

# Ontogenia del Sistema Digestivo del Guapote Lagunero *Parachromis dovii* durante el Periodo Larval y Selección de Ingredientes para su Alimentación

S. Valverde-Chavarría, <sup>1\*</sup>, C.A. Álvarez-González, <sup>2</sup>, J.B. Ulloa-Rojas, <sup>1</sup>, C.A. Frías-Quintana, <sup>2</sup>, R. Guerrero-Zárate, <sup>2</sup>, J.R. Quirós-Orlich, <sup>1</sup>, M. Brais-Medina, <sup>1</sup>, E. Calvo-Elizondo, <sup>1</sup> y L. Alvarado-Guzmán <sup>3</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio de Acuicultura Continental, Escuela de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional de Costa Rica. Calle 9, Avenidas 0 y 1, Heredia 86-3000, Costa Rica. Tel/Fax: +506-2237-5230 \*E-mail: [silvia.valverde.chavarría@una.cr](mailto:silvia.valverde.chavarría@una.cr)

<sup>2</sup> Laboratorio de Acuicultura Tropical, DACBIOL, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Carretera Villahermosa Cárdenas Km 0.5, 86139, Villahermosa, Tabasco, México. <sup>3</sup> Laboratorio de Patología, Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional de Costa Rica

---

## Resumen

El guapote lagunero, *Parachromis dovii*, es un cíclido nativo de Costa Rica muy apreciado por su tamaño y calidad de su carne. Esta especie posee la ventaja de aceptar el alimento formulado desde el inicio de la alimentación exógena; sin embargo, su uso exclusivo produce un crecimiento muy lento. Debido a lo anterior, surgió la necesidad de investigar la ontogenia del sistema digestivo y sus enzimas y la evaluación *in vitro* de ingredientes dietarios; con el fin de generar información que permita formular alimentos inertes que mejoren el crecimiento larval. Se encontró que esta especie tiene un patrón de desarrollo similar al de otros cíclidos neotropicales, con la aparición muy precoz del estómago y las enzimas digestivas. Además, el crecimiento de las larvas alimentadas inicialmente con nauplios de *Artemia* fue de 12.25% PCd<sup>-1</sup>, mientras que en las alimentadas con una dieta formulada fue de 6.53% PCd<sup>-1</sup>. De las 7 harinas de origen vegetal evaluadas, las que produjeron la menor inhibición de las proteasas digestivas fueron la harina de trigo (59.08%) y puntilla de arroz (58.21%). Con respecto a los ensayos de digestibilidad alcalina *in vitro*, de las 6 harinas evaluadas, las que presentaron los valores más altos fueron la de carne y hueso (113.92%) y la de pescado (74.92%).

Palabras clave: *ontogenia, sistema digestivo, guapote lagunero*

## 1. Introducción

El conocimiento de los cambios temporales que experimenta el sistema digestivo durante el desarrollo larval de los peces es esencial para comprender su fisiología digestiva y requerimientos nutricionales, y para desarrollar protocolos de alimentación y de cultivo adecuados para cada estadio del desarrollo fisiológico (Lazo *et al.* 2011).

Existen diferencias interespecíficas considerables en el tiempo que tardan en diferenciarse las estructuras del sistema digestivo, desarrollarse y volverse funcionales. Ese tiempo depende tanto de factores genéticos como de factores externos, dentro de los cuales la calidad del agua (principalmente la temperatura) y la disponibilidad y composición del alimento juegan un rol importante (Lazo *et al.* 2011). Por lo tanto, es necesario evaluar el desarrollo temporal de esas estructuras y sus funciones para cada especie, considerando dichos factores externos.

En la alimentación de las larvas de peces es común el uso de organismos vivos, tales como la *Artemia*, a los cuales se les atribuyen ventajas como el estímulo visual y químico, poseer buena digestibilidad y enzimas que la mejoran, una mejor distribución en la columna de agua y mantener la calidad nutricional por más tiempo (Beux y Zaniboni-Filho 2008). Sin embargo, su producción es costosa y su calidad nutricional suele variar, por lo que existe un gran interés en el desarrollo de dietas formuladas capaces de reemplazar al alimento vivo (Drossou *et al.* 2006).

En algunas especies de peces de agua dulce, que ponen huevos grandes, el estómago se desarrolla más temprano que en la mayoría de especies marinas, durante la etapa de transición a la alimentación exógena (Lazo *et al.* 2011); lo que facilita su alimentación con dietas formuladas. Sin embargo, el desarrollo de dietas formuladas para los estadios larvales de peces presenta retos y dificultades, tales como el proveer nutrientes altamente digestibles para estos organismos, los que aún no poseen un sistema digestivo completamente desarrollado (Lazo 2000). De ahí la importancia de una selección adecuada de los ingredientes a utilizar en el alimento, especialmente en el caso de las fuentes de

proteína, ya que las larvas de peces tienen un requerimiento proteico alto (Martínez-Montaña y Lazo 2012).

Desde hace varios años surgió la necesidad de buscar fuentes de proteína alternativas que reemplacen, al menos parcialmente, las harinas de pescado, debido a su alto costo. En este sentido, los estudios se han enfocado sobre todo en fuentes de origen vegetal. Sin embargo, éstas presentan factores antinutricionales, dentro de los cuales destacan los inhibidores de las proteasas digestivas, los que desfavorecen el proceso digestivo de los organismos. Por lo tanto, en la selección de ingredientes de origen vegetal es importante evaluar su efecto sobre las enzimas de los peces (Alarcón *et al.* 2001).

Los ensayos *in vitro*, de digestibilidad y de inhibición enzimática, permiten evaluar los ingredientes de una forma rápida y sencilla (Alarcón *et al.* 2001; Alarcón *et al.* 2002; Chong *et al.* 2002). Debido a que durante el desarrollo larval de los peces cambia su capacidad digestiva, resulta necesario realizar estos ensayos para cada estadio de desarrollo de la especie en estudio (Martínez-Montaña y Lazo 2012).

El guapote lagunero es un cíclido endémico de Costa Rica, en donde se distribuye en ambas Vertientes (Atlántica y Pacífica). Es un pez piscívoro, aunque también ingiere crustáceos e insectos en menor cantidad. Además, alcanza un gran tamaño (más de 45 cm de longitud), lo que unido a su fuerza y buen sabor, le confieren gran popularidad tanto en la pesca deportiva así como fuente de alimento (Bussing 2002).

La Escuela de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de Costa Rica (UNA) ha realizado varios estudios enfocados en el cultivo de esta especie, y desde hace varios años completó su ciclo de vida y lo produce a escala experimental. Cabrera *et al.* (1998) describieron el desarrollo embrionario y larval de estos organismos, en condiciones de laboratorio, obtenidos de una pareja de reproductores silvestres. Günther y Ulloa (1995) estudiaron el crecimiento de las larvas alimentadas con diferentes raciones de nauplios de *Artemia*, el crecimiento de los juveniles en regímenes de cultivo en dependencia de la densidad (Günther, 1996) y la utilización de la dieta respecto al contenido proteico (Ulloa

Valverde *et al.* 2013. Ontogenia del Sistema Digestivo del Guapote Lagunero *Parachromis dovii* durante el Periodo Larval y Selección de Ingredientes para su Alimentación. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Alvarez-González, C. (Eds), Contribuciones Recientes en Alimentación y Nutrición Acuícola, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, pp. 320-355.

1997). Sevilla (comunicación personal, 20 de Agosto, 2013) registró el crecimiento de esta especie en tanques de tierra durante 10 ciclos de cultivo, que fue en promedio de 250 g en 15 meses.

De manera que, aunque *P. dovii* presenta una serie de ventajas para el cultivo, tiene un crecimiento relativamente lento, por lo que resulta necesario formular alimentos que permitan optimizarlo. Para lograr esto, es necesario evaluar la capacidad digestiva en diferentes periodos del ciclo de vida, así como determinar sus requerimientos nutricionales (Álvarez-González *et al.* 2008). Este trabajo se enfoca en los estudios que la UNA ha realizado en los últimos años, en colaboración con la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco (México), acerca del desarrollo del sistema digestivo y sus enzimas, y la selección de ingredientes, mediante ensayos *in vitro*, para la formulación de dietas adecuadas para las larvas de esta especie.

## **2. Metodología**

### **2.1. Reproducción y cultivo larvario**

La producción y cultivo larval se realizó en el Laboratorio Húmedo de la Escuela de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de Costa Rica. Los padrotes de *P. dovii* se mantuvieron en tanques de fibra de vidrio de 2 ton, con un sistema de recirculación del agua por sifoneo, en una relación hembra:macho de 1:1. La temperatura se mantuvo alrededor de los 25 °C y el fotoperiodo en 9 horas luz y 15 horas oscuridad. La alimentación consistió en un alimento comercial para trucha, que se suministró 3 veces al día. Los desoves de cada pareja, de entre 500 a 1000 huevos, fueron espontáneos.

Las larvas recién eclosionadas se extrajeron del tanque de reproductores por sifoneo y se distribuyeron en acuarios de 10 l, en un sistema recirculado, a una densidad de 23 ind/l. La temperatura del agua en el sistema se mantuvo entre 25.2 °C y 29.4 °C, el oxígeno disuelto entre 6.0 ppm y 6.8 ppm y el nivel de amoníaco se mantuvo inferior a 0.05 ppm. El fotoperiodo fue el mismo que en los tanques de reproductores.

Las larvas se alimentaron en exceso con nauplios y metanauplios de *Artemia* (aprox. 250/ml) no enriquecidos, desde los 5 DDE y hasta los 30 DDE. Posteriormente, los alevines se alimentaron con una dieta formulada (cuadro 2) a saciedad. La alimentación se realizó 4 veces al día: a las 8:00, 11:00, 14:00 y a las 17:00 horas; durante la misma se suspendió el flujo de agua por 30 min.

Cuadro 1. Composición del alimento formulado.

Ingredientes	Porcentaje (%)
Harina de pescado	48
Harina de soya	21
Harina de trigo	15
Harina de carne y hueso	9
Aceite de soya	2
Aceite de pescado	2
Mezcla vitamínica	2
Sal	1

Composición proximal: 45% de proteína y 10% lípidos.

## 2.2. Toma de muestras y mediciones biométricas

Para los diferentes estudios realizados, las muestras de larvas se tomaron de distintos desoves. Los muestreos se realizaron antes de la primera alimentación del día y las larvas se mantuvieron durante una hora en agua libre de alimento, con el fin de que evacuaran cualquier remanente de alimento presente en el tracto digestivo. Posteriormente, se sacrificaron con una sobredosis de metansulfonato de triclaína (MS-222), se midieron bajo un estereoscopio con micrómetro ocular ( $\pm 0.07$  mm), o con un vernier ( $\pm 0.01$  mm), dependiendo del tamaño, y se determinó el peso húmedo con una balanza analítica ( $\pm 0.01$  mg). Finalmente, las larvas se lavaron con agua destilada y se fijaron con formalina tamponada al 10% para los análisis histológicos, o se congelaron a  $-20$  °C para los ensayos bioquímicos.

### 2.3. Desarrollo histológico del sistema digestivo

Los muestreos se realizaron diariamente iniciando el día de la eclosión y hasta los 30 DDE. Las larvas fijadas se deshidrataron en soluciones sucesivas de etanol y benceno y finalmente se incluyeron en parafina. Los bloques de parafina se cortaron sagitalmente con un micrótopo en láminas de 3  $\mu\text{m}$  de diámetro. Las láminas se desparafinaron y rehidrataron al colocarlas en soluciones sucesivas de xileno, etanol y agua destilada. Posteriormente, se tiñeron con Hematoxilina-Eosina y se fotografiaron.

### 2.4. Ontogenia enzimática

Los muestreos se realizaron los días 6, 14, 22, 30 y 41 DDE. Las larvas congeladas se liofilizaron y posteriormente se les separó la sección visceral. Las muestras se dividieron en dos grupos, con el fin de realizar a un grupo el análisis de proteasas ácidas y al otro el de enzimas alcalinas. El primer grupo se homogenizó en buffer 100 mM Glicina-HCl, pH 2.0 y el segundo grupo en buffer 50 mM Tris-HCl,  $\text{CaCl}_2$  20 mM, pH 7.5 (35 mg/ml). Todas las muestras se manipularon en frío (hielo) para evitar la desnaturalización enzimática. Los homogenizados se centrifugaron a 14,000 g por 30 min a 4 °C para obtener el sobrenadante (extracto enzimático), y se almacenaron a -20 °C hasta el momento de su análisis.

