

Efecto de la administración de levaduras en el proceso de maduración del tracto digestivo de peces.¹

D. Tovar-Ramírez^{1,2}, J.L. Zambonino-Infante¹, C. Cahu¹, F.J. Gatesoupe¹ y R. Vázquez-Juárez²

¹Unité Mixte de Nutrition de Poissons INRA-IFREMER - Centre de Brest - BP 70 - 29280 Plouzané France, Tel. (0)2 98 224090, Fax. (0)2 98 224653

²Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. Mar Bermejo No. 195, Col. Playa Palo Santa Rita C.P. 23090, La Paz, B.C.S., México. Tel (112) 53633; Fax (112) 53625. rvazquez@cibnor.mx

RESUMEN: El uso de los probióticos en la acuicultura ha cobrado interés en los últimos años. En el presente estudio se evalúa el potencial probiótico de levaduras en el desarrollo del tracto digestivo en la etapa larvaria de dos especies importantes: la lubina europea, *Dicentrarchus labrax* y la cabrilla arenera, *Paralabrax maculatofasciatus*. Se eligieron 10 cepas de levaduras y se seleccionaron aquellas que presentarían una producción de poliaminas importante y una buena capacidad de adhesión al intestino de las larvas del pez. La producción de poliaminas se cuantificó por HPLC en las levaduras mediante cromatografía de alta resolución (HPLC). Para estudiar la adhesión de levaduras al intestino de larvas, se utilizó el marcaje celular con DTAF (5-([4,6-dichlorotriazin-2-YL]amino)- fluorescein) y la observación por microscopía de fluorescencia. Se observó que la cepa HF1 (*Debaryomyces hansenii*) y la X2180 (*Saccharomyces cerevisiae*) produjeron más espermidina y espermina, y mostraron la mejor capacidad de adhesión al intestino de la lubina, respectivamente. Las levaduras seleccionadas se incluyeron al alimento de larvas de la lubina europea para conocer el efecto en su crecimiento, sobrevivencia y actividad enzimática digestiva. Las larvas alimentadas con la dieta que contenía la cepa HF1, experimentaron un aumento del 8.3% en la sobrevivencia, pero no así para el aumento de peso con la dieta de referencia. Se observó que la actividad amilasa secretada de páncreas, así como aquella obtenida de los cocientes entre fosfatasa alcalina, maltasa y leucin-aminopeptidasa y la enzima citosólica leucin-alanin aminopeptidasa, se incrementan en el día 27 para las larvas alimentadas con la cepa HF1; y, posteriormente, se igualan los valores de actividad con respecto a la dieta de referencia en el día 42. Este comportamiento sugiere la maduración temprana del sistema digestivo en larvas alimentadas con la cepa HF1. Finalmente, se cuantificó el mRNA de la lipasa, tripsina y fosfolipasa mediante la técnica de RT-PCR, para conocer la expresión de los genes de estas enzimas como respuesta al estímulo alimenticio elaborado con levaduras. Como producto de este trabajo, se identificó y se registró una secuencia que pertenece a una lipasa en el banco EMBL - (European Bioinformatics Institute) con el No. de acceso AJ275976 y se obtienen los primeros datos del uso de levaduras productoras de poliaminas en la maduración del tracto digestivo de larvas de pez.

PALABRAS CLAVES: Probióticos, levaduras, maduración del tracto digestivo, peces.

INTRODUCCION

El cultivo de peces marinos se ha convertido en una actividad creciente que se apoya principalmente de los criaderos para el suministro de larvas alimentadas generalmente con alimento vivo durante su primer mes de vida (Zambonino-Infante y Cahu, 1999). La secuencia de alimentación se basa

¹ Tovar-Ramírez, D., Zambonino-Infante, J.L., Cahu, C., Gatesoupe, F.J., Vázquez-Juárez, R., 2000. Efecto de la administración de levaduras en el proceso de maduración del tracto digestivo de peces. In: Cruz -Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Olivera-Nowoa, M.A. y Civera-Cerecedo, R., (Eds.). Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 19-22 Noviembre, 2000. Mérida, Yucatán, Mexico.

principalmente en rotíferos (*Brachionus plicatilis*) y *Artemia salina* durante los primeros 20-25 días de cultivo, continuando con una combinación del alimento vivo con alimento seco hasta completar el destete (Kolkovski *et al.* 1997a). La alimentación exógena principia pocos días antes de la absorción completa del vitelo mientras que el alimento comienza a ser digerido en un sistema poco desarrollado (Gatesoupe, 1993).

Desde hace años, se ha creído que las larvas de peces no poseen las enzimas necesarias para digerir las dietas compuestas y que la digestión del alimento vivo se realiza por autólisis de estos microorganismos en el tracto digestivo (Zambonino-Infante y Cahu, 1999); por otro lado, también algunos autores han sugerido que las larvas de peces no pueden asimilar las dietas compuestas debido a la insuficiente actividad enzimática (Lauff y Hofer, 1984) y que puede ser compensada por la actividad enzimática del alimento vivo (Dabrowski y Glogowski, 1977). Recientes resultados demuestran que la actividad enzimática de larvas alimentadas con dietas compuestas y con alimento vivo es similar (Zambonino-Infante y Cahu, 1994a). De igual forma, el hecho de sustituir completamente el alimento vivo por dietas compuestas se obtiene la misma sobrevivencia y crecimiento (Péres *et al.* 1997). En la búsqueda de encontrar sustitutos del alimento vivo para la industria del cultivo de larvas de peces, se ha despertado un enorme interés por el uso de los probióticos como suplementos de los alimentos vivos y elaborados para la acuicultura, y de mejorar los rendimientos en el cultivo de larvas bajo un esquema de cultivo amigable con el ambiente (Gatesoupe, 1999). Especial atención se ha puesto en aquellos microbios que contrarrestan la invasión de patógenos y aumentan la salud del hospedero al incrementar su resistencia contra éstos, y en aquellos también que aporten moléculas de importancia fisiológica para el hospedero (Tovar *et al.*, 2000a). Desde un amplio sentido, el término de probiótico se aplica a aquellos microbios que son administrados de tal manera que entran al sistema gastrointestinal del hospedero, y que se mantienen vivos con la finalidad de aportar salud (Gatesoupe, 1999). Sin embargo, consideramos importante hacer alusión a las moléculas que son aportadas por el microorganismo y que desempeñan una función benéfica para el hospedero, participando en su desarrollo o cubriendo alguna necesidad fisiológica.

