

Avances en la Fisiología Digestiva de la Mojarra Tahuina *Cichlasoma trimaculatum*

F.J. Toledo-Solís,¹ A. Uscanga-Martínez^{1*}, G. Marquez-Couturier², C.A. Álvarez-González³, R. Guerrero-Zárate², N. Perales-García¹, W.M. Contreras-Sánchez², R. Martínez-García²

¹ Laboratorio de Nutrición y Producción Acuícola, Campus del Mar, Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas, Tonalá, Chiapas. México. *arkady.uscanga@unicach.mx

² Laboratorio de Acuicultura Tropical, División Académica de Ciencias Biológicas, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Carretera Villahermosa-Cárdenas Km 0.5, C.P. 86039 Villahermosa, Tabasco, México.

Resumen

La tahuina es uno de los ciclidos más apreciados en el Sureste mexicano por lo que se ha venido desarrollando en el Laboratorio de Nutrición y Producción Acuícola del Campus del Mar-UNICACH una serie de investigaciones que ha permitido desarrollar el cultivo de esta especie. Sin embargo, el desarrollo de estos estudios es solamente la plataforma de una serie de trabajo que permitirá que se comience a explotar el cultivo de esta especie. Es así que en este trabajo se presentan los avances sobre la fisiología digestiva del *Cichlasoma trimaculatum*. Para ello se realizó el desarrollo de las enzimas digestivas durante la ontogenia inicial. Los resultados mostraron que la actividad de las proteasas alcalinas, tripsina y quimotripsina están presentes a partir del día 6 después de la eclosión (dde), durante la alimentación exógena con nauplios de *Artemia*. Las actividades de carboxipeptidasa A y leucina-aminopeptidasa están presentes desde los primeros días, incrementándose para los días 6 y 9 dde. En cambio la actividad de proteasa ácida está presente a partir del 9 dde. La electroforesis SDS-PAGE reveló seis tipos de bandas en las proteasas alcalinas, con peso molecular entre 113.4 y 20.4 kDa. Las primeras tres bandas aparecen en el día 6 dde, pero es hasta el día 11 dde cuando aparecen todas las isoformas. En base a estos resultados, se considera que esta especie completa su maquinaria enzimática digestiva a partir del día 9 después de eclosión. Así mismo, se realizó la caracterización de las proteasas digestivas en juveniles. En donde, se encontró que existe una mayor actividad de las proteasas alcalinas (3.95 ± 0.32 U/mg proteína) en relación a las proteasas ácidas (2.01 ± 0.57 U/mg proteína). La temperatura óptima de las proteasas alcalinas es de 60°C y son más termoestables a los cambios de temperatura, y las proteasa acidas a 50 °C. El pH óptimo de las proteasas ácidas resultó de pH 2, y en las

proteasas alcalinas de pH 10. El uso de los inhibidores específicos y el análisis de electroforesis SDS-PAGE revelaron siete tipos de bandas para las proteasas alcalinas y ponen en manifiesto la presencia mayoritaria de serina-proteasas; en las proteasas ácidas se inhibió más del 98% de la actividad con el inhibidor pepsina A. Por lo tanto, se pone en manifiesto que la digestión de *C. trimaculatum* está compuesta tanto de proteasas ácidas como de alcalinas, y desde el punto de vista enzimático apunta a ser considerada de hábitos omnívoros con tendencia a la carnívora.

Palabras clave: *Cichlasoma trimaculatum*; Enzimas digestivas; Inhibidor.

Introducción

La acuacultura a nivel mundial se basa en el cultivo de un número muy restringido de especies, en relación al total de especies acuáticas que se consumen en los mercados internacionales por captura. La razón de esto es la falta de estudios para determinar el potencial de cultivo de las especies, ya que implica la intervención de investigadores especializados en diversas disciplinas (Rojas y Mendoza, 2000). El objetivo principal de la acuacultura con fines comerciales es la obtención y producción de peces de tamaño adecuado para el consumo, en el menor tiempo posible y a bajo costo; uno de los requisitos para lograr este fin es cubrir satisfactoriamente todas sus necesidades tanto biológicas como ecológicas mediante la creación de condiciones ambientales óptimas (Steeffens, 1987).

Los cíclidos han tenido una gran importancia en acuacultura a nivel mundial y las especies africanas han sido esparcidas en la mayor parte de los trópicos y subtrópicos. Estos organismos han sido un gran éxito en pesquerías y en acuacultura en muchos países (Martínez-Palacios y Ross, 1994). En México el desarrollo de la acuacultura se ha apoyado en métodos y técnicas de cultivo que fueron diseñadas para especies exóticas; estas condiciones favorecieron la introducción de varias especies como: la carpa, la tilapia, el bagre y la trucha (Rojas y Mendoza, 2000).

Chiapas es el estado con mayor riqueza de peces continentales en México y el único con la influencia de dos vertientes de América (separadas por la Sierra Madre); además, forma parte de dos grandes provincias ictiolimnológicas tropicales, Chiapas-Nicaragua y Usumacinta (Miller, 1966; Nelson, 2004 *et al*; Rodiles-Hernández, *et al*, 2005). La vertiente del Pacífico tiene forma de una franja angosta (de 30 a 55 km) con una extensión de más de 260 km, por lo que la presencia de peces marinos que penetran a los sistemas estuarino-lagunares es considerable. La vertiente hidrológica del Atlántico es mucho más amplia y extensa (300 km en promedio, entre la sierra madre y la costa del Golfo de México) y está marcada por la influencia de dos importantes redes hidrológicas: la del río Grijalva y la del río Usumacinta, proveniente de Guatemala, que se unen en Frontera, Tabasco, menos de 20 km antes de desembocar al Golfo de México.

La seguridad alimentaria es considerada como uno de los principales problemas de la sociedad moderna. Esto es aun más preocupante en los países en vías de desarrollo (FAO, 2006). Una de las alternativas como fuente importante de alimento es la acuicultura con el cultivo de organismos acuáticos como: peces, moluscos, crustáceos y plantas acuáticas (Hepher, 2001; FAO, 2004).

El desarrollo y crecimiento de la piscicultura en México se ha basado en la introducción de especies exóticas. Las cuales se han domesticado para fines comerciales, principalmente tilapias, bagres, carpas y truchas, entre otras. Importando las técnicas de cultivo y adecuándolas a las condiciones de nuestro país (Baltazar, 2007). En consecuencia, los estudios sobre la biología básica de peces nativos con potencial para ser incorporados a la acuicultura local han sido escasos (Mendoza *et al.*, 1993; Martínez-Palacios y Ross, 1994; Rojas y Mendoza, 2000). El desarrollo de las técnicas de cultivo para estas especies, han avanzado conforme a los impactos ambientales generados por las diversas actividades humanas como pesca excesiva, contaminación, introducción de especies exóticas a ríos y lagunas, modificaciones al hábitat, etc. Así como también, al observar disminución en las poblaciones silvestres y cambios en las preferencias de consumos en las nuevas generaciones perdiendo identidad cultural y conocimiento empírico de los recursos naturales (Márquez, 2011).

