

El Ciclo Diario de la Digestión en Peces Cultivados.

Aspectos Funcionales y Metodológicos

Manuel Yúfera

Instituto de Ciencias marinas de Andalucía (ICMAN-CSIC)

Campus Universitario Río San Pedro s/n, 11519 Puerto Real, Cádiz, España

E-mail: manuel.yufera@icman.csic.es

Resumen

La eficiencia de la digestión depende entre otros factores de la adecuada relación entre enzima y sustrato, así como del tiempo de hidrólisis bajo las condiciones apropiadas. La digestión es un proceso temporal que, en peces, como en otros vertebrados, empieza con la detección del alimento y finaliza con la expulsión de los desechos. La disponibilidad del alimento en el medio es variable a lo largo del ciclo diario por lo que también lo es la ingestión y digestión de los nutrientes. Cabe pues esperar que haya momentos óptimos para suministrar el alimento y que favorezcan su digestión, y momentos más desfavorables en los que se reduciría la eficiencia de digestión. Por eso, el diseño de protocolos de alimentación más eficientes requiere del conocimiento previo de los ciclos digestivos. En esta revisión se describirán los estudios realizados en este sentido y el estado de conocimiento de la función digestiva en relación a los ciclos diarios. Se muestran tanto los avances en larvas de peces como en juveniles y adultos que presentan diferentes modos de digestión. Dada la variabilidad entre especies, y la escasez de estudios, la información disponible es aún muy fragmentaria para definir patrones de actuación.

Palabras clave: Peces, digestión, ritmos diarios, protocolo de alimentación

Introducción

Los protocolos de alimentación utilizados en la cría y engorde de peces son variados entre las diferentes instalaciones de cultivo, así como entre especies. Estos protocolos, con distinta ración y frecuencia de alimentación diarias, generalmente se han establecido en base a la propia experiencia previa y a abordajes empíricos y no están sustentados por un conocimiento de los fundamentos biológicos y tecnológicos. En la alimentación de peces, como en otros vertebrados, la eficiencia con que se incorporan los nutrientes al organismo depende entre otros aspectos de la interacción entre la disponibilidad del alimento y las capacidades digestivas de la especie. Como todo proceso fisiológico, la digestión tiene una dimensión temporal que se inicia por una serie de estímulos asociados a la presencia de alimento y su detección, y finaliza cuando los nutrientes ingeridos han sido convenientemente hidrolizados para permitir su absorción por las paredes intestinales y los desechos expulsados. En este proceso temporal, otro elemento a considerar es el tránsito digestivo que afecta al tiempo en que el alimento ingerido está disponible para ser hidrolizado por las enzimas digestivas condicionando la eficiencia digestiva. Es evidente que el nivel de disponibilidad del alimento en el medio no es permanentemente constante ni es igual de accesible para el organismo al que alimenta a lo largo del día. Por ello, la ingestión de alimento presenta igualmente un patrón diario con variaciones entre horas (Boujard & Leatherland 1992; Madrid, Boujard & Sánchez-Vázquez 2001) y cabe esperar por lo tanto que también suceda lo mismo con su posterior digestión.

A lo largo de la evolución, los organismos han adaptado sus pautas vitales a los ciclos naturales para optimizar los procesos fisiológicos frente a los cambios predecibles de los factores medioambientales. Para ello, las funciones vitales están controladas por un sistema de osciladores biológicos internos que permiten a los organismos estar preparados de forma anticipada a los acontecimientos cíclicos de la naturaleza dependientes de los movimientos de la Tierra en relación a los astros que la rodean (Pittendrigh 1993; Reebs 2002). Especialmente influyente en la alimentación animal es el ciclo día/noche que influye en la presencia de alimento, su detección e ingesta. El sistema circadiano endógeno oscila en

ciclos cercanos a 24 horas en ausencia de señal externa y se sincronizan por estímulos externos, particularmente la luz (Whitmore, Foulkes y Sassone-Corsi 2000; Vatine, Vallone, Gothilf y Foulkes 2011). Aun considerando que la iluminación es un sincronizador preferente, la alimentación también presenta un papel destacado de forma independiente (Spieler 1992; Feliciano, Vivas, de Pedro, Delgado, Velarde y Isorna 2011; López-Olmeda 2017).

Se ha descrito que la mayoría de los peces se alimentan predominantemente utilizando la visión por lo que es necesario un determinado nivel de iluminación para que detecten el alimento, aunque también influye de manera destacada el olfato y hay especies en que la iluminación no es un factor necesario. Desde el punto de vista de la acuicultura, estas variaciones diarias en la actividad alimentaria, con máximos y mínimos a determinadas horas, nos llevan a pensar que existen ciertos momentos más apropiados para suministrar el alimento en los cuales se favorecería el proceso de digestión, y otros en los que la digestión no sería igual de eficiente, con el consiguiente descenso en la relación coste/beneficio del proceso de engorde y exceso de vertido de residuos nitrogenados al medio. Por ello, una buena planificación de los protocolos de alimentación fijando adecuadamente el momento y la frecuencia de las tomas diarias, tendría que tener en cuenta estos patrones diarios. Sin embargo, el conocimiento que disponemos de la función digestiva en peces está basado principalmente en muestreos puntuales en un determinado momento del día que no reflejan la situación periprandial ni cómo se organiza este proceso durante un ciclo de 24 horas.

Resulta curioso que mientras las variaciones de productos de la absorción intestinal o productos hormonales en plasma se han examinado profusamente en estudios de respuestas rítmicas y postprandial (Boujard y Leatherland 1992; Cowan, Azpeleta y López-Olmeda 2017), los cambios en la propia función digestiva no hayan recibido apenas atención en peces. A diferencia de lo que ocurre en crustáceos (Molina, Cadena y Orellana 2000; Nolasco-Soria y Vega-Villasante 2000; Espinosa-Chaurand, Vega-Villasante, Carrillo-Farnés y Nolasco-Soria 2017), hasta hace relativamente pocos años nuestro conocimiento sobre las variaciones diarias de la actividad de las enzimas digestivas como respuesta a la

Yúfera, M. 2017. El Ciclo Diario de la Digestión en Peces Cultivados. Aspectos Funcionales y Metodológicos. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., López Acuña, L.M. y Galaviz-Espinoza, M. . (Eds), Investigación y Desarrollo en Nutrición Acuicola Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, pp. 55-77.

ingestión era bastante escaso. Recientes estudios empiezan a darnos una idea de cómo se organiza la función digestiva para adaptarse a periodos repetitivos de 24 horas. Hay que tener en cuenta que cuando hablamos de la función digestiva no solo nos referimos a la actividad de las enzimas digestivas determinada con técnicas bioquímicas e indicadoras de una cantidad determinada de enzimas en el tracto digestivo, sino también a los pasos previos que preparan la maquinaria enzimática. Los precursores de los enzimas están codificados por los correspondientes ARNm cuya expresión relativa también va a mostrar variaciones horarias.

Los peces constituyen un grupo de numerosísimas especies adaptadas a una extrema diversidad de hábitats. Debido a la variedad de hábitos de alimentación y comportamiento, así como morfológica y fisiológica, se pueden encontrar notables diferencias en el proceso de digestión entre grupos taxonómicos y especies. Las diferencias son incluso más notables cuando se comparan diferentes etapas de la vida, sobre todo durante el desarrollo y transformación de larvas a juveniles. Teniendo en cuenta todas estas fuentes de variabilidad la información disponible es aún bastante fragmentaria y dispar. Tomando como base nuestros estudios, en esta revisión se harán una puesta al día de nuestros conocimientos sobre la digestión en peces en el marco del ciclo diario y se describirán los aspectos más destacables de este proceso en las diferentes etapas del ciclo de vida, así como los problemas metodológicos asociados a este tipo de investigación.