La concentración de proteína soluble se cuantificó por la técnica de Bradford (1976) usando como estándar una curva patrón de albúmina bovina sérica. La actividad de proteasas alcalinas se evaluó por el método de Walter (1984), usando caseína a pH 9.0. La actividad de proteasas ácidas se determinó por la técnica de Anson (1938), usando hemoglobina a pH 2.0. La mezcla de reacción en ambas técnicas fue incubada a 37 °C. Una unidad de actividad enzimática fue definida como 1  $\mu\text{g}$  de tirosina liberada por minuto, usando el coeficiente de extinción molar de 0.005.

La actividad tipo tripsina se determinó con la técnica de Erlanger *et al.* (1961) usando el sustrato BAPNA a pH 8.2. La actividad tipo quimotripsina se cuantificó siguiendo el protocolo de DelMar *et al.* (1979) con el sustrato SAAPNA a pH 7.8. La actividad de la

leucina-aminopeptidasa se evaluó de acuerdo al protocolo de Maraux *et al.* (1973) usando el sustrato leucina *p*-nitroanilida a pH 7.2. La actividad de carboxipeptidasa A se cuantificó siguiendo el método descrito por Folk y Schirmer (1963), usando el sustrato Hipuril-L-fenilalanina a pH 7.5. Para estas 4 proteasas, la mezcla de reacción fue incubada a 25 °C. Una unidad de actividad enzimática fue definida como 1 µg de nitroanilida liberada por minuto, usando el coeficiente de extinción molar de 8.8.

El ensayo de α-amilasa fue realizado siguiendo el protocolo de Somoyi-Nelson descrito por Robyt y Whelan (1968) usando almidón como sustrato a pH 7.5 y 25 °C. Se definió una unidad de actividad como la cantidad de enzima que libera 1 µg de maltosa por minuto. La actividad de la lipasa fue cuantificada de acuerdo a Versaw *et al.* (1989), usando como sustrato el β-naftil caprilato a pH 7.2 y 25 °C. Una unidad de actividad fue definida como la liberación de 1 µg de naftol por minuto, usando el coeficiente de extinción molar de 0.02. Las actividades de la fosfatasa ácida y alcalina fueron medidas de acuerdo a la metodología de Begmeyer (1974) incubando los extractos en una solución al 2% de 4-nitrofenil fosfato a pH 5.5 y a 25 °C. Una unidad de actividad fue definida como la liberación de 1 µg de naftil por minuto, utilizando el coeficiente de extinción molar de 0.0185.

Todas las determinaciones se realizaron por triplicado y la actividad enzimática se calculó empleando las siguientes ecuaciones:

Actividad por ml:

$$U/ml = \frac{\Delta \text{absorbancia} \times \text{FD}(\text{ml})}{\text{CEM tirosina} \times \text{T}(\text{min})}$$

Actividad total (por individuo):

$$U/\text{larva} = (U/ml)/N$$

Actividad específica:

$$U/\text{mg P} = \frac{U/ml}{\text{mg P/ml}}$$

En donde, U: unidades de actividad enzimática, Δ absorbancia: incremento en la absorbancia con respecto al blanco; FD: volumen final de la reacción/volumen del extracto

enzimático; CEM: coeficiente de extinción molar; T: tiempo de incubación en minutos; N: número de larvas por ml de extracto enzimático y mg P: miligramos de proteína soluble en el extracto.

## 2.5. Efecto del alimento en el crecimiento y la actividad de proteasas digestivas

Las larvas se obtuvieron de acuerdo a la sección 2.1 y se dividieron de manera aleatoria en 6 peceras de 10 l de un sistema recirculado, a una densidad de 11.3 larvas/l. Se utilizaron dos protocolos de alimentación, en ambos se alimentó en exceso y con la misma frecuencia (4 veces/día). Los protocolos de alimentación fueron:

A) Destete temprano. Se alimentó con nauplios de *Artemia*, iniciando a los 8 DDE y hasta los 15 DDE. A partir del día 16 se inició la transición del alimento vivo al formulado, con un cambio del 20% diario, de modo que a partir del día 20 se alimentó exclusivamente con un alimento peletizado (45% proteína, cuadro 1), formulado y fabricado en el Laboratorio de Nutrición de la Escuela de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional.

B) Alimento formulado. Se alimentó desde los 8 DDE hasta el final del experimento, el día 28, con la misma dieta usada en A) a una ración diaria del 100% de la masa corporal.

C)

Los muestreos se realizaron a los 8, 12, 16, 20, 24 y 28 DDE. El crecimiento se calculó como la tasa específica de crecimiento (TEC), tanto en periodos como para el periodo total.

$$TEC = (\ln Pf - \ln Pi / t2-t1) * 100$$

En donde, Pf: peso o longitud final; Pi: peso o longitud inicial; t2: día final y t1: día inicial. Para realizar los análisis bioquímicos, los extractos se prepararon como en la sección 2.4.1, excepto que en vez de buffer, se utilizó agua desionizada. La concentración de proteína soluble en los extractos se cuantificó como en 2.4.2. Se evaluaron los niveles de proteasas alcalinas y ácidas totales empleando la metodología de Sarath *et al.* (1989). En la determinación de las proteasas alcalinas se utilizó azocaseína al 2% a pH 9.0 como sustrato

y para las proteasas ácidas (tipo pepsina) se utilizó hemoglobina al 2% a pH 2.0. En ambos casos, las mezclas de reacción se incubaron a 37 °C. Una unidad de actividad enzimática se definió como el incremento en 1 unidad de absorbancia por minuto.

## **2.6. Evaluación del efecto inhibitorio de harinas vegetales sobre las proteasas digestivas alcalinas**

En este estudio se utilizaron larvas obtenidas a partir de desoves naturales del cruce de hembras híbridas (♂ *P. dovii* X ♀ *Parachromis managuensis*) con machos de *P. dovii*, ya que no se contó con desoves de hembras puras de *P. dovii* durante el período de la investigación. Estas hembras híbridas fueron fenotípicamente idénticas a las hembras de *P. dovii*. La reproducción y el cultivo larval se realizaron como en la sección 2.1. y las larvas obtenidas mostraron una talla similar a las larvas de *P. dovii*. Los muestreos se realizaron a los 15, 22 y 30 DDE y los extractos enzimáticos se prepararon como en el punto 2.4., excepto que se utilizó agua desionizada en vez de buffer para realizar el homogenizado. La actividad proteolítica alcalina total de los extractos se cuantificó como en 2.4.

Se evaluaron siete harinas de origen vegetal: soya, acemite de trigo, maíz, puntilla de arroz, coquito de palma africana, semolina de arroz y harina de trigo; seleccionadas de acuerdo a su valor nutricional para peces y su disponibilidad en el mercado nacional. La composición proximal de las harinas se muestra en el cuadro 2.

Las disoluciones de las harinas se prepararon siguiendo la metodología de Alarcón *et al.* (2001). El porcentaje de inhibición de la actividad proteolítica alcalina producido por las harinas vegetales se cuantificó siguiendo el procedimiento descrito por García-Carreño *et al.* (1996). En breve, se añadieron 500 µg del extracto vegetal por cada UA de proteasas alcalinas totales presentes en 20 µl de extracto enzimático, y buffer pH 9.0. La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 60 minutos. Luego se cuantificó la actividad proteolítica residual, para esto se utilizó caseína al 0.5% y se incubó la reacción por 45 minutos a 37°C. Al terminar el tiempo de incubación, se detuvo la reacción con ácido tricloroacético (TCA) 20%, se centrifugó a 16 000 x g durante 5 minutos y se leyó la absorbancia del sobrenadante a 280 nm. En los blancos de actividad el TCA se añadió junto

con la caseína. En los controles de actividad se sustituyó la harina vegetal por agua desionizada. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

El porcentaje de inhibición (%I) se definió como la reducción porcentual de la actividad enzimática (calculada como en 2.4) con respecto al control de actividad.

## **2.7. Evaluación de la digestibilidad alcalina *in vitro* de la proteína de ingredientes dietarios**

Para este ensayo se utilizaron únicamente organismos de 30 DDE, obtenidos del mismo desove que en 2.4. Los extractos enzimáticos se prepararon utilizando una relación de 1:5 P:V (peso de los paquetes viscerales: volumen de agua desionizada) y la actividad proteolítica alcalina total de los extractos se cuantificó como en 2.4.

Se evaluaron seis ingredientes, uno importado: harina de pescado de Panamá, y cinco de origen local: harina de pescado (de subproductos de atún), harina de soya, harina de Tortave (sub-productos del procesamiento de pollos), harina de sangre y harina de carne y hueso; los cuales fueron seleccionados en base a su contenido de proteína (Cuadro 2), precio y disponibilidad en el mercado local. Todos los ingredientes fueron finamente macerados y tamizados para obtener un mismo tamaño de partícula (75  $\mu\text{m}$ ).

La digestibilidad proteica *in vitro* de los ingredientes se evaluó empleando la técnica del pH-STAT, según la metodología descrita por Dimes y Haard (1994). Brevemente, 40 mg de proteína de cada ingrediente proteico se disolvieron en agua destilada y el pH se ajustó a 8.0 durante 15 min. Se adicionó una cantidad de extracto enzimático equivalente a 12 UA de proteasas alcalinas totales, al cual previamente se le ajustó el pH a 8.0. El volumen final de la mezcla de reacción se ajustó a 5 ml con agua destilada. La titulación se realizó durante 45 min, con agitación continua y a temperatura ambiente (aproximadamente 25°C), utilizando un titulador automático.

El porcentaje de enlaces peptídicos hidrolizados conocido como grado de hidrólisis proteica (GH) del sustrato (ingrediente) se calculó a partir de la siguiente ecuación:

Valverde *et al.* 2013. Ontogenia del Sistema Digestivo del Guapote Lagunero *Parachromis dovii* durante el Periodo Larval y Selección de Ingredientes para su Alimentación. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Alvarez-González, C. (Eds), Contribuciones Recientes en Alimentación y Nutrición Acuícola, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, pp. 320-355.

$$GH = B \times N_B \times 1/\alpha \times 1/M_p \times 1/h_{tot} \times 100\%$$

En donde, B: volumen (mL) del NaOH usado para mantener el pH en 8.0 durante el tiempo de reacción determinado;  $N_B$ : normalidad de la base (0.1 N);  $\alpha$ : grado promedio de disociación de los grupos  $\alpha$ -aminoácidos liberados durante la hidrólisis, determinado por la ecuación  $\alpha = (10^{\text{pH} - \text{pK}}) / (1 + 10^{\text{pH} - \text{pK}})$  donde los valores de pK son dependientes de la temperatura y tamaño del péptido. Por lo tanto, el valor de  $1/\alpha$  es el factor de calibración de  $\alpha$  para el pH-STAT, que de acuerdo a Adler-Nissen (1986), a un pH de 8.0 y una temperatura de reacción cercana a 25 °C,  $1/\alpha = 1.5$ ;  $M_p$ : masa de proteína cruda en la mezcla de reacción, estimada al multiplicar la concentración de nitrógeno (N) obtenido por el método Kjeldahl (1883) por un factor de conversión adecuado ( $f_N$ ); y  $h_{tot}$ : contenido total de enlaces peptídicos en la proteína, el cual es expresado como equivalentes de enlaces peptídicos por kilogramo (o miliequivalente por gramo), siendo 8.0 meq/g una buena aproximación (Adler-Nissen, 1986).

Cada determinación fue realizada por triplicado para cada ingrediente, las líneas base se realizaron por duplicado. Los valores de autohidrólisis se obtuvieron de las líneas base y se expresaron como un porcentaje de aquellos obtenidos al emplear los extractos enzimáticos digestivos (Alarcón *et al* 2002).

Se utilizó la caseína como proteína de referencia, asignándole a su GH un valor de 100 y asignándole a cada ingrediente probado un valor porcentual de digestibilidad con respecto a la caseína.

Cuadro 2. Composición proximal (% base seca) de los ingredientes evaluados en las secciones 2.6 y 2.7. Promedios  $\pm$  desviación estándar, n=2. ELN: extracto libre de nitrógeno.