La mojarra tahuina (*Cichlasoma trimaculatum*) es un cíclido nativo con potencial para el cultivo. Esta especie en México se distribuye en los estados de Guerrero, Oaxaca y Chiapas; habita preferentemente en aguas tranquilas como ríos, lagunas y en ambientes salobres como esteros con fondos arenosos o lodosos, y entre las raíces de los manglares (Orellana-Amador, 1992). Es de hábitos alimenticios omnívoros, pero con tendencia a la carnivoría durante algunos meses del año; se considera que presenta un rápido crecimiento, resistencia al manejo y acepta con facilidad alimentos balanceados (Violante, 1995). Además, de ser una especie con preferencia en el consumo sobre otras especies en los mercados locales; motivo por el cual presenta un elevado valor económico. Por lo tanto, es necesario continuar en la generación de conocimientos científicos que permitan establecer las bases metodológicas para el cultivo de esta especie, en áreas de investigación como fisiología reproductiva, fisiología digestiva y nutrición.

La alimentación en los sistemas de cultivo acuícolas es fundamental en el desarrollo de los organismos (Carrillo *et al.* 1987; Barletta, 2001). Por lo tanto, las dietas comerciales o formuladas deben de proporcionar los requerimientos nutricionales en cada etapa de desarrollo (D'Abramo y Lovell, 1991; Kim *et al.* 2002). Sin embargo, para la formulación de los alimentos balanceados es necesario conocer la participación de las enzimas digestivas debido a que estas son un reflejo de la capacidad digestiva de cada organismo; al estar directamente relacionada con la cantidad de enzimas digestivas disponible para el rompimiento de los alimentos (Pedersen y Eggum, 1983, Kendall *et al.* 1984).

En un sistema digestivo desarrollado las enzimas digestivas son las encargadas de llevar a cabo el proceso de digestión. El cual, se realiza mediante la hidrólisis enzimática, en donde los alimentos son transformados a nutrientes o moléculas más simples, que son fácilmente asimilables por las células del intestino (Chong-Carrillo y Vega-Villanasante, 2004). En los peces el proceso de digestión puede estar constituido por una fase ácida y una fase alcalina. Cuando existe una fase ácida se lleva a cabo en el estómago actuando principalmente la enzima pepsina y la secreción de HCl. La fase alcalina se realiza en el intestino, con ayuda de las proteasas (tripsina, quimotripsina, carboxipeptidasa y aminopeptidasas), lipasas, amilasas y fosfatasas (Alarcón, 1997). Por lo que es importante estudiarlas en cada fase del desarrollo, para saber desde cuando están presentes y son funcionales para iniciar el proceso de digestión

En peces con ontogenia indirecta (los cuales tienen un proceso de etapas durante el desarrollo como embrionaria, larvaria, juvenil, adulta y senectud), las larvas al momento de la eclosión cuentan con un sistema digestivo rudimentario, complementándose durante el desarrollo larval. El sistema digestivo es un simple tubo recto y corto sin diferenciación (Lazo, 2000). Este se comienza a diferenciar al finalizar la absorción del saco vitelino, segmentando para dar paso a la aparición de válvulas musculares, bucofaringe, porciones anterior, media y posterior del intestino (Govoni, 1980). Pero es hasta finalizar el periodo larvario, cuando la larva cuenta con el tracto digestivo completo al contar con el estómago y sus glándulas gástricas, intestino, ciegos pilóricos y demás órganos que participan en el proceso de digestión (Cousin *et al.* 1987; Lazo, 2000). Desde el punto de vista nutricional el desarrollo del estómago, indica la transformación a la etapa juvenil; en donde cuenta con un sistema digestivo completamente formado y puede alimentarse de forma óptima

(Tanaka, 1973; Govoni *et al.* 1986; Lazo, 1999; Álvarez-González, 2003). Este proceso de larva a juvenil es muy variado, por lo general tardar de 15 a 60 días después de la eclosión, pero en otras especies tarda más tiempo (Cousin *et al.* , 1987; Álvarez-González, 2003).

Los estudios de ontogenia enzimática determinan en qué momento los organismos disponen de todas las enzimas digestivas para llevar a cabo la digestión. Con técnicas bioquímicas y electroforéticas se puede hacer un seguimiento de las enzimas digestivas a lo largo del desarrollo larvario de especies cultivadas (Alarcón y Martínez, 1998). Mediante los niveles de actividad enzimática se puede estimar o inferir el grado de madurez y funcionalidad del aparato digestivo (Moyano, 2006). Además, este tipo de estudios brinda información para establecer esquemas de alimentación, sugiriendo cuando realizar los cambios de alimentación y el momento más adecuado para el suministro de alimentos inertes “destete” (Ueberschär, 1993; Alarcón y Martínez, 1998; Moyano, 2006). También para la formulación de alimentos balanceados con las características de la especie.

En cambio, los estudios de caracterización enzimática describen las condiciones óptimas en donde las enzimas digestivas alcanzan su máxima actividad. Este tipo de estudios son esenciales cuando se quiere entender sus tipos y modos de acción, así como el nivel de actividad que presentan las enzimas digestivas (Moyano, 2006). Además, determinan las condiciones óptimas y estabilidad de factores como pH y temperatura; en el cual las enzimas alcanzan la mayor actividad y como son afectadas a lo largo del tiempo (Moyano, 2006; Álvarez-González, *et al.* , 2008). Una de las herramientas utilizadas en los estudios de caracterización enzimática es el uso de inhibidores específicos, los cuales se complementan con técnicas electroforéticas en geles de poliacrilamida (García-Carreño *et al.* , 1993; Álvarez-González *et al.* , 2010b). En donde, los inhibidores afectan los centros activos y disminuyen la actividad enzimática, permitiendo con ello conocer la sensibilidad y los mecanismos de acción de las enzimas digestivas (Salvensen y Nagase, 1989; Moyano, 2006). Esta información permite delimitar el uso de harinas o nutrientes en la formulación de alimentos balanceados debido a que algunos ingredientes pueden contener sustancias que afecten totalmente o parcialmente la actividad enzimática, y por consiguiente el proceso de digestión del organismo.

Por lo tanto, en el presente trabajo se determinará el desarrollo ontogénico enzimático en larvas y la caracterización de las proteasas digestivas en juveniles de *C. trimaculatum*. Esto

permitirá conocer en qué momento aparecen y cuando son funcionales las enzimas digestivas durante el desarrollo larval; así como las condiciones óptimas y la estabilidad a factores como pH y temperatura; y los mecanismos de acción de las proteasas digestivas de *C. trimaculatum*. Con ello, se aportara información básica en la fisiología digestiva, formulación y diseño de dietas balanceadas con las características digestivas de la especie; así como también en el establecimiento de los esquemas de alimentación de esta especie.

