

Avances en el Estudio de la Nutrición Larvaria, Expresión y Actividad de Enzimas Digestivas en Totoaba (*Totoaba macdonaldi*, Gilbert 1890) una Especie con Potencial de maricultivo en Baja California

Mario. A. Galaviz^{a*}, Lus. M. López^a, Alejandra García Gasca^b, Enric Gisbert^c,
Alfonso Álvarez^d Gerardo Sandoval^a y Conal .D. True^a.

^a Universidad Autónoma de Baja California (UABC), Facultad de Ciencias Marinas. PO Box 76, Ensenada B.C. 22860, México. E-mail: mgalaviz@uabc.edu.mx

^b Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, Unidad Mazatlán, Avenida Sábalo Cerritos s/n, Mazatlán, Sinaloa 82010, México

^c Institut de Recercai Tecnologia Agroalimentàries. IRTA Sant Carles de la Ràpita, Tarragona, Spain

^d Laboratorio de Acuicultura Tropical DACBIOL-UJAT, Carr. Vhsa-Cárdenas Km 0.5, Bosques de Saloya, Villahermosa, Tabasco, México.

Resumen

El conocimiento de la fisiología digestiva en larvas de peces marinos es esencial para establecer protocolos de alimentación apropiados para cada etapa de cultivo, y así mismo para desarrollar dietas formuladas de acuerdo a la capacidad digestiva de las larvas en desarrollo. En el presente estudio, el sistema digestivo de totoaba fue caracterizado durante su ontogenia utilizando técnicas bioquímicas y moleculares con el fin de entender la capacidad digestiva de esta especie. La expresión y actividad de tripsina y quimiotripsina fueron observadas en el día pos-eclosión, dpe 1, con incrementos al inicio de la primera alimentación exógena y durante el desarrollo del tracto digestivo. Un incremento significativo en la expresión de pepsina fue detectado en el dpe 16, mientras que el incremento en el nivel de actividad fue detectado al dpe 24, lo cual coincidió con el desarrollo del estómago. Un segundo incremento en el nivel de expresión de pepsina fue detectado en el dpe 35, seguido por un pico de actividad en el dpe 40, coincidiendo con el cambio de alimento vivo a dieta formulada.

Palabras clave: *enzimas, totaba, larvas.*

1. Introducción

En la acuicultura de peces marinos, uno de los puntos más importantes es la alimentación, especialmente en la etapa larvaria, ya que los cambios anatómicos y fisiológicos durante su desarrollo son los factores que definen sus requerimientos nutricionales. En el medio natural, una vez que el saco vitelino es absorbido, los peces toman su alimento del plancton (alimento vivo) como dieta inicial. El mayor constituyente nutricional del alimento vivo es la proteína, la capacidad proteolítica para la digestión del bolo alimenticio puede ser considerada como la más importante en los estudios nutricionales con larvas de peces (García-Ortega, 2000).

Los esfuerzos de investigación se han dirigido a determinar las condiciones que incrementen la supervivencia y crecimiento de las larvas; estos esfuerzos incluyen estudios de fisiología digestiva con el objeto de planificar mejor las estrategias de alimentación y estos estudios son de suma importancia, ya que de ello depende el éxito del cultivo. Se ha probado que el nivel de actividad de algunas enzimas digestivas puede ser un buen indicador del estado nutricional, la presencia de ciertas enzimas es relevante para establecer el momento óptimo para el destete (Uebershar, 1993) o bien para evaluar el estado general del cultivo.

Una de las razones por las cuales la supervivencia de las larvas de peces marinos en cultivo es muy baja, se debe al desconocimiento de su capacidad digestiva, ya que en muchos de los casos, no se toman en cuenta las transformaciones morfológicas internas más importantes, como la formación y acomodamiento progresivo de los principales órganos y el incremento en su funcionalidad, las cuales normalmente ocurren durante el primer mes de desarrollo (Alarcon, 1997 y Kurokawa *et al.*, 1998). La gran mayoría de los peces marinos al momento de la eclosión carecen de un estómago funcional y su tracto gastrointestinal se desarrolla de forma progresiva (Zambonino-Infante y Cahu, 2001).

Diversos autores han realizado estudios en varias especies de peces marinos demostrando que el estómago, el páncreas y el intestino no se encuentran completamente desarrollados y

maduros al momento de la eclosión y que estos órganos presentan algunos cambios morfológicos y funcionales durante el desarrollo larval que difieren dependiendo de la edad y el estado nutricional. Así mismo, estos estudios han establecido las bases para describir y determinar la capacidad digestiva de las distintas especies (Douglas *et al.*, 1999; Zambonino-Infante y Cahu, 1994, 2001; Gisbert *et al.*, 2004, 2008; Murray *et al.*, 2004, 2006; Chen *et al.*, 2006; García-Gasca *et al.*, 2006; Álvarez-González *et al.*, 2006, 2008, 2010). Las enzimas digestivas son secretadas en diversos órganos, incluyendo: el estómago, el páncreas, la vesícula biliar y las paredes del intestino. Sin embargo también se ha demostrado que un porcentaje bajo de las enzimas (1 %) pueden provenir de las presas vivas o de las bacterias que conforman la flora intestinal (Lauff y Hoffer, 1984; Kurokawa *et al.*, 1998). Particular atención la ha recibido el tejido pancreático ya que sintetiza y secreta en el lumen del intestino una cantidad de enzimas (proteasas, lipasas y carbohidrasas pancreáticas) en forma de precursores inactivos (zimógenos). Entre las proteasas más importantes se pueden mencionar a la tripsina, la quimiotripsina y la elastasa. Así mismo, entre las lipasas se destacan la lipasa neutra dependiente de sales biliares y las fosfolipasas. Por su parte, entre las carbohidrasas más primordiales se encuentran las amilasas y las maltasas (Kolkovski y Sakakura, 2007).

El hígado es uno de los primeros órganos en desarrollarse y está involucrado en la absorción del saco vitelino. El páncreas y la vesícula biliar, están relacionados con la digestión de proteínas, lípidos y carbohidratos, mismos que fueron observados poco tiempo después, sin embargo son completamente funcionales al momento de la primera alimentación exógena (Lauff y Hoffer, 1984; Kurokawa *et al.*, 1998). Cuando el estómago está completamente desarrollado y funcional, la digestión de proteínas de las larvas de peces inicia en un medio ácido (HCl) el cual activa a la enzima pepsina que es la enzima principal en el estómago. En contraste con aquellas larvas de peces marinos que no secretan ácido clorhídrico y por lo tanto ni pepsinógeno para digerir las proteínas, la digestión se realiza esencialmente con las enzimas pancreáticas e intestinales activas en un medio alcalino (Tanaka 1973; Tanaka *et al.*, 1976, Rønnestad, *et al.*, 2003). Por otro lado, en el intestino la digestión se lleva a cabo a través de procesos tanto intracelulares como extracelulares (Smith, 1989). Las enzimas extracelulares que participan en estos procesos

pueden estar localizadas en el lumen intestinal, por ejemplo, enzimas secretadas por el páncreas como la tripsina y la quimotripsina, así mismo algunas están adheridas a la membrana del epitelio intestinal (borde en cepillo) como lo son la aminopeptidasa y la fosfatasa alcalina. En el caso de las intracelulares el único grupo descrito corresponde a las catepsinas. Watanabe (1984) observó la absorción de proteínas (peroxidasa del rábano) por medio de pinocitosis y su posterior digestión intraenterocítica por medio de lisosomas, lo cual resultó que la digestión intracelular se realiza principalmente en la región posterior del intestino. Este mecanismo de digestión es más importante en larvas que en peces juveniles o adultos, y se cree que la digestión intracelular compensa la baja digestión extracelular exhibida durante la etapa larvaria (Watanabe, 1984; Cahu *et al.*, 1995).

