-20
- Mendoza EA, Páramo SD, Contreras MW, Márquez CG (1993) Alternativas para el desarrollo piscícola para el manejo complementario de áreas inundadas de Tabasco, México. pp. 263-279. En: Tabasco realidad y perspectiva, Vol. II. Gobierno del Estado de Tabasco
- Moon LH, Kee-Cho Ch, Jeong-Eui L, Sang-Geun Y, (2001) Dietary protein requirement of juvenile giant Croaker, *Nibea Japonica* Temminck & Schlegel. *Aquaculture Research* 32(1),112-118

- Morais S, Koven W, Rønnestad I, Dinis MT, Conceição LEC (2005) Dietary protein/Lipid ratio and lipid nature affects fatty acid absorption and metabolism in Senegalese sole *Solea senegalensis* Kaup 1858, larvae. *Aquaculture* 246,347-357
- Moyano FJ, Alarcón FJ, Díaz M (1998) Comparative biochemistry of fish digestive proteases applied to the development of in vitro digestibility assays. *Comp. Biochem. Physiol.* 5,135-143
- Moyano FJ, Díaz M, Alarcón FJ, Sarasquete MC (1996) Characterization of digestive enzyme activity during larval development of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Fish Physiol. Biochem.* 15,121-130
- Mowry RD (1963) The special value of methods that color both acidic and vicinal hydroxyl groups in the histochemical study of mucins with revised directions for the colloidal iron stain, the use of Alcian blue G8X and their combinations with the periodic acid- Schiff reaction. *Ann. NY Acad. Sci.* 106,402-423
- Murray HM, Gallant JW, Johnson SC, Douglas SE (2006) Cloning and expression analysis of three digestive enzymes from Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) during early development: Predicting gastrointestinal functionality *Aquaculture* (252),394-408
- Nanton DA, Lall SP, McNiven MA (2001) Effects of dietary lipid level on liver and muscle lipid deposition in juvenile haddock, *Melanogrammus aeglefinus*. *Aquaculture* 32,225-34
- O'Brien-MacDonald K, Brown JA, Parrish CC (2006) Growth, behavior, and digestive enzyme activity in larval Atlantic cod (*Gadus morhua*) in relation to rotifer lipid, *ICES Journal of Marine Science*, 63 (2),275-284
- Olli JJ, Hjelmeland K, Krogdahl A (1994) soybean trypsin inhibitors in diets for atlantic salmon (*Salmo salar*). effects on nutrient digestibilities and trypsin in pyloric caeca homogenate and intestinal content *Comp Biochem Physiol* 109,923-928
- Olvera-Novoa MA, Gasca-Leyva E (1996) The dietary protein requirements of *Cichlasoma synspilum* Hubbs, 1953 (Piscis: Cichlidae) fry. *Aquaculture Research*. 27,167-173
- Oña C, Alarcón FJ, Díaz M, Abellán E (2003) Estudio comparativo de la degradación in vitro de proteínas por las proteasas estomacales de Denton (*Dentex dentex*), Pargo (*Pagrus pagrus*) y el híbrido *Dentex x Pagrus*. II Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura (CIVA), pág. 540-549
- Oña C, Alarcón FJ, Díaz M, Abellán E (2005). Hidrólisis proteica in vitro de materias primas de diferente calidad por las proteasas intestinales de tres esparidos. X Congreso Nacional de Acuicultura, Almería España
- Otwell WS, Rickards LW (1981) Cultured and wild American eels, *Anguilla rostrata*: fat content and fatty acid composition. *Aquaculture*. 26,67-76
- Pedersen B, Eggum BO (1983) Prediction of protein digestibility by an in vitro enzymatic pH-stat procedure. *J. Anim. Physiol. & Anim. Nutr.* 49,265-277.
- Peres H, Oliva-Teles A (2001) Effect of dietary lipid level on growth performance and feed utilization by European sea bass juveniles *Dicentrarchus labrax*. *Aquaculture*. 179,325-334
- Person-Le Ruyet J, Menu B, Cadena-Roa M, Métailler R (1983) Use of expanded pellets suplementes with attractive chemical substances for the wening of turbot (*Scophthalmus maximus*). *J. World Maricul. Soc.* 14,676-678
- Pferrer E, Al-Sabty H, Haverkamp R (1992) Studies on lysine requirements on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed wheat gluten as only source of dietary protein. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 67,74-82

- Real, G. 2003. Maculinización de crías de mojarra castarrica *Cichlasoma urophthalmus* mediante la administración de 17- α Metiltestosterona, Under graduate Thesis. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, México
- Regost C, Arzel J, Kaushik SJ (1999) Partial or total replacement of fish meal by corn gluten meal in diet for turbot (*Psetta maxima*). *Aquaculture* 180,99-117
- Resendes A, Salvadores ML (1983) Contribución al conocimiento de la biología del pejelagarto *Lepisosteus tropicus* (Gill) y la mojarra tenguayaca *Petenia splendida* (Gunther), del estado de Tabasco. *Biótica* 8(4),413-426.