Antecedentes

Enzimas digestivas

Las enzimas son catalizadores biológicos que incrementan la rapidez o la velocidad de una reacción, sin verse alteradas ellas mismas en el proceso global. La mayor parte de los catalizadores biológicos son proteínas, las cuales se han clasificado por parte de la Comisión de Enzimas (EC) de la Unión Internacional de Bioquímica en seis grandes grupos (Lehninger, 1984; Mathews y Van Holde, 1998).

- 1) Óxido reductasas: catalizan reacciones de oxidación-reducción.
- 2) Transferasas: catalizan transferencias de grupos funcionales de una molécula a otra.
- 3) Lipasas: catalizan eliminaciones de un grupo o adiciones de un grupo a un doble enlace, u otras rupturas que implican un reordenamiento electrónico.
- 4) Isomerasas: catalizan reordenamientos intermoleculares.
- 5) Ligasas: catalizan reacciones en las que se unen dos moléculas.
- 6) Hidrolasas: catalizan rupturas hidrolíticas.

En el caso particular de los peces, muchas de las enzimas digestivas pertenecen al grupo 6, y se han clasificado en los siguientes grupos en función del tipo de nutriente que hidrolizan.

Proteasas

Las *proteasas* (EC 3.4) son enzimas de gran importancia debido a que catalizan la hidrólisis de los enlaces peptídicos que forman la estructura primaria de las proteínas y están presentes en muchos organismos (Dixon y Webb, 1979). Algunas proteasas están

implicadas en procesos como la digestión de proteínas, la actividad de proenzimas y prehormonas, y muchos otros (Stroud, 1975). Dentro de ellas, existen dos subgrupos: las endopeptidasas, hidrolizan enlaces peptídicos internos que pertenecen a la categoría EC 3.4.21-24. Dentro de estas tenemos a: Las proteasas ácidas como la *pepsina* (EC 3.4.23.1), *gastricina* (EC 3.4.23.3) y *quimosina* o *renina* (EC 3.4.23.4) presentes en el jugo gástrico de mamíferos, aves, anfibios y peces. En los peces la pepsina es de gran importancia para la digestión ácida, mostrando mayor actividad a pH 2 y es fácilmente inactivada por el inhibidor específico pepstatin A (Alarcón, 1997).

La *tripsina* (EC 3.4.21.4) la cual hidroliza los enlaces peptídicos constituidos por arginina o lisina. Es de origen pancreático y muestra mayor actividad alrededor del pH 8 (Alarcón, 1997).

La *quimotripsina* (EC 3.4.21.1) que hidroliza enlaces peptídicos cuando el residuo 1 contiene tirosina, fenilalanina o triptófano; también actúa sobre amidas y ésteres (Whitaker, 1994). También es de origen pancreático.

Las *catepsinas* están relacionadas con los procesos de digestión intracelular.

Las exopeptidasas, que hidrolizan enlaces peptídicos entre aminoácidos terminales (extremo amino o carboxilo de la proteína), y se agrupan bajo la categoría EC 3.4.11-19. Siendo las más importantes: Las *aminopeptidasas* (EC 3.4.11) que catalizan la hidrólisis de los restos aminoácidos, concretamente desde el extremo amino de un péptido. Se clasifican en función de los requerimientos de iones metálicos (Mn^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} o Co^{2+}) y la especificidad por determinados dipéptidos (Behal *et al.*, 1965).

Las *carboxipeptidasas* liberan residuos aminoácidos del extremo carboxiterminal de los péptidos y proteínas. Se conocen dos familias de carboxipeptidasas: las serina carboxipeptidasas (EC 3.4.16) que contienen un residuo de serina en su centro activo. Y las metalo carboxipeptidasas (EC. 3.4.17) que requieren de iones de Zn para ser activas (Alarcón, 1997).

También se clasifican en 4 grupos de acuerdo a sus mecanismos de acción, el cual depende en buena medida de los residuos aminoácidos que constituyen su centro activo: 1. *Serina-proteasas* (EC 3.4.21): tienen un grupo serina en el centro activo, así como histidina y aspártico.

2. *Cisteina-proteasas* (EC 3.4.22): se caracterizan por la presencia del grupo cisteína (-SH) en su centro catalítico.

3. *Proteasas ácidas o aspárticas* (EC 3.4.23): se caracterizan por la presencia de ácido aspártico en el centro activo y poseen máxima actividad a pH ácido.

4. *Metal-proteasas* (EC 3.4.24): poseen un resto de ácido glutámico en el centro activo y requieren de un catión divalente (Zn, Ca o Mg) para catalizar la hidrólisis del enlace peptídico.

Amilasas

Las *amilasas* catalizan la hidrólisis del enlace α 1-4 del almidón y glucógeno. Se dividen en alfa (α) y beta (β), o endo y exo amilasas. La α -amilasa (EC 3.2.1.1.) está presente en el jugo pancreático de gran cantidad de animales (Archibal, 1987), ya que hidroliza indistintamente enlaces a lo largo de la cadena del polímero hidrocarbonado, liberando moléculas de glucosa y maltosa. Por su parte la β -amilasa hidroliza a los carbohidratos por el extremo no reductor, y se restringen exclusivamente al reino vegetal (Hirikado *et al.* , 1994).

Lipasas

Las *lipasas* son enzimas que han sido clasificadas en dos tipos principales: 1) las esterasas (EC 3.1.1.1), que preferentemente actúan sobre ésteres simples de ácidos grasos con bajo peso molecular que tienen una cierta capacidad de solubilizarse. 2) las lipasas verdaderas (EC 3.1.1.3), que se distinguen porque hidrolizan sustratos poco solubles; estas se han descrito en varios tejidos animales (páncreas, plasma sanguíneo, saliva y jugo pancreático).

Fosfatasas

Las *fosfatasas ácida y alcalina* (EC 3.1.3.2 y 3.1.3.1) catalizan la separación de fósforo inorgánico a partir de fosfato orgánico. Se encuentran en los epitelios intestinales y en diferentes capas tisulares del estómago. Su papel fisiológico en los vertebrados superiores está relacionado con los procesos de mineralización de los huesos (Harris, 1989), así como en procesos de transporte de nutrientes a través de membrana. Tales fosfatasas se asocian con el transporte activo de glucosa, proteínas y lípidos, e incluso de agua e iones en el caso de la fosfatasa alcalina (Dupuis *et al.* , 1991).

Estudios de enzimas digestivas en peces

En los primeros estudios donde se implementaron las herramientas bioquímicas fueron para determinar la capacidad digestiva de animales en campo en función de sus hábitos alimenticios. Sarbahi (1951), realizó estudios en *Carassius auratus* y *Micropterus salmoides* donde encontró que existe una diferenciación de las enzimas en función a la región del tracto digestivo. Esto permitió continuar con estudios que han servido de base para el desarrollo de micrométodos en la detección, caracterización y purificación de las enzimas digestivas en los diferentes estadios de peces.