Las primeras fases del desarrollo

Las larvas de peces son planctívoras y su alimentación en cultivo se basa en mantener una concentración mínima presas de forma permanente en los tanques de cultivo, lo que favorece la posibilidad de que se estén alimentando continuamente. Una práctica bastante habitual en larvicultura de peces es prolongar las horas de luz estableciendo generalmente fotoperiodos de iluminación permanente durante las primeras semanas después de la eclosión. Con esta práctica y considerando que las larvas de mayoría de las especies cultivadas son predadoras visuales se pretende favorecer la ingestión diaria y así acelerar el

crecimiento. La literatura existente sobre el comportamiento alimentario en larvas plantea ciertas dudas sobre la utilidad de esta práctica, ya que los ritmos de alimentación diarios también se han descrito en poblaciones de larvas mantenidas con iluminación permanente (Fujii, Kurokawa, Kawai, Yoseda, Dan, Kai, *et al.* 2007; Yoseda, Yamamoto, Asami, Chimura, Hashimoto & Kosaka 2008; Mata-Sotres, Martínez-Rodríguez, Pérez-Sánchez, Sánchez-Vázquez y Yúfera 2015). De aquí la necesidad de conocer con detalle los ciclos de digestión en estas primeras etapas.

En las larvas de peces la digestión tiene lugar en un ambiente neutro-alcálico en el intestino medio y distal, ya que el estómago sólo se desarrolla generalmente al final de esta fase. No obstante, también se ha descrito el desarrollo precoz del estómago en algunas especies (Rønnestad, Yúfera, Ueberschär, Ribeiro, Sæle & Boglione 2013). El comienzo de la alimentación es una fase crucial y bien definida en el desarrollo de peces (Yúfera & Darías 2007). Solo cuando todos los órganos relacionados con la captura de presas y con el tránsito digestivo están preparados y son funcionales se inicia la alimentación. Teniendo en cuenta que tanto la luz como el alimento son sincronizadores de los osciladores endógenos, un interesante desafío es saber si el comienzo de la alimentación deja alguna huella en los ciclos de alimentación. La información al respecto es vaga y heterogénea. Como se ha comentado anteriormente, en varias especies se ha observado que los ritmos de alimentación perduran en ausencia de alternancia luz/oscuridad, aunque pierden la sincronía con los teóricos día y noche, incluso pueden desaparecer en el transcurso del desarrollo (Dou, Seikai y Tsukamoto 2000). Igualmente se ha descrito en algunas especies que los ritmos de expresión de los genes reloj en condiciones de iluminación permanente desaparecen con el progreso desarrollo (Davie, Sanchez, Vera, Sánchez-Vázquez y Migaud 2011; Martín-Robles, Whitmore, Pendón & Muñoz-Cueto 2013). No obstante, en dorada (*Sparus aurata* (L.)), las variaciones circadianas del nivel de ingestión y de la expresión de los genes reloj se mantuvieron al menos durante dos meses en condiciones de luz permanente (Mata-Sotres *et al.* 2015). Además, en este estudio se observó que los ciclos detectados en larvas a los pocos días de iniciar la alimentación estaban ya desfasados con respecto a las que se mantuvieron con un ciclo día/noche (Fig. 1). Esto puede deberse a que

el momento de la primera ingestión, usualmente en las primeras horas de la tarde, podría haber determinado la acrofase de los ciclos. Confirmando así, que el alimento también es sincronizador de los ritmos en larvas.

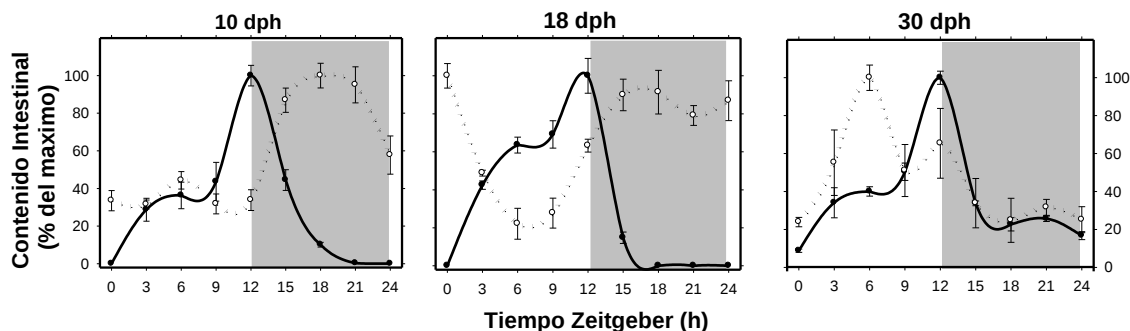


Figura 1. Patrones diarios del contenido del tubo digestivo en larvas de *Sparus aurata* a diferentes días desde la eclosión (dph). Línea continua: con fotoperiodo de 12h Luz/12h Oscuridad. La zona sombreada indica el periodo de oscuridad. Línea punteada: con luz continua. (Modificado de Mata-Sotres *et al.* 2015).

En cualquier caso, el comienzo de la alimentación es gradual, tanto en cantidad de alimento ingerido como en la proporción de larvas que están alimentándose, hasta que se detecta alimento en el 100% de las larvas, periodo que difiere entre especies. Es bien conocido que las larvas de peces están preparadas para digerir desde el primer momento, ya que disponen del ARNm que codifican los enzimas y de zimógenos en el páncreas desde antes de la apertura de la boca (Zambonino-Infante y Cahu 2001; Lazo, Darias & Gisbert 2011). Sin embargo, la información de cómo se inicia la digestión con la primera ingesta de alimento es prácticamente inexistente y se limita a un estudio con larvas de mero, *Epinephelus malabaricus* (Bloch & Schneider), (Fujii *et al.* 2007) y otro con larvas de lenguado, *Solea senegalensis* (Kaup), (Navarro-Guillén, Moyano, y Yúfera, 2015), una especie que presenta una fase de vida y alimentación pelágica durante dos semanas hasta que acaba la metamorfosis. En dichos estudios se observa que la actividad de la tripsina ya presenta un ritmo diario desde el primer día de ingestión. Por el contrario, no se observaron claros ciclos diarios en la actividad de otros enzimas digestivos en *S. senegalensis* (Navarro-Guillén *et al.* 2015).

Una vez comenzada la alimentación y con todas las larvas alimentándose de forma rutinaria y activa se puede observar que bajo condiciones naturales de iluminación la actividad alimentaria muestra marcados ciclos adaptados a la alternancia de luz/oscuridad. Esto se ha observado tanto en el medio natural como en poblaciones en cultivo (Okauchi, Oshiro, Kitamura, Tsujigado y Fukusho 1980; Mackenzie, Ueberschär, Basford, Heath y Gallego 1999; Shoji, Maehara y Tanaka 1999; Dou *et al.* 2000; Østergaard, Munk y Janekarn 2005; Kotani y Fushimi 2011). Así, en especies como *Paralichthys olivaceus* (Temminck & Schlegel), *Melanogrammus aeglefinus* (L.), *Acanthopagrus schlegeli* (Bleeker), *Scomberomorus niphonius* (Cuvier), se han descrito claros ciclos de ingestión con preferencias a alimentarse en los crepúsculos, amanecer y atardecer, si bien el patrón diario de ingestión parece tener un alto componente específico. En algunas especies como *Misgurnus anguillicaudatus* (Cantor), *Cynoglossus semilaevis* (Günther) y *S. senegalensis* se ha descrito un cambio gradual de preferencias diurnas a nocturnas cuando se pasa de la fase pelágica a bentónica después de la metamorfosis (Ma, Liu, Xu, Liang y Zhuang 2006; Wang, Hu, Wang, Cao, Yang, Lü, *et al.* 2008; Navarro-Guillén *et al.* 2015). En experimentos más detallados realizados con larvas de *S. aurata* y *S. senegalensis*, se ha observado que en presencia continua de alimento y con fotoperiodo de luz/oscuridad, las larvas van aumentando el contenido intestinal durante la fase de luz alcanzando el máximo al iniciarse la fase oscura para evacuar el contenido progresivamente durante dicha fase oscura (Mata-Sotres *et al.* 2015; Navarro-Guillén *et al.* 2015). Este incremento no es continuo y suele presentar dos fases ingestivas preferentes, una por la mañana y otra por la tarde, que se acumulan y resultan en un incremento casi en continuo del contenido intestinal durante la fase diurna. En postlarvas de lenguado después del inicio de la fase bentónica tras la migración ocular, la alimentación es prácticamente continua durante todo el ciclo diario completo tanto de día como de noche. Finalmente, los juveniles de esta especie mostrarán una actividad netamente nocturna (Bayarri, Muñoz-Cueto, López-Olmeda, Vera, Rol de Lama, Madrid, *et al.* 2004).