Ingrediente	Proteína %	Lípidos %	ELN %	Ceniza %
Harina de pescado de Panamá	64.83 $\pm$ 1.85	14.13 $\pm$ 0.01	0.26	20.78 $\pm$ 0.01
H. de pescado local	58.83 $\pm$ 0.12	10.51 $\pm$ 0.16	6.25	24.41 $\pm$ 0.10
H. Tortave	51.51 $\pm$ 0.44	35.28 $\pm$ 0.52	0.9	12.31 $\pm$ 0.11
H. de carne y hueso	39.48 $\pm$ 1.20	19.67 $\pm$ 0.52	4.74	36.11 $\pm$ 0.67
H. de sangre	89.60 $\pm$ 0.60	1.29 $\pm$ 0.11	0.04	9.07 $\pm$ 0.11
H. de soya	55.10 $\pm$ 0.01	3.96 $\pm$ 0.10	33.82	7.12 $\pm$ 0.03
H. de acemite de trigo	19.38 $\pm$ 0.75	7.78 $\pm$ 0.53	67.26	5.58 $\pm$ 0.01
H. de maíz	11.65 $\pm$ 0.32	9.11 $\pm$ 0.42	76.07	3.17 $\pm$ 0.02
H. de puntilla de arroz	9.76 $\pm$ 0.13	4.32 $\pm$ 0.09	84.96	0.97 $\pm$ 0.02
H. de coquito de palma	15.28 $\pm$ 0.48	10.33 $\pm$ 0.37	70.17	4.23 $\pm$ 0.05
H. de semolina de arroz	13.86 $\pm$ 0.27	12.05 $\pm$ 0.40	62.26	11.83 $\pm$ 0.52
H. de trigo	12.50 $\pm$ 0.61	6.88 $\pm$ 0.32	79.55	1.06 $\pm$ 0.01

## 2.8. Análisis estadístico

Para determinar si hubo diferencias en el crecimiento, sobrevivencia y en la actividad enzimática, entre los protocolos de alimentación utilizados en el apartado 2.5, se realizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA). Los resultados del porcentaje de inhibición enzimática de cada ingrediente (2.6) se compararon mediante un ANOVA y una prueba de rangos múltiples, al igual que los resultados de digestibilidad *in vitro* (2.7). Todas las pruebas se realizaron a un nivel de significancia de 0.05, utilizando el paquete estadístico Statgraphics Centurion XV.

### 3. Resultados

#### 3.1. Desarrollo histológico del sistema digestivo

Las larvas de guapote lagunero recién eclosionadas (0 DDE,  $6.43 \pm 0.13$  mm) presentaron un tubo digestivo recto e indiferenciado, cerrado en la parte anterior y posterior, en posición dorsal al saco vitelino. El saco vitelino fue largo y de forma ovoide, con varias gotas de aceite. Las glándulas digestivas accesorias, como el hígado y el páncreas no se visualizaron en ese momento. La pigmentación de los ojos inició algunas horas después de la eclosión. Dos DDE ( $7.66 \pm 0.12$ ) empezó a formarse la vejiga gaseosa, en posición dorsal al intestino. El hígado aumentó bastante de tamaño y se observaron acumulaciones lipídicas en los hepatocitos. Las larvas abrieron la boca a los 3 DDE ( $7.95 \pm 0.24$  mm), lo cual coincidió con el inicio de la diferenciación del tubo digestivo en: buco-faringe, esófago, estómago incipiente, el cual consistió en un ensanchamiento al final del esófago presentando células en acino (futuras glándulas gástricas), el intestino anterior y posterior, cuya mucosa empezaba a formar pliegues. Además, el esófago presentó células globet y el páncreas presentó gránulos acidofílicos (zimógenos) (Fig. 1a-c).

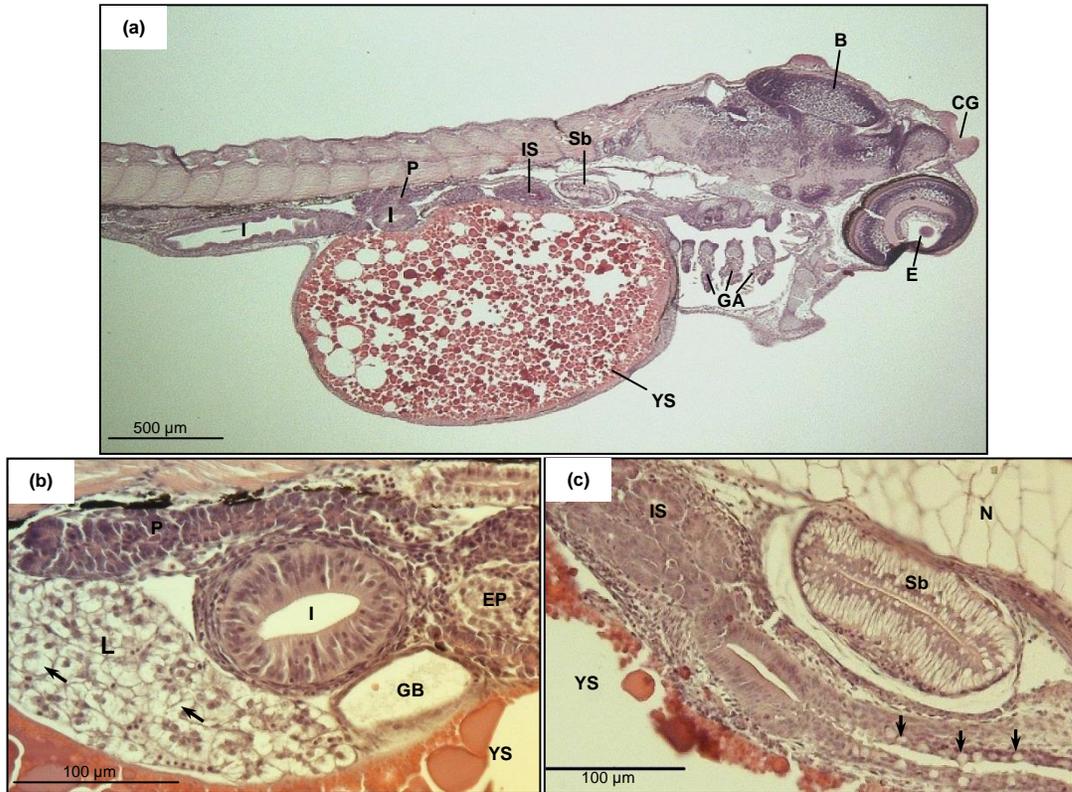


Figura 1. Cortes longitudinales de larvas tres DDE. (a) Vista general. (b) Páncreas e hígado, las flechas señalan las vacuolas lipídicas de los hepatocitos. (c) Estómago y vejiga natatoria incipientes, las flechas señalan las células globet en el esófago. B: cerebro, CG: glándula adhesiva, E: ojo, EP: páncreas endocrino, GA: arcos branquiales, I: intestino, IS: estómago incipiente, L: hígado, N: notocordio, P: páncreas exocrino, Sb: vejiga natatoria, YS: saco vitelino.

A los 5 DDE ( $8.31 \pm 0.14$  mm) se empezó a inflar la vejiga natatoria y se abrió el ano. A los 6 DDE ( $8.58 \pm 12$  mm) las larvas nadaban libremente en la columna de agua e iniciaron el periodo de alimentación mixta: exógena y endógena. Estas larvas presentaron un estómago con glándulas gástricas, dentro del cual había quistes de *Artemia* (Fig. 2a-b). Además, se completó la torsión del intestino, el cual presentaba una mucosa con más pliegues y células globet (Fig. 2c).

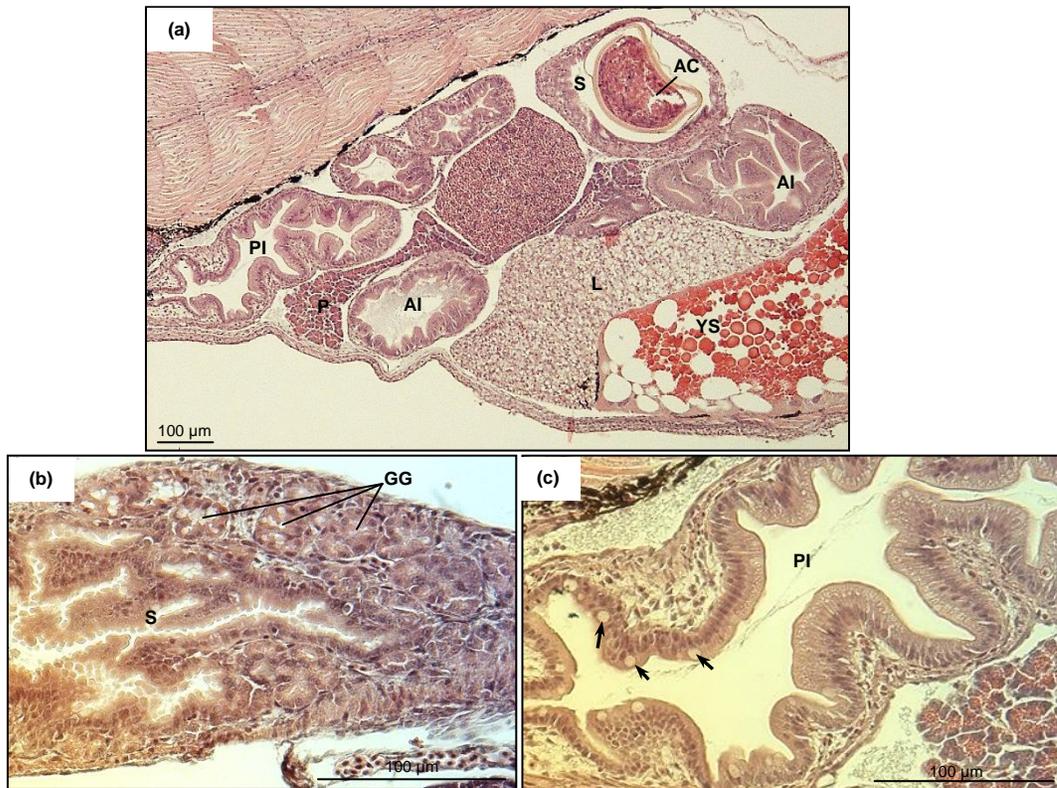


Figura 2. Cortes longitudinales de larvas 6 DDE. (a) Vista general mostrando la presencia de un quiste de *Artemia* en el estómago. (b) Intestino posterior, las flechas señalan las células globet. (c) Estómago con glándulas gástricas. AC: quiste de *Artemia*, GG: glándulas gástricas, IA: intestino anterior, IP: intestino posterior, L: hígado, P: páncreas exocrino, S: estómago, YS: saco vitelino.

A los 9 DDE ( $10.20 \pm 0.24$  mm) aparecieron vacuolas lipídicas supranucleares en las células del epitelio intestinal, las cuales ocupan la mayor parte del citoplasma (Fig. 3b). El estómago parece bien desarrollado, con muchos pliegues y glándulas gástricas (Fig. 3a). Casi todas las reservas vitelinas se han consumido, principalmente quedaban gotas de aceite que se terminaron de consumir aproximadamente 15 DDE ( $14.61 \pm 0.23$  mm). Posteriormente, no se observaron cambios en las estructuras del sistema digestivo, excepto por la formación de depósitos de grasa (adipocitos) en el páncreas y el aumento en volumen de todos los órganos digestivos (Fig. 3c).