La mayor parte de estudios en enzimas digestivas se ha realizado en especies marinas con potencial para el cultivo o de interés comercial. En juveniles de robalo (*Centropomus undecimalis*) se han realizado estudios de caracterización y ontogenia enzimática. Donde se encontró que las proteasas ácidas de esta especie muestran una alta actividad a pH 2 y son inestables a pH alcalinos a partir de pH 8. Las proteasas alcalinas mostraron dos picos de actividad enzimática de pH 7 y 11, estas resultaron estables a los diferentes pH viéndose afectada la actividad a pH extremos como pH 2 y 12. La temperatura óptima de las proteasas ácidas y alcalinas resultó de 75°C y 65°C respectivamente; y en ambos casos son estables a temperaturas altas (Álvarez-González *et al.* 2010a). En la etapa inicial de larvas se ha estudiado el desarrollo ontogénico enzimático, donde a partir del día 34 ddf el

mecanismo enzimático se considera completo (Jiménez-Martínez *et al.* 2012); ambos autores consideran a esta especie como un carnívoro estricto.

En atunes se cuenta con el estudio realizado por Essed *et al.* (2002) en *Thunnus thynnus* y el de Matus *et al.* (2007) en *Thunnus orientalis*. En donde estudiaron la actividad de las proteasas digestivas del estómago e intestino. En *T. thynnus* se encontró una mayor actividad en el estómago, y los óptimos de temperatura y pH para la actividad de las proteasas ácidas se determinó en 50°C y a pH's de 2 y 3.5. Mientras que en proteasas alcalinas resultó de 60°C y de pH's 10 y 12. En cambio en *T. orientalis*, la máxima actividad de las proteasas alcalinas y lipasas se alcanza a un pH 9, menor al determinado en *T. thynnus*. El pH óptimo de las proteasas ácidas se determinó en pH 3, mientras que la temperatura óptima para la actividad enzimática se encuentre en un rango de 35 a 60°C.

En lenguados, como *Solea senegalensis* se ha determinado que existe mayor actividad enzimática en el intestino en relación al estómago y a temperaturas mayores a los 50°C, la actividad de las proteasas ácidas y alcalinas son inestables. Pero a diferentes pH's las proteasas ácidas resultaron ser más estables a las proteasas alcalinas (Sáenz *et al.* , 2005). En salmones (*Brycon orbignyanus*), se tiene el realizado por García-Carreño *et al.* (2002). En donde, el pH óptimo para el estómago resultó de valor 2.5 y la actividad de estas enzimas es estable a pH ácidos. Al igual, las enzimas del intestino son estables a pH alcalinos y el pH óptimo resultó de 10. La temperatura óptima del intestino resultó 10°C más elevada a la temperatura óptima del estómago que fue de 50°C, y la actividad en los dos órganos disminuye a partir de los 60°C. En las proteasas ácidas el inhibidor pepstatin A afectó la actividad en un 90%; en las proteasas alcalinas la mayor inhibición se obtuvo con SBT1 y TLCK en un 85 y 52%.

En cambio en otros trabajos se ha optado primeramente por la purificación de las enzimas digestivas para después ser analizadas, siendo la pepsina y tripsina las más estudiadas. En *Scophthalmus maximus* y en *Katsuwonus pelamis* se estudio la pepsina de forma purificada por Hai-ying *et al.* (2006) y Nalinanon *et al.* (2010) respectivamente. Para las dos especies se encontrando un pH óptimo de 2 y una temperatura óptima alrededor de los 45°C, siendo inestable y perdiendo actividad totalmente a partir de los 60 °C. También se encontró una inhibición de 100% por el inhibidor pepstatin A específico de pepsina. Los estudios de tripsina purificada se tiene los realizados en *Sardinops sagax caerulea*, *Balistes capriscus* y

Sardinella aurita por Castillo-Yáñez *et al.* (2005); Jellouli *et al.* (2009) y Ben *et al.* (2011) respectivamente. En donde se encontró un pH óptimo en un rango de pH de 8 a 10, en donde también resultaron ser más estables; fuera de este rango muestran inactividad o inestabilidad de la actividad coincidiendo con lo descrito por Simpson (2000). Con respecto a la temperatura mostraron más actividad alrededor de los 50°C y por arriba de los 60°C pierden actividad y son inestables.

En larvas de *Paralichthys californicus* se estudió el desarrollo de la actividad enzimática. En donde, se determinó las enzimas de pepsina, tripsina, quimotripsina, L-aminopentidasa, lipasa, α -amilasa y fosfatasa ácida y alcalina; observando actividad de algunas enzimas en el día 4 dde, mientras que para el día 18 dde se inicia una baja actividad de la pepsina. Por lo tanto, el mecanismo enzimático podría estar completo del día 18 al 30 dde, donde se podría alimentar con dietas inertes (Álvarez-González *et al.* 2006). En dorada *Sparus aurata* se determinó que a partir del día 3 dde, existe actividad de las proteasas alcalinas considerándose completo y desarrollado esta parte del mecanismo enzimático después de este día. Esta actividad se conserva durante el desarrollo larval hasta los 30 dde, después disminuye hasta ser diferente entre peces adultos y larvas (Díaz *et al.* 1997). En otras especies como *Chelon labrosus* y *Pagrus auriga* el desarrollo del mecanismo enzimático es más tardado, completándose a partir de la segunda semana después de eclosión y a los 35 dde respectivamente (Moyano *et al.* 2005; Zouiten *et al.* 2008). En el caso de *C. labrosus*, se podría suministrar una dieta con ingredientes vegetales, debido a que presenta una secreción de amilasa desde los primeros días (Zouiten *et al.* 2008). En cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* también se han estudiado las enzimas digestivas, encontrándose presencia de proteasas alcalinas en el día 2 dde. Considerando que el mecanismo enzimático podría estar completo a partir del día 12 al 18 dde donde se podría suministrar dietas artificiales, pero éste será totalmente eficiente después del día 25 dde (Álvarez-González *et al.* 2008; Álvarez-González *et al.* 2010b).

En peces dulceacuícolas los estudios realizados han sido menos en comparación con especies marinas. Iracheta (2006), estudió las enzimas digestivas en larvas de pejelagarto *Atractosteus tropicus* del día 4 al 34 dde, las cuales fueron alimentadas exógenamente a partir del día 5 dde con diferentes dietas. Encontrando que a partir de la alimentación exógena existe secreción de las principales enzimas como pepsina, tripsina, quimotripsina,

aminopeptidasa, lipasa y fosfatasas ácidas y alcalinas. Considerando que a partir del 5 dde las larvas cuenta con un estomago funcional y se podría alimentar con dietas artificiales, con características particulares para la especie. Guerrero-Zarate (2010), caracterizó las proteasas y lipasas en juveniles de la misma especie, encontrando un pH óptimo de proteasas ácidas de 2, pero en proteasas alcalinas existen diferentes puntos óptimos (pH de 6 a 8 y pH 10). Las proteínas ácidas y alcalinas tienen una temperatura óptima de actividad a 65°C y además, las proteasas presentan una acción conjunta en la digestión debido a que las proteasas ácidas y alcalinas, son ligeramente resistentes a pH alcalinos y ácidos respectivamente.