En cualquier caso, los patrones diarios de la función digestiva en larvas de peces están muy poco estudiados. A excepción de los estudios de Ueberschär (1993; 1995) con muestras oceánicas de larvas de *Clupea harengus* (L.), *Sardina pilchardus* (Walbaum) y *Sprattus sprattus* (L.), de Mackenzie *et al.* (1999) con muestras oceánicas de *M. aeglefinus*, y de Fujii *et al.* (2007) en larvas cultivadas de *E. malabaricus* sobre la actividad trípica, solo recientemente se han realizado determinaciones continuas de algunas enzimas pancreáticas en un par de especies mantenidas en el laboratorio, *S. senegalensis* y *S. aurata* (Navarro-Guillén *et al.* 2015; Mata-Sotres, Moyano, Martínez-Rodríguez y Yúfera 2016). En estos estudios cada enzima digestiva muestra un patrón de actividad particular. En el caso de las proteasas, solo la actividad de la tripsina se ha examinado en detalle. En todos los casos se ha encontrado un ritmo claro de la actividad trípica y mostrando una alta correlación con la actividad alimentaria, hasta el punto de que a veces se observan patrones casi paralelos al contenido digestivo (Fig. 2). Esta parece ser una respuesta general ya que se ha descrito en todos los estudios mencionados anteriormente. Esta respuesta no es sorprendente si tenemos en cuenta que la tripsina está considerada como una enzima digestiva crucial en larvas de peces (Ueberschär, 1993) necesaria para movilizar la elevada cantidad de aminoácidos que hacen falta para la generación de nuevos tejidos en organismos con una tasa de crecimiento muy elevada. En especies de agua templadas, el tiempo de residencia del alimento en el intestino larvario está limitado a 1 a 2 horas (Yúfera, Fernández-Días y Pascual 1995; Andrade, Brazão, Nogueira, Ferreira, Dillinger, Dinis, *et al.* 2011; Ortiz-Monis, Mancera y Yúfera 2017), y la hidrólisis proteica se tiene que realizar con rapidez para maximizar la biodisponibilidad de los aminoácidos y su pronta incorporación a los tejidos corporales (Morais, Lacuisse, Conceição, Dinis y Rønnestad 2004).

Por el contrario, los patrones de la actividad diaria de lipasas, y amilasas no muestran claros ritmos diarios. Tanto en *S. aurata* como en *S. senegalensis* las actividades se varían con ciertas oscilaciones durante el periodo diario y solo en ocasiones se observa un descenso al final del periodo oscuridad que se recupera al iniciarse el periodo de luz (Mata-Sotres *et al.* 2015; Navarro-Guillén *et al.* 2015). Hasta donde sabemos no hay estudios en larvas de otras especies sobre la evolución diaria completa de estas enzimas.

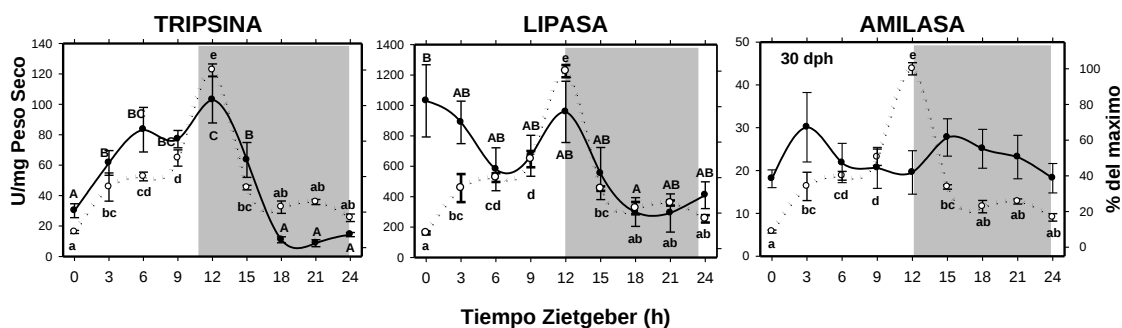


Figura 2. Patrones de actividad diaria de tripsina, lipasa y amilasa pancreáticas en comparación con el contenido del tubo digestivo en larvas de *Sparus aurata* de 30 días desde la eclosión con fotoperiodo de 12h Luz/12h Oscuridad. Línea continua: actividad enzimática. Línea punteada: contenido del tubo digestivo. La zona sombreada indica el periodo de oscuridad. (Modificado de Mata-Sotres *et al.*, 2016).

Las variaciones diarias de la expresión del ARNm de los principales enzimas pancreáticos (*tripsinógeno*, *chymotripsinógeno*, *fosfolipasa A2*, *lipasa activada por sales biliares*, y α -*amilasa*) se han analizado en larvas de *S. aurata* (Mata-Sotres *et al.* 2016). En este estudio se ha observado que los patrones diarios difieren notablemente del de las actividades descritas en el mismo experimento. Esta diferencia es esperable puesto que la expresión molecular está regulada de forma diferente a la actividad bioquímica. También hay que tener en cuenta que las isoformas enzimáticas que contribuyen a la actividad de un determinado enzima no tienen por qué corresponder plenamente con la isoforma del transcrito que ha sido clonado y con el que se ha medido la expresión génica. De forma general, la expresión de estas enzimas suele ser menor en las primeras horas del periodo de oscuridad y más elevada al final del periodo de oscuridad y/o al inicio del periodo de luz. Es decir el ARNm de las enzimas digestivas tiende a sobre expresarse cuando se va a iniciar el siguiente ciclo de alimentación de manera que la maquinaria estaría preparada para sintetizar los enzimas necesarios. Una respuesta anticipatoria que permitiría una mejor utilización de los nutrientes ingeridos.

Desde el punto de vista práctico resulta interesante comparar los resultados entre larvas alimentadas con presas vivas o con microdietas. En un experimento con larvas de *S. aurata*

(Mata, Moyano, Martínez-Rodríguez & Yúfera 2014).) se comprobó los patrones de ingestión eran similares en larvas alimentadas en continuo con rotíferos y con una elevada frecuencia con microdieta, en ambos casos mostrando la respuesta de incremento bi-modal antes mencionada. También los patrones de tripsina eran muy semejantes, pero no el de la actividad de lipasa que alcanzaba valores muy inferiores con esta microdieta experimental. Sin embargo, las expresiones génicas de tripsinógeno y pre-lipasa activada por sales biliares si fueron muy similares. Estos resultados indican que la regulación digestiva por efecto de la dieta ocurre a nivel post-transcripcional y en este caso en particular se pone en evidencia una limitación en la digestión de la fracción lipídica de la microdieta.