En los últimos años en México se ha incrementado considerablemente el interés del cultivo de peces marinos de importancia comercial y con ello el estudio de su nutrición. Especies como totoaba (*Totoaba macdonaldi*), corvina blanca (*Atractoscion nobilis*), lenguado (*Paralichthys californicus*), jurel aleta amarilla (*Seriola dorsalis*), cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*), botete diana (*Sphoeroides annulatus*), pargo lunarejo (*Lutjanus guttatus*) están siendo estudiadas con diferentes grados de avances (Civera-Cerecedo *et al.*, 2002; Duncan *et al.*, 2003; Gisbert *et al.*, 2004; García-Ortega *et al.*, 2009; López *et al.*, 2009; Galaviz *et al.*, 2011). El grado de avance difiere entre especies, sin embargo, en la actualidad los cultivos comerciales de peces marinos en México se limitan principalmente a la engorda en jaulas de organismos capturados en medio natural debido a la incapacidad de lograr su cultivo larvario (García-Ortega, 2002; y Avilés-Quevedo, 2005). Los problemas en la larvicultura de peces marinos principalmente están relacionados con los aspectos de nutrición y alimentación.

Recientemente se han realizado estudios en especies con potencial de cultivo en México sobre desarrollo del sistema digestivo, actividad enzimática, requerimientos de proteínas, lípidos y carbohidratos, en especies como *A. nobilis* (Valverde, 2002; López *et al.*, 2006, 2009; Durazo *et al.*, 2010), *P. californicus* (Gisbert *et al.*, 2004; Álvarez-González *et al.*, 2006; Zacarias-Zoto *et al.*, 2006), *S. annulatus* (García-Ortega *et al.*, 2002; García-Gasca *et al.*, 2006; García-Ortega, 2009), *L. guttatus* (García-Ortega *et al.*, 2009; Abdo de la Parra *et al.*, 2006; García-Ortega, 2009).

al., 2010) y *P. maculatofasciatus* (Peña *et al.*, 2003; Álvarez-González *et al.*, 2008, y 2010). Se ha logrado un gran avance en estudios sobre fisiología digestiva en etapas larvarias y ampliado el conocimiento sobre los requerimientos nutricionales en etapas de engorda (juveniles y adultos). A pesar de ello, se han presentado diversas dificultades relacionadas con el desconocimiento exacto de las condiciones ambientales óptimas para el cultivo, falta de información acerca de los hábitos alimenticios y requerimientos nutricionales. Los cambios ontogenéticos y del crecimiento larval son información vital para poder llevar a cabo con éxito dicha actividad y mantener un estado nutricional óptimo hasta la etapa de juvenil y/o adulto. En México existen especies de peces marinos con oportunidad de ser explotadas para su cultivo con fines de repoblamiento y comercial, entre la que destaca *Totoaba macdonaldi*.

La totoaba se encontraba clasificada en el género *Cynoscion*, género en el que la totoaba fuera la especie que alcanzaba la mayor talla dentro de su familia (Sciaenidae) con tallas cercanas a los dos metros de longitud (Berdegú, 1955) y pesos superiores a los 135 kg (Cannon, 1966). Actualmente se encuentra clasificada como *Totoaba macdonaldi*, en un género y especie única para esta familia y es un pez endémico del Golfo de California (Cisneros-Mata *et al.*, 1997). A partir de 1975 ha sido incluida en la lista de especies en peligro de extinción (CITES, 2005). A principios de 1900 se exportaba su vejiga gaseosa a oriente para ser utilizado como principal ingrediente en una sopa gourmet (Berdegú 1955). En 1942 la captura de esta especie alcanzó un máximo de 2,261 toneladas. Sin importar el incremento en el esfuerzo pesquero, la producción anual fluctuó hasta llegar a capturar sólo 58 toneladas en 1975 (Flanagan y Hendrickson, 1976).

Aunque se han postulado diversas causas probables que afectan a las poblaciones de este importante recurso, la información que existe sobre la totoaba sigue siendo muy limitada. Se han llevado a cabo estudios sobre su desarrollo embrionario (Morales-Ortiz, 1999), desarrollo larval (Sandoval-Garibaldi, 2001) y requerimientos nutricionales. En éstos se ha investigado el efecto de diferentes niveles de ácidos grasos, dietas isoprotéicas, niveles de alimentación, etc. (López *et al.*, 2006; Solórzano-Salazar, 2006 y Vizcaíno-Pérez, 2008), sin embargo, se desconoce la capacidad digestiva de las larvas en cautiverio y actualmente

aún se encuentra en desarrollo el protocolo óptimo de alimentación para el desarrollo larval de esta especie.

Actualmente la Unidad de Biotecnología en Piscicultura de la Facultad de Ciencias Marinas de la Universidad Autónoma de Baja California, lleva a cabo el desarrollo de la biotecnía de cultivo de esta especie, enfocado a lograr el inicio de un programa de repoblamiento a partir reproductores mantenidos en cautiverio (True *et al.*, 1997, 2001). Sin embargo, la maduración y reproducción logradas han sido generalmente limitadas (calidad de huevo), lo que podría atribuirse al desconocimiento de sus requerimientos nutricionales (López *et al.*, 2006). Aún que ya se ha logrado su cultivo existen limitantes para escalarlo a nivel comercial y una de ellas se centra en la obtención de información detallada sobre la nutrición y fisiología digestiva durante la ontogenia temprana de esta especie. Por lo anterior es indispensable conocer el desarrollo del sistema digestivo y sus capacidades enzimáticas. Por lo que la presente investigación tiene como objetivo, el generar información sobre la expresión y actividad de tripsina, quimiotripsina y pepsina durante el desarrollo del sistema digestivo en larvas y juveniles de totoaba, alimentadas con alimento vivo y durante el periodo de destete.

2. Metodología

1.1. Protocolo de cultivo larvario de totoaba (*T. macdonaldi*)

2.1.1 Obtención de huevos y cultivo larvario

Huevos y larvas de totoaba fueron obtenidos de reproductores mantenidos en cautiverio en la Unidad de Biotecnología en Piscicultura (UBP) de la Facultad de Ciencias Marinas, Universidad Autónoma de Baja California campus Ensenada de acuerdo a los procedimientos establecidos en dicha unidad (True, 2012).