Como ejemplo podemos citar las poliaminas, moléculas presentes en todas las células vivas y que son requeridas principalmente en aquellos tejidos con alto recambio celular y de crecimiento (Bardocz, 1993). Entre las poliaminas podemos citar a la putrescina ($\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}_2$), espermidina ($\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}_2$) y espermina ($\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}_2$). Hasta la fecha, se han descrito algunas de las funciones que desempeñan en los seres vivos; sin embargo, aún no se tiene elucidado completamente su mecanismo funcional en la célula. Se sabe que son esenciales para el crecimiento y proliferación celular. Se han descrito también, funciones específicas como inespecíficas dentro del ciclo de replicación celular, tales como el control e iniciación de la traducción de proteínas, estabilización de la molécula del RNA, estimulación de la asociación de las subunidades ribosomales y estimulación de la síntesis del DNA y RNA (Bardocz, 1993).

Desde el punto de vista de su aplicación, las poliaminas se han utilizado para inducir el desarrollo del tracto digestivo de mamíferos (Buts *et al.* 1993; Buts *et al.* 1994; Dufour, *et al.* 1988) y de peces (Péres *et al.* 1997). Se ha demostrado que la poliaminas juegan un papel importante en el desarrollo de tracto gastrointestinal de mamíferos, incluyendo páncreas, hígado e intestino (Bardocz, 1995; Buts *et al.* 1993), y que el suministro de 0.33% de espermina en las etapas larvianas de *Dicentrarchus labrax*, se incrementa la sobrevivencia hasta un 33 % con respecto a la dieta control, libre de poliaminas (Péres *et al.* 1997).

Se sabe que durante las primeras cinco semanas de vida de los peces marinos, se llevan a cabo numerosos cambios funcionales y morfológicos en su sistema digestivo (Péres *et al.* 1997), por lo que es de suma importancia el conocer los factores que regulan el desarrollo, crecimiento y sobrevivencia de las larvas en este período crítico. Para este fin, se está estudiando el uso de levaduras productoras de poliaminas como inductoras de la maduración del sistema digestivo de las larvas de la lubina europea *Dicentrarchus labrax* (Tovar *et al.* 2000a,b), pez de alto potencial económico en Europa (FAO Fisheries Circular, 1986-1995; Josupeit, 1995) y de la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus*. El propósito de este estudio, es conocer el efecto de levaduras seleccionadas por su producción de poliaminas y su adherencia al tracto digestivo de peces, en el desarrollo del sistema digestivo de la lubina europea. *D. labrax* y de la cabrilla arenera *P. maculatofasciatus*.

MATERIALES Y METODOS

Microorganismos

Las cepas de levaduras evaluadas en este estudio por su producción de poliaminas y capacidad de adherencia al intestino de *D. labrax*, se enlistan en la Tabla 1.

Tabla 1. Cepas de levaduras utilizadas en este estudio

Cepa	Observación/Referencia
<i>Rhodotorula glutinis</i>	Aislada de peces/Andlid <i>et al.</i>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> CBS 7764	Aislada de peces/Andlid <i>et al.</i>
<i>Debaryomyces hansenii</i> J26	Cepa de colección Univ. Goteborg
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> CBS 7765	Aislada de peces Andlid <i>et al.</i> , 1993
<i>Debaryomyces hansenii</i> HF1, CBS 8339	Aislada de peces/Andlid <i>et al.</i> 1993
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Cepa de colección Univ. Goteborg
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> X2180	Cepa de colección Univ. Goteborg
Cepa AY1	Aislada de abulón, no identificada
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 7835*	Aislada de paciente-Byron <i>et al.</i> 1995
<i>Candida albicans</i> *	Aislada de catéter de paciente (SSA La Paz, B.C.S.)

* Se incluyeron dos cepas consideradas patógenas como referencia.

Medios de cultivo y crecimiento de las levaduras

La reactivación de las levaduras se llevó a cabo en medio líquido YPD y las cinéticas de crecimiento se llevaron a cabo en medio de cultivo líquido YNB DIFCO. Como parámetro de crecimiento se consideró el aumento en densidad óptica (550 nm) a 200 rpm y 25 °C. La excepción fue *Candida albicans* cuyo crecimiento se llevó a cabo en tubos de ensaye y se midió su crecimiento por peso seco. Se hizo esta excepción porque durante su crecimiento forma agregados y requiere de mayor agitación.

Método de extracción de poliaminas biogénicas

El método de extracción y detección de poliaminas se llevó a cabo de acuerdo a Mallé *et al.* (1996). Se utilizó ácido perclórico para su extracción y la dansilación para la detección de las poliaminas por HPLC en un aparato LKB-LCC 2552 de PHARMACIA unicord SII, y detector de fluorescencia GILSON mod. 121. Se usó una columna SUPELCOSIL SIGMA-ALDRICH LC-18-DB, de 25 cm de largo, 5 µm de diámetro. Se utilizó un flujo de 1 ml/min con una concentración de agua/acetonitrilo de acuerdo a los tiempos y porcentajes descritos por Malle *et al.* (1996). Para cuantificar las poliaminas se

realizo una curva estándar con putrescina, espermidina y espermina (SIGMA, Co) y el estándar interno 1, 3-diaminopropano (SIGMA).

Marcaje de levaduras

Para observar la adhesión de las levaduras al intestino de las larvas de *D. labrax*, se realizó un marcaje con DTAF de acuerdo a Sherr *et al.* (1987). Se obtuvieron los intestinos de larvas y se incubaron con las levaduras marcadas durante 2 h a 37 °C.

Potencial de adhesión de levaduras marinas productoras de poliaminas, al tracto digestivo de larvas de D. labrax

El estudio de adhesión se llevó cabo con las levaduras enlistadas en la sección de producción de poliaminas. Después de haber evaluado la producción de poliaminas en las 10 diferentes cepas, se procedió a estudiar su capacidad de adherirse al tracto digestivo de larvas de *D. labrax* de 41 días de edad. Los segmentos de intestino fueron puestos en buffer de fosfatos pH 7.4, posteriormente se adicionó el cultivo de las levaduras marcadas con DTAF. Los segmentos fueron incubados durante 30 minutos a temperatura ambiente y después se lavaron 3 veces con buffer de fosfatos. Una vez que concluyó el tiempo de incubación, se evaluó la cantidad de levaduras por campo adheridas por microscopía de fluorescencia (40X).