Juveniles y adultos

Tras la adquisición de los caracteres definitivos del sistema digestivo, el proceso de hidrólisis de los nutrientes ingeridos presenta unos rasgos bien diferenciados de la fase larvaria. En peces con estómago es la aparición de las glándulas gástricas y funcionalidad de este órgano el que define el final de esta transición a juvenil desde el punto de vista de la alimentación. El engorde de peces se realiza generalmente con iluminación natural o condiciones que simulan la alternancia de día-noche. El suministro del alimento en juveniles y adultos suele ser más puntual con una o varias comidas durante el día. El tránsito digestivo está controlado en parte por el estómago que actúa como contenedor y distribuidor de la ingesta al resto del tubo digestivo. La digestión tiene dos fases claramente diferenciadas y sucesivas, una digestión gástrica en ambiente ácido (excepto en peces agástricos) y posteriormente una digestión intestinal en ambiente neutro-alcalino. Por tanto, las condiciones iónicas en el lumen del tubo digestivo constituyen un factor clave en la activación de los correspondientes enzimas. Existen diversos estudios que caracterizan los intervalos óptimos de pH y temperatura para la actividad de los enzimas digestivos en peces. Hay ciertas variaciones entre especies pero de forma general la pepsina está activa entre 0,5 y 4 con un óptimo cercano a pH 2, mientras que la tripsina lo hace entre pH 7 y 12 (Alarcón, Díaz, Moyano & Abellán 1998; Wang, Wang, Wang, Xue y Sun 2006; Nalinanon, Benjakul, Visessanguan y Kishimira 2008; Chen, Cao, Yoshida, Liu, Weng,

Sun, *et al.* 2009). Así pues, la tripsina puede estar activa en un intervalo más amplio que la pepsina. La cuestión que se plantea es si estos valores de pH se dan en el lumen gastrointestinal de juveniles y adultos, y en tal caso, durante cuánto tiempo. Las mediciones secuenciales de pH gastrointestinal en peces teleósteos se limitan a una decena de especies cubriendo en mayor o menor medida el periodo postprandial.

En vertebrados se han descrito dos estrategias básicas de acidificación gástrica. Por una parte, especies que mantienen una acidificación permanente en el estómago; por otra parte especies que mantienen un ambiente luminal neutro entre comidas, y la acidificación gástrica solo se inicia al entrar el alimento en el estómago recuperándose los valores neutros al vaciarse (Secor 2003; Papastamatiou & Lowe 2005). La mayoría de los peces teleósteos estudiados muestran la segunda estrategia (Deguara, Jauncey y Agiuss 2003; Yúfera, Fernández-Díaz, Vidaurreta, Cara y Moyano 2004; Nikolopoulou, Moutou, Fountoulaki, Venou, Adamidou & Alexis 2011; Yúfera, Moyano, Astola, Pousão-Ferreira y Martínez-Rodríguez, 2012; Márquez, Robles, Morales & Moyano 2012; Rosero 2013; Hlophe, Moyo y Ncube 2014; Solovyev, Kashinskaya, Rusinek y Izvekova 2016; Jacob, Pouil, Lecchini, Oberhänsli, Swarzenski y Metian 2017; Yúfera, Nguyễn y Trần 2017), aunque también se han descrito una acidificación permanente en un par de especies como la trucha arcoíris, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) (Sugiura, Roy y Ferraris 2006; Bucking & Wood 2009), y la cobia, *Rachycentrum canadum* (L.) (Yúfera, Nguyen, Engrola, Conceição, Jordal, Le, *et al.* 2016). En el intestino siempre se ha descrito un ambiente neutro-alcálico, variando entre una ligera acidificación y una ligera alcalinización. Lo relevante de estos patrones iónicos es cómo afectan a la actividad de las enzimas. Considerando que en las especies que acidifican el estómago después de la ingestión la pepsina sólo se activa a valores inferiores a pH 4, la actividad de la pepsina dependerá del patrón postprandial del pH gástrico y de que se realmente se alcancen los niveles mínimos de activación, no que no siempre ocurre (Fig. 3). Por otra parte, en especies que presentan una acidificación permanente puede haber una subida de pH gástrico motivada por el efecto tampón y de dilución de la ingesta pudiendo quedar por encima de los pH óptimos de activación de la pepsina (Bucking & Wood 2009).

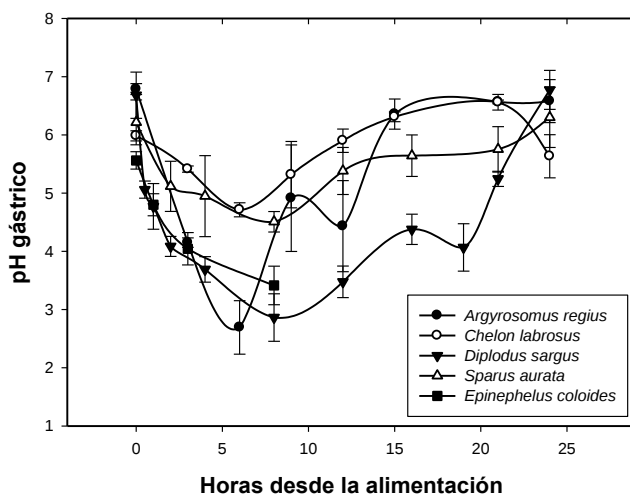


Figura 3. Variación postprandial del pH gástrico (media y error estándar) en varias especies de teleósteos (recopilado de Yúfera *et al.* 2012, 2014, 2017 y Rosero 2013).

La proteólisis ácida se realiza con la participación de la pepsina que se activa desde su precursor (pepsinógeno) cuando el pH es suficientemente bajo, y de la bomba de protones, que es la responsable de verter el CLH que acidificará en lumen del estómago. Un detalle metodológico importante a este respecto es como se analiza la actividad pepsina. La metodología usual se basa en una reacción de hidrólisis tamponada a pH 2 (Anson 1938), por lo que el resultado es indicativo de la cantidad de pepsina teóricamente disponible; es decir pepsina activa + pepsinógeno. Pero como se ha comentado anteriormente, en peces no siempre se dan estos valores tan bajos de pH gástrico (Fig. 3 y 5) por lo que es más apropiado tamponar la reacción al pH luminal medido en la muestra si queremos tener una estimación más realista de la actividad de la pepsina en ese momento del ciclo. La actividad postprandial de proteasas tanto ácida como alcalina en juveniles y adultos se ha estudiado en muy pocas especies. Para comprender el patrón básico de respuesta digestiva postprandial lo más adecuado es observar que ocurre en la situación más sencilla, peces que reciben una sola comida diaria ofrecida siempre a la misma hora. En este caso el estómago se llena rápidamente y tras un lapso de tiempo se evacua lentamente durante varias horas pasando al intestino (Nikolopoulou *et al.* 2011; Yúfera *et al.* 2012; Márquez *et al.* 2012).

Por su parte, el intestino muestra un patrón similar, pero con cierto desplazamiento en el

tiempo. La actividad de la pepsina muestra valores dispares según los estudios. En experimentos con *Diplodus sargus* (L.) y *S. aurata*, cuando se ha utilizado el pH luminal real en la determinación analítica, se observa un aumento de la pepsina tras la ingestión que descende cuando el estómago se está vaciando (Yúfera *et al.* 2012, 2014) (Fig. 4 y 5). Cuando la pepsina se ha analizado tamponando a un pH cercano a 2 se ha encontrado una actividad constante o casi constante en *D. sargus*, *S. aurata* y *Anguilla anguilla* (L.) (Montoya, López-Olmeda, Yúfera, Sánchez-Muros y Sánchez-Vázquez 2010; Yúfera *et al.* 2012; López-Olmeda, López-García, Sánchez-Muros, Blanco-Vives, Aparicio y Sánchez-Vázquez 2012), aunque también se han encontrado picos de actividad no relacionados con el momento de la ingestión (Yúfera *et al.* 2014). Esto indica que el pepsinógeno estaría permanentemente disponible y solo se activaría al descender el pH por la acción de la bomba de protones.