2.1.2. Alimentación

La alimentación de las larvas se proporcionó de acuerdo al protocolo de UBP, el cual inició a partir del dpe 4. El primer alimento vivo que se le proporcionó a las larvas fueron rotíferos vivos a razón de 5 rotíferos mL⁻¹ durante los primeros tres días después de

haber iniciado la primera alimentación exógena. A partir del dpe 8 las larvas se alimentaron tres veces al día hasta el dpe 16, a partir de este día se empezaron a introducir nauplios de *Artemia* a razón de 0.5 mL^{-1} , así la densidad de rotíferos empezó a disminuir hasta que el dpe 18, para posteriormente ser alimentado solo con nauplios de *Artemia*. Los nauplios de *Artemia* fueron en aumento de acuerdo a la edad de la larva llegando a proporcionar cinco nauplios mL^{-1} para el dpe 24 y mantenerse hasta el inicio del cambio de alimento vivo a alimento inerte (destete) (Otohime Japanese Marine Weaning, Red Mariculture; proteína 52.11%, lípidos 16.3% y cenizas 11.2%, tamaño de partículas desde 200 hasta $1410 \mu\text{m}$) que se realizó el dpe 28 en adelante. La cantidad de nauplios de *Artemia* disminuyeron conforme aumentaba el cambio de alimento y fueron sustituidos del tanque de cultivo el dpe 34, mientras que la cantidad (g) de microdieta fue en aumento para completar el destete el dpe 34 (Figura 1).

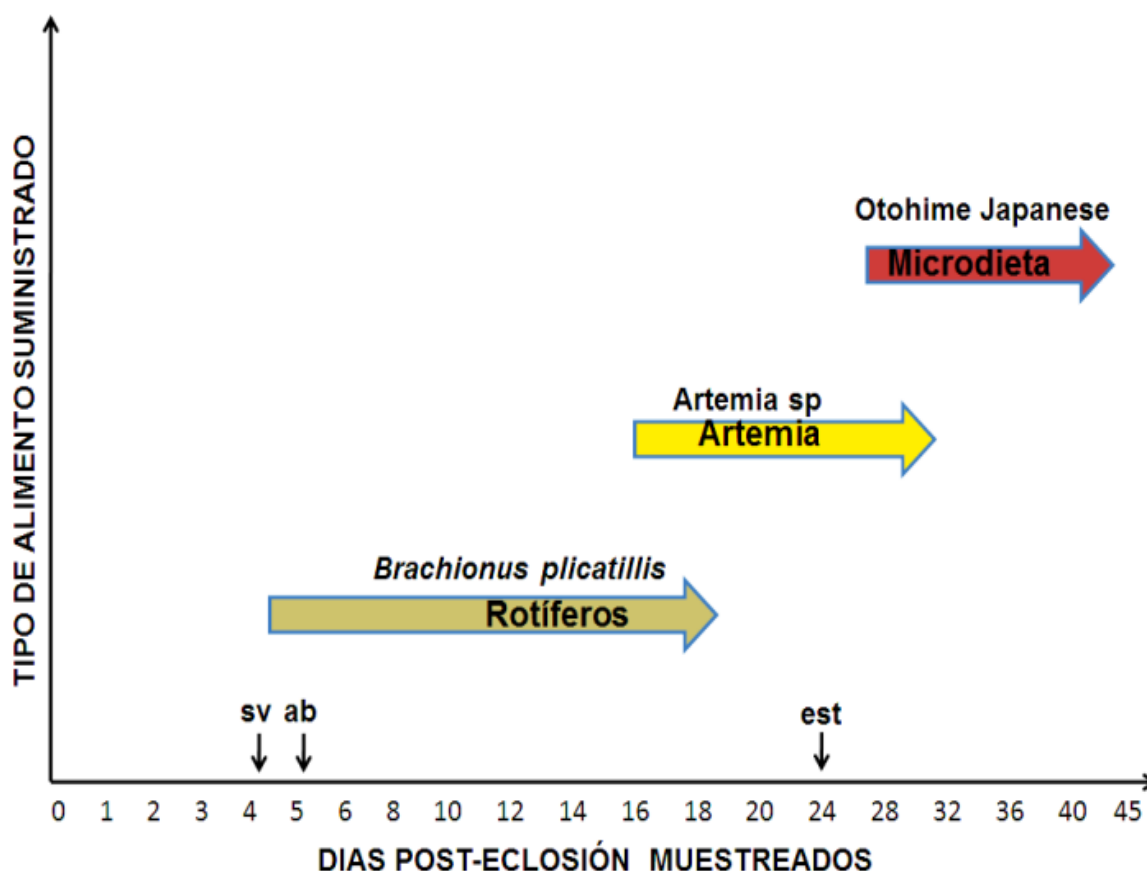


Figura 1. Protocolo de alimentación y toma de muestras durante el larvicultivo de totoaba (*T. macdonaldi*). (ab), abertura de la boca, (est), estómago, (sv), absorción del saco vitelino.

2.2.0. Colecta de muestras para análisis bioquímico y molecular

Dependiendo de su talla, larvas de totoaba ($n=30-100$) fueron muestreadas de manera aleatoria directamente de los tanques de cultivo experimental, se utilizó una malla de $300\mu\text{m}$. Las muestras fueron colectadas una hora después de la primera alimentación (8.00 a.m.) esto con el fin de descartar posibles efectos de enzimas provenientes de la dieta. Las muestras de larvas fueron colectadas cada día desde el dpe 0 hasta el dpe 6, luego las muestras fueron colectadas cada dos días hasta el dpe 20 y cada cuatro días hasta el final del estudio (dpe 40). Después de haber muestreado las larvas, éstas fueron anestesiadas con tricaina metansulfonato (MS 222), lavadas con agua destilada para remover el exceso de sales y congeladas a -70°C hasta análisis.

Muestras adicionales ($n=10-30$) fueron tomadas cada día para registrar datos de talla en longitud total y peso húmedo desde el dpe 0 hasta el dpe 4 y 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 24, 28, 32, 36 y 40 dpe. La longitud total promedio (mm) fue obtenida mediante la medición de una muestra de larvas (10 larvas) bajo un microscopio usando una cámara digital y el software PAXcam2 (Pax-it versión 6, Mis Inc., USA). El peso húmedo individual de las larvas (mg) fue calculado pesando tres submuestras de larvas ($n=30$) con una balanza analítica (Sartorius, Gottingen, Germany; precisión 1×10^{-4} g).

2.2.1. Preparación de extractos enzimáticos

Los extractos enzimáticos se obtuvieron al macerar las muestras de eleuteroembriones (larvas recién eclosionadas), larvas y juveniles. En larvas mayores a 18 dpe se disecó el sistema digestivo con el propósito de eliminar los inhibidores enzimáticos que pudieran estar presentes en la musculatura, así como otras enzimas relacionadas con el metabolismo de las proteínas musculares y el sistema inmune (Hjelmeland, 1985).

En este caso, las disecciones se realizaron bajo un microscopio estereoscópico y de una lámpara con lupa sobre portaobjetos enfriados en una cama de hielo seco, con el fin de mantener las larvas a baja temperatura durante la disección. Cada muestra proveniente de la

disección contuvo de 10 a 30 larvas (0-16 dpe) o de tres a cinco sistemas digestivos (a partir del día 18 dpe), los cuales se homogenizaron en 1 ml de agua desionizada en baño de hielo (4 °C) utilizando un homogenizador de tejidos (Kontes, USA). Los homogenizados se centrifugaron a 14,000 g durante 30 min a 4°C, en una centrífuga refrigerada (Biofuge Primo R marca Heraeus). El sobrenadante se utilizó como extracto enzimático y se separó en alícuotas de 200 µl que se almacenaron a -70°C hasta su análisis.

2.2.3. Cuantificación de la actividad proteolítica

La Tabla II indica los sustratos utilizados para cuantificar por medio de espectrofotometría la actividad de algunas enzimas proteolíticas presentes en los extractos larvarios.