Efecto del alimento PL17 para D. labrax enriquecido con dos cepas de levadura (D. hansenii HF1 y S. cerevisiae X2180) seleccionadas por su adhesión y producción de poliaminas

Las levaduras *D. hansenii* (HF1) y *S. cerevisiae* (X2180), seleccionadas por su capacidad de adhesión al intestino de las larvas y producción de poliaminas, fueron incorporadas al alimento PL17 cuya composición basal esta patentada (Pat. 99-050449) y contiene, 58.4% de proteína, 21.3% de lípidos, (11.6% lípidos neutros y 7.8% de fosfolípidos), 12.2% de cenizas relativas a la materia seca y la humedad fue de 9.8%. El tamaño del alimento fue de 120-200µm del día 10 al 20 después de la eclosión y 200-400 µm del día 20 en adelante).

Las levaduras fueron crecidas hasta su fase logarítmica, se concentraron por centrifugación y luego resuspendidas en agua destilada estéril, para ser adicionadas al alimento por aspersión en proporción de 0.9 mL de suspensión celular (equivalente 67.5×10^4 UFC para *D. hansenii* HF1 y 63×10^4 UFC para *S. cerevisiae* X2180) por gramo de alimento. La cantidad de células de *D. hansenii* cepa HF1 adicionada al alimento, produce 21.93 nM de espermidina, 8.07 nM de espermina y 7.75 nM de putrescina, mientras que *S. cerevisiae* X2180 produce 2.76 nM de espermidina, 6.36 nM de espermina y 1.36 nM de putrescina. Después de adicionar la suspensión de levaduras, el alimento fue secado en una estufa a 37 °C durante 45 min. La suspensión celular fue almacenada en refrigeración (4°C) después de preparar el alimento para las larvas y la sobrevivencia de las levaduras fue medida durante su almacenamiento.

Cultivo larvario y alimentación de D. labrax

El experimento se llevó a cabo en el laboratorio húmedo de la Unidad Mixta de Nutrición de peces INRA-IFREMER, Centro Brest, Francia. Las larvas se consiguieron en la empresa Aquanord, Francia y arribaron a la estación en un estado prelarvario, es decir, sin haberse llevado a cabo la abertura de la boca. Se mantuvieron en la oscuridad hasta el día 9 sin alimento. Fueron crecidas por 41 días en

estanques de fibra de vidrio de 35 L⁻¹ de capacidad a una densidad inicial de 60 organismos L⁻¹. La temperatura se mantuvo a 13 °C desde el inicio y se incrementó progresivamente a 20 °C en el día 9 después de su eclosión. La salinidad fue de 34 g L⁻¹ y la intensidad luminosa fue de 9 Wm⁻² a partir de la ida 15 de cultivo. Los niveles de oxígeno se mantuvieron por arriba de 6mg L⁻¹. Fueron cultivadas en agua de mar filtrada en un filtro de arena y pasada por un calentador de tungsteno y desgaseada en una columna con anillos de plástico. Las larvas se alimentaron continuamente con un distribuidor automático de bandas, verificándose la ingesta por microscopio estereoscópico. Para cada régimen alimenticio, se utilizaron cuatro réplicas incluyendo un control sin levaduras.

Sobrevivencia y peso de las larvas

La sobrevivencia se calculó por el número inicial y final de larvas, expresándose como %. Se tomó en cuenta también el número de larvas muestreadas para los ensayos enzimáticos y extracción de RNA. El peso de las larvas fue obtenido del muestreo de 10 larvas por estanque, los días 5, 16, 22, 29, 36 y 42 de cultivo.

Efecto del alimento suplementado con levaduras sobre la actividad enzimática digestiva de larvas de D. labrax

Durante el crecimiento larvario (día 27) y al final del experimento (día 41), las larvas fueron colectadas por la mañana (8:30) antes de ser alimentadas y almacenadas a -80 °C, hasta su proceso. Para la disección de larvas y obtención de homogenados se utilizó la metodología descrita por Cahu y Zambonino-Infante (1994). De los extractos obtenidos, se ensayaron las enzimas pancreáticas tripsina (Holm *et al.* 1988) y amilasa (Métais y Bieth, 1968). De igual forma, ambas enzimas fueron ensayadas en el intestino para conocer la cantidad secretada. De las membranas con borde de cepillo se ensayaron la enzimas fosfatasa alcalina (PAL) (Bessey *et al.* 1946), leucin-aminopeptidasa (LAP) (Maroux *et al.* 1973), y la enzima citosólica leucin-alanin-peptidasa (leu-ala) (Nicholson y Kim, 1975). La actividad de las diferentes enzimas se refirió como actividad específica (miliunidades/ mg de proteína) y la determinación de proteínas se realizó por el método de Bradford (1974) usando albúmina sérica bovina como estándar. Las membranas con borde de cepillo se obtuvieron de acuerdo a (Cahu y Zambonino-Infante, 1994; método modificado de acuerdo a Crane *et al.* 1979).

Elaboración de sondas de cDNA para la detección de la lipasa primaria de larvas y adultos de D. labrax

Los oligonucleotidos ("primers") se diseñaron de los segmentos más conservados del resultado del alineamiento con los mRNA de nuestro interés, registrados en los bancos de secuencias con acceso en la siguiente página de Internet: <http://www.infobiogen.fr/services/deambulum/fr/>.

La extracción del RNA se llevó a cabo en larvas recién colectadas (8:30) en ayunas y adultos. Para la extracción de RNA total se utilizó el segmento pancreático utilizando el protocolo de extracción que acompaña al reactivo de TRIZOLTM de GIBCO Life Sciences. Del RNA total se tomaron 5 µg para ser transcritos a cDNA utilizando la transcriptasa inversa del virus de la leucemia murina-maloney (MMLV) de acuerdo a las instrucciones del kit READY TO GO de Amersham Pharmacia Biotech Inc., NJ, USA. La amplificación del cDNA se llevó a cabo usando la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La reacción se llevó a cabo en 50 µL conteniendo 0.66 µg del cDNA, 0.2 U de Taq polimerasa (Amersham), 100 µM de dNTP's, 50 pmoles de cada primer, 1X del amortiguador de la reacción (Amersham) y agua destilada estéril hasta completar 50 µL. La reacción de amplificación se llevó a

cabo en un termociclador ROBOCYCLER Gradient 96 Stratagene CA USA., con los parámetros descritos en la Tabla 2.

Tabla 2. Amplificación de los fragmentos seleccionados

Desnaturalización inicial del cDNA	94 °C	30 seg	1 ciclo
Desnaturalización del cDNA formado	94 °C	1 min	30 ciclos
Hibridación de los primers	variable *	1 min 1/2	30 ciclos
Elongación del cDNA formado	72 °C	2 min	30 ciclos
Elongación final	72 °C	7 min	1 ciclo

* La temperatura de hibridación depende de las proporción de G/C que contienen los primers elaborados.