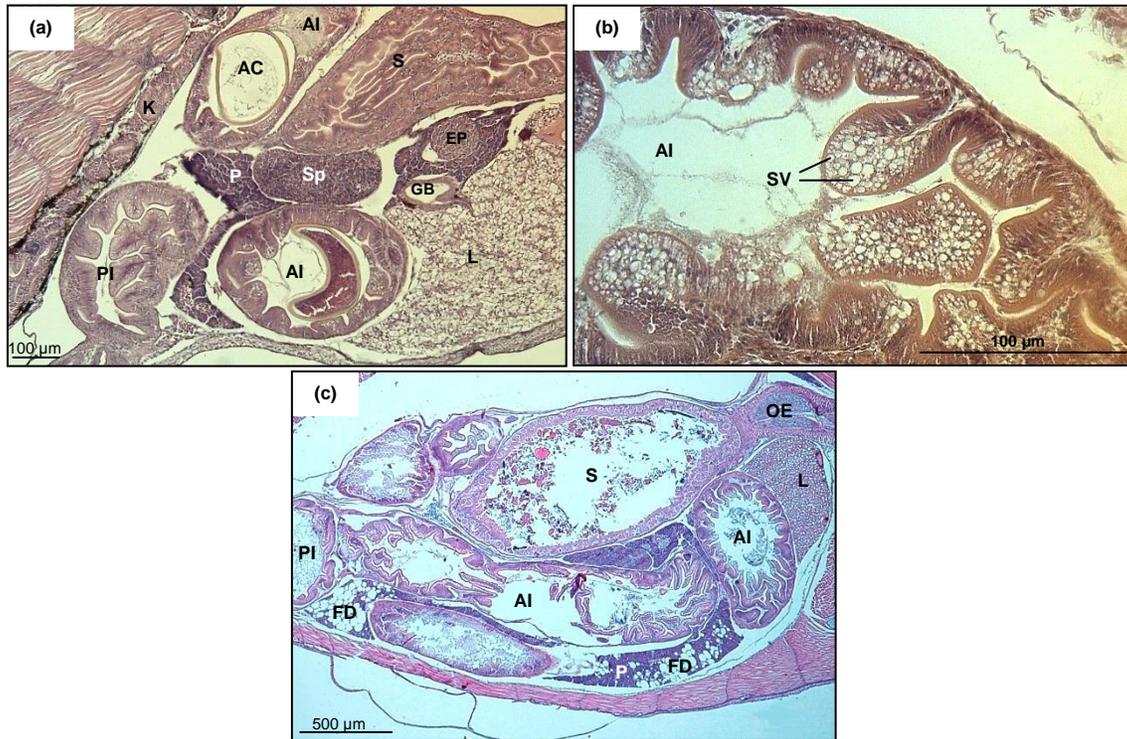


Figura 3. Cortes longitudinales de larvas de 9 y 25 DDE. (a) Vista general a los 9 DDE mostrando la presencia de quistes de *Artemia* en el intestino anterior. (b) Intestino posterior, los enterocitos presentan inclusiones lipídicas supranucleares. (c) Vista general a los 25 DDE (final del periodo larval) mostrando depósitos de grasa (adipocitos) en el páncreas.

AC: quiste de *Artemia*, EP: páncreas endocrino, FD: depósitos de grasa, GB: vesícula biliar, IA: intestino anterior, IP: intestino posterior, L: hígado, OE: esófago, P: páncreas exocrino, S: estómago, Sp: bazo, SV: vacuolas lipídicas supranucleares.

### 3.2. Ontogenia enzimática

Al inicio de la alimentación exógena, el peso húmedo y la longitud total de las larvas utilizadas para la descripción de la ontogenia enzimática fue de  $7.56 \pm 0.31$  mg y  $9.49 \pm 0.28$  mm respectivamente. Al final del periodo de estudio (40 DDE), las larvas pesaron  $268.66 \pm 25.44$  mg y midieron  $27.66 \pm 1.06$  mm (Fig. 4).

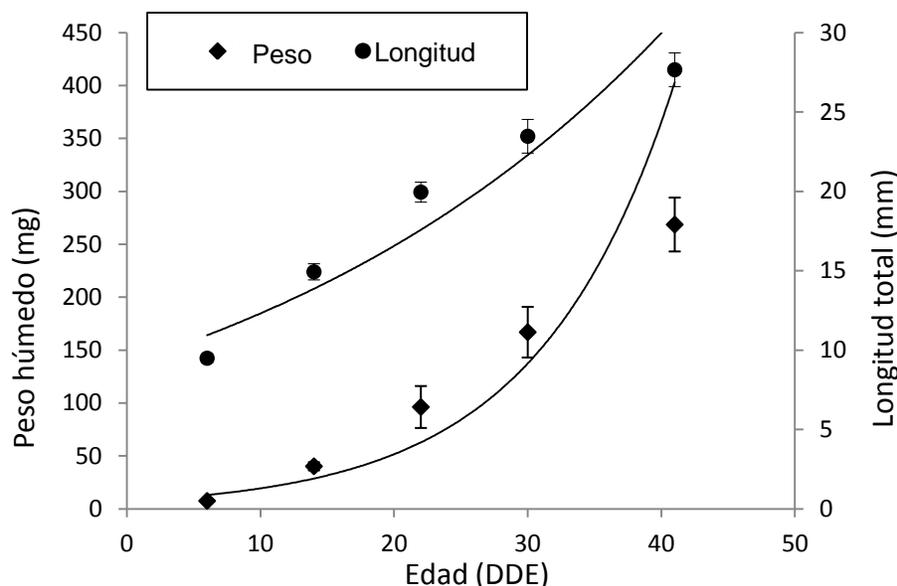


Figura 4. Peso húmedo y longitud total de larvas de *P. dovii* (promedio  $\pm$  DE, n=30).

Todas las enzimas evaluadas se detectaron desde el primer día de muestreo. La actividad específica de proteasas ácidas mostró los niveles más altos al inicio y al final del periodo de muestreo (6 y 41 DDE), mostrando fluctuaciones entre esos días (Fig. 5a). La actividad específica de proteasas alcalinas presentó los mayores niveles a los 14 y 41 DDE (Fig. 5b). La actividad específica de la tripsina se incrementó ligeramente a los 14 DDE, para disminuir paulatinamente hasta los 41 DDE (Fig. 5c). Por el contrario, la actividad específica de la quimotripsina fue incrementando paulatinamente hasta los 41 DDE (Fig. 5d). La actividad específica de leucina-aminopeptidasa mostró un patrón de variación temporal similar a las proteasas alcalinas, con un pico a los 14 DDE y un máximo a los 41 (Fig. 5e). Finalmente, la actividad específica de la carboxipeptidasa A disminuyó de los 6 a los 14 DDE, para luego incrementarse hasta un máximo a los 30 DDE y volver a disminuir a los 41 días (Fig. 5f).

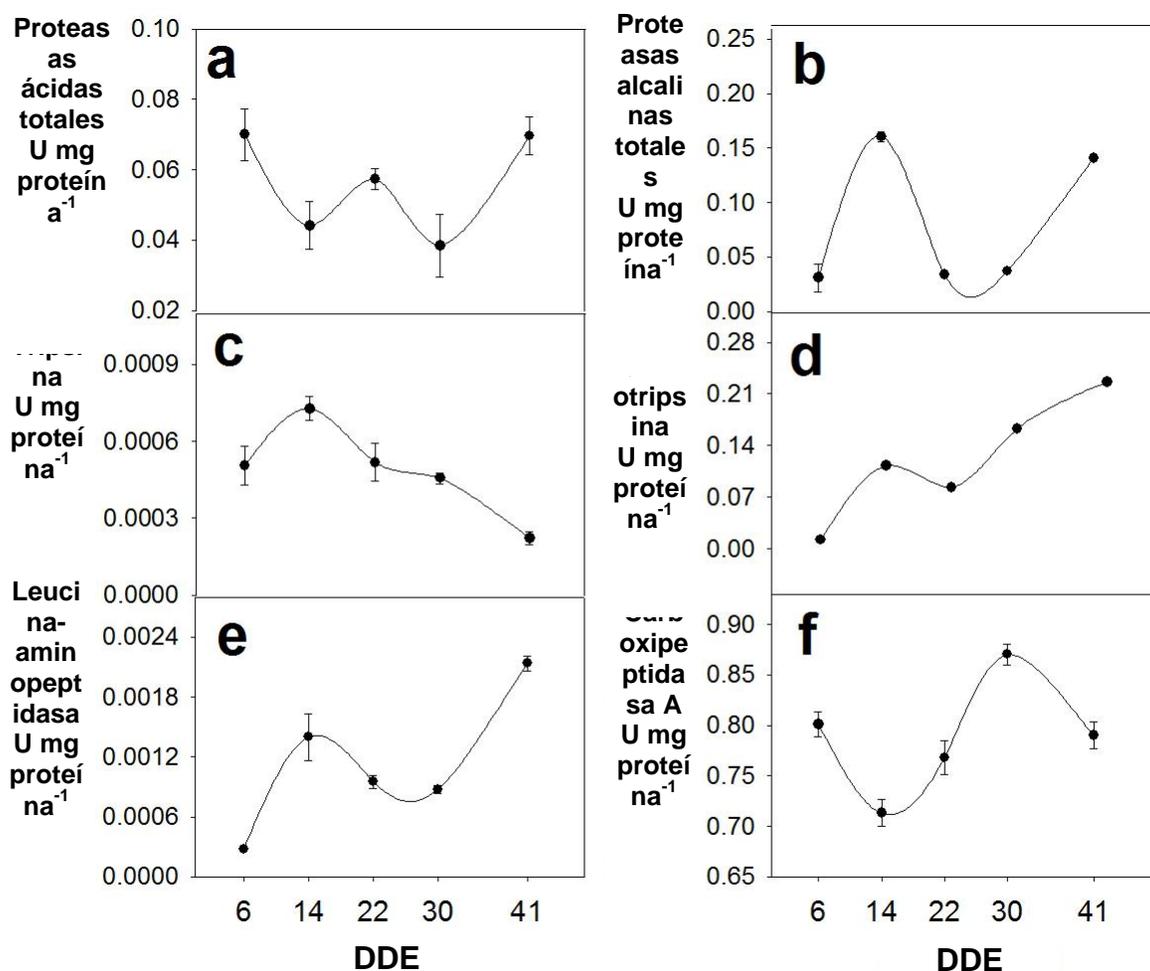


Figura 5. Actividad específica de proteasas digestivas durante la ontogenia inicial de *P. dovii* (promedio  $\pm$  DE). (a) Proteasas ácidas, (b) proteasas alcalinas, (c) tripsina, (d) quimotripsina, (e) leucina-aminopeptidasa y (f) carboxipeptidasa A.

La actividad específica de la lipasas (Fig. 6a) presentó un pico a los 14 DDE y después alcanzó un máximo a los 41 DDE. La actividad específica de la  $\alpha$ -amilasa fue fluctuante, con un pico a los 22 DDE y un máximo a los 41 DDE (Fig. 6b). La actividad específica de la fosfatasa ácida, presentó su mínima actividad a los 6 DDE, luego alcanzó su valor mayor a los 14 DDE, para disminuir gradualmente hasta los 41 DDE (Fig. 6c). Finalmente, la actividad específica de fosfatasa alcalina mostró un pico de máxima actividad a los 22 DDE (Fig. 6d).

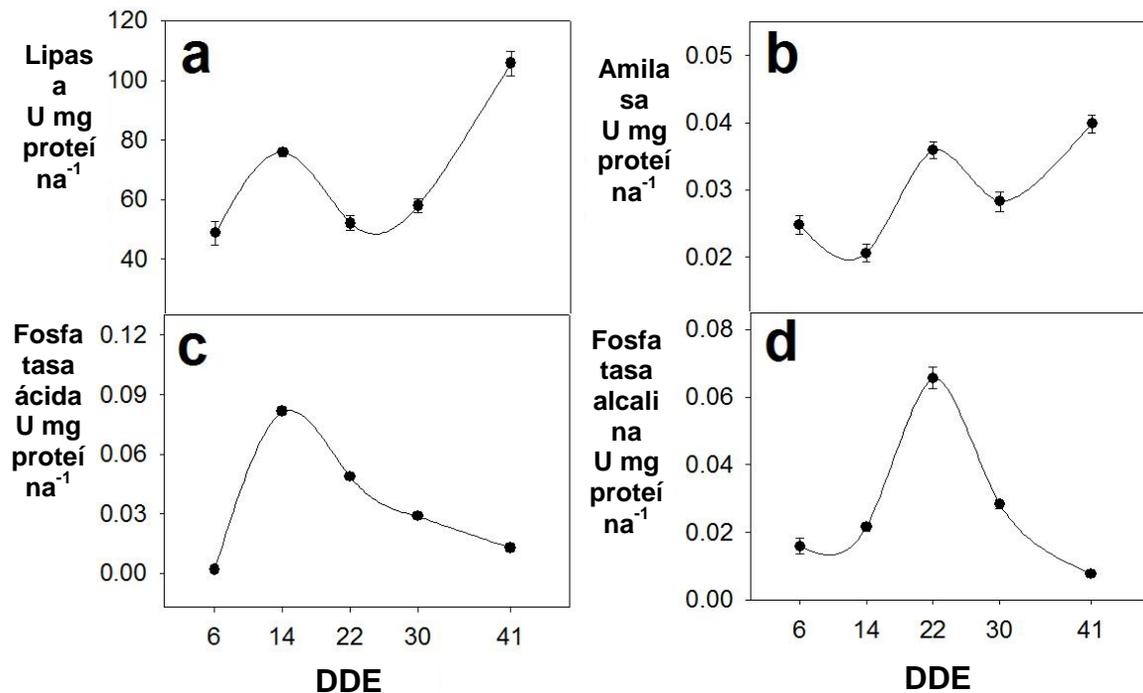


Figura 6. Actividad específica de diferentes enzimas digestivas durante la ontogenia inicial de *P. dovii* (promedio  $\pm$  DE, n=3). (a) Lipasa, (b)  $\alpha$ -amilasa, (c) fosfatasa ácida y (d) fosfatasa alcalina.