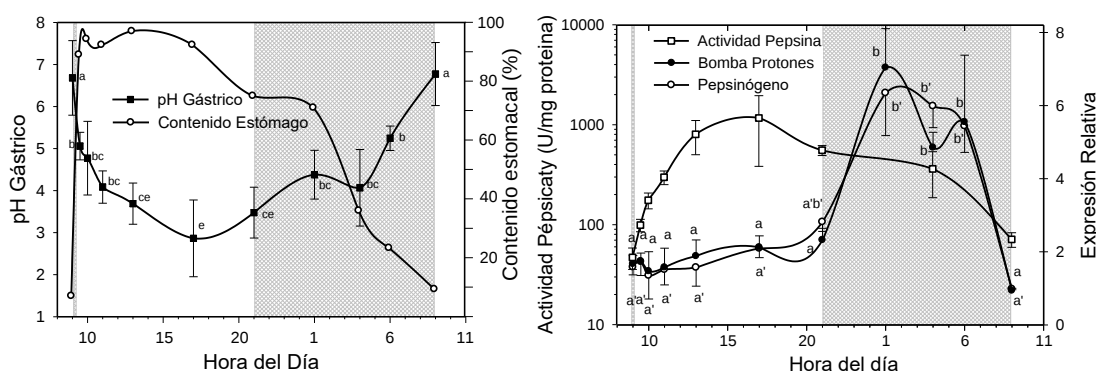


Figura 4. Respuesta digestiva gástrica en juveniles de *Diplodus sargus* frente a una única comida matutina (9:00 h). Izquierda: Llenado y vaciado del estómago y evolución del pH luminal. Derecha: Actividad de la pepsina medida al correspondiente pH gástrico y expresión génica del pepsinógeno y la bomba de protones. La zona sombreada indica el periodo de oscuridad.

Con respecto a proteasas alcalinas (tripsina y chimotripsina) los estudios realizados en *O. mykiss* (Santigosa, Sánchez, Médale, Kaushik, Pérez-Sánchez y Gallardo 2008), *S. aurata* (Montoya *et al.* 2010; Morales, Márquez, Saenz de Rodrigañez, Bermúdez, Robles y Moyano 2014), *S. senegalensis* (Rodiles, Santigosa, Herrera, Hachero-Cruzado, Cordero, Martínez-Llorens *et al.* 2012), *A. anguilla* (López-Olmeda *et al.* 2012), *Silurus*

meridionalis (Zeng, Fu, Li, Li, Li, Cao *et al.* 2014) y *Dicentrarchus labrax* (L.) (Castro, Couto, Pérez-Jiménez, Serra, Díaz-Rosales, Fernandes *et al.* 2016) muestran ciertas discrepancias en el momento en que actividad se incrementa, que puede ser antes o, más habitualmente, algún tiempo después de la ingestión. De hecho, los máximos de actividad se pueden alcanzar bastantes horas después de la ingestión, esto concordaría con el tiempo necesario para el quimo pase al intestino. Otros enzimas como lipasas y amilasas muestran igualmente máximos de actividad varias horas después de la ingestión y no necesariamente coincidentes con los máximos de tripsina (Santigosa *et al.* 2008; Montoya *et al.* 2010; López-Olmeda *et al.* 2012).

Estos patrones se modifican sensiblemente cuando se complica el protocolo de alimentación. En experimentos en los que la hora de alimentación varió aleatoriamente de día a día se ha observado la actividad de la proteasa alcalina y amilasas puede ser constante o presentar cierto aumento postprandial adaptándose a la hora de ingesta (Vera, De Pedro, Gomez-Milán, Delgado, Sánchez-Muros, Madrid, *et al.* 2007; Montoya *et al.* 2010).

Las discrepancias se deben probablemente a aspectos metodológicos relativos a la talla del pez, condiciones previas al experimento, el tipo y cantidad de alimento, y al número de muestras postprandiales que se han tomado. Todo esto dificulta enormemente la comparación de resultados, sobre todo cuando se intenta establecer una respuesta general a un protocolo de alimentación diario estable. De hecho, es difícil discriminar si un incremento de actividad enzimática en las horas previas a la alimentación se debe a una respuesta anticipatoria o por el contrario a una respuesta tardía dependiente del tiempo de tránsito requerido para alcanzar el intestino medio.

De igual manera, la ampliación de la frecuencia de alimentación a dos o más comidas diarias altera los perfiles de acidificación gástrica, y en consecuencia los de la actividad enzimática de la pepsina. En un estudio con juveniles tempranos de *S. aurata* (Yúfera *et al.* 2014) se observó que, en los peces alimentados dos veces al día, la pepsina mostraba un máximo varias horas después de cada suministro de alimento. Sin embargo, cuando el

alimento se suministró en continuo la actividad péptica mostraba un solo máximo diario, al igual que cuando se le suministró una sola vez. Otro aspecto destacable en este estudio es que los valores máximos de actividad de pepsina se incrementaron con la frecuencia de alimentación, alcanzando 5, 14 y 40 U/g de pez respectivamente con 1 comida, 2 comidas y en continuo durante la fase diurna (Fig. 4).

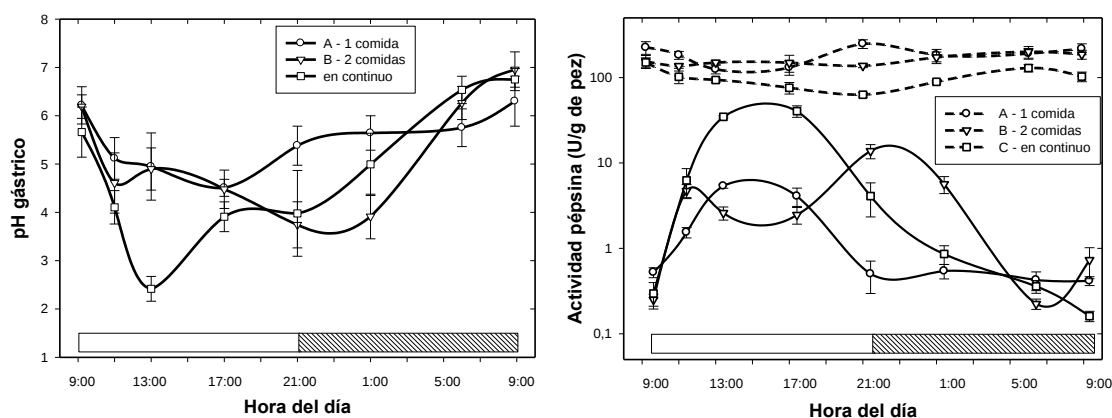


Figura 4. Variación del patrón diario del pH gástrico (izquierda) y actividad péptica (derecha) en juveniles de *Sparus aurata* alimentados con diferentes frecuencias diarias (A: una comida a las 9:00 h; B: dos comidas, a las 9:00 y 16:00 h; C: en continuo durante la fase diurna. En línea continua se muestra la actividad péptica determinada al correspondiente pH luminal. En línea punteada se muestra la actividad determinada a pH 2. (modificado de Yúfera *et al.* 2014).

La información sobre expresión génica de los correspondientes precursores enzimáticos es aún más escasa. En *S. aurata* se ha encontrado una respuesta evidente de incremento paralelo de la expresión los genes implicados en la digestión ácida (pepsinógeno y de la bomba de protones) cuando se ha vaciado el estómago y cesado la actividad de la pepsina (Yúfera *et al.* 2012). En este caso la expresión fue elevada durante todo el periodo nocturno descendiendo justo antes de la siguiente comida, lo que sugiere que se estaría reponiendo el pepsinógeno necesario para el siguiente ciclo digestivo. En juveniles de *S. aurata*, los resultados no fueron tan claros. Sólo se detectó un aumento de expresión durante la transición de la noche al día en peces alimentados una sola vez o en continuo (Yúfera *et al.* 2014). También en juveniles de *O. mykiss* se ha observado un incremento del ARNm del pepsinógeno unas 6 horas después de la alimentación, cuando

aun hay bastante contenido estomacal (Borey, Panserat, Surget, Cluzeaud, Plagnes-Juan, Herman *et al.* 2016). Otro aspecto interesante de este estudio, es que el incremento de la expresión de enzimas intestinales como prolidasa, fosfolipasa y maltasa se detectó a las dos horas de la alimentación, pero con un máximo 12 horas después, cuando el quimo llega al intestino. En este caso, parece ser que tanto la ingestión como el tiempo de tránsito digestivo están modulando la respuesta génica.