En especies de acuafilia también se han realizados estudios sobre las enzimas digestivas, evaluando el efecto del pH y de inhibidores específicos. En *Symphysodon aequitasciata* (Chong *et al.* , 2002) y en *Scleropages formosus* (Natalia *et al.* , 2004), el pH óptimo de las proteasas ácidas resultó de valor 2 para las dos especies, mientras que en las proteasas alcalinas resultaron varios puntos óptimos en un rango de 8 a 11. También se encontró para las dos especies una mayor actividad de tipo tripsina en relación a la quimotripsina, y por lo consiguiente una mayor inhibición del TLCK inhibidor específico de tripsina.

En cíclidos también se ha determinado el desarrollo enzimático digestivo y la estabilidad de las enzimas bajo diferentes condiciones. Chakrabarti *et al.* (2006), estudió las enzimas digestivas y realizó la caracterización parcial con el uso de inhibidores de proteasas en el tracto digestivo durante la ontogenia inicial de un híbrido de carpa (*Hypophthalmichthys molitrix* ♀) × (*Aristichthys nobilis* ♂). Donde encontró que a partir del día 4 dde existe actividad de amilasa y lipasa, y que tripsina y quimotripsina están presentes en más de una isoforma.

Existen solamente dos estudios sobre el desarrollo de enzimas digestivas en larvas de cíclidos nativos para el estado de Tabasco; uno de la mojarra castarica (*Cichlasoma urophthalmus*) y otro de la mojarra tenguyaca (*Petenia splendida*). López-Ramírez *et al.* (2011), reportan que para *C. urophthalmus* el mecanismo enzimático digestivo se considera plenamente formado para el día 11 ddf. Esto es similar a lo reportado por Perales-García (2009) en *P. splendida*, donde se encuentra una completa acción de las enzimas digestivas a partir del día 9 ddf, incrementándose para el día 12 ddf. Estos autores consideran esta última fecha como la terminación de la formación del mecanismo enzimático. Los dos

autores recomiendan que a partir de estos días se puede sustituir el alimento vivo por alimento inerte. El cual, deberá ser el adecuado en requerimiento nutricional y asimilación de nutrientes para la etapa larval de cada especie. En *P. splendida* se caracterizó parcialmente las proteasas digestivas, donde las proteasas alcalinas presentaron pH's óptimos entre 9 y 10, mientras que las proteasas ácidas el pH óptimo resultó de 5. La temperatura óptima en la actividad de proteasas ácidas y alcalinas en ambos caso se determino a 55°C.

Estudios realizados en *Cichlasoma trimaculatum*

Entre los cíclidos nativos de México, se encuentra los géneros *Cichlasoma* y *Petenia* el primero con numerosas especies y el segundo con una sola (Álvarez del Villar, 1970). La falta de conocimientos básicos sobre la biología, ecología y comportamiento de estas especies, así como la falta de experiencias sobre adaptación al cautiverio, manejo, aceptación de alimentos balanceados y requerimientos nutricionales ha detenido por mucho tiempo la selección de las especies más adecuadas a la acuicultura

Los estudios que se han reportado para *C. trimaculatum* son pocos. En ellos se ha determinado parte de su alimentación, distribución y abundancia, ciclo de vida, asociación a parásitos, desarrollo gonádico, reproducción y crecimiento en cautiverio. Primeramente Yáñez-Arancibia (1978), realizó un estudio de la ictiofauna en las lagunas costeras del estado de Guerrero, México; en donde señala la tendencia de alimentación de esta especie y la cataloga como un consumidor primario de tipo omnívoro. Esto coincide a lo reportado por Violante (1995), pero además menciona que esta especie tiende a ser carnívora durante algunos meses del año. Gil (1991), Díaz-Ruiz (2006) y Miller (2009), clasificaron a *C. trimaculatum* con una especie dulceacuícola, pero que puede tolerar bajas salinidades. Debido a que en una parte de su ciclo de vida, utiliza la vegetación sumergida y emergente de lagunas estuarianas para realizar el desove, entre los meses de junio-noviembre, cuando la salinidad disminuye (Violante, 1995; Díaz-Ruiz, 2006). Opuesto a lo descrito por Gómez-González (2005), quien menciona que esta especie tienen una amplia tolerancia a la salinidad de 0 a 34‰ al encontrarse ampliamente distribuida durante todo el año en el sistema lagunar-estuarino eurihalino de Carretas-Pereyra, Chiapas.

En cuestiones de fisiología reproductiva las hembras alcanza primero la madurez sexual. Violante (1995), reportó que la maduración sexual de las hembras lo alcanzan a los 14 cm de longitud total, mientras que en los machos es a los 14.92 cm. Las hembras llegan a desovar un promedio de huevos de $3,082.42 \pm 1,060.52$, a una temperatura promedio de 27.8 ± 0.2 °C, a un pH de 7.6 ± 0.1 y a una concentración de oxígeno de 6.13 mg/L. Los huevos tienen una forma alargada con una longitud de 1.86 ± 0.10 mm y un ancho de 1.25 ± 0.06 mm, con un tiempo de eclosión de 55 a 58 hrs post-desove y la reabsorción del saco vitelino ocurre aproximadamente a los 7 días post-eclosión. En Laboratorio de Nutrición y Producción Acuícola del Campus del Mar-UNICACH, en sistemas controlados de recirculación se ha logrado la producción masiva de larvas, al utilizar una proporción de sexo 2:1 (hembras-machos) y emplear alimento balanceado diseñado para peces carnívoros como trucha (Silver Cup® Pedregal con 45% de proteína y 16% de lípidos). Las larvas producidas han sido destinadas al repoblamiento de los sistemas lagunares-estuarios del estado Chiapas, y una mínima parte a cuestiones de investigación (Uscanga-Martínez *et al.* 2012). Con respecto a la abundancia de esta especie en el estado de Guerrero en la laguna de Tres Palos, la abundancia relativa es menor al 1% (Gil, 1991). Este mismo patrón de abundancia se encontró en el estado de Chiapas, en el sistema lagunar-estuarino Chantuto-Panzacola, en donde se encontró una baja abundancia con respecto a otras especies de la zona (Díaz-Ruiz, 2006). Pero en el sistema lagunar-estuarino de Carretas-Pereyra, *C. trimaculatum* se encuentra entre las especies que representan el 86% de la captura en distribución y abundancia numérica (Velázquez-Velázquez *et al.* 2005). En estudios de parasitología se tiene el de Violante-González (2008), donde menciona que *C. trimaculatum*, presenta mayormente parásitos de tipo generalistas y pocos que son especialistas de cíclidos.