Actividad proteolítica ácida total (pepsina): Para la medición de la actividad proteolítica ácida se utilizó una modificación de la metodología de Sarath *et al.* (1989). Se añadieron 150 µl de hemoglobina desnaturalizada a 50 µl de extracto enzimático y la mezcla se incubó a 37°C durante 10 min, después de los cuales la reacción se detuvo con 300 µl de ácido tricloroacético al 5% y se dejó reposar durante 30 min a 4°C.

La proteína precipitada se eliminó por centrifugación a 19,000 g durante 5 min y la absorbancia del sobrenadante se midió a 280 nm contra un blanco en el cual el extracto enzimático se inactivó por adición del ácido antes de iniciar la reacción. Se utilizó pepsina porcina comercial (SIGMA) a una concentración de 10 µg ml⁻¹ como control. Una unidad de actividad se definió como la cantidad de enzima que catalizó la formación de 1 µg de tirosina por minuto.

Actividad tipo tripsina: Para la medición de la actividad tipo tripsina se utilizó una modificación de la metodología de Erlanger *et al.* (1961). Se le añadieron 350 µl de BAPNA (Nα-Benzoil-DL-Arginina-P-Nitroanilida) a 50 µl del extracto enzimático y la mezcla se incubó a 37°C durante 30-60 min; al término de este tiempo la reacción se detuvo con 100 µl de ácido acético al 30% y se dejó reposar durante 15 min a temperatura ambiente. La absorbancia a 410 nm se leyó contra un blanco en el cual el extracto

enzimático se inactivó por adición previa del ácido. Se utilizó como control tripsina comercial (SIGMA Tipo IX, de páncreas de porcino), con una concentración de reacción de 10 µg ml⁻¹. Una unidad de actividad corresponde a 1 µmol de p-nitroanilida liberada por minuto usando como coeficiente de extinción molar 8800 cm⁻¹M⁻¹.

Actividad tipo quimotripsina: Para la medición de la actividad tipo quimotripsina se utilizó la metodología de Hummel (1959) con las modificaciones realizadas por Applebaum *et al.* (2001). La cantidad de extracto enzimático necesaria para detectar actividad (5-50 µl) se llevó a un volumen final de 50 µl con agua desionizada. La reacción se inició al añadir 450 µl de BTEE (N-Benzoyl-L-Tirosina Etil Ester) y la muestra se incubó por 15-30 min a 37°C. La absorbancia a 256 nm se leyó contra un blanco en el cual el extracto enzimático se sustituyó con agua desionizada, usando como control quimotripsina comercial (SIGMA Tipo II, de páncreas de bovino) en una concentración de reacción de 1 µg ml⁻¹. Una unidad de actividad enzimática se definió como 1 µmol de BTEE hidrolizado por minuto utilizando el coeficiente de extinción molar 964 cm⁻¹ M⁻¹.

2.2.4. Cálculo de actividades específicas.

La actividad de un extracto problema se determinó utilizando las siguientes ecuaciones:

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

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

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

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

Siendo:

ΔABS el incremento de absorbancia a una determina longitud de onda; volumen final (reacción), el volumen final de la reacción; CEM, el coeficiente de extinción molar.

Tabla II. Sustratos utilizados para cuantificar espectrofotométricamente la actividad de diferentes enzimas digestivas en larvas de totoaba

Sustrato	Especificidad	Solvente
Generales:		
Hemoglobina 2% (desnaturalizada) ¹	Proteasas ácidas (pepsina)	
Específicos:		
BAPNA 1 mM ²	Tipo tripsina	DMSO
BTEE 0.56 mM ³	Tipo quimiotripsina	DMSO

1 Metodología de Sarath *et al.* (1989).

2 BAPNA: N α -Benzoil-DL-Arginina-P-Nitroanilida. Metodología de Erlanger *et al.* (1961).

3 BTEE: N- Benzoil-L-Tirosina Etil Ester. Metodología de Hummel (1959) modificada por Applebaum (2001).

2.3. Análisis molecular

2.3.1. Clonación de genes de enzimas digestivas en larvas de totoaba

El análisis molecular se realizó según la metodología descrita por García-Gasca *et al.* (2006). El ARN total fue extraído de larvas completas (hasta el dpe 16) y de tracto digestivo (desde el dpe 18 hasta el final del estudio), usando reactivo Trizol (Invitrogen), seguido por dos tratamientos de DNAsa para eliminar completamente el ADN genómico. La síntesis de ADNc se llevó a cabo con 5 μ g de ARN total y la enzima transcriptasa reversa MMLV (Promega) en presencia de random primers.

Para el diseño de los oligos para los genes de las diferentes enzimas se obtuvieron secuencias de nucleótidos de las diferentes enzimas para otras especies de peces usando el programa ENTREZ del NCBI (Nacional Center of Biotechnology Information) a partir del cual fue posible ingresar a la base de datos de GenBank. Las secuencias fueron alineadas utilizando el programa Multalin o Clustal-W. Se obtuvieron secuencias consenso de

regiones conservadas para diseñar los oligos degenerados. Estos oligos se diseñaron utilizando el programa PRIMER3.

A partir de estos oligos se realizaron amplificaciones por PCR utilizando ADNc y los productos obtenidos fueron purificados y ligados a un vector pGEM-(Promega), introducidos en bacterias competentes *E. coli* DH5 α y fueron transformados por choque térmico; la extracción del plásmido se realizó mediante lisis alcalina. La secuenciación bidireccional se llevó a cabo utilizando primers universales para secuenciación T7/SP6 (T7: 5'-TAA-TAC-GAC-TCA-CTA-TAG-GG-3'; SP6: 5'-ATT-TAG-GTG-ACA-CTA-TAG-3') y un secuenciador LICOR IR2 siguiendo las instrucciones del fabricante. Las secuencias obtenidas fueron comparadas con otras secuencias en base de datos del GenBank mediante BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) y editadas mediante el programa BioEdit. Posteriormente se diseñaron oligos específicos para cada enzima para proceder a la cuantificación de la expresión génica por PCR en tiempo real.

2.3.2. PCR Cuantitativo (qPCR)

La expresión de genes de tripsina, quimotripsina, pepsina y 18s ribosomal fue cuantificada de manera relativa con un termociclador de tiempo real SmartCycler (Cepheid) usando SYBER GREEN®. Las muestras de ADNc de larvas de totoaba de los diferentes días post eclosión fueron analizadas por duplicado y se utilizó como control interno el gen 18s ribosomal (los primers para qPCR se muestran en la Tabla IV). Las reacciones de PCR se realizaron bajo las siguientes condiciones: 95°C por 2.5 minutos, y 40 ciclos a 95°C por 30s, 60°C por 30s y 72°C por 30s. La elaboración de la curva estándar de cada uno de los genes se realizó por medio de diluciones seriadas del ADNc amplificado con los primers de tripsina, quimotripsina, pepsina y 18s ARNr. Se utilizaron los valores del ciclo umbral (CT) y el número de copias en escala logarítmica (log copy number) obtenidos del análisis de dilución serial para realizar un análisis de regresión lineal y calcular cada una de las curvas estándar.