Como se puede ver, la información disponible en la fase de engorde es heterogénea y aún insuficiente para establecer patrones generales de respuesta digestiva. Quizás las diferencias fisiológicas inter-específicas pesen mucho en estas diferencias. Lo que sí parece deducirse de todos estos experimentos es que, independientemente de la frecuencia de alimentación, en peces aclimatados a un protocolo de alimentación diario de rutina, el tubo digestivo tiende a estar vacío antes de la primera comida del día siguiente, y la digestión se organiza en periodos de 24 h. Cuando se pasa de una sola a varias comidas diarias las respuestas postprandiales se solapan y finalmente parecen acomodarse en patrones específicos para cada protocolo de alimentación. Seguramente, los cambios temporales de actividad están encaminados a economizar energía y maximizar la eficiencia digestiva bajo las condiciones rutinarias de alimentación específicas a las que se encuentran sometidos los peces.

Consideraciones finales y conclusiones

Es evidente que el conocimiento sobre los ciclos diarios de digestión en peces es aún muy incompleto. Los resultados disponibles proceden de un pequeño número de especies y en diferentes condiciones experimentales. Hay otras fuentes de variación además de las descritas aquí. Existe un cambio de talla manifiesto entre los juveniles después de la metamorfosis y los adultos que han alcanzado la madurez sexual; no hay información de cómo afectaría esto al tránsito y los ciclos digestivos. En algunas especies se ha descrito una dicotomía en el comportamiento alimentario en una misma especie entre diurnos y nocturnos, esto se refleja obviamente en los ciclos de digestión. Además, generalmente solo se ha examinado en unas pocas enzimas digestivas, dando prioridad a las proteasas, y no

hay un estudio profundo de todas las enzimas pancreáticas e intestinales que permitan obtener una visión de conjunto. Aún hay menos información a nivel molecular, por lo tanto, es difícil vislumbrar aspectos clave de regulación de la respuesta anticipatoria.

Por todo esto, ni siquiera en una determinada especie tenemos un barrido mínimamente completo de diferentes posibilidades de alimentación que contribuya a comprender como cambia la función digestiva cuando se modifica el régimen de alimentación. En todo caso, sí se han producido avances que permiten ver ciertas respuestas. Como se ha descrito anteriormente, los perfiles de actividad diaria varían sensiblemente al cambiar los horarios y frecuencia de alimentación. Esta adaptación de la función digestiva a unas condiciones de rutina plantea un interesante dilema; si debemos adaptar los protocolos de alimentación a los ritmos digestivos, o los ritmos se adaptan por si solos a los diferentes protocolos establecidos. Los presentes resultados indican que hay unos límites en esta adaptación, y que la misma cantidad de alimento diario se ingiere y dirige mejor si está repartido en más de una toma al día. El tener la posibilidad de elegir el momento preferente para alimentarse, ya sea por alimentación continua o con alimentadores a demanda, parece rendir los mejores resultados. Pero para asegurar esto aún hacen falta estudios de digestibilidad que acompañen a los diferentes protocolos.

La dificultad logística de muestreos periódicos continuados durante 24 o 48 horas es una de las razones de la escasez de este tipo de estudios. El número de muestras necesarias para la obtención de patrones fiables puede disminuir sensiblemente el número y densidad de peces en los tanques de experimentación. En experimentos de nutrición y engorde el número de peces es un factor crítico y la disminución drástica de la población a mitad del experimento puede afectar sensiblemente al resultado final. Por otra parte, un muestreo persistente puede afectar al estrés de los peces y resultar en valores atípicos y no representativos en los últimos puntos del muestreo.

Lo que está claro es que sólo con muestreos periódicos durante el ciclo diario se puede obtener una idea representativa de la capacidad y respuesta digestiva a un determinado protocolo; una sola muestra diaria proporciona en muchos casos una visión errónea de la

realidad ya que el máximo de actividad se puede alcanzar a diferentes horas según el protocolo de alimentación.

Agradecimientos

Esta revisión incluye principalmente los resultados de los proyectos RIDIGEST (AGL2011-23722) y EFISHDIGEST (AGL2014-52888-R) del Plan Nacional de Investigación (MINECO, España) con contribución de FEDER.

Referencias

- Alarcón, F.J., Díaz, M., Moyano, F.J. y Abellán, E. (1998). Characterization and functional properties of digestive proteases in two sparids; gilthead seabream (*Sparus aurata*) and common dentex (*Dentex dentex*). *Fish Physiology and Biochemistry* 19, 257-267.
- Andrade, C.A.P., Brazão, I.P.G., Nogueira, N., Ferreira, M.P., Dillinger, T., Dinis, M.T. *et al.* (2011). Red porgy (*Pagrus pagrus*) larval feeding performance and behavior at the onset of exogenous feeding. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 407, 377-381.
- Anson, M. (1938). The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with haemoglobin. *Journal of General Physiology* 22, 79-89.
- Bayarri, M.J., Muñoz-Cueto, J.A., López-Olmeda, J.F., Vera, L.M., Rol de Lama, M.A. y Madrid, J.A., *et al.* (2004). Daily locomotor activity and melatonin rhythms in Senegal sole (*Solea senegalensis*). *Physiology & Behavior* 81, 577-583.
- Borey, M., Panserat, S., Surget, A., Cluzeaud, M., Plagnes-Juan, E., Herman, A. *et al.* (2016). Postprandial kinetics of gene expression of proteins involved in the digestive process in rainbow trout (*O. mykiss*) and impact of diet composition. *Fish Physiology and Biochemistry* 42, 1187-1202.
- Boujard, T. y Leatherland, J.F. (1992) Circadian rhythms and feeding time in fishes. *Environmental Biology of Fishes* 35, 109-131.
- Bucking, C. y Wood, C.M. (2009). The effect of postprandial changes in pH along the gastrointestinal tract on the distribution of ions between the solid and fluid phases of chime of rainbow trout. *Aquaculture Nutrition* 15, 282-296.
- Castro, C., Couto, A., Pérez-Jiménez, A. Serra, C.R., Díaz-Rosales, P., Fernandes, R. *et al.* (2016). Effects of fish oil replacement by vegetable oil blend on digestive enzymes and tissue histomorphology of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. *Fish Physiology and Biochemistry* 42(1):203-217.