Los productos de amplificación fueron separados por electroforesis sobre agarosa al 1.2 % y analizados en un fluorómetro FluoroScan Multimager de BIO-RAD. La visualización se llevó a cabo gracias a la adición de bromuro de etidio en razón de 4 µL/ 50 mL de TE (Tris-EDTA, pH 8.0).

Posteriormente, se procedió a la purificación de los fragmentos de cDNA cortando las bandas de nuestro interés. La recuperación y purificación del cDNA se obtuvo con el protocolo del kit GENE CLEAN SPIN KIT (BIO 101 INC, CA USA). Finalmente, los segmentos amplificados por PCR fueron clonados de acuerdo al kit TOPO^R TA CLONING (INVITROGENE, The Netherlands), utilizando células competentes de *E. coli* y al plásmido pCR 2.1 TOPO 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 ARNm de las enzimas lipasa, fosfolipasa, tripsina y Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) por RT-PCR

De una alícuota de los fragmentos clonados del cDNA, se procedió a realizar la cuantificación del mRNA para las enzimas tripsina, fosfolipasa, lipasa y GAPDH. Los resultados fueron expresados como mRNA de cada enzima/mRNA de la GAPDH. Se ha demostrado que la normalización de cualquier enzima en relación a la GAPDH provee valores representativos y reproducibles para comparar la expresión genética a nivel del mRNA (Solch y Arnold, 1996).

RESULTADOS

Potencial de adhesión de levaduras marinas productoras de poliaminas, al tracto digestivo de larvas de D. Labrax

Las levaduras que demostraron sintetizar una mayor cantidad de poliaminas fueron la HF1 *D. hansenii* y la X2180 *S. cerevisiae*. En este orden, también se observó una mayor capacidad de adherencia al intestino de *D. Labrax* (Fig. 1). Por lo que fueron seleccionadas para llevarse a cabo los bioensayos con larvas recién eclosionadas de *D. Labrax*.

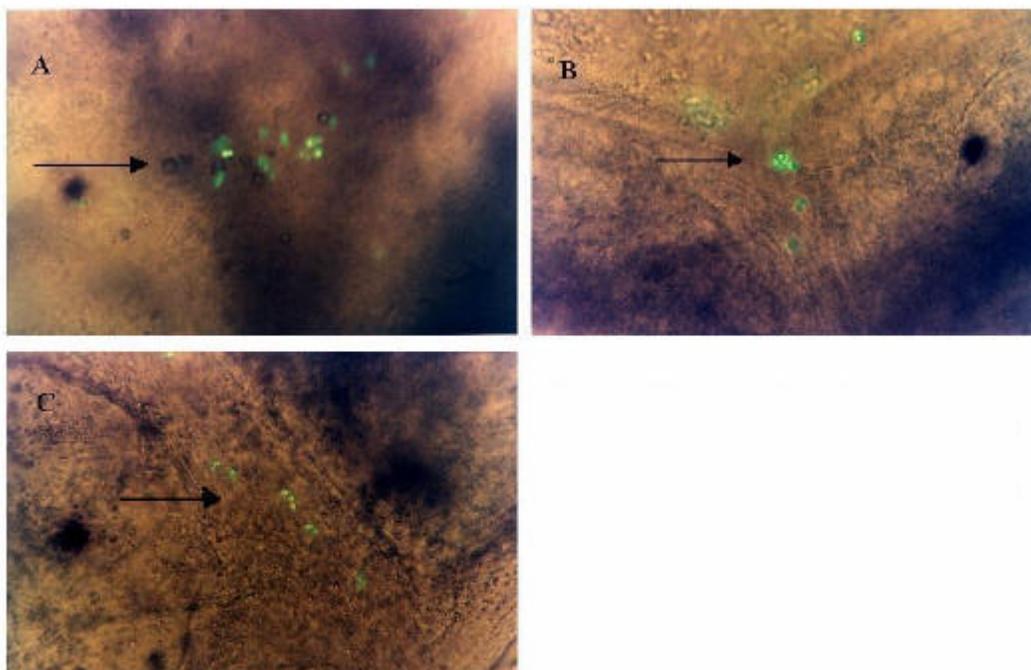


Fig. 1. Micrografía de fluorescencia en donde las flechas muestran a las cepas A) *Debaryomyces hansenii* (HF1), B) *Saccharomyces cerevisiae* (YL12) y 3) *S. cerevisiae* (X2180) adheridas al intestino de larvas de *D. labrax* (40 X).

Efecto de D. hansenii HF1 y S. cerevisiae X2180 incorporadas en el alimento de D. labrax

Con el uso de *D. hansenii* cepa HF1 en el alimento, se obtuvo un aumento en la sobrevivencia de larvas hasta un 8.3% con respecto al control. No fue detectado algún tipo de levadura en la dieta control y la presencia de bacterias de género *Vibrio* en el intestino de las larvas fue <100 UFC por cada tratamiento, lo que no resulta significativo para nuestros resultados de producción de poliaminas.

A pesar de los resultados positivos en la sobrevivencia, se obtuvieron menores pesos promedio con respecto al control al usar alimento suplementado con levaduras (Fig. 2). La variación del número de levaduras viables utilizadas en la elaboración del alimento para las larvas no varió significativamente ($p>0.05$) durante su almacenamiento en refrigeración.