Por otra parte, en condiciones de cautiverio *C. trimaculatum* demostró tener una rápida adaptación, resistente al manejo, muy voraz y además acepta con facilidad dietas secas. En la etapa inicial del cultivo, se determinó que las crías requieren de niveles altos de proteína alrededor del 45% (Violante, 1995). Sin embargo, se necesita generar mucha información en fisiología digestiva y en nutrición para poder diseñar un alimento específico para la especie.

Ontogenia de las enzimas digestivas en larvas

Materiales y métodos

Obtención y preparación de las muestras

Las muestras de larvas del día 0 (eleuteroembrión) hasta al día 60 después de eclosión (dde) de *C. trimaculatum* se obtuvieron de seis desoves simultáneos; del lote de reproductores cultivados en el Laboratorio de Nutrición y Producción Acuícola del Campus del Mar de la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas. Las larvas después de 1 dde se colocaron en un sistema de recirculación con oxigenación continua, con temperatura promedio de 30.6 ± 2.5 °C. Las larvas se alimentaron tres veces al día (08:00, 13:00 y 18:00 hrs) a saciedad aparente; del día 4 al 10 dde se alimentó con alimento vivo (nauplio de *Artemia*), enseguida se inició una coalimentación de alimento vivo y alimento balanceado Silver Cup® (45% de proteína y 16% de lípidos) durante los días 11 y 12 dde. Para el día 13 dde hasta finalizar el muestreo, se suministró únicamente alimento balanceado. Un día antes de cada muestreo se suspendió la última alimentación. La toma de muestras se realizó a las 08:00 hrs de forma manual con una red de 500 µm de luz de malla, de acuerdo a lo descrito en la tabla 1.

Tabla 1. Días de muestreo y número de larvas muestreadas de *C. trimaculatum* durante el experimento.

Numero de larvas colectadas	Días después de eclosión (dde)
1000	0, 1, 3
500	6, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21
300	24, 27, 30, 33, 36
200	39, 42, 45
100	60

Enseguida las larvas se sacrificaron por shock térmico y se almacenaron en congelación hasta su procesamiento. Adicionalmente, se tomaron 35 organismos en cada muestreo para evaluar el crecimiento en peso y longitud total. Las muestras de larvas del día cero hasta el día 11 dde se procesaron enteras, del día 13 al 60 dde se les cortó la cabeza y la cola con el fin de aislar el paquete visceral. Para la preparación de los extractos, las muestras se homogenizaron en una proporción de 200 mg/ml (p/v) en solución glicina-HCl 100 mM a

pH 2 para los extractos enzimáticos de estómago y en tris-HCl 50 mM + CaCl₂ 25 mM pH 7.5 para los extractos enzimáticos de intestino. El homogenizado se centrifugó a 14,000 rpm por 30 min a 4 °C; después, se recuperó el sobrenadante y se almacenó en congelación hasta la aplicación de las pruebas bioquímicas.

Análisis bioquímicos

La concentración de proteína soluble en los extractos multienzimáticos de estómago e intestino, se midió por la técnica de Bradford (1976), usando como estándar una curva patrón de albúmina bovina sérica. La actividad de proteasas ácidas (pepsina) se midió con la técnica de Anson (1938), usando como sustrato hemoglobina al 1%, en una solución glicina-HCl 100 mM pH 2.0. La actividad de proteasas alcalinas se midió con la técnica descrita por Kunitz (1947) modificada por Walter (1984), usando como sustrato caseína al 1% en solución tris-HCl 100 mM + CaCl₂ pH 9.0. En ambas técnicas, la reacción se detuvo con 0.5 ml de ácido tricloracético al 20%. Una unidad de actividad enzimática se definió como 1 µg de tirosina liberada por minuto, en base al coeficiente de extinción molar de 0.0008 a 280 nm. La actividad de tripsina se midió con la técnica de Erlanger *et al.* (1961) usando como sustrato BAPNA (N- α -benzoyl-DL-arginine p-nitroanilide) al 3.5 mM, en solución de tris-HCl 100 mM + CaCl₂ 10 mM pH 8. La actividad de quimotripsina se midió por la técnica de DelMar *et al.* (1979) usando como sustrato SAAPNA (N-succinyl-alanyl-alanine-proline-p-nitroanilide) al 0.1 mM en solución tris-HCl 100 mM + CaCl₂ 10 mM pH 7.8. La actividad de leucina-aminopeptidasa se midió con la técnica descrita por Maraun *et al.* (1973), usando como sustrato leucina *p*-nitroanilida al 1 mM, en solución fosfato sódico monobásico 50 mM pH 7.2. Las reacciones de las técnicas descritas anteriormente se detuvieron con ácido acético al 30%; una unidad de actividad enzimática se definió como 1 µg de nitroanilida liberada por minuto, usando los coeficientes de extinción molar de 8.8 para la tripsina a 410 nm, 9.64 para la quimotripsina a 405 nm y 8.2 leucina aminopeptidasa a 410 nm. La actividad de carboxipeptidasa A se midió con la técnica descrita por Folk y Schirmer (1963), usando como sustrato hipuryl-L-fenil-alanina al 1mM en solución tris-HCl 25 mM + NaCl 50 mM pH 7.5. Una unidad de actividad enzimática se definió como 1 µg de hipuryl liberado por minuto, usando como coeficiente de extinción molar 0.36 a 254

nm. La actividad de α -amilasa se midió usando la técnica de Somoyi-Nelson descrito por Robyt y Whelan (1968) usando como sustrato almidón al 2% en solución fosfato de sodio y citrato de sodio 100 mM + NaCl 50 mM pH 7.5. Una unidad de actividad enzimática se definió como 1 μ g de maltosa liberada por minuto, usando como coeficiente de excitación molar 0.0034 a 600 nm. La actividad de lipasa se midió con la técnica descrita por Versaw *et al.* (1989), usando como sustrato β -naftil caprilato a 100 mM. Una unidad de actividad se definió como 1 μ g de naftol liberado por minuto, usando el coeficiente de extinción molar de 0.02 a 540 nm. Las actividades fosfatasa ácida y alcalina se midieron de acuerdo a la técnica de Bergmeyer (1974), usando como sustrato 4-nitrofenilfosfato 2% en una solución de ácido cítrico/citrato a pH 5.5 para condiciones ácidas y en solución glicina-NaOH 100 mM a pH 10.1 para condiciones alcalinas. Una unidad de actividad se definió como 1 μ g de nitrofenol liberado por minuto utilizando el coeficiente de extinción molar de 0.0185 a 405 nm. La actividad de los extractos se expresó empleando las siguientes ecuaciones: 1) Unidad por ml = (Δ abs x volumen final de la reacción (ml)) x (CEM x tiempo (min) x volumen del extracto (ml)); 2) Unidades por mg de proteína = Unidades por ml / mg de proteína soluble; 3) Unidades por larva = Unidades por ml / número de larvas por ml. La actividad enzimática se expresó de acuerdo a las ecuaciones 2) U mg de proteína⁻¹ y 3) U larva⁻¹ usando el total de larvas en cada homogenizado por extracto.