- Chen, W.Q., Cao, M.J., Yoshida, A., Liu, G.M., Weng, W.Y., Sun, L.C. *et al.* (2009). Study on Pepsinogens and Pepsins from Snakehead (*Channa argus*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57, 10972-10978.
- Cowan, M., Azpeleta, C. y López-Olmeda, J.F. (2017). Rhythms in the endocrine system of fish: a review. *Journal of Comparative Physiology B* (en prensa) DOI 10.1007/s00360-017-1094-5
- Davie, A., Sanchez, J.A., Vera, L.M., Sanchez-Vazquez, J. y Migaud, H. (2011). Ontogeny of the circadian system during embryogenesis in rainbow trout (*Oncorhynchus Mykiss*) and the effect of prolonged exposure to continuous illumination on daily rhythms of *per1*, *clock*, and *aanat2* expression. *Chronobiology International* 28, 177-86.
- Degua, S., Jauncey, K. y Agius, C. (2003). Enzyme activities and pH variations in the digestive tract of gilthead sea bream. *Journal of Fish Biology* 62, 1033-1043.
- Del Pozo, A., Montoya, A., Vera, L.M. y Sánchez-Vázquez, F.J. (2012). Daily rhythms of clock gene expression, glycaemia and digestive physiology in diurnal/nocturnal European seabass. *Physiology & Behavior* 106, 446-50.
- Dou, S., Seikai, T. y Tsukamoto, K. (2000). Feeding behavior of Japanese flounder larvae under laboratory conditions. *Journal of Fish Biology* 56, 654-666.
- Espinosa-Chaurand, D., Vega-Villasante, F., Carrillo-Farnés, O. y Nolasco-Soria, H. (2017). Effect of circadian rhythm, photoperiod, and molt cycle on digestive enzymatic activity of *Macrobrachium tenellum* juveniles. *Aquaculture* 479, 225-232.
- Feliciano, A., Vivas, Y., de Pedro, N., Delgado, M.J., Velarde, E. y Isorna, E. (2011). Feeding time synchronizes clock gene rhythmic expression in brain and liver of goldfish (*Carassius auratus*). *Journal of Biological Rhythms* 26, 24-33.
- Fujii, A., Kurokawa, Y., Kawai, S., Yoseda, K., Dan, S., Kai, A. *et al.* (2007). Diurnal variation of tryptic activity in larval stage and development of proteolytic enzyme activities of malabar grouper (*Epinephelus malabaricus*) after hatching. *Aquaculture* 270, 68-76.
- Hlophe, S.N., Moyo, N.A.G. y Ncube, I. (2014). Postprandial changes in pH and enzyme activity from the stomach and intestines of *Tilapia rendalli* (Boulenger, 1897), *Oreochromis mossambicus* (Peters, 1852) and *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). *Journal of Applied Ichthyology* 30, 35-41.
- Jacob, S., Pouil, S., Lecchini, D., Oberhänsli, F., Swarzenski, P. y Metian, M. (2017). Trophic transfer of essential elements in the clownfish *Amphiprion ocellaris* in the context of ocean acidification. *PLoS ONE* 12(4), e0174344.
- Jonhston, J.D. (2014). Physiological responses to food intake throughout the day. *Nutrition Research Reviews* 27, 107-118.
- Kotani, T.Y. y Fushimi, H. (2011). Determination of appropriate feeding schedules from diel feeding rhythms in finfish larviculture. *Aquaculture* 315, 104-113.

- Lazo, J.P., Darias, M.J. y Gisbert, E. (2011). Ontogeny of the digestive tract. In: *Larval fish nutrition* (ed. by G.J. Holt). Wiley, West Sussex, pp 1-47.
- López-Olmeda, J.F., López-García, I., Sánchez-Muros, M.J., Blanco-Vives, B., Aparicio, R. y Sánchez-Vázquez, F.J. (2012). Daily rhythms of digestive physiology, metabolism and behaviour in the European eel (*Anguilla anguilla*). *Aquaculture International* 20, 1085–1096.
- López-Olmeda, J.F. (2017). Nonphotic entrainment in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* 203, 133-143.
- Ma, A.J., Liu, X.Z., Xu, Y.J., Liang, Y. y Zhuang, Z.M. (2006). Feeding rhythm and growth in the tongue sole, *Cynoglossus semilaevis* Günther, during its early life stages. *Aquaculture Research* 37, 586-593.
- Mackenzie, B.R., Ueberschär, B., Basford, B., Heath, M. y Gallego, A. (1999). Diel variability of feeding activity in haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) larvae in the East Shetland area, North Sea. *Marine Biology* 138, 361-368.
- Madrid, J.A., Boujard, T. y Sánchez-Vázquez, F.J. (2001) Feeding rhythms. In: *Food Intake in Fish*. (ed. by D. Houlihan, T. Boujard and M. Jobling) Blackwell Science, London, pp. 189-215.
- Márquez, L., Robles, R., Morales, G. y Moyano, F.J. (2012). Gut pH as a limiting factor for digestive proteolysis in cultured juveniles of the gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Fish Physiology and Biochemistry* 38, 859-869.
- Martín-Robles, A.J., Whitmore, D., Pendón, C. y Muñoz-Cueto, J.A. (2013). Differential effects of transient constant light-dark conditions on daily rhythms of Period and Clock transcripts during Senegalese sole metamorphosis. *Chronobiology International* 30, 699-710.
- Mata, J.A., Moyano, F.J., Martínez-Rodríguez, G. y Yúfera, M. (2014). Effect of feeding frequency on digestive function of gilthead seabream (*Sparus aurata*) larvae fed microdiets. *Aquaculture Europe* 2014, San Sebastián, España, 14-17 October 2014.
- Mata-Sotres, J.A., Martínez-Rodríguez, G., Pérez-Sánchez, J. y Sánchez-Vázquez, F.J., Yúfera, M. (2015). Daily rhythms of clock gene expression and feeding behaviour during the development in gilthead seabream, *Sparus aurata*. *Chronobiology International* 32, 1061-1074.
- Mata-Sotres, J.A., Moyano, F.J., Martínez-Rodríguez, G. y Yúfera, M. (2016). Daily rhythms of digestive enzyme activity and gene expression in gilthead seabream (*Sparus aurata*) during ontogeny. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, 197, 3-51.
- Molina, C., Cadena, E. y Orellana, F. (2000). Alimentación de camarones en relación a la actividad enzimática como una respuesta natural al ritmo circadiano y ciclo de muda. In: *Avances en Nutrición Acuicola V*. (ed. por L.E. Cruz-Suárez, D. Ricque-Marie, M. Tapia-Salazar, M.A. Olvera-Novoa, R.

- Civera-Cerecedo), Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 19–22 Nov. Merida, Yucatán, México, pp. 358-379.
- Montoya, A., López-Olmeda, J.F., Yúfera, M., Sánchez-Muros, M.J. y Sánchez-Vázquez, F.J. (2010). Feeding time synchronizes daily rhythms of behavior and digestive physiology in gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 306, 315-21.
- Morais, S., Lacuisse, M., Conceição, L.E.C., Dinis, M.T. y Rønnestad I. (2004) Ontogeny of the digestive capacity of Senegalese sole (*Solea senegalensis*), with respect to digestion, absorption and metabolism of amino acids from *Artemia*. *Marine Biology* 145, 243-250
- Morales, G.A., Márquez, L., Saenz de Rodrigañez, M.A., Bermúdez, L., Robles, R. y Moyano, F.J. (2014). Effect of phytase supplementation of a plant-based diet on phosphorus and nitrogen bioavailability in sea bream *Sparus aurata*. *Aquaculture Nutrition* 20, 172-182.
- Nalinanon, S., Benjakul, S., Visessanguan, W. y Kishimira, H. (2008). Tuna pepsin: characteristics and its use for collagen extraction from the skin of threadfin bream (*Nemipterus spp.*). *Journal of Food Science* 73 (5), C413-C419.
- Navarro-Guillén, C., Moyano, F.J. y Yúfera, M. (2015). Diel food intake and digestive enzyme production patterns in *Solea senegalensis* larvae. *Aquaculture* 435, 33-42.
- Nikolopoulou, D., Moutou, K.A., Fountoulaki, E., Venou, B., Adamidou, S. y Alexis, M.N. (2011). Patterns of gastric evacuation, digesta characteristics and pH changes along the gastrointestinal tract of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) and European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Comparative Biochemistry and Physiology A* 158, 406-414.
- Nolasco-Soria, H. y Vega-Villasante, F. (2000). Actividad enzimática digestiva, ritmos circadianos y su relación con la alimentación del camarón. In: *Avances en Nutrición Acuícola IV* (ed. Por R. Civera-Cevedo, C.J. Pérez-Estrada, D. Ricque-Marie, L.E. Cruz-Suárez). Memorias del IV Simposio Internacional de Nutrición Acuícola. Nov 15-18, La Paz, B.C.S., México, pp. 149-165.
- Okauchi, M., Oshiro, T., Kitamura, S., Tsujigado, A. y Fukusho, K. (1980). Number of rotifer, *Brachionus plicatilis*, consumed daily by a larva and juvenile of porgy, *Acanthopagrus schlegelii*. *Bulletin of National Research Institute of Aquaculture* 1, 39-45.
- Ortiz-Monís, M.A., Mancera, J.M. y Yúfera M. (2017). Determining gut transit rates in gilthead seabream larvae fed microdiets. Larvi 2017, 7th fish & shellfish larviculture symposium, Ghent, Belgium, 4-7 September 2017.
- Østergaard, P., Munk, P. y Janekarn, V. (2005). Contrasting feeding patterns among species of fish larvae from the tropical Andaman Sea. *Marine Biology* 146, 595-606.
- Papastamatiou, Y.P. y Lowe, C.G. (2005). Variations in gastric acid secretion during fasting between two species of shark. *Comparative Biochemistry and Physiology A* 141, 210–214