### 3.3. Efecto del alimento en el crecimiento y la actividad de proteasas digestivas

La supervivencia fue de 99.1% para el protocolo A (destete temprano) y de 97.9% para el protocolo B (uso exclusivo de alimento formulado), no encontrándose diferencia significativa ( $P=0.106$ ).

El incremento en la longitud total al final del periodo experimental fue superior para el protocolo A que con el B,  $9.10 \pm 0.25$  mm vs  $3.94 \pm 0.09$  mm, respectivamente. Este incremento correspondió a una tasa específica de crecimiento en longitud de  $3.40 \pm 0.07\%$  diario y  $1.77 \pm 0.05\%$  diario. El periodo de mejor crecimiento para el tratamiento A ocurrió al inicio de la alimentación, entre los 8 y 12 DDE y para el tratamiento B, avanzado el periodo larval, entre los 20 y 24 DDE (Cuadro 3).

Se observó la misma tendencia para el peso corporal (PC). El incremento en peso de las larvas para todo el periodo también fue superior y más acelerado en el tratamiento A que en B,  $81.31 \pm 2.41$  mg vs  $20.64 \pm 0.57$  mg, respectivamente. La tasa específica de crecimiento en peso correspondiente fue de  $12.25 \pm 0.11$  %  $\text{PCd}^{-1}$  para el protocolo A y de  $6.53 \pm 0.27$  %  $\text{PCd}^{-1}$  para el protocolo B. En el protocolo A, el crecimiento en peso más destacado sucedió entre los 8 y 12 DDE y en el protocolo B entre los 16 y 20 DDE (Cuadro 3).

Cuadro 3. Tasa específica de crecimiento (TEC, %  $\text{d}^{-1}$ ) en longitud y peso por periodo para larvas de *P. dovii*, según el protocolo de alimentación. Promedio  $\pm$  error estándar,  $n=3$ . Los promedios en la misma fila, con letras distintas indican diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre tratamientos.

DDE	TEC Longitud total		TEC Peso	
	Protocolo A	Protocolo B	Protocolo A	Protocolo B
8-12	$6.39 \pm 0.50^a$	$1.39 \pm 0.34^b$	$20.67 \pm 1.36^a$	$1.32 \pm 1.23^b$
13-16	$3.92 \pm 0.57^a$	$1.76 \pm 0.30^b$	$18.02 \pm 0.93^a$	$6.93 \pm 0.91^b$
17-20	$3.33 \pm 0.02^a$	$1.95 \pm 0.21^b$	$8.80 \pm 0.65^a$	$8.37 \pm 0.53^a$
21-24	$1.51 \pm 0.22^a$	$2.46 \pm 0.42^a$	$6.21 \pm 0.45^a$	$8.14 \pm 1.76^a$
25-28	$1.85 \pm 0.34^a$	$1.28 \pm 0.23^a$	$7.58 \pm 1.50^a$	$8.01 \pm 1.34^a$

Con respecto a la actividad individual de proteasas alcalinas totales (U/larva), las larvas alimentadas con el protocolo A presentaron una mayor actividad (Figura 7a), mostrando dos picos, uno 16 DDE y otro mayor a 24 DDE. Con el protocolo B, las larvas aumentaron progresivamente su actividad proteolítica alcalina y el valor máximo se obtuvo al final del experimento. En términos de la actividad específica (U/mg proteína), los resultados fueron similares para ambos protocolos de alimentación (Figura 7b). La única diferencia notable consistió en la mayor actividad presentada por las larvas del protocolo A a los 24 DDE.

Las larvas presentaron actividad de proteasas ácidas (tipo pepsina) desde el inicio de la alimentación exógena. Los cambios temporales en los niveles de actividad de estas enzimas, en ambos protocolos de alimentación, fueron similares a los presentados por las

proteasas alcalinas, tanto para la actividad total como para la actividad específica (Figura 7c y 7d).

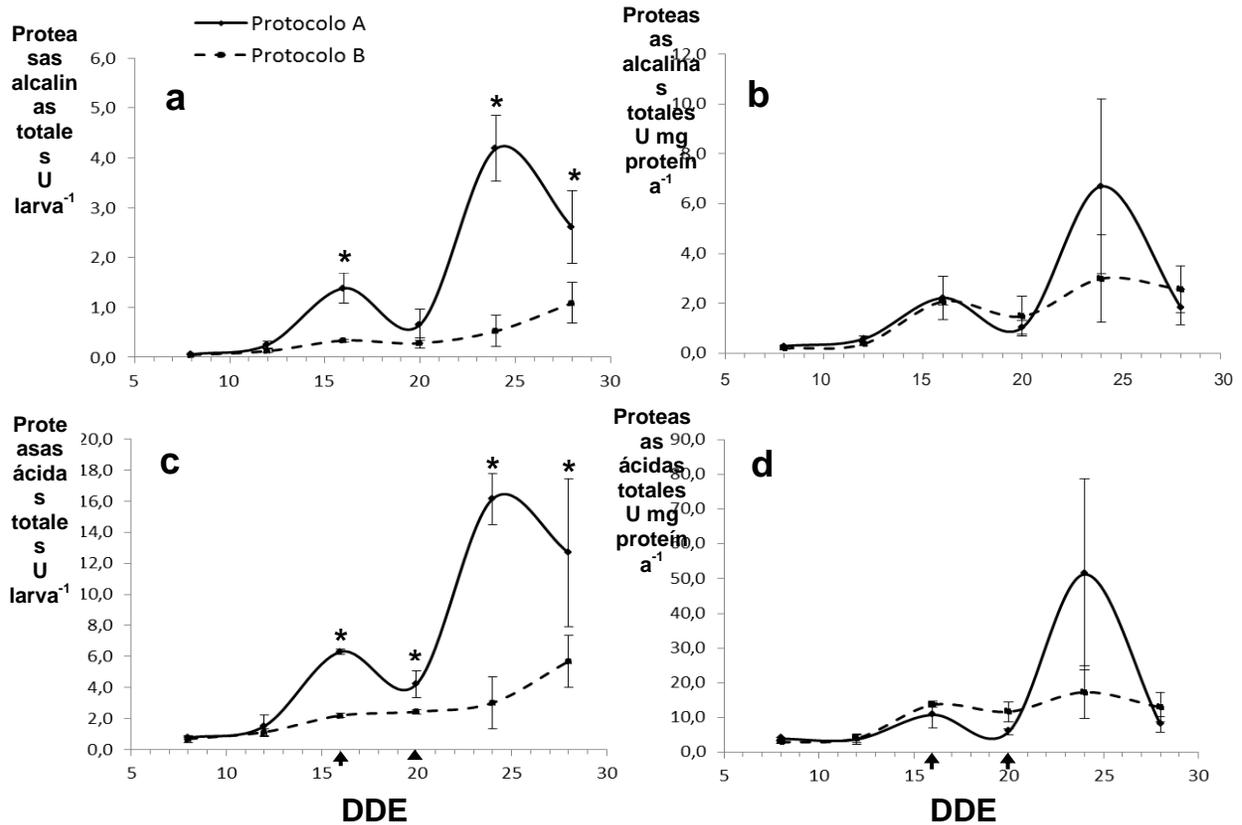


Figura 7. Actividad proteolítica de *P. dovii* durante el periodo larval de acuerdo al protocolo de alimentación (protocolo A= destete temprano, protocolo B= uso exclusivo de alimento formulado). a) Actividad alcalina total; b) actividad alcalina específica; c) actividad ácida total; d) actividad ácida específica. Promedios  $\pm$  error estándar, n=3. Los asteriscos indican diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ ) entre protocolos de alimentación. Las flechas en el eje X indican el inicio y final del destete en el protocolo A.

### 3.4. Evaluación del efecto inhibitorio de harinas vegetales sobre las proteasas digestivas alcalinas

Todas las harinas vegetales probadas redujeron la actividad proteolítica alcalina de las larvas de *P. dovii*. En general, las harinas de soya y acemite de trigo produjeron los porcentajes mayores de inhibición, mientras que las harinas de trigo y puntilla de arroz produjeron los valores más bajos ( $P \leq 0.05$ ). Sin embargo, se presentaron diferencias entre estadios de desarrollo, larvas de 30 DDE mostraron una sensibilidad mayor a los inhibidores presentes en estas harinas, excepto con las harinas de soya, coquito de palma y acemite de trigo (Fig. 8,  $P \leq 0.05$ ).

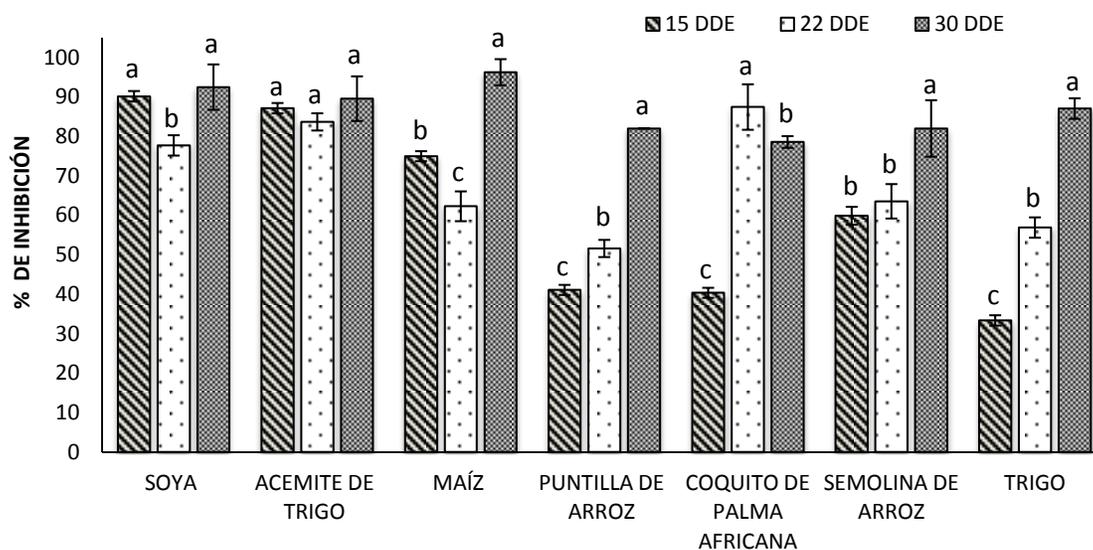


Figura 8. Porcentajes de inhibición de las proteasas digestivas alcalinas en larvas de *P. dovii* de 15, 22 y 30 DDE (promedios  $\pm$  DE). Los promedios con letras distintas indican diferencias significativas entre estadios larvales para la misma harina ( $P \leq 0.05$ ).

### 3.5. Evaluación de la digestibilidad alcalina *in vitro* de la proteína de ingredientes dietarios

El ingrediente que presentó el mayor valor de hidrólisis proteica y de digestibilidad alcalina *in vitro* de la proteína fue la harina de carne y hueso (res), superando incluso a la caseína

(empleada como patrón o control). Por el contrario, la harina que presentó el valor más bajo fue la harina de soya (Cuadro 4 y Fig. 9).