- Ribeiro L, Zambonino-Infante JL, Cahu C, Dinis MT (1999) Development of digestive enzymes in larvae of *Solea senegalensis*, Kaup 1858. *Aquaculture* 170,465-473
- Robaina L, Moyano FJ, Izquierdo MS, Socorro J, Vergara JM, Montero D (1997) Corn gluten and meat and bone meals as protein sources in diets for gilthead seabream (*Sparus aurata*): Nutritional and Histological implications. *Aquaculture*. 157,347-359
- Robyt JF, Whelan WJ (1968) The β -amylases. pp 477-497. In: Radley JA (ed.). *Starch and its Derivatives*. Academic Press, London
- Rojas CP, Mendoza EA (2000) El cultivo de especies nativas en México. Estado de Salud en la Acuicultura. Instituto Nacional de la Pesca-SEMARNAP. Dirección General de Investigaciones en Acuicultura, México
- Rosenlaud G, Stoss J, Talbot C (1997) Co-feeding marine fish larvae with inert and live diets. *Aquaculture* 155,183-191
- Sánchez-Concha J, Rodríguez-Pérez J (1993) Inversión sexual de larvas de *Cichlasoma urophthalmus* mediante la aplicación de andrógenos. Under graduate thesis, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, México
- Santiago LM, Jardón O, Jaramillo SG, Reyes AJ, Sánchez VA (1997) Edad, crecimiento y hábitos alimenticios de *Cichlasoma salvini* (Günther), *Cichlasoma urophthalmus* (Günther), *Oreochromis niloticus* (Linneo) y *Petenia splendida* (Günther). Presa Miguel de la Madrid H. (Cerro de oro), Tuxtepec, Oaxaca. Resúmenes del V Congreso Nacional de Ictiología 3-5 de febrero de 1997, Mazatlán, Sinaloa, México
- Sarbahi DS (1951) Studies of the digestive tracts and the digestive enzymes of the goldfish *Carassius auratus* (Linnaeus) and the largemouth black bass *Micropterus salmoides* (Lacépède). *Bull. Mar. Biol. Lab. Woods Hole* 100,24-257
- Satterlee LD, Marshall HF, Tennyson JM (1979) Measuring protein quality. *J.A.O.C.S.* 56,103-109
- Saunders RM, Conner MA, Booth AN, Bickoff EM, Kohler GO (1972) Measurement of digestibility of alfalfa concentrates by in vivo and in vitro methods. *J. Nutr.*, 103,530-535
- Savoie L, Gauthier SF (1986) Dialysis cell for the in vitro measurement of protein digestibility. *J. Food Sci.* 51,494-498
- SEMARNAP (2006) La acuicultura en México. <http://www.semarnap.gob.mx>
- Shiau S, Liang H (1995) Carbohydrate utilization and digestibility by tilapia, *Oreochromis niloticus* x *O. aureus*, are affected by chromic oxide inclusion in the diet. *J. Nutr.* 125(4),976-982
- Sklan D, Prag T, Lupatsch I (2004) Apparent digestibility coefficients of feed ingredients and their prediction in diets for tilapia *Oreochromis niloticus* x *Oreochromis aureus* (Teleostei, Cichlidae). *Aquaculture Research* 35(4), 358-364

- Smith RR (1995) Apparent digestion coefficients and metabolizable energy of feed ingredients for rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Journal of the World Aquaculture Society 26, 432-437
- Stauffer C (1989) Enzyme Assays for Food Scientists. Van Nostand Reinhold/AVI, New York
- Strickland JDH, Parsons TR (1972) A practical handbook of seawater analysis. Fisheries Research Board of Canada. Ottawa
- Stroud R (1975) A family of proteins-cutting proteins. Sci. Am., 231(1),74-89
- Sugiura SH, Dong FH, Rathbone CK, Hardy RW (1998) Apparent protein digestibility and mineral availabilities in various feed ingredients for salmonids. Aquaculture 159,177-200
- Tacon AGJ (1993) Feed ingredients for warmwater fish: fish meal and other processed feedstuffs. FAO Fisheries Circular, 845
- Tacon AGJ (1995) Application of nutrient requirement data under practical conditions: special problems of intensive and semi-intensive fish farming. J. Applied Ichthyol., 11,205-214
- Tanaka M, Kawai S, Yamamoto S (1972) On the development of the system and changes in activities of digestive enzymes during larval and juvenil stage in ayu. Bull. Jap. Soc. Scient. Fish, 38,1143-1152.