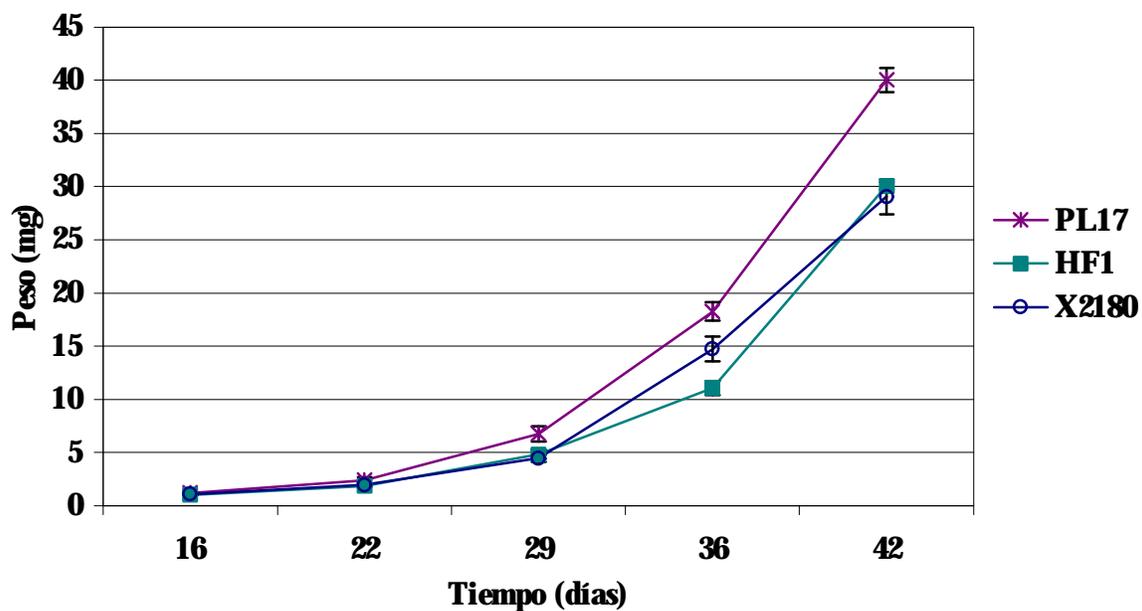


Fig. 2. Peso obtenido de las larvas de *D. labrax* durante su cultivo, alimentado con la dieta control (PL17) y aquellas elaboradas con las cepas HF1 y X2180.

La actividad enzimática tipo tripsina secretada de las larvas en el día 27, es igual con aquellas alimentadas con la dieta control y la elaborada con *D. hansenii* HF1; sin embargo, en ese mismo día la actividad tripsina decrece con la dieta de la cepa X2180. La misma tendencia se observa para el término del experimento (Fig. 3).

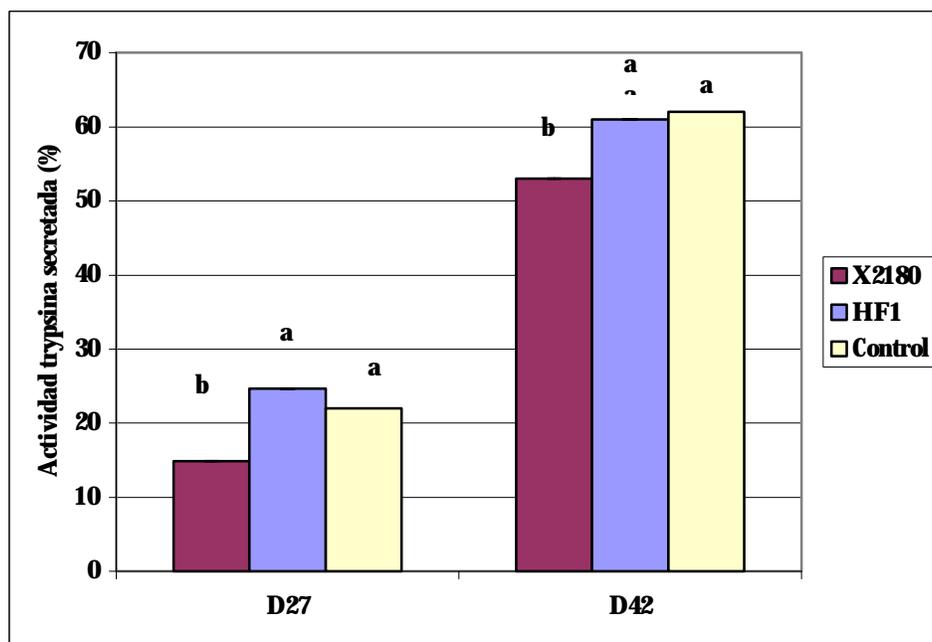


Fig. 3. Actividad tripsina secretada en larvas de 27 y 42 días, alimentadas con las cepas X2180, HF1 y la dieta control PL17. Las letras significan la homogeneidad entre los diferentes tratamientos ($p < 0.05$).

Por otro lado, la actividad enzimática tipo amilasa secretada por las larvas, se incrementa en el día 27 en aquellas alimentadas con la dieta que contiene *D. hansenii* HF1. Al término del experimento, la actividad amilasa secretada se mantiene igual en las larvas alimentadas con las tres dietas (Fig. 4).

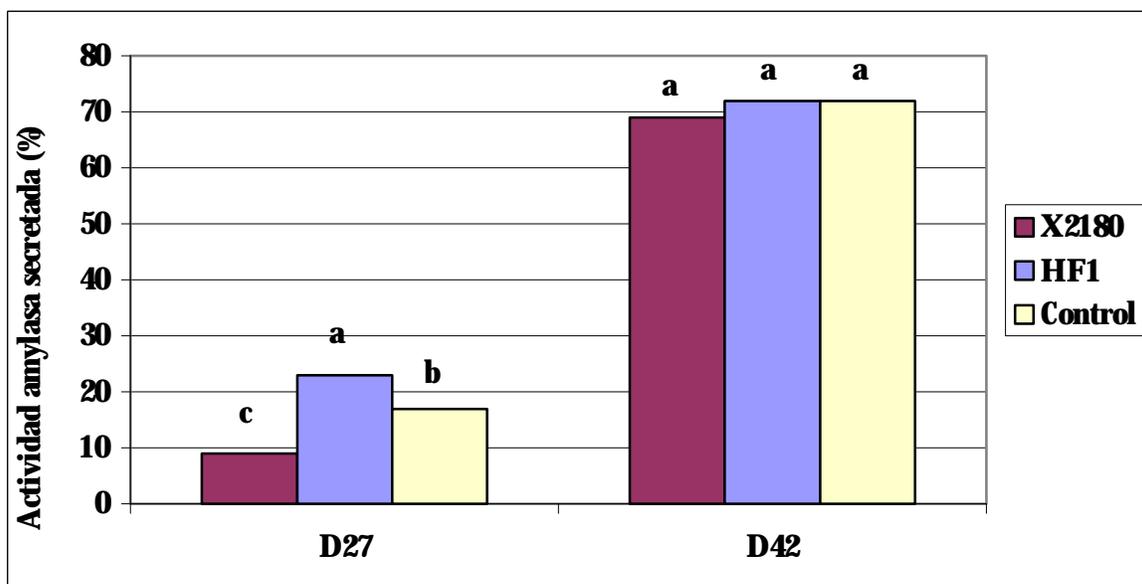


Fig. 4. Actividad enzimática de la amilasa secretada por larvas crecidas hasta el día 27 y 42, alimentadas con las cepas X2180, HF1 y la dieta control PL17. Las letras significan la homogeneidad entre los diferentes tratamientos ($P < 0.05$).

Diseño de sondas de cDNA para la detección de la lipasa de D. labrax

Para el diseño de los primers específicos, se utilizaron las secuencias registradas del Zebrafish *Danio rerio* (No. AW018709, que es un cDNA 5' similar al precursor del triacilglicérido lipasa) y a la del ratón doméstico *Mus musculus* (No. X58426, que es un RNA para una triacilglicérido lipasa hepática).