Cuadro 4. Grado de hidrólisis proteica (GH) y porcentaje de digestibilidad alcalina de la proteína utilizando extractos enzimáticos de *P. doyii* de 30 DDE. Promedios  $\pm$  DE, n=3. Los valores con letras diferentes indican diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ ).

Harina	GH	Digestibilidad
Caseína	2.67 $\pm$ 0.07	100.00 $\pm$ 2.62 <sup>a</sup>
Harina de carne y hueso	3.04 $\pm$ 0.17	113.92 $\pm$ 6.17 <sup>b</sup>
H. de pescado de Panamá	2.00 $\pm$ 0.09	74.92 $\pm$ 3.4 <sup>c</sup>
H. de Tortave	1.87 $\pm$ 0.08	69.99 $\pm$ 2.68 <sup>c</sup>
H. de pescado local	1.41 $\pm$ 0.13	52.85 $\pm$ 4.72 <sup>d</sup>
H. de sangre	1.01 $\pm$ 0.06	38.07 $\pm$ 2.03 <sup>e</sup>
H. de soya	0.53 $\pm$ 0.00	19.82 $\pm$ 0.00 <sup>f</sup>

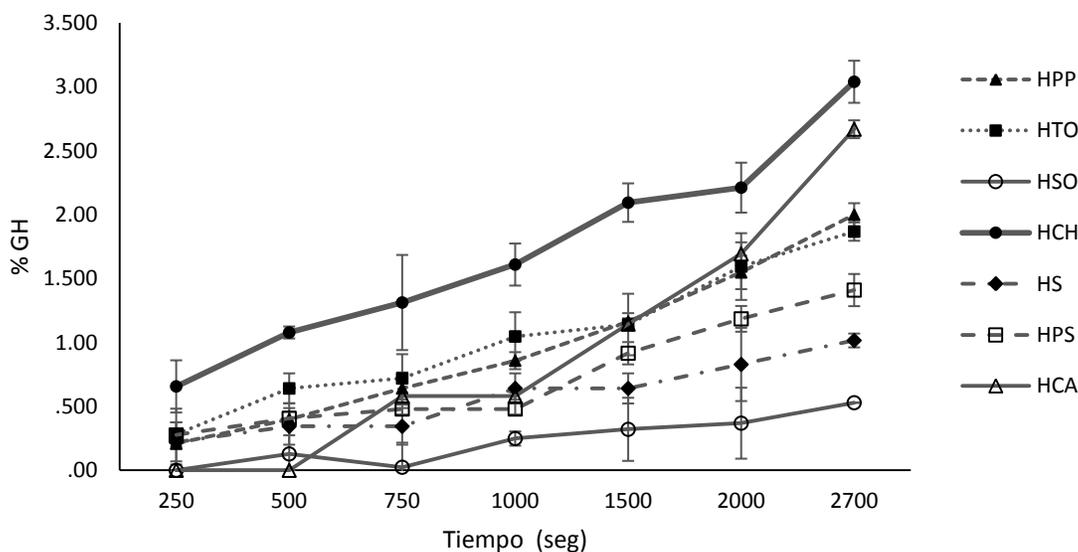


Figura 9. Porcentaje de hidrólisis proteica en condiciones alcalinas, en función del tiempo, utilizando extractos enzimáticos de *P. doyii* de 30 DDE. Promedios  $\pm$  DE, n=3. HPP: harina

de pescado Panamá, HTO: harina de tortave, HSO: harina de soya, HCH: harina de carne y hueso, HS: harina de sangre, HPS: harina de pescado local y HCA: caseína.

#### 4. Discusión

El desarrollo macroscópico (boca, ojos, ano, etc.) de las larvas coincidió con lo reportado por Cabrera *et al.* (1988) para esta misma especie, quienes reportaron el final de la etapa larval y el inicio de la fase de alevín a los 20 DDE, cuando aparecen las primeras escamas.

El desarrollo del sistema digestivo de larvas de *P. dovii* fue similar al reportado para otros cíclidos y otras especies de agua dulce (ver revisión en Treviño *et al.* 2011). Sin embargo, el tiempo que tardan en diferenciarse las estructuras digestivas varía entre distintas especies. Estas diferencias temporales se relacionan con las estrategias reproductivas de cada especie (Balon 1975). La ontogenia del sistema digestivo de los cíclidos que desovan sobre un sustrato, como *P. dovii* (presente trabajo), *Cichlasoma dimerus* (Meijide y Guerrero 2000), *Oreochromis niloticus* (Morrison *et al.* 2001), *Petenia splendida* (Treviño *et al.* 2011) y *Cichlasoma urophthalmus* (Cuenca-Soria *et al.* 2013), es más acelerada que en cíclidos que son incubadores bucales, como *Labeotropheus* sp. (Fishelson 1995). Las larvas de los desovadores en sustrato se desarrollan más rápidamente para maximizar sus posibilidades de sobrevivencia; mientras que las larvas que reciben protección parental (incubadores bucales) pueden dirigir su energía al crecimiento u otros propósitos (Lazo *et al.* 2011).

Bajo las condiciones de cultivo empleadas en este estudio, *P. dovii* agotó sus reservas vitelinas 11 días después de haber iniciado la alimentación exógena. Este es un periodo de tiempo bastante largo, similar al encontrado en larvas de *P. splendida* (Treviño *et al.* 2011). Según Gisbert y Williot (1997), la presencia de este alimento endógeno podría facilitar la transición hacia la alimentación exógena y constituye una ventaja en caso de que se retrase su inicio.

El estómago de las larvas de *P. dovii* mostró una morfología uniforme, igual a lo presentado por *P. splendida* (Treviño *et al.* 2011), lo cual indica que realiza principalmente

digestión química, en vez de una combinación de digestión química y mecánica, como en otras especies de peces que presentan una diferenciación del estómago en regiones cardiaca, fúndica o pilórica (Zambonino-Infante *et al.* 2008).

La presencia de vacuolas lipídicas supranucleares en el epitelio intestinal, a partir de los 9 DDE, indica que aunque las larvas pueden digerir y absorber los lípidos del alimento (endógeno y exógeno) y transportarlos hasta el hígado, su habilidad de transporte debe ser limitada (Gisberth *et al.* 2005). Los depósitos de grasas que se presentan posteriormente (a partir de los 15 DDE) en el páncreas, podrían indicar que el tipo de alimento suministrado (*Artemia*) o la cantidad excede el requerimiento lipídico de esta especie.

Con respecto a la ontogenia enzimática, se encontró actividad de las enzimas evaluadas desde antes del inicio de la alimentación exógena, la cual inició a los 6 DDE. Esto concuerda con lo reportado para *O. niloticus* (Tengjaroenkul *et al.* 2002), *Oreochromis mossambicus* (Lo y Weng 2006), *C. urophthalmus* (López-Ramírez *et al.* 2011) y *P. splendida* (Treviño *et al.*, 2011). Según Zambonino-Infante y Cahu (2001), las larvas de la mayoría de especies de peces cuentan con un amplio espectro de enzimas digestivas desde antes del inicio de la alimentación exógena, por lo que la actividad inicial parece estar genéticamente programada.

La alta actividad de proteasas digestivas ácidas encontrada a los 6 DDE coincide con la presencia de glándulas gástricas en el estómago de las larvas de esta edad, e indica que el estómago es funcional (Fig. 5a y 2b). La determinación del momento en que el estómago es funcional es importante, ya que para muchos autores es cuando se debe iniciar el uso de alimentos formulados (Lazo *et al.* 2007). El que la actividad ácida específica ( $U \cdot mg \text{ proteína}^{-1}$ ) haya sido mayor al inicio, podría deberse a un menor contenido de otras proteínas solubles en los extractos, debido a que el estómago es muy pequeño a esta edad. Mientras que el incremento en la actividad encontrado a los 41 DDE podría deberse a que esta edad el estómago posee una gran cantidad de glándulas gástricas capaces de secretar proteasas ácidas.

El incremento de la actividad específica de las proteasas alcalinas totales durante los primeros días es indicativo del desarrollo del páncreas y del intestino; mientras que el descenso posterior coincidió con el final de la etapa larval y el inicio de la fase de alevín (alrededor a los 22 DDE). Este patrón ha sido reportado para otras especies y se cree que se relaciona con cambios fisiológicos que suceden durante el desarrollo larval, tales como la reducción en la síntesis de enzimas digestivas, el aumento en otras proteínas solubles en los extractos, la aparición de otras hormonas o enzimas, o podría estar genéticamente programado (Zambonino-Infante y Cahu 2001; Lazo *et al.* 2007). El aumento de la actividad proteolítica de *P. dovii* al final, puede asociarse con el paso de larva a alevín y a la presencia del sistema digestivo completamente desarrollado (Fig. 5b y 3c).

Las fluctuaciones (aumentos y descensos) en la actividad específica de tripsina y quimiotripsina (endo-proteasas) (Fig. 5c y d) también se han reportado en larvas de otras especies, como *Sciaenops ocellatus* (Lazo *et al.* 2007), y se ha hipotetizado que se deben a cambios genéticamente programados y a variaciones en el alimento natural de los organismos (Zambonino-Infante y Cahu 2001).

Según Zambonino-Infante y Cahu (1994) la leucina-aminopeptidasa y las fosfatasa ácidas y alcalinas, que son enzimas del epitelio intestinal, son indicadores de la maduración de los enterocitos y del intestino. De manera que en larvas de *P. dovii* esto sucede entre los 14 y 22 DDE, de acuerdo a los patrones de actividad presentados por esas enzimas.

Los picos de actividad específica de lipasas y amilasas a los 14 y 22 DDE, respectivamente, podrían relacionarse, al igual que en el caso de las proteasas, con el desarrollo y maduración del sistema digestivo, específicamente del páncreas. Luego del periodo de transición de larva a juvenil (22-30 DDE), los niveles de ambas enzimas incrementaron, coincidiendo con lo reportado para *P. splendida*. Según Uscanga-Martínez *et al.* (2011), esto le permite a las larvas un mayor aprovechamiento del alimento natural, debido a que pueden hidrolizar el glucógeno de sus presas, ya que esta es una especie carnívora, con hábitos piscívoros.

La aceptación de alimento formulado en larvas de *P. dovii*, desde el inicio de la alimentación exógena, produjo un incremento en peso y longitud, sin afectar su supervivencia. Esto demuestra que el sistema digestivo de estos organismos se encuentra lo suficientemente desarrollado para digerir y asimilar dietas formuladas desde el inicio de la alimentación exógena. Sin embargo, el alimento formulado empleado produjo una tasa específica de crecimiento muy baja (cuadro 3). Según Lazo (2000) entre las razones que se han postulado sobre el pobre desempeño de las dietas formuladas destacan: carecer de sustancias que estimulen su ingestión; no estimular la secreción de zimógenos hacia el tubo digestivo, o inhibir ciertas enzimas digestivas ya presentes; ser deficientes en nutrientes esenciales (como amino ácidos, ácidos grasos, vitaminas, etc.); proveer nutrientes esenciales pero, con una estructura química inadecuada para su digestión, absorción y eficiente utilización, o en un proporciones inadecuadas.

Los estudios de crecimiento en larvas de peces de agua dulce muestran resultados variables al emplear diferentes alimentos. En carpas, Rottman *et al.* (1991) obtuvieron mayor crecimiento con *Artemia* en *Ctenopharyngodon idella* y con una dieta formulada en *Hypophthalmichthys nobilis*. Las larvas del gaspar *Atractosteus spatula* tuvieron un mejor crecimiento al alimentarse con dietas formuladas (Mendoza *et al.* 2008). Drossou *et al.* (2006) no encontraron diferencia en el crecimiento de larvas de la tilapia *O. niloticus* alimentadas con *Artemia* o una dieta para alevines de trucha. Pareciera que, además de la especie, el adecuado crecimiento de las larvas está ligado al suministro de dietas adecuadas a la capacidad digestiva de los organismos en cultivo, sus requerimientos nutricionales y las condiciones de crianza.