Para el cálculo del número de copias (C0) en muestras no conocidas se empleó el modelo de regresión lineal:

$$y = a + b (CT)$$

Dónde:

y= nivel de expresión de cada gen, a= intercepto, b= pendiente de la curva estándar y CT= ciclo umbral.

Finalmente para normalizar la C0 de cada muestra se dividió la C0 de cada uno de los genes por el C0 de 18s rRNA y por último cada muestra normalizada se dividió por el calibrador que en este caso fue el día post eclosión uno (dpe 1).

2.4. Análisis estadístico

La actividad específica e individual de las enzimas digestivas en larvas fue expresado como media y desviación estándar (media $\pm$ D.E). Todos los datos fueron analizados para su normalidad y homogeneidad de varianzas. Se realizaron pruebas de análisis de varianzas de una vía (ANOVA), identificando las diferencias con pruebas de comparaciones múltiples de Tukey. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa Sigma-Plot 11.0 para Windows (Sigma- Plot® 11.0, USA). Todas las pruebas estadísticas se realizaron con un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$.

2.0. Resultados

2.1. Expresión y actividad de enzimas digestivas

Tripsina

La expresión de mRNA de tripsina se detectó a niveles muy bajos durante el dpe 1, sin embargo, hacia el dpe 5 la expresión incrementó, la cual coincidió con el inicio de la alimentación a base de rotíferos (Figura 2A). El nivel de expresión volvió a incrementar en el dpe 16 cuando la alimentación cambió de rotíferos a nauplios de *Artemia*, sin embargo, no se observaron diferencias significativas ($P > 0.05$) al dpe 16 con respecto a los demás días.

El máximo nivel de mRNA de tripsina fue detectado en el dpe 34, cuando las glándulas gástricas y el estómago estaban completamente desarrollados y las larvas fueron alimentadas exclusivamente con microdieta. En el dpe 40 (al final del experimento) se observó una disminución muy marcada mas no significativa ($P>0.05$) con respecto al nivel de expresión del gen de tripsina.

La actividad específica de tripsina fue detectada desde el dpe 1 (0.39 ± 0.05 mU/mg proteína), manteniéndose baja durante los siguientes días, sin embargo, un incremento significativo ($P<0.001$) fue observado en el dpe 12 (1.06 ± 0.20 mU/mg proteína). Después del dpe 12 la actividad específica de tripsina disminuyó hasta el dpe 16 (0.39 ± 0.01 mU/mg proteína), la cual incrementó de nuevo hacia el dpe 25 (0.99 ± 0.17 mU/mg proteína $P<0.001$), sin embargo, el nivel de actividad específica de tripsina volvió a disminuir durante los siguientes días donde no se observaron diferencias significativas ($P= 0.999$) en la actividad enzimática cuando las larvas fueron alimentadas a base de rotíferos y *Artemia*. El máximo nivel de actividad específica de tripsina se alcanzó el dpe 40 (1.83 ± 0.05 mU/mg proteína) (Figura 3B).

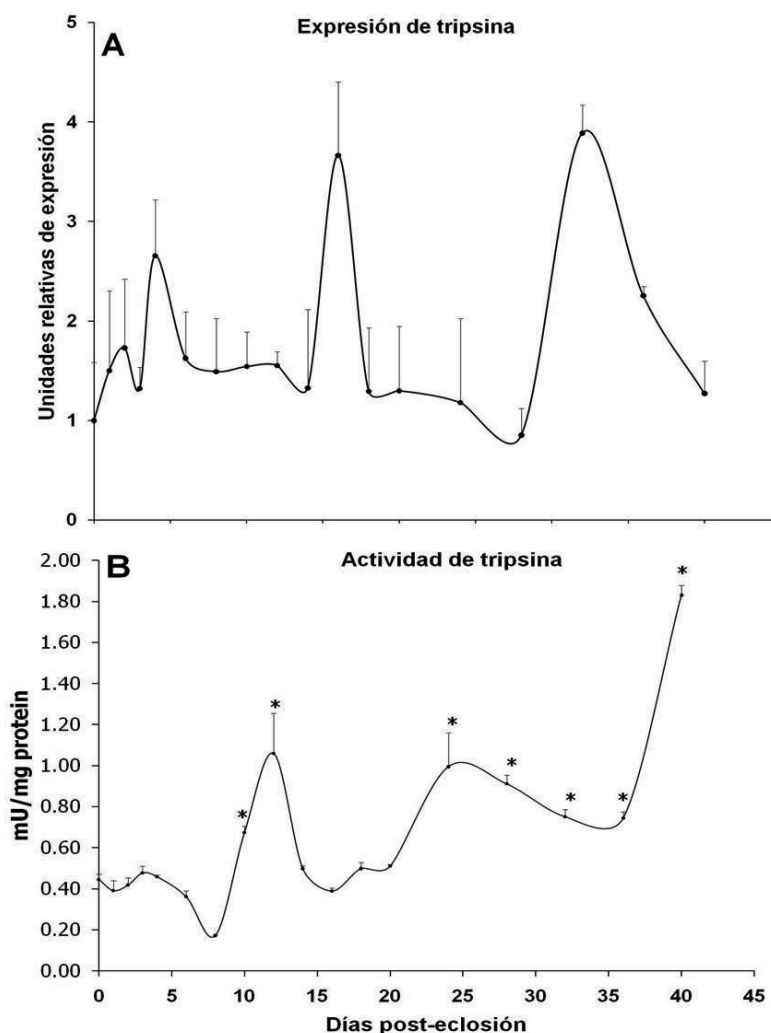


Figura 2. Expresión y actividad de tripsina en larvas de totoaba durante su desarrollo larvario (Media $\pm$ DE, n=3). Asteriscos (*) indican diferencias significativas en el tiempo.

Quimotripsina

La expresión de quimotripsina fue detectada a nivel muy bajo en el dpe 1, la cual mostró dos incrementos importantes durante el desarrollo del presente estudio, sin embargo dichos incrementos no fueron significativos ($P > 0.05$). El primer incremento fue observado en el dpe 16 (Figura 3A), coincidiendo con el cambio de alimentación de rotíferos a nauplios de *Artemia*. El segundo incremento fue observado en el dpe 36, cuando las larvas fueron alimentadas con microdieta como dieta exclusiva, luego el nivel de expresión de quimotripsina disminuyó hacia el final del estudio al dpe 40.

Diferencias significativas ($P < 0.001$) fueron observadas en la actividad específica de quimotripsina (Figura 14B), la cual se detectó a un nivel muy bajo en el dpe 1 (0.18 ± 0.08 $\text{mU} \times 10^{-3} \text{ mg proteína}^{-1}$), con incremento posterior significativo ($P < 0.001$) en el dpe 12 (2.57 ± 0.38 $\text{mU} \times 10^{-3} / \text{mg proteína}$), coincidiendo con la alimentación a base de rotíferos y con el desarrollo del intestino. No se observaron diferencias significativas entre los días 12 y 36 ($P = 0.805$). Sin embargo, un incremento significativo fue observado en el dpe 36 (1.75 ± 0.95 $\text{mU} \times 10^{-3} \text{ mg proteína}^{-1}$) ($P < 0.001$). Durante este periodo las larvas estaban por terminar la transición de alimento vivo a inerte. En el dpe 40 la actividad de quimotripsina disminuyó significativamente ($P < 0.001$) con respecto a los dpe 12 y 36 (Figura 3B).