Primers diseñados para lipasa:

HL dir1	5'	tgtggcttcaacagc	3'
HL dir2	5'	agatcatcca(ct)ggg	3'
HL dir3	5'	gggtggctcgctagat	3'
HL rev1	5'	cgctccaagrctgta	3'
HL rev2	5'	grctgtacccaatca	3'

Se ensayaron las Combinaciones y temperaturas siguientes:

Combinaciones	No. de pares de bases esperado	Temperaturas
dir1-rev1	291	46, 48, 50, 52 °C
dir1-rev2	283	44, 46, 48, 50
dir2-rev1	260	44, 46, 48, 50
dir2-rev2	252	44, 46, 48, 50
dir3-rev1	234	48, 50, 52, 54
dir3-rev2	260	44, 46, 48, 50, 52

De las 6 combinaciones de primers, solamente dieron respuesta positiva el dir1-rev1 (D1R1) y dir3-rev2 (D3R2) (Fig. 5). Una vez purificadas las bandas, se clonaron y se secuenciaron. Del resultado de la secuenciación del cDNA correspondiente a la combinación D1R1DL, se obtuvo un fragmento de 288 pares de bases, reportado ya (Tovar, 2000) como una triacilglicérido lipasa (EC 3.1.1.) con una homología del 85% en 60 pares de bases, a la secuencia de la lipasa hepática del ratón doméstico (*Mus musculus*).

Una vez secuenciados los fragmentos de cDNA de la lipasa y confirmada su homología con secuencias conocidas registradas en las bases de datos, se comenzará a cuantificar el mRNA de las enzimas lipasa, fosfolipasa y tripsina, utilizando el mRNA de la enzima GAPDH como estándar interno (resultados no mostrados), para aquellas larvas alimentadas con levaduras.

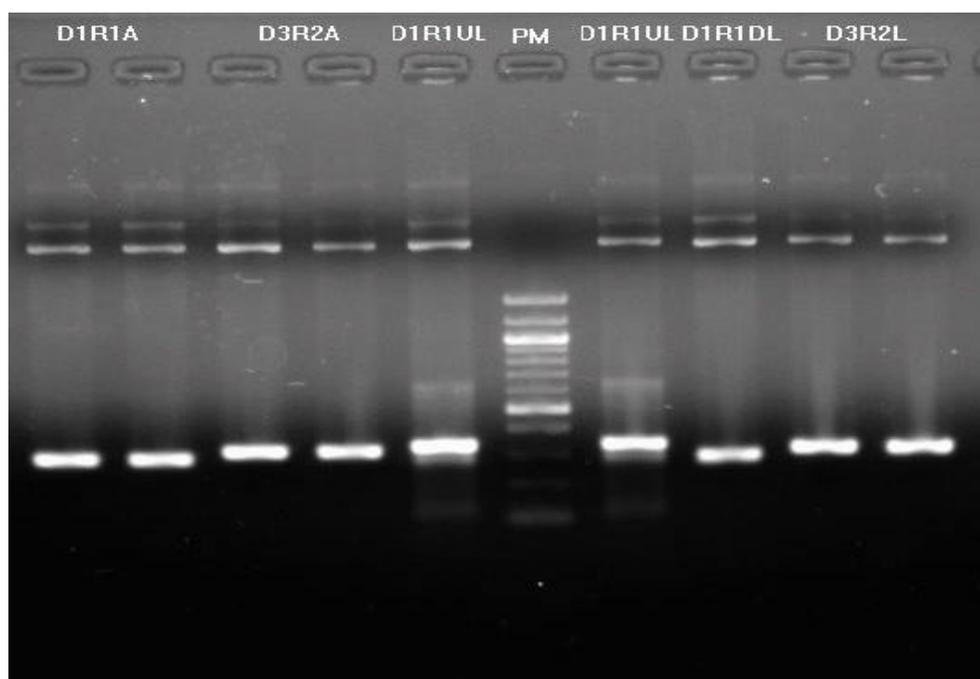


Fig 5 . Electroforésis de agarosa que muestra los productos de amplificación de los cDNA puros –provenientes de las diferentes combinaciones de oligonucleótidos.

DISCUSION

Debido a que el recambio celular en el epitelio intestinal es mayor que en cualquier otro tejido, las poliaminas son vitales para una función y estructura adecuada del tracto digestivo. Además de la síntesis *in situ*, se ha demostrado que en el intestino la demanda requiere de fuentes externas, particularmente aquellas poliaminas suministradas con la dieta y la contribución de la microflora indígena (Bardocz *et al.* 1996).

Resulta interesante la cantidad de poliaminas que son detectadas en el medio de cultivo de las levaduras, y que sugiere una forma de administrarlas directamente al intestino de la larva aprovechando la capacidad de adherencia de las levaduras. La mejor respuesta de adhesión al intestino de la lubina fue observado con *D. hansenii* cepa HF1, seguido de *S. cerevisiae* cepa YL12, y después con *S. cerevisiae* cepa X2180 (Fig. 1). Previos resultados (Vázquez-Juárez *et al.* 1997; Andlid *et al.* 1995) han demostrado que *D. hansenii* HF1 tiene una gran afinidad a la mucosa intestinal de peces, lo que sugiere que el intestino es un importante lugar para el crecimiento y proliferación microbiana en especies en cautiverio, y la mucosa gástrica una rica fuente de nutrientes para estos microbios (Andlid *et al.* 1995).

El aporte de poliaminas al sistema digestivo del pez por las levaduras, puede resultar de mucha importancia en las etapas larvarias para la maduración de su sistema digestivo y lograr una mejor sobrevivencia. Se sabe que durante el primer año de vida la lubina europea experimenta un lento crecimiento comparado con sus etapas posteriores de desarrollo (Casti *et al.* 1989). También se ha demostrado que en el primer mes de vida, es el tiempo mas crítico en el crecimiento y desarrollo de esta especie (Péres *et al.* 1998) por lo que es de primordial importancia incluir probióticos en los alimentos para contribuir al aporte de moléculas estimuladoras del crecimiento y diferenciación celular. Debido a que las levaduras no penetran a los enterocitos de las larvas, suponemos que existe una secreción o liberación de poliaminas como resultado del metabolismo de éstas, lo que inducen el incremento de la sobrevivencia como lo fue observado por Péres *et al.* (1997). En este trabajo, se obtuvo un aumento del 33% de sobrevivencia en larvas alimentadas con 0.33% de espermina pura. Se ha demostrado que estas moléculas son consideradas un factor importante en la maduración de las membranas de borde de cepillo del intestino en mamíferos (Greco *et al.* 2000).