- Pittendrigh, C.S. (1993) Temporal organization: reflections of a Darwinian clock-watcher. *Annual Reviews of Physiology* 55, 16-54.
- Reeb, S.G. (2002) Plasticity of diel and circadian activity rhythms in fishes. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 12, 349-371.
- Rodiles, A., Santigosa, E., Herrera, M., Hachero-Cruzado, I., Cordero, M.L., Martínez-Llorens, S. *et al.* (2012). Effect of dietary protein level and source on digestive proteolytic enzyme activity in juvenile Senegalese sole, *Solea senegalensis* Kaup 1850. *Aquaculture International* 20, 1053-1070.
- Rønnestad, I., Yúfera, M., Ueberschär, B., Ribeiro, L., Sæle, Ø. y Boglione, C. (2013) Feeding behaviour and digestive physiology in larval fish: current knowledge, and gaps and bottlenecks in research. *Reviews in Aquaculture* 5, S59-S98.
- Rosero, A.P. (2013). Comparación de la fisiología digestiva entre un pez carnívoro (Corvina, *Argyrosomus regius*) y un pez omnívoro (Liseta, *Chelon labrosus*), e influencia de la inclusión de un acidificante en el pienso sobre el proceso digestivo. Tesis de Master, Universidad de Cádiz, 52 p.
- Santigosa, E., Sánchez, J., Médale, F., Kaushik, S., Pérez-Sánchez, J. y Gallardo, M.A. (2008). Modifications of digestive enzymes in trout (*Oncorhynchus mykiss*) and sea bream (*Sparus aurata*) in response to dietary fish meal replacement by plant protein sources. *Aquaculture* 282, 68-74.
- Secor, S. (2003). Gastric function and its contribution to the postprandial metabolic responses in the Burmese python, *Python molurus*. *Journal of Experimental Biology* 206, 1621-1630.
- Shoji, J., Maehara, T. y Tanaka, M. (1999.) Diel vertical movement and feeding rhythm of Japanese mackerel larvae in the central Seto inland sea. *Fisheries Science* 65, 726-730.
- Solovyev, M.M., Kashinskaya, E.N., Rusinek, O.T. y Izvekova, G.I. (2016). Physiological pH values in the digestive tract of perch *Perca fluviatilis* from different habitats. *Journal of Ichthyology* 56(2), 312-318.
- Spieler, R.E. (1992) Feeding-entrained circadian rhythms in fishes. In: *Rhythms in Fishes* (ed. by M.A. Ali,), Plenum, New York, pp. 137-147.
- Sugiura, S.H., Roy P.K. y Ferraris, R.P. (2006). Dietary acidification enhances phosphorus digestibility but decreases H⁺/K⁺-ATPase expression in rainbow trout. *Journal of Experimental Biology* 209, 3719-3728.
- Ueberschär, B. (1993). Measurement of proteolytic enzyme activity: significance and application in larval fish research. In: *Physiological and Biochemical Aspects of Fish Development*. (ed. by B.T. Walther, and H.J. Fyhn), University of Bergen, Norway, pp. 233-239.
- Ueberschär, B. (1995). The use of tryptic enzyme activity measurement as a nutritional condition index: laboratory calibration data and field application. *ICES Marine Science Symposiums* 201, 119-129.
- Vatine, G., Vallone, Y., Gothilf, Y. y Foulkes, N.S. (2011). It's time to swim! Zebrafish and the circadian clock. *FEBS Letters* 585, 1485-1494.

- Vera, L.M., De Pedro, N., Gomez-Milán, E., Delgado, M.J., Sánchez-Muros, M.J., Madrid, J.A. *et al.* 2007 Feeding entrainment of locomotor activity rhythms, digestive enzymes and neuroendocrine factors in goldfish. *Physiology & Behavior* 90, 518-24.
- Wang, H.Y., Wang, Y.J., Wang, Q.Y., Xue, C.H. y Sun, M. (2006). Purification and characterization of stomach protease from the turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Fish Physiology and Biochemistry* 32, 179-188.
- Wang Y, Hu M, Wang W, Cao L, Yang Y, Lü B. *et al.* (2008). Transpositional feeding rhythm of loach *Misgurnus anguillicaudatus* from larvae to juveniles and its ontogeny under artificial rearing conditions. *Aquaculture International* 16, 539-549
- Whitmore, D., Foulkes, N.S. y Sassone-Corsi, P. (2000). Light acts directly on organs and cells in culture to set the vertebrate circadian clock. *Nature* 404, 87-91.
- Yoseda, K., Yamamoto, K., Asami, K., Chimura, M., Hashimoto, K. y Kosaka S. (2008). Influence of light intensity on feeding, growth and early survival of leopard coral grouper (*Plectropomus leopardus*) larvae under mass-scale rearing conditions. *Aquaculture* 279, 55-62.
- Yúfera M., Fernández-Díaz, C. y Pascual, E. (1995). Feeding rates of gilthead seabream, *Sparus aurata*, larvae on microcapsules. *Aquaculture* 34, 257-268.
- Yúfera, M., Fernández-Díaz, C., Vidaurreta, A., Cara, J.B. y Moyano, F.J. (2004). Gastrointestinal pH and development of the acid digestion in larvae and early juveniles of *Sparus aurata* L. (Pisces: Teleostei). *Marine Biology* 144, 863-9.
- Yúfera, M., Moyano, F.J., Astola, A., Pousão-Ferreira, P. y Martínez-Rodríguez, G. (2012). Acidic digestion in a teleost: Postprandial and circadian pattern of gastric pH, pepsin activity, and pepsinogen and proton pump mRNAs expression. *PLoS ONE* 7(3) e33687.
- Yúfera, M., Romero, M.J., Pujante, I.M., Astola, A., Mancera, J.M., Sánchez-Vázquez, F.J. *et al.* (2014). Effect of feeding frequency on the daily rhythms of acidic digestion in a teleost fish (gilthead seabream). *Chronobiology International* 31, 1024-1033.
- Yúfera, M., Nguyen, M.V., Engrola, S., Conceição, L., Jordal, A-EO., Le, M.H. *et al.* (2016). Cobia exhibits a permanent gastric acidity as digestion strategy. Aquaculture Europe 2016, Edinburgh, Scotland, UK, 20-23 September 2016.
- Yúfera, M., Nguyễn, M.V. y Trần, H.V. (2017). Preliminary outcomes on the gastrointestinal luminal ionic conditions in orange-spotted grouper juveniles. Aquaculture Europe 2017, Dubrovnik, Croacia, 17-20 October 2017.
- Zambonino-Infante, J.L. y Cahu, C.L. (2001). Ontogeny of the gastrointestinal tract of marine fish larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 130 (4), 477-487.
- Zeng, L.Q., Fu, S.J., Li, X.M., Li, F.J., Li, B., Cao, Z.D. *et al.* (2014). Physiological and morphological responses to the first bout of refeeding in southern catfish (*Silurus meridionalis*). *Journal of Comparative Physiology B* 184, 329-346.