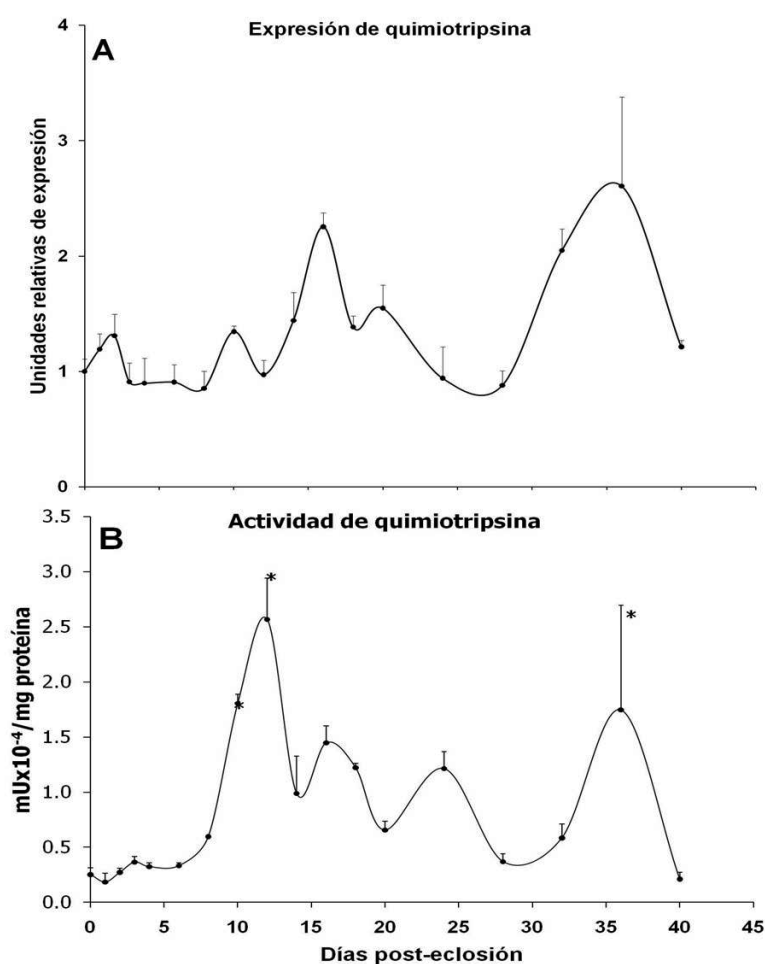


Figura 3. Expresión y actividad de quimotripsina en larvas de totoaba durante su desarrollo larvario (Media $\pm$ DE n=3). * indican diferencias significativas en el tiempo.

Pepsina

La expresión del gen de pepsina fue detectada significativamente en el dpe 16, dos días antes de la aparición de las glándulas gástricas (Figura 4A). El máximo nivel de la expresión de pepsina incrementó significativamente en el dpe 36 ($P = 0.025$), el cual coincidió con el desarrollo completo del estómago. Después del dpe 36 y hasta el dpe 40 el nivel de expresión disminuyó (etapa final del bioensayo).

La actividad específica de pepsina fue detectada a niveles muy bajos entre los dpe 18 y 20 (0.20 ± 0.07 U mg proteína⁻¹). El primer incremento significativo en actividad específica fue observado el dpe 24 (2.16 ± 1.17 U mg proteína⁻¹, $P = 0.01$) el cual coincidió con el inicio de la formación del estómago (Figura 4B). Posteriormente la actividad disminuyó entre los días 28 y 32 para luego incrementar significativamente ($P < 0.01$) al final del experimento en el dpe 40. Sin embargo, la expresión de pepsina fue detectada a niveles bajos en el dpe 14, en el dpe 16 se observó un incremento no significativo ($P = 0.715$), para luego disminuir en el dpe 25 y volver a incrementar significativamente ($P = 0.025$) en el día 36 donde alcanzó su nivel máximo.

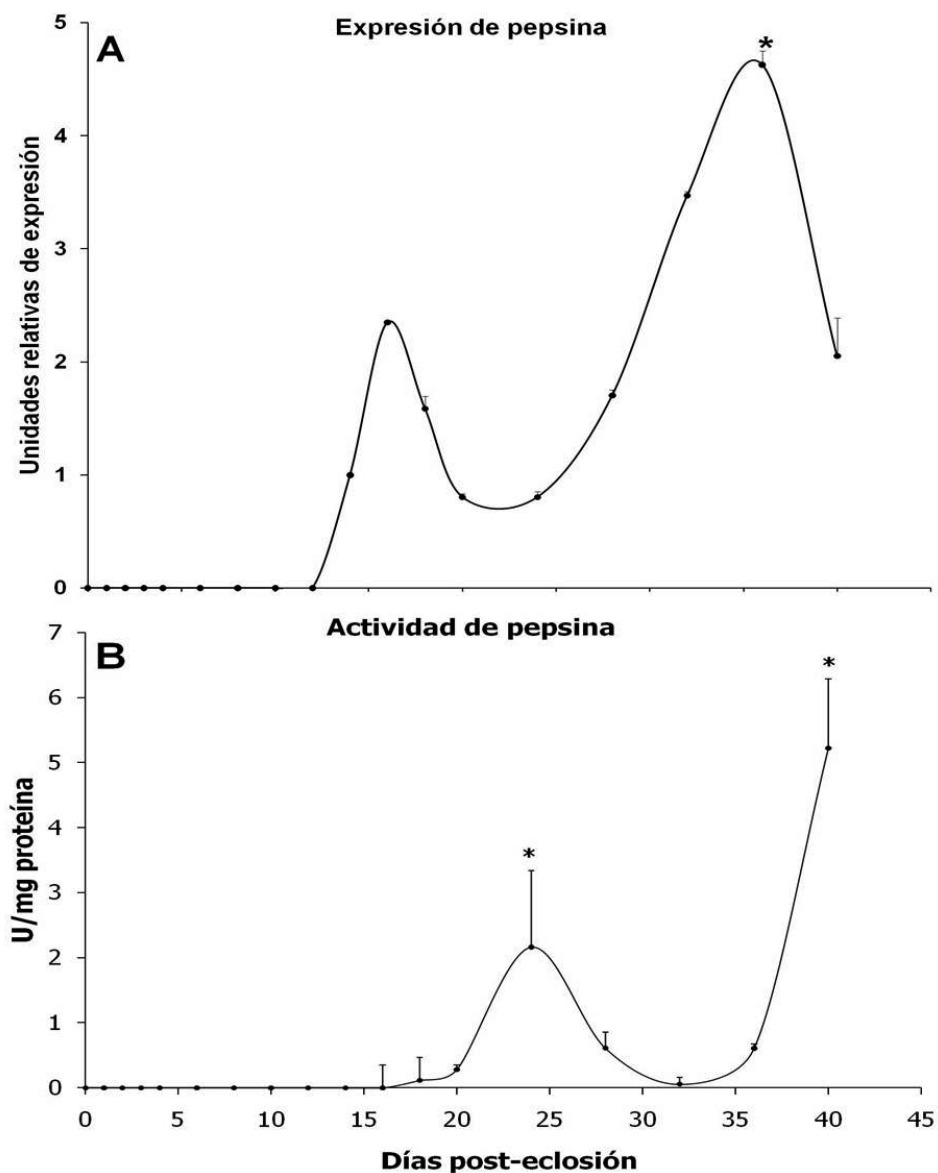


Figura 4. Expresión y actividad de pepsina en larvas de totoaba durante su desarrollo larvario (Media $\pm$ DE n=3). * Indican diferencias significativas en el tiempo.