A los 41 días de haber iniciado el cultivo, se detectaron 2.5×10^2 y 1.5×10^2 levaduras en el intestino de larvas alimentadas con *D. hansenii* HF1 y *S. cerevisiae* X2180 respectivamente, lo que confirma nuestros resultados de adhesión y efecto de la dieta enriquecida con la primera cepa. Sin embargo, la obtención de un bajo peso promedio de larvas alimentadas con levaduras, pudo haber sido provocado por el cambio de textura adquirido por el alimento al ser humedecido y luego secado en la estufa, ya que éste se sedimentó en los acuarios a una velocidad mayor que la dieta control.

El efecto positivo *D. hansenii* HF1, lo podemos evidenciar al observar una modulación de la actividad enzimática digestiva en los primeros 27 del desarrollo larvario de la lubina. La Fig. 4 muestra que la secreción de la amilasa en el día 27 se ve favorecida con respecto al control ($P < 0.05$) cuando es alimentada con la dieta que incluye dicha cepa. Esto también se puede evidenciar cuando se analizan los cocientes de actividad enzimática de la Tabla 3. El incremento significativo ($P < 0.05$ contra el control) de la actividad de la maltasa (32.8%), y de las enzimas de las células con borde de cepillo, fosfatasa alcalina (62.5%) y leucin-amino-peptidasa (47%) sugieren el paso de una digestión citosólica a una digestión extracelular (Tovar *et al.* 2000b). Se ha demostrado que un bajo nivel de actividad de enzimas intracelulares (citosólicas) y el aumento de actividad de las enzimas de las células con borde

de cepillo, caracterizan la maduración de los enterocitos en mamíferos (Henning, 1987) y en peces (Cahu y Zambonino-Infante, 1994).

Tabla 3. Cocientes de actividad enzimática.

	HF1	X2180	Control
Día 27			
AP	56 ± 5.4 ^a	7 ± 2.0 ^c	21 ± 3.6 ^b
LAP	85 ± 10.2 ^a	7 ± 2.0 ^c	45 ± 14.3 ^b
Maltasa	6.4 ± 0.75 ^a	2.4 ± 0.42 ^c	4.3 ± 0.14 ^b
Día 42			
AP	303 ± 67.4	324 ± 80.8	232 ± 51.9 ns
LAP	54 ± 5.6 ^b	74 ± 21.8 ^{a b}	105 ± 26.2 ^a
Maltasa	53 ± 3.5	66 ± 18	41 ± 5 ns

AP- Fosfatasa alcalina

LAP – Leucin-aminopeptidasa

ns – valores sin diferencia significativa

Los valores con diferentes letras poseen diferencia significativa ($p < 0.05$).

Otro efecto positivo de la administración de levaduras productoras de poliaminas, lo podemos observar al incrementarse la sobrevivencia con respecto al control ($P < 0.05$). Anteriormente Cahu y Zambonino-Infante (1994) observaron que la maduración temprana de los enterocitos de peces conduce a la obtención de mayores tasas de sobrevivencia larvaria.

El efecto de la maduración del sistema digestivo, acompañado de la administración de probióticos ha sido bien documentado en mamíferos pero no en peces. Se ha observado que en ratas destetadas (20-30 días) y oralmente alimentadas con *S. boulardii* (100 mg/día), incrementan su actividad específica de sacarasa (157%) y maltasa (47.5%) como producto de la liberación de poliaminas (55% espermidina y 43% espermina) (Buts *et. al.* 1994).

La caracterización parcial del gen de la lipasa, nos permitirá conocer aún mas el papel que juegan los probióticos en el desarrollo y expresión del gen que codifica esta enzima digestiva durante la etapa larvaria de la lubina. Este es el tercer trabajo que reporta la clonación y secuenciación de un fragmento de una lipasa en peces marinos. Previamente, Gjellesvik *et al.* (1994) reportaron la clonación del gen de la carboxilester lipasa del salmón del Atlántico *Salmo salar*; y más recientemente, Clark *et al.* (1998) reportaron un fragmento de una lipasa de Zebrafish *Danio rerio* que posee semejanza al precursor de la triacilglicerido lipasa del ratón (Chang *et al.* 1991).

Con este estudio, se complementará la información concerniente al efecto de dietas compuestas en el crecimiento y desarrollo del sistema digestivo en peces, ya que los reportes del uso de dietas compuestas en etapas larvarias tempranas son escasos (Zambonino-Infante y Cahu, 1999).

AGRADECIMIENTOS

Los resultados de este trabajo son parte del proyecto ECOS-ANUIES M98-S03 y proyecto CONACyT 25956B. Dariel Tovar agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) (No. Becario 84016), al Institute National de la Recherche Agronomique (INRA), a Patrick Quazuguel, Marie Madelaine Legall de la Unité Mixte de Nutrition de Poissons (INRA-IFREMER) por el apoyo recibido.