Análisis electroforético

La clasificación de proteasas alcalinas se realizó mediante electroforesis SDS-PAGE en gel discontinuo en condiciones desnaturalizantes (Laemmli, 1970; García-Carreño, 1993). La electroforesis se realizaron en una cubeta Mini PROTEAN® III (Bio-Rad) de dos placas de geles verticales de 8×10×0.075 cm, con capacidad de 10 muestras por gel. Los extractos enzimáticos se mezclaron con el tampón de muestra (tris-HCl 0.5 M pH 6.8, sacarosa, SDS, azul de bromofenol) a una proporción de 1:1 v/v, se cargaron 20 μ l de muestra en cada pozo de los geles. En las proteasas alcalinas el zimograma discontinuo constó de un gel de almacenamiento al 4% y un gel de separación al 10%; el corrimiento se realizó a 80 V durante 15 min y a 100 V durante 100 min con una resistencia de 24 mA a 4°C, en un buffer de corrimiento a pH 8.3; los geles se enjuagaron con agua destilada y después fueron

sumergidos en una solución de caseína de Hammerstein 2% (en tris-HCl 50mM pH 9) a 4°C durante 45 min para permitir la absorción de caseína por el gel y después una incubación a 37 °C durante 3 horas para que las proteasas hidrolizaran el sustrato. Finalmente, los geles de las electroforesis se enjuagaron con agua destilada y se colocaron en una solución de TCA al 12% por 15 minutos, se tiñeron con solución 0.1% de azul brillante de Coomassie R-250 (0.12g para 100 ml), metanol, ácido acético y agua destilada en proporción de volumen 50:20:50 respectivamente por 1 hora, para después ser desteñidos con solución de metanol-ácido acético-agua destilada (35:10:55). Las zonas claras indicaran la presencia de proteasas después de un periodo de 24 h. Para determinar el peso molecular se colocó 5 µl en un pocillo en cada gel de SDS-PAGE del marcador comercial Bio Basic Inc BM523, el cual está compuesto por las siguientes proteínas de peso molecular: fosforilasa B de conejo 97.4 KD, albúmina bovina sérica 66.2 KD, Ovoalbúmina 42.7 KD, anhidrasa carbónica 31.0 KD y lisozima 14.4 KD. La electromobilidad relativa (Rf) se calculó para todos los zimogramas (Igbokwe y Downe 1978) y el peso molecular (MW) de cada banda con actividad de proteasa alcalina se calculó con el ajuste lineal entre el Rf y el logaritmo decimal de los pesos moleculares de las proteínas usadas como marcadores y con ayuda del programa Quantity One 1-D Analisis Software de Bio-Rad®.

Análisis estadístico

Se aplicó una regresión exponencial ($y=a * e^{bx}$) entre el peso húmedo y la talla con respecto a los días de crecimiento para determinar el tipo de crecimiento de *C. trimaculatum*, con el programa estadístico STATISTICA™ v 7.0, donde “a” es la talla o peso inicial y “b” es la tasa de crecimiento específico en mm o g por día.

Resultados

El crecimiento en peso húmedo y longitud de *C. trimaculatum* hasta los 60 dde es de tipo exponencial (Fig. 1a-b). El peso húmedo inicial y la longitud total inicial resultaron de

0.0058 g y 7.1365 mm respectivamente; mientras que la tasa de crecimiento en peso es de 0.0829 g día⁻¹ y para la longitud de 0.0249 mm día⁻¹.