3.0. Conclusiones

En larvas de totoaba, el sistema digestivo está completamente funcional entre los dpe 24 y 28, ya que mediante análisis bioquímicos y moleculares se cuantificaron tres de las principales enzimas digestivas relacionadas con la digestión de proteínas contenidas en la dieta, proporcionando así información relevante para esta especie, esto debido a que no se contaba con información detallada sobre la fisiología digestiva y protocolos de alimentación adecuados para *T. macdonaldi*. Entre los dpe 24 y 28 las larvas de totoaba son capaces de digerir dieta formulada y absorber los nutrientes de la misma, por lo tanto, basándonos en los resultados obtenidos y bajo las condiciones experimentales en las que se realizó este estudio, se propone estandarizar el inicio del período del destete a partir del dpe 24.

Los conocimientos obtenidos en el presente estudio constituyen un aporte importante para el desarrollo del cultivo larvario de especies como totoaba (*T. macdonaldi*). Así mismo, estos resultados son clave para apoyar de manera certera el cultivo de esta especie en Baja California, tal y como se realiza con otras especies de peces marinos en otros países. El éxito de dichos desarrollos tecnológicos se basa en un buen control y conocimiento exhaustivo del proceso de alimentación, digestión y nutrición durante el desarrollo fisiológico digestivo en peces.

Referencias

- Abdo-de la Parra, M.I., Rodríguez-Ibarra, E., Campillo-Martínez, F., Velasco-Blanco, G., García-Aguilar, N., Álvarez-Lajonchère, L.S., Voltolina, D. 2010. Efecto de la densidad de siembra sobre el crecimiento y supervivencia larval del pargo lunarejo *Lutjanus guttatus*. Revista de Biología Marina y Oceanografía 45, 141-146.
- Alarcón-López, F.J. 1997. Procesos digestivos en peces marinos: Caracterización y aplicaciones prácticas. Tesis de doctorado. Universidad de Almería. Departamento de Biología Aplicada. Almería. España. Pp. 292.
- Álvarez-González, C.A., Cervantes-Trujano, M., Tovar-Ramírez, D., Conklin, D.E., Nolasco, H., Gisbert, E., Piedrahita, R., 2006. Development of digestive enzymes in California halibut *Paralichthys californicus* larvae. Fish Physiology and Biochemistry 31, 83-93.
- Álvarez-González, C. A., Moyano-López, F.J., Civera-Cerecedo, R., Carrasco-Chávez, V., Ortiz-Galindo, J.L., Dumas, S., 2008. Development of digestive enzyme activity in larvae of spotted sand bass *Paralabrax maculatofasciatus*. I: Biochemical analysis. Fish Physiology and Biochemistry 34, 373-384.
- Álvarez-González, C. A., Moyano-López, F.J., Civera-Cerecedo, R., Carrasco-Chávez, V., Ortiz-Galindo, J.L., Nolasco-Soria, H., Tovar-Ramírez, D., Dumas, S., 2010. Development of digestive enzyme activity in larvae of spotted sand bass *Paralabrax maculatofasciatus*. II: Electrophoretic analysis. Fish Physiology and Biochemistry 36, 29-37.
- Avilés-Quevedo, A., 2005. Calidad de huevos y larvas según el manejo de los reproductores de la cabrilla *Paralabrax maculatofasciatus*. Tesis de doctorado. Departamento de Biología Animal, Universidad de Barcelona España. 199 pp.
- Applebaum, S.L., Perez, R., Lazo, J.P., Holt, G.J., 2001. Characterization of chymotrypsin activity during early ontogeny of larval red drum *Sciaenops ocellatus*. Fish Physiology and Biochemistry 25, 291-300.
- Berdegúe, A.J., 1955. La pesquería de la totoaba (*Cynoscion macdonaldi*), en San Felipe, Baja California. Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural 16(1-4), 45-78.
- Cahu, C.L., Zambonino-Infante, J.L., 1995. Effect of the molecular form of dietary nitrogen supply in sea bass larvae: Response of pancreatic enzymes and intestinal peptidases. Fish Physiology and Biochemistry 14: 209-214.
- Cannon R. 1966. The Sea of Cortés. Lane Magazine and Book Co., Menlo Park, Calif.
- Chen, B.N., Qin, J.G., Kumar, M.S., Hutchinson, W.G. y Clarke, S.M., 2006. Ontogenetic development of digestive enzymes in yellowtail kingfish *Seriola lalandi* larvae. Aquaculture 260, 264-271.
- Cisneros-Mata, M., Botsford, L.W., Quinn, J.F., 1997. Projecting of *Totoaba macdonaldi*, a population with unknown age-dependent variability. Ecol. Appl 7, 968-980.

- CITES. 2005. Appendices I, II and III (12/01/2005). Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora, Geneva, Switzerland, 49 pp.
- Civera-Cerecedo, R., Ortiz-Galindo, J.L., Dumas, S., Nolasco-Soria., Alvarez-González, C.A., Anguas-Vélez, B., Peña-Martínez, R., Rosales-Velazquez, M.O., Carrasco-Chávez, R., García-Gómez, R., Goytortúa-Bores, E., 2002. Avances en la nutrición de la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus*. pp. 352-408. En: Cruz-Suárez, L.E., Rique-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Gaxiola-Cortés, M.G., Simoes, N. (Eds). VI Simposium Internacional de Nutrición Acuicola, 3 al 6 de Septiembre de 2002, Cancún, Quintana Roo, México.
- Douglas, S.E., Gawlicka, A., Mandlam, S., Gallant, J.W., 1999. Ontogeny of the stomach in winter flounder: characterization and expression of the pepsinogen and proton pump genes and determination of pepsin activity. *Journal of Fish Biology*. 55, 897-915.
- Duncan, N., Rodríguez, G., Alock, D., y Zohar, Y. 2003. Effects of controlled delivery and acute injections of LHRH-a on bullseye puffer fish *Sphoeroides annulatus* spawning. *Aquaculture* 218, 625-635.
- Durazo, E., Cruz, A.C., López, L.M., Lazo, J.P., Drawbridge, M., Viana, M.T., 2010. Effects of digestible protein levels in isonitrogenous diets on growth performance and tissue composition of juvenile *Atractoscion nobilis*. *Aquaculture Nutrition* 16, 54-60.
- Erlanger, B., Kokowsky, N., Cohen, W., 1961. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 95, 271-278.
- Flanagan, C. A., Hendrickson, J.R., 1976. Observations on the comercial fishery and reproductive biology of the Totoaba (*Totoaba macdonaldi*) Gilbert 1890 in the northern Gulf of California. *Fishery Bulletin* 74(3), 531-544.
- Galaviz, M.A., García-Gasca, A., Drawbridge, M., Álvarez-González, C.A., López, L.M., 2011. Ontogeny of the digestive tract and enzymatic activity in White sea bass *Atractoscion nobilis* larvae. *Aquaculture* 318, 162-168.
- García-Gasca, A., Galaviz, M., Gutiérrez, J.N., García-Ortega, A., 2006. Developement of the digestive tract, trypsin activity and gene expression in eggs and larvae of the bullseye puffer fish *Sphoeroides annulatus*. *Aquaculture* 256, 366-376.
- García Ortega, A. 2000. Valor nutricional de los quistes de *Artemia* y su uso como fuente de proteína en dietas artificiales para larvas de peces. In: Cruz – Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Olvera-Novoa, M.A & Civera- Cerecedo, R., (Eds). Avances en Nutrición Acuicola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuicola. 19-22 Noviembre, 2000. Mérida, Yucatán. p. 287-299.
- García-Ortega A., 2009. Nutrition and feeding research in the spotted rose snapper *Lutjanus guttatus* and bullseye puffer *Sphoeroides annulatus*, new species for marine aquaculture. *Fish Physiology and Biochemistry* 35, 69-80.