Con respecto al efecto del alimento en la actividad enzimática, según Zambonino-Infante y Cahu (2001), la composición de la dieta puede modular (disminuir o incrementar) la actividad de ciertas enzimas digestivas. De acuerdo con Hofer y Wee (citados por Drossou *et al.* 2006), la producción de enzimas proteolíticas aumenta con el uso de alimentos inadecuados, ya que las larvas intentan compensar la mala calidad del alimento produciendo más enzimas. Además, el tiempo de tránsito intestinal en las larvas es menor que en los juveniles, a causa de una menor longitud intestinal, por lo que tienen menos

tiempo para la digestión y absorción. Una mayor producción enzimática requiere de un gasto energético considerable, lo cual produce un menor crecimiento. Esto concuerda con los resultados obtenidos en términos de actividad proteolítica específica, para ambos grupos de proteasas, ya que sus niveles fueron muy semejantes entre ambos protocolos (A: *Artemia* y B: alimento inerte), incluso llegando a ser menores para el protocolo A en determinados momentos (Fig. 7b y d).

Los niveles de actividad específica de las proteasas ácidas y alcalinas mostraron el mismo patrón de variación temporal dentro de cada tratamiento. Con el protocolo B, la actividad de ambas enzimas mostró un aumento progresivo a lo largo del periodo larval, lo que indica que hubo cierta compensación debida al alimento formulado. Con el protocolo A, los niveles de actividad proteolítica disminuyeron ligeramente durante el periodo de destete, lo que sugiere que hubo un efecto por el cambio de alimento. Sin embargo, estas fluctuaciones también se presentaron al alimentar las larvas exclusivamente con *Artemia* (Fig. 5). De manera que, como se mencionó antes, podrían deberse a cambios fisiológicos o a programas genéticos innatos (Zambonino-Infante y Cahu 2001; Lazo *et al.* 2007). El aumento en la actividad enzimática luego del destete, cuando las larvas se alimentaban exclusivamente con la dieta formulada, podría deberse a una compensación fisiológica. Por el contrario, el descenso en la actividad específica al final del periodo larval podría indicar que el sistema digestivo es entonces capaz de digerir y asimilar adecuadamente el alimento formulado.

La menor actividad de proteasas ácidas determinada en este ensayo (efecto del alimento en la actividad proteolítica), en comparación con lo reportado para la ontogenia enzimática (Fig. 7d y 5a, respectivamente), pudo ser influenciada por la forma de preparar los extractos enzimáticos, ya que en el primer caso se prepararon en agua destilada y no en buffer a pH 2.0, lo cual pudo causar cierto grado de inactivación de estas enzimas.

Además del conocimiento de la ontogenia digestiva y el efecto del alimento sobre esta, la selección de ingredientes adecuados es fundamental para la formulación de dietas capaces de maximizar el crecimiento de las larvas. Por esta razón, en este trabajo se realizó la

evaluación *in vitro* de varios ingredientes, por medio de ensayos de inhibición de la actividad proteolítica alcalina para valorar ingredientes de origen vegetal, y usando el método de pH-Stat, para evaluar la digestibilidad proteica alcalina de ingredientes ricos en proteína, tanto de origen animal como vegetal.

Los resultados obtenidos al evaluar el efecto de diferentes ingredientes de origen vegetal en la actividad proteolítica alcalina de las larvas de *P. dovii*, indican que la susceptibilidad a los inhibidores está influenciada por el estadio de desarrollo larval (Fig. 8). Esto podría deberse a los cambios temporales en los niveles de las diferentes proteasas digestivas durante el periodo larval (Fig. 5). Debido a lo anterior, se recomienda la formulación de dietas específicas para cada estadio del desarrollo larval, que incluyan los ingredientes que presenten la menor inhibición de las proteasas y la mayor digestibilidad.

En otros estudios realizados en peces marinos y dulceacuícolas, se ha reportado que el efecto de los inhibidores presentes en las harinas vegetales varía en dependencia del ingrediente, la cantidad suministrada y la especie (El-Sayed *et al.* 2000; Alarcón *et al.* 2001; Chong *et al.* 2002; Pérez *et al.* 2003; Santiagosa *et al.* 2008; Rodiles *et al.* 2012).

Al comparar los ingredientes evaluados, independientemente del estadio de desarrollo, se determinó que la harina de soya y el acemite de trigo produjeron la mayor inhibición ( $p \leq 0.05$ ). El efecto de la soya coincide con los resultados obtenidos por Pérez *et al.* (2003) con *Piaractus mesopotamicus*, así como por Alarcón *et al.* (2001) en *Lutjanus argentiventris* y *Lutjanus novemfasciatus*. Además, El-Sayed *et al.* (2000) reportan una disminución del crecimiento y aprovechamiento del alimento en *O. niloticus*, al utilizar la soya como sustituto de la harina de pescado. Por el contrario, Chong *et al.* (2002) encontraron poca inhibición enzimática en *Symphysodon spp.*, sugiriendo la inclusión de esta fuente proteica en la dieta.

Existen dos grupos de inhibidores de proteasas en la soya: el inhibidor Kunitz y el inhibidor Bowman-Birt, que inhiben tanto a la tripsina como a la quimiotripsina. Además, la soya presenta otros factores antinutricionales (FANs) como los fitatos, los cuales no actúan directamente sobre las proteasas, pero pueden formar complejos fitato-proteína que disminuyen la acción de las proteasas digestivas de las larvas sobre la proteína (National

Research Council 2011). En el caso de los inhibidores de proteasas, estos se pueden inactivar en cierto grado con tratamientos térmicos (Alarcón *et al.* 2001).

Con respecto a la harina de trigo, Moyano *et al.* (1999) determinaron su efecto en adultos de *O. niloticus*, *Sparus aurata* y *Solea senegalensis*, encontrando mayor inhibición en las proteasas de *S. senegalensis*, mientras que sus derivados, como el salvado de trigo (en concentraciones bajas), mostraron porcentajes de inhibición menores que con derivados del arroz (afrechillo de arroz) en adultos de *P. mesopotamicus* y *Odontesthes bonaerensis* (Pérez *et al.* 2003).

De igual forma, con la harina maíz se ha determinado un efecto inhibitorio sobre la enzima tripsina (Jamal *et al.* 2012). En el caso de la harina de coquito de palma africana, su inclusión en niveles mayores al 10% produjo una reducción en el crecimiento de *O. aureus* (Iluyemi *et al.* 2010), la cual pudo ser causada, en parte, por la presencia de inhibidores de proteasas y otros FANs. Sin embargo, procesos de biocoversión, como la fermentación con *Trichoderma koningii*, han mejorado la digestibilidad de la proteína en híbridos de tilapia (Ng *et al.* 2002; Hem *et al.* 2008).

Los valores de digestibilidad alcalina obtenidos en este trabajo con alevines de *P. dovii* de 30 DDE son similares a los reportados por Álvarez-González *et al.* (2008) para juveniles de *P. splendida*, otro cíclido carnívoro, quienes obtuvieron valores bajos de digestibilidad alcalina para la harina de soya y para la harina de sangre de res y valores altos para la caseína, la harina de vísceras de pollo y la harina de pescado. De igual manera, con *Centropomus undecimalis*, otra especie carnívora, se obtuvo resultados similares (Concha-Frías 2008).

Según Uscanga-Martínez *et al.* (2011), el comportamiento de la digestibilidad de las diferentes fuentes de proteínas se relaciona con los hábitos alimenticios, por lo que al ser estas especies carnívoras tendrán mayor capacidad de hidrolizar las harinas de origen animal. Además, el bajo valor de digestibilidad alcalina *in vitro* obtenido para la harina de soya se relaciona también con la presencia de inhibidores de proteasas (Fig. 9 y 8).

Valverde *et al.* 2013. Ontogenia del Sistema Digestivo del Guapote Lagunero *Parachromis dovii* durante el Periodo Larval y Selección de Ingredientes para su Alimentación. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Alvarez-González, C. (Eds), Contribuciones Recientes en Alimentación y Nutrición Acuicola, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, pp. 320-355.

Con base en los resultados de digestibilidad *in vitro*, se podrían iniciar ensayos para sustituir en algún porcentaje la harina de pescado, ya sea por harina de tortave o harina de carne y hueso, tomando también en consideración su perfil de aminoácidos.

En conclusión, las larvas de *P. dovii* cuentan con un sistema digestivo lo suficientemente desarrollado, con las estructuras y las enzimas digestivas necesarias para digerir y asimilar el alimento formulado, desde el inicio de la alimentación exógena. Sin embargo, el alimento formulado debe diseñarse con base en los requerimientos nutricionales y en la capacidad digestiva en cada fase del desarrollo larval. De manera que todavía falta por determinar los requerimientos nutricionales, así como cuantificar la digestibilidad *in vitro* de otros ingredientes y para diferentes estadios del desarrollo larval, con el fin de formular una dieta adecuada para las larvas de esta especie.

### **Agradecimientos**

Los autores agradecen al Dr. Juan Alberto Morales del Laboratorio de Patología de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional (UNA), por su colaboración con la histología de las larvas y al Lic. Cristian Fonseca, del Laboratorio de Calidad de Productos Pesqueros de la Estación de Biología Marina de la UNA, por la realización de los análisis proximales de las harinas evaluadas.

## Referencias bibliográficas

- Adler-Nissen, J. 1986. Enzymic hydrolysis of food proteins. Elsevier Applied Science Publishers, London, UK.
- Alarcón, F.J., F.L. García-Carreño & M.A. Navarrete del Toro (2001) Effect of plant protease inhibitors on digestive proteases in two fish species, *Lutjanus argentiventris* and *L. novemfasciatus*. Fish Physiology and Biochemistry 24, 179-189.
- Alarcón, F.J., F.J. Moyano & M. Díaz (2002) Evaluation of different protein sources for aquafeeds by an optimized pH-stat system. J. of the Sci. of Food and Agric. 82, 1-8.
- Álvarez-González, C.A, G. Márquez-Couturier, L. Arias-Rodríguez, W.M Contreras-Sánchez, A. Uscanga-Martínez, N. Perales-García, F.J Moyano-López, R. Civera-Cerecedo, E. Goytuotua-Bores, L. Isidro-Olán, J.A Almeida-Madrigal, D. Tovar-Ramírez, J.N Gutiérrez-Rivera, L.M. Arévalo-Galán, E.Gisbert, L. Treviño & B. Morles-Sánchez (2008) Avances en la fisiología digestiva y nutrición de la mojarra tenguayaca *Petenia splendida*. En: L.E. Cruz Suárez, D. Ricque Marie, M. Tapia Salazar, M. G. Nieto López, D.A. Villarreal Cavazos, J.P. Lazo Corvea y M.T. Viana (ed). Avances en Nutrición Acuícola IX. Memorias del Noveno Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. Universidad Autónoma de Nuevo León. Monterrey, N.L. México, pp. 135-235.
- Anson, M.L. (1938) The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin. The Journal of General Physiology 22, 79-89.
- Balon, E. K. (1975) Reproductive guilds of fishes: a proposal and definition. J. Fish. Res. Board Can. 32, 1663-1670.
- Bergmeyer, H.U. (1974) Phosphatases: Methods of enzymatic analysis, Vol 2. Academic Press, New York.
- Beux, L.F. & E. Zaniboni-Filho (2008) *Artemia* sp. Proportions and Effects on Survival and Growth of Pintado, *Pseudoplatystoma corruscans* Larvae. J. Appl. Aqua. 20, 184-199.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 72, 248-25
- Bussing, W.A. (2002) Peces de las Aguas Continentales de Costa Rica. Editorial de la Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica.
- Cabrera, J., R. Murillo & M. Mora (1988) Desarrollo embrionario, larval y del alevín de *Cichlasoma dovii* (Günther, 1864) (Pisces: Cichlidae). Rev. Biol. Trop. 36, 417- 422.
- Chong, A., R. Hashim & A.B. Ali (2002) Inhibition of protease activities in discus *Symphysodon spp.* by three plant meals. Aquaculture International 10, 433-441.
- Concha-Frías, B. (2008) Evaluación de la capacidad digestiva de juveniles de *Centropomus undecimalis* (Bloch, 1792), sobre diferentes ingredientes proteínicos. Tesis de Maestría. Universidad Católica del Norte, Chile.