REFERENCIAS

- Andlid, T., Juárez, R.V., Gustafsson, L.. 1995. Yeast colonizing the intestine of Rainbow Trout (*salmo gairdneri*) and Turbot (*Scophthalmus maximus*) microb. Ecol., 30, 321-324.
- Bardocz, 1993. The role of dietary polyamines. European Journal of Clinical Nutrition, 47, 683-690.
- Bardocz, S., White, A., Grant, G., Brown, D.S., Duguid, T.G., Pusztai, A., 1996. Uptake and bioavailability of dietary polyamines. Biochem. Soc. Trans. 24 (2), 2265.
- Bessey, A.O., Lowry, O.H., Brock, M.J., 1946. Rapid coloric method for determination of alkaline phosphatase in five cubic millimeters of serum J. Biol. Chem., 164,321-329.
- Bradford, M.M., 1974. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem., 72, 248-254.
- Buts, J.P., De Keyser, N., Kolanowsky, J., Sokal, E., Van Hoof, F., 1993. Maturation of villus and crypt cell functions in rat small intestine. Digestive Diseases and Sciences, 38 (6), 1091-1098.
- Buts, J.P., Keyser, N., Raedemaeker, L.. 1994. *Saccharomyces boulardii* enhances rat intestinal enzyme expression by endoluminal release of polyamines, Pediatric Research, 36 (4), 522-527.
- Byron, J.K., Clemons, K.V., McCusker, J.H., Davis, R.W., Stevens DA., 1995. Pathogenicity of *Saccharomyces cerevisiae* in complement factor five-deficient mice. Infect.Immun. 63, 478-485.
- Cahu, Ch., Zambonino-Infante, J.L., 1994. Early weaning of seabass (*Dicentrarchus labrax*) larvae with a compound diet: effect on digestive enzymes. Comp. Biochem. Physiol., 2, 213-222.
- Casti. A., Orlandini, G., Soldi, M.E., Davalli, P., Reali, N., Vivani, R., 1989. Tissue polyamine concentration in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*): change with age and seasonal of the year. Ital. J. Biochem., 38, 369-373.
- Clark M., Johnson S.L., Lehrach H., Lee R., Li, F., Marra M., Eddy S., Hillier L., Kucaba T., Martin J., Beck C., Wylie T., Underwood K., Steptoe M., Theising B., Allen M.
- Bowers Y., Person B., Swaller T., Gibbons M., Pape D., Harvey N., Schurk R., Ritter E., Kohn S., Shin T., Jackson Y., Cardenas M., McCann R., Waterston R., Wilson R., 1998. "WashU Zebrafish EST Project"; Unpublished.
- Chang S.F., Netter H.J., Will H., 1991. "Characterization of cDNA encoding the mouse hepatic triglyceride lipase and expression by in vitro translation". FEBS Lett., 289, 69-72.
- Crane., R.K., Boge, G., Rigal, A., 1979. Isolation of brush border membranes in vesicular form from the intestinal spiral valve of the small dogfish (*Scyliorhinus canicula*). Biochim. Biophys. Acta 554: 262-267.
- Dabrowski, K.,Glogoswki, J., 1977. Studies on the role of exogenous proteolytic enzymes in digestion process in fish. Hydrobiologia, 54, 129-134.
- Dufour, C., Dandrifosse, G., Forget, P., Vermesse, F., Romain, N., Lepoint, P., 1988. Spermine and spermidine induce intestinal maturation in the rat. Gastroenterology, 95, 112-116.
- FAO, 1986-1995. Aquaculture Statistics, Fisheries Circular No. 815, Revision 9.
- Gatesoupe, J. F., 1993. Development of fish larvae and rearing conditions in hatcheries. Coastal and stuarine studies. In: Lahlou, B. and Vitiello P. (eds), American Geophysical Union, Washington DC, Capítulo 10, pp. 159-172.
- Gatesoupe, J. F., 1999. The use of probiotics in aquaculture, Aquaculture, 180, 147-165.
- Gjellesvik, D.R., Lorens, J.B., Male, R., 1994. Pancreatic carboxylester liapse from atlantic salmon (*Salmo salar*) cDNA sequence and computer-assisted modelling of terciary structure, Eur. J. Biochem. 226, 603-612.
- Greco, S., Hugueny, I., George, P., Perrine, P., Louisot, P., Biol. M.C. 2000. Influence of spermine on intestinal maturation of the glycoprotein glycosylation process in neonatal rats. J. Biochem., 345, 69-75.
- Henning, S.J., 1987. Functional development of the gastrointestinal tract. Physiology of the gastrointestinal tract, pp 285-300., 2nd edition. edited by L.R. Johnson. Raven Press, New York.
- Holm, H., Hanssen, L.E., Krogdahl, A., and Florholmen, J., 1988. High and low inhibitor soybean meals affect human duodenal proteinase activity differently: *in vivo* comparison with bovine serum albumin. J. Nutri., 118, 515-520.
- Josupeit, H., 1995. European markets for seabass, seabream and turbot, Aquaculture Europ. 20 (2), 6-12.
- Kolkovski, S., Tandler, A., Izquierdo M.S., 1997. Effects of live food and dietary digestive enzymes on the efficiency of microdiets for seabass (*Dicentrarchus labrax*) larvae, Aquaculture, 148, 313-322.
- Lauff, M., Hofer, R., 1984. Development of proteolytic enzymes in fish and the importance of dietary enzymes. Aquaculture 37, 335-346.
- Mallé, P., Vallé, M., Bouquelet, S., 1996. Assay of biogenic amines involved in fish decomposition, Journal of AOAC, vol. 79; No. 1, pp. 43-49.
- Maroux, S., Louvard, D., Baratti, J., 1973. The aminopeptidases from hog-intestinal brush border. Biochem. Biophys. Acta, 321, 282-295.
- Métais, P., Bieth, J., 1968. Determiration de l'alfa-amilase par une microtechnique. Annal. Biol. Clin., 26,133-142.
- Nicholson, J. A., Kim, Y.S., 1975. A one-step L-amino acid oxidase assay for intestinal peptide hydrolase activity. Anal. Biochem., 63,110-117.

- Péres, A., Cahu, C.L., Zambonino-Infante, J.L., 1997. Dietary spermine supplementation induces intestinal maturation in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Fish Physiol. and Biochem.*, 16, 479-485.
- Sherr, B. F., Sherr, E.B., Fallon, R.D., 1987. Use of monodispersed, fluorescently labeled bacteria to estimate *in situ* protozoan bacterivory. *Appl. and Environ. Microbiol.*, 53 (5), pp. 958-965.
- Solch, J.P., Arnold, G.L., 1996. Multiplex reverse transcription polymerase chain reaction combined with temperature gradient gel electrophoresis as a tool for the normalized quantitation of intrinsic factor mRNA. *Electrophoresis*, 17,30-39.
- Tovar-Ramírez, D., 2000. *Dicentrarchus labrax* partial mRNA for triglyceride lipase, AC AJ275976, 288 bp, European Bioinformatics Institute (EMBL).
- Tovar-Ramírez, D., Zambonino-Infante, J.L., Gatesoupe, F.J., Vázquez-Juárez, R., 2000a. Preliminary study of the potential of yeast as probiotics for the european seabass larvae *Dicentrarchus labrax*. AQUA 2000, NICE FRANCE, 2-6 mayo del 2000.
- Tovar-Ramírez, D., Zambonino-Infante, J.L., Cahu, C., Gatesoupe, F.J., Vázquez-Juárez, R., 2000b. Improvement of gut maturation in sea bass larvae by yeast incorporation in diet. (En preparación).
- Vázquez-Juárez, R., Andlid, T., Gustafsson, L., 1997. Adhesion of yeast isolated from fish gut to crude intestinal mucus of rainbow trout *Salmo gairdneri*. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 6(1), 64-71.
- Zambonino-Infante, J.L., Cahu, Ch., 1994. Influence of diet on pepsin and some pancreatic enzymes in seabass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Comp. Biochem. Physiol.* vol. 109A, No. 2, pp. 209-212
- Zambonino-Infante, J.L., Cahu, Ch., 1999. High dietary lipids levels enhance digestive tract maturation and improve *Dicentrarchus labrax* larval development, American Society for Nutritional Sciences, pp. 1195-1200.