- Gisbert, E., Piedrahita, R.H., Conklin, D.E., 2004. Ontogenetic development of the digestive system in California halibut *Paralichthys californicus* with notes on feeding practices. *Aquaculture* 232, 455-470.
- Gisbert, E., Ortiz-Delgado, J.B., Sarasquete, C., 2008. Nutritional cellular biomarkers in early life stages of fish. *Histology and Histopathology* 23, 1525-1539.
- Hjelmeland, K., Jørgensen, T., 1985. Evaluation of radioimmunoassay as a method to quantify trypsin and trypsinogen in fish. *Transactions of the American Fisheries Society* 114, 619– 621.
- Hummel, B.C.W., 1959. A modified spectrophotometric determination of chymotrypsin, trypsin and thrombin. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* 37, 1393-1399.
- Kolkovski, S. y Sakakura Y. 2007. Yellowtail kingfish culture-Opportunities and problems. *World Aquaculture* 38, 44-48.
- Kurokawa, T., Shiraishi, M., Suzuki, T., 1998. Quantification of exogenous protease derived from zooplankton in the intestine of Japanese sardine *Sardinop melanotictus* larvae. *Aquaculture* 161,491-499.
- Lauff, M., Hoffer, R., 1984. Proteolytic enzymes in fish development and the importance of dietary enzymes. *Aquaculture* 37, 335-346.
- López, L.M., Durazo, E., Viana, M.T., Drawbridge, M., Bureau, D., 2009. Dietary lipid levels effect on performance, body composition and fatty acid profile of juvenile white seabass, *Atractoscion nobilis*. *Aquaculture* 289,101-105.
- Morales-Ortíz C. 1999. Descripción del desarrollo embrionario de totoaba (*Totoaba macdonaldi*) bajo condiciones de laboratorio. Tesis de licenciatura, Universidad Autónoma de Baja California, Ensenada, B.C., México, 56 pp.
- Murray, H.M., Perez-Casanova, J.C., Gallant, J.W., Johnson, S.C., Douglas, S.E., 2004. Trypsinogen expression during the development of the exocrine pancreas in Winter flounder, *Pseudopleuronectes americanus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part S* 138, 53-59.
- Murray, H.M., Gallant, J.W., Johnson, S.C., Douglas, S.E., 2006. Cloning and expression analysis of three digestive enzymes from Atlantic halibut *Hippoglossus Hippoglossus* during early development: Predicting gastrointestinal functionality. *Aquaculture* 252, 394-408.
- Peña, R., Dumas, S., Villalejo-Fuerte, M., Ortiz-Galindo, J., 2003. Ontogenetic development of the digestive tract in reared spotted sand bass *Paralabrax maculatofasciatus* larvae. *Aquaculture* 219, 633- 644.
- Sandoval-Garibaldi G. 2001. Desarrollo morfológico de la totoaba (*Totoaba macdonaldi*) (Gilbert, 1890) durante su estadio larval en condiciones de laboratorio. Tesis de licenciatura, Universidad Autónoma de Baja California, Ensenada, B.C., México. 75 p.
- Sarath, G., De la Monte, R.S., Warner, F.W., 1989. Protease assay methods. Pages 25–56. In: R.J. Beyon and J.S. Bond, editors. *Proteolytic enzymes: a practical approach*. Oxford University Press, New York, New York, USA.

- Smith, L., 1989. Digestive Functions in Teleost Fishes *In* Fish Nutrition. J. Halver (Ed.) Academic Press, Inc. London. Pp 332-422.
- Solórzano Y. 2006. Efecto de niveles de alimentación sobre el crecimiento y composición química de juveniles de *Totoaba macdonaldi*. Maestría Universidad Autónoma de Baja California. Facultad de ciencias marinas.
- Tanaka, M., 1972. Studies on the structure and function of the digestive system in teleost larvae. Part 5: Epithelial changes in the posterior gut and protein digestion. Japanese Journal of Ichthyology 19, 172-180.
- True C.D., A. Silva Loera y N. Castro Castro. 1997. Acquisition of *Totoaba macdonaldi* (Sciaenidae) broodstock: field handling, decompression and prophylaxis of an endangered species. Progressive Fish-Culturist. 59(3).
- True C.D., N. Castro-Castro, G. Sandoval-Garibaldi y C. Morales-Ortiz. 2001. Reproducción Controlada de *Totoaba macdonaldi* (Gilbert). Resumen de ponencia oral del VII Congreso de la Asociación de Investigadores del Mar de Cortés. Pag. 82.
- True, C. D. 2012 Desarrollo de la biotecnia de cultivo de *Totoaba macdonaldi*. Tesis Doctorado. Universidad Autónoma de Baja California, Facultad de Ciencias Marinas. Ensenada, Baja California. México.
- Ueberschär, B., 1993. Measurement of proteolytic enzyme activity: Significance and application in larval fish research. Part III 233-239 *In*: Physiological and Biochemical Aspects of Fish Development. Edited by B.T. Walther an H.J. Fhyn. University of Bergen, Norway.
- Valverde-Chavarría, S. 2002. Desarrollo del sistema digestivo de larvas de corvina blanca, *Atractoscion nobilis* (Ayres, 1860) (Sciaenidae), y selección de fuentes proteicas adecuadas para su alimentación. Tesis de maestría. Centro de investigación científica y educación superior de Ensenada.
- Vizcaíno E. 2008. Efecto en el crecimiento, consumo, sobrevivencia y composición proximal de juveniles de *Totoaba macdonaldi*, alimentados con dietas isproteicas formuladas con distintos niveles de energía. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Baja California. Facultad de ciencias marinas.
- Watanabe, Y. 1984. An ultrastructural study of intracellular digestion of horseradish peroxidase by the rectal epithelium cells in larvae of a freshwater cottid fish *Cottus nowawae*. Bulletin of the Japanes Society For the Science of Fish 50, 409-416.
- Zacarías-Soto, M., Muguet, J.B., Lazo, J.P., 2006. Proteolytic activity in California Halibut Larvae *Paralichthys californicus*. Journal of World Aquaculture Society 37 (2), 175-185.
- Zambonino-Infante, J.L., Cahu, C., 1994. Development and response to a diet change of some digestive enzymes in seabass *Dicentrarchus labrax* larvae. Fish Physiology and Biochemistry 12, 399-408.
- Zambonino-Infante, J.L., Cahu, C.L., 2001. Ontogeny of the gastrointestinal tract of marine fish larvae. Comparative Biochemistry and Physiology C 130, 477-487.