- Tengjaroenkul B, Smith BJ, Caceci T, Smith SA (2000) Distribution of intestinal enzyme activities along the intestinal tract of cultured Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L., Aquaculture 182,317-327
- Tengjaroenkul B, Smith BJ, Smith SA, Chatreewongsin U (2002) Ontogenic development of intestinal enzymes of cultured Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L. Aquaculture 211,241-251
- Treviño-Carrillo LM, Alvarez-González CA, Gisbert E, Perales-García N, Arévalo-Galán L, Márquez-Couturier G, Uscanga-Martínez A (2008) Histological and morphological evaluations Histological and morphological evaluations of the digestive system of native cichlid bay snook *Petenia splendida* during early ontogeny. 8th Larval Biology Symposium. 6-11th July 2008, Lisboa, Portugal
- Tucker JW (1998) Marine fish culture. Kluwer Academic Publishers, Massachusetts, USA
- Ueberchär B (1993) Measurement of proteolytic anzyme activity: Significance and application in larval fish research. Part III. p. 233-239. In: Physiological and biochemical aspects of fish development. Walther, B.T. y Fyhn, H.J. (Eds.). Univ. of Bergen, Norway
- Valtierra MT, Schmitter JJ (2000) Hábitos alimentarios de las mojaras (Perciformes: Cichlidae) de la laguna Caobas, Quintana Roo, México. Rev. Biol. Trop. 48,2-3.
- Velasco RC, (1976) Los peces de agua dulce del Estado de Chiapas. Ediciones del Gobierno del Estado de Chiapas, México
- Verreth J, Van Tongeren M (1989) Weaning time in *Clarias gariepinus* (Burchell) larvae. Acuaulture 83,81-88
- Versaw W, Cuppett SL, Winters DD, Williams LE (1989) An improved colorimetric assay for bacterial lipase in nonfat dry milk. J. Food Sci. 54,232-254
- Versichelle D, Léger P, Lavens P, Sorgeloos P (1989) L'utilisation d'artémia. In: Aquaculture (G. Barnabé, ed.). Technique et Documentation, Lavoisier, Paris, pp. 241-259.

- Vidal JM (2004) Masculinización de crías de la mojarra tenguayaca *Petenia splendida* Gunther 1862 mediante bioencapsulado del esteroide 17- α -metiltestosterona en nauplios de *Artemia salina*. Under graduate thesis, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, México
- Vizcarra-Quiroz JJ (1986) Dosis letal de triclorfon (Dipterex) en *Cichlasoma urophthalmus* (Cichlidae). Under graduate thesis, Instituto Tecnológico de Mar, Veracruz, México
- Waldford J, Lam TJ (1993) Development of digestive tract and proteolytic anzyme activity in seabass (*Lates calcarifer*) larvae and juveniles. *Aquaculture* 109,187-205
- Walter HE (1984) Proteinases: methods with hemoglobin, casein and azocoll as substrates. In *Methods of Enzymatic Analysis*. Vol. V, pp. 270-277. Edited by H.J. Bergmeyer. Verlag Chemie. Weinham
- Weber K, Osborn M (1969) The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.*, 244,4406-4412
- Weede N (1997) Low phosphorus plant protein ingredients in finishing diets for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Universidad de Washington. Seattle, WA, USA
- Weisser H (2007) Chemistry of gluten proteins. *Food Microbiol.* 24,115-119
- Welcomme R (1988) International introduction of inland aquatic species. FAO Fisheries Technical Paper. Italia
- Williams KC, Barlow CG, Rodgers, L., Hockings, I., Agcorpa, C., Ruscoe, I., 2003. Barramundi *Lates calcarifer* perform well when fed pelleted diets high in protein and lipid. *Aquaculture*. 225, 191-20
- Zambonino-Infante JL, Cahu C (1994) Development and response to a diet change of some digestive enzymes in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Fish Physiol. Biochem.* 12(5),399-408
- Zambonino-Infante JL, Cahu C (1999) High dietary lipid levels enhance digestive tract maturation and improve *Dicentrarchus labrax* larval development. *J. Nutr.* 129,1195-1200
- Zambonino-Infante JL, Cahu C, Péres A, Quazuguel P, Le Gall MM (1996) Sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae fed differen Artemia rations: growth, pancreas enzymatic response and development of digestive functions. *Aquaculture* 139,129-138
- Zhou QC, Mai KS, Tan BP, Liu YJ (2005) Partial replacement of fishmeal by soybean meal in diets for juvenile cobia (*Rachycentron canadum*). *Aquaculture*. 11,175-182