- Cuenca-Soria, C.A., C.A. Álvarez-González, J.L. Ortiz-Galindo, D. Tovar-Ramírez, R. Guerrero-Zárate, S. Aguilar-Hernández, M.A. Perera-García, R. Hernández-Gómez, & E. Gisbert (2013) Histological development of the digestive system of Mayan cichlid *Cichlasoma urophthalmus* (Günther 1862). *J. Appl. Ichthyol.* doi: 10.1111/jai.12307.
- DelMar, E.G., C. Largman, J. Brodrick & M. Geokas (1979) A sensitive new substrate for chymotrypsin. *Anal Biochem* 99, 316-20.
- Dimes, L.E. & N. Haard (1994) Estimation of protein digestibility: Development of an in vitro method for estimating protein digestibility in salmonids (*Salmo gairdneri*). *Comp. Biochem. Physiol.* 108A, 349-362.
- Drossou, A., B. Ueberschär, H. Rosenthal & K.H. Herzig (2006) Ontogenic development of the proteolytic digestion activities in larvae of *Oreochromis niloticus* fed with different diets. *Aquaculture* 256, 479-488.
- El-Sayed, A.-F.M., I. Martínez & F.J. Moyano (2000) Assessment of the effect of plant inhibitors on digestive proteases of Nile tilapia using *in vitro* assays. *Aquaculture International* 8, 403-415.
- Erlanger, B., N. Kokowsky & W. Cohen (1961) The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Arch Biochem Biophys* 95, 271-278.
- Fishelson, L. (1995) Ontogenesis of cytological structures around the yolk sac during embryologic and early larval development of some cichlid fishes. *J. Fish Biol.* 47, 479-491.
- Folk, J.E. & E.W. Schirmer (1963) The porcine pancreatic carboxypeptidase A system. *J Biol Chem* 238, 3884-3894.
- Francis, G., H.P.S. Makkar & K. Becker (2001) Antinutritional factors present in plant-derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish. *Aquaculture* 199, 197-227.
- García-Carreño, F.L., M.A. Navarrete del Toro, M. Díaz-López, M.P. Hernández-Cortes & J.M. Ezquerro (1996) Proteinase inhibition of fish muscle enzymes using legume seed extracts. *J Food Protec* 59, 312-8.
- Gisbert, E. & P. Williot (1997) Larval behaviour and effect of the timing of initial feeding on growth and survival of Siberian sturgeon larvae under small scale hatchery production. *Aquaculture* 156, 63-76.
- Gisbert, E., L. Villeneuve, J.L. Zambonino-Infante, P. Quazuguel & C.L. Cahu (2005) Dietary phospholipids are more efficient than neutral lipids for long-chain polyunsaturated fatty acid supply in European sea bass *Dicentrarchus labrax* larval development. *Lipids* 40, 609-618.
- Günther, J. (1996) Crecimiento del guapote lagunero (*Cichlasoma dovii*) en régimen de cultivo intensivo en estanques y su dependencia de la densidad. *UNICIENCIA* 13: 13-19.
- Günther, J. & J. Ulloa (1995) Growth and feed utilization of dow cichild (*Cichlasoma dovii*) larvae fed *Artemia* naupli. *Rev. Biol. Trop.* 43, 272-282.
- Hem, S., S. Toure, C. Sagbla & M. Legendre (2008) Bioconversion of palm kernel meal for aquaculture. Experiences from the forest region (Republic of Guinea). *African Journal of Biotechnology* 7, 1192-1198.

- Iluyemi, F.B., M.M. Hanafi, O. Radziah & M.S. Kamarudin (2010) Nutritional evaluation of fermented palm kernel cake using red tilapia. *African Journal of Biotechnology* 9, 502-507.
- Jamal, F., P.K. Pandey, D. Singh & M.Y. Khan (2012) Serine protease inhibitors in plants: nature's arsenal crafted for insect predators. *Phytochem Rev*, 12, 1-34.
- Kjeldahl, C. (1883) New method for determination of nitrogen in organic materials. *Z. Analyt. Chem.* 22, 366-382.
- Lazo, J.P. (2000) Conocimiento actual y nuevas perspectivas en el desarrollo de dietas para larvas de peces marinos. En: L.E. Cruz -Suárez, D. Ricque-Marie, M. Tapia-Salazar, M.A. Olvera-Novoa y R. Civera-Cerecedo (ed.). *Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*. Mérida, Yucatán, México, pp. 300-312.
- Lazo, J.P., G.J. Holt & C.R. Arnold (2002) Towards the development of suitable microdiets for substitution of live prey in the rearing of red drum larvae: applications of studies on the digestive physiology. *Fisheries Science* 68, 888-891.
- Lazo, J.P., R. Mendoza, G.J. Holt, C. Aguilera & C.R. Arnold (2007) Characterization of digestive enzymes during larval development of red drum (*Sciaenops ocellatus*). *Aquaculture* 265, 194-205.
- Lazo, J.P., M.J. Darias & E. Gisbert (2011) Ontogeny of the digestive tract. In: *Larval Fish Nutrition*. G.J. Holt (ed.), pp. 1-46. John Wiley & Sons, UK.
- Lo, M.-J. & C.-F. Weng (2006) Developmental regulation of gastric pepsin and pancreatic serine protease in larvae of the euryhaline teleost, *Oreochromis mossambicus*. *Aquaculture* 261, 1403-1412.
- López-Ramírez, G., C.A. Cuenca-Soria, C.A. Alvarez-González, D. Tovar-Ramírez, J.L. Ortiz-Galindo, N. Perales-García, G. Márquez-Couturier G, L. Arias-Rodríguez, J.R. Indy, W.M. Contreras-Sánchez, E. Gisbert & F.J. Moyano (2011) Development of digestive enzymes in larvae of Mayan cichlid *Cichlasoma urophthalmus*. *Fish Physiol Biochem.* 37, 197-208.
- Maraux, S., D. Louvard & J. Baratti J (1973) The aminopeptidase from hog-intestinal brush border. *Acta Biochim Biophys* 321, 282-295.
- Martínez-Montaña, E. & J.P. Lazo (2012) *In vitro* protein digestibility of dietary ingredients throughout ontogeny of California halibut, *Paralichthys californicus*, larvae. *Journal of the World Aquaculture Society* 43, 51-62.
- Meijide, F. J. & G.A. Guerrero (2000) Embryonic and larval development of a substrate-brooding cichlid *Cichlasoma dimerus* (Heckel, 1940) under laboratory conditions. *J. Zool.* 252, 481-493.
- Mendoza, R., C. Aguilera, L. Carreón, J. Montemayor & M. González (2008) Weaning of alligator gar (*Atractosteus spatula*) larvae to artificial diets. *Aquaculture Nutrition* 1, 223-231.
- Morrison, C.M., T. Miyake & J.R. Wrigh Jr (2001) Histological study of the development of the embryo and early larva of *Oreochromis niloticus* (Pisces: Cichlidae). *J. Morphol.* 247, 172-195.
- Moyano, F.J. (2006) Bioquímica digestiva en especies acuicultivadas: aplicaciones en Nutrición. En: L.E. Cruz Suárez, D.R. Marie, M. Tapia Salazar, M.G. Nieto López, D.A. Villarreal Cavazos, A.C. Puello Cruz y A. García Ortega (ed.). *Avances de Nutrición Acuícola VIII. VIII Simposium Internacional*
- Valverde *et al.* 2013. Ontogenia del Sistema Digestivo del Guapote Lagunero *Parachromis dovii* durante el Periodo Larval y Selección de Ingredientes para su Alimentación. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Alvarez-González, C. (Eds), *Contribuciones Recientes en Alimentación y Nutrición Acuícola*, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, pp. 320-355.

- de Nutrición Acuícola. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, México, pp. 396-409.
- Moyano, F.J., I. Martínez, M. Díaz & F.J. Alarcon (1999) Inhibition of digestive proteases by vegetable meals in three fish species; seabream (*Sparus aurata*), tilapia (*Oreochromis niloticus*) and African sole (*Solea senegalensis*). *Comparative Biochemistry and Physiology* 122, 327-332.
- National Research Council (2011) Nutrient Requirements of Fish and Shrimp. The National Academies Press, Washington DC.
- Ng, W.-K., H.-A. Lim, S.-L. Lim & C.-O. Ibrahim (2002) Nutritive value of palm kernel meal pretreated with enzyme or fermented with *Trichodema koningii* (Oudemans) as a dietary ingredient for red hybrid tilapia (*Oreochromis sp.*). *Aquaculture Research* 33, 1199-1207.
- Pérez, J.J., G.A. Wicki, F.J. Moyano & F.J. Alarcón (2003) Evaluación del efecto de inhibidores de proteasa presentes en ingredientes vegetales utilizables en piensos para dos especies piscícolas cultivadas en Argentina; Pacú (*Piaractus mesopotamicus*) y Pejerrey (*Odontesthes bonaeriensis*). II Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura (CIVA), 442-454.
- Robyt, J.F. & W.J. Whelan (1968) The  $\alpha$ -amylases. In: Starch and its Derivates. J.A. Radley (ed.), pp. 477-497. Chapman and Hall, London, UK.
- Rodiles, A., E. Santigosa, M. Herrera, I. Hachero-Cruzado, M.L. Cordero, S. Martínez-Llorens, S.P. Lall, S. & F.J. Alarcón (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.
- Rottmann, R.W., J.V. Shireman & E.P. Lincoln (1991) Comparison of three live foods and two dry diets for intensive culture of grass carp and bighead carp. *Aquaculture* 96, 269-280.
- Santigosa, E., J. Sánchez, F. Médale, S. Kaushik, J. Pérez-Sánchez & M.A. Gallardo (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.
- Sarath, G., R.S. De la Motte & F.W. Wagner (1989) Protease assay methods. In: Proteolytic enzymes: a practical approach. R.J. Beynon and J.S. Bond (ed.), pp. 25-55. Oxford University Press, New York. USA.
- Tacon, A. (1990) Standard methods for the nutrition and feeding of farmed fish and shrimp. Argent Laboratories Press, USA.
- Tengjaroenkul, B., B.J. Smith, S.A. Smith & U. Chatreewongsin (2002) Ontogenic development of the intestinal enzymes of cultured Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L. *Aquaculture* 211, 241-251.
- Treviño, L., C.A. Álvarez-González, N. Perales-García, L. Arévalo-Galán, A. Uscanga-Martínez, G. Márquez-Couturier, I. Fernández & E. Gisbert (2011) A histological study of the organogenesis of the digestive system in bay snook *Petenia splendida* Günther (1862), from hatching to the juvenile stage. *J. Appl. Ichthyol.* 27, 73-82.

- Ulloa, J.B. (1997) Growth and feed utilization of *Cichlasoma dovii* juveniles fed practical diets containing different protein levels. *J. Aqua. Trop.* 12, 89-96.
- Uscanga-Martínez, A., F.J. Moyano-López, C.A. Álvarez-González & N. Perales-García. (2011) Aplicaciones a la mejora de la utilización nutritiva del alimento en cíclidos cultivados en México. En: L.E. Cruz-Suárez, D. Ricque-Marie, M. Tapia-Salazar, M.G. Nieto-López, D.A. Villarreal-Cavazo, J. Gamboa-Delgado y L. Hernández-Hernández. (ed.). *Avances en Nutrición Acuícola XI - Memorias del Décimo Primer Simposio Internacional de Nutrición Acuícola*. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México, pp. 46-104.
- Versaw, W., S.L. Cuppett, D.D. Winters & L.E. Williams (1989) An improved colorimetric assay for bacterial lipase in nonfat dry milk. *J Food Sci* 54, 232-254.
- Walter, H.E. (1984) Proteinases: methods with hemoglobin, casein and azocoll as substrates. In: *Methods of Enzymatic Analysis*. Vol. V. H.U. Bergmeyer (ed.), pp. 270-277. Verlag Chemic Weinheim, Germany.
- Zambonino-Infante, J.L. & C.L. Cahu (1994) Influence of diet on pepsin and some pancreatic enzymes in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Comp. Biochem. Physiol.* 109, 209-212.
- Zambonino-Infante, J.L. & C.L. Cahu (2001) Ontogeny of the gastrointestinal tract of marine fish larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 130, 477-487.
- Zambonino-Infante, J.L., E. Gisbert, C. Sarasquete, I. Navarro, J. Gutiérrez, J. & C.L. Cahu (2008) Ontogeny and physiology of the digestive system of marine fish larvae. In: *Feeding and digestive functions of fishes*. J. E. O. Cyrino, D. Bureau and B. G. Kapoor (ed.), pp. 277-344. Science Publishers Inc., Enfield, UK.