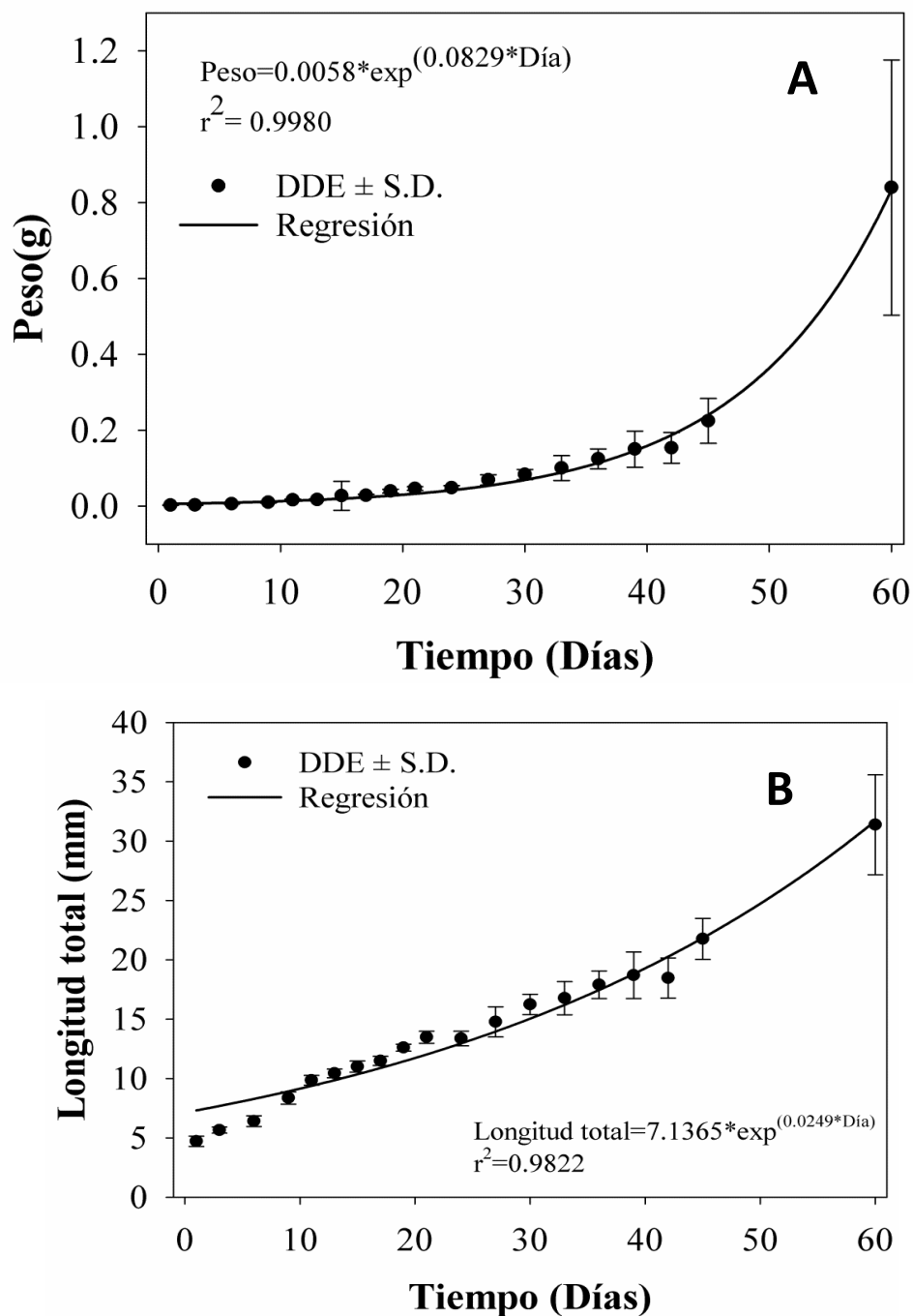


Figura 1. a) Promedio del peso húmedo (g por larva ± S.D. n=30) y b) promedio de la longitud total (mm por larva ± S.D. n=30) de larvas de *C. trimaculatum*.

Por otra parte, la actividad enzimática de las proteasas se muestra en la figura 2a-l. La actividad específica de la proteasa ácida se presentó desde los primeros días en niveles muy bajos, incrementándose para el día 9 dde y decreciendo para el día 13 dde, para después incrementar y mantenerse fluctuante hasta alcanzar una actividad máxima el día 30 dde y decrecer el día 60 dde (Fig. 2a). La proteasa alcalina se detectó a partir del día 6 dde incrementándose para alcanzar su máxima actividad el día 17 dde, decreciendo fluctuantemente hasta el día 60 dde (Fig. 2c). La actividad tripsina se detecta desde el día 6 dde, tiene una máxima actividad para los días 15 y 17 dde, decreciendo hasta el día 60 dde (Fig. 2e). La quimotripsina se detecta el día 6 dde con un incremento hasta alcanzar la máxima actividad el día 13 dde manteniéndose hasta el día 42 dde, para después decrecer el último día de muestreo (Fig. 2g). La carboxipeptidasa A está presente desde los primeros días incrementándose y alcanzado la máxima actividad los días 6 y 9 dde, para disminuir el día 11 dde y mantenerse fluctuante el resto de los días (Fig. 2i). La leucina-aminopeptidasa está presente desde los primeros días incrementándose el día 6 dde, con una actividad máxima para los días 15, 17 y 21 dde; después decrece y se mantiene fluctuante hasta el día 60 dde (Fig. 2k). Las actividades individuales de la proteasa ácida, proteasa alcalina, tripsina, carboxipeptidasa A y leucina-aminopeptidasa presentan el mismo patrón, incrementando con el paso del tiempo y alcanzando su máxima actividad para el día 60 dde (Fig. 2b, d, f, j, l). Para la quimotripsina también presenta el mismo incremento, pero alcanza su máxima actividad el día 42 dde (Fig. 2h).

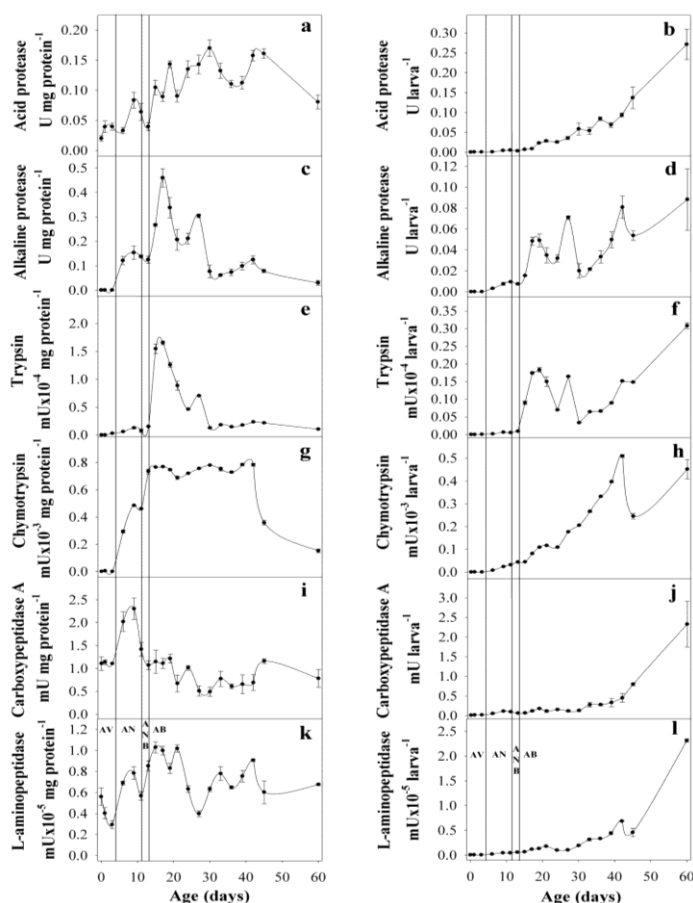


Figura 2. Actividad enzimática digestiva de las proteasas durante la ontogenia inicial de *C. trimaculatum* (promedio $\pm$ S.D. n=3). a) actividad de la proteasa ácida específica, b) actividad individual de las proteasas ácidas, c) actividad de la proteasa alcalina específica, d) actividad individual de las proteasas alcalinas, e) actividad específica de la tripsina, f) actividad individual de la tripsina, g) actividad específica de la quimotripsina, h) actividad individual de la quimotripsina, i) actividad específica de la carboxipeptidasa, j) actividad individual de la carboxipeptidasa, k) actividad específica de la leucina-aminopeptidasa, l) actividad individual de la leucina-aminopeptidasa. AV: Alimentación de vitelo; AN: Alimentación con nauplios; ANB: Alimentación con nauplios y balanceado; AB: Alimentación con balanceado.

La actividad específica lipasa se detecta a partir del día 6 dde incrementándose y decreciendo para el día 17 dde, para después volver a incrementar y alcanzar una actividad máxima el 24 dde, decreciendo hasta el día 60 dde (Fig. 3a). La actividad específica de amilasa es detectable a partir del día 3 dde y se mantienen fluctuante en incremento hasta

alcanzar una actividad máxima el día 45 dde (Fig. 3c). La actividad individual de lipasa se registra en incremento hasta el día 21 dde, para después decrecer hasta el día 33 dde y enseguida vuelve a incrementarse hasta alcanzar una actividad máxima el día 60 dde (Fig. 3b). La actividad individual de amilasa va en incremento y decrece para los días 39 y 42 dde, para después incrementarse nuevamente hasta alcanzar una actividad máxima el día 60 dde (Fig. 3d). La fosfatasa alcalina se detecta en el día 3 dde, incrementándose hasta alcanzar una actividad máxima el día 15 y 19 dde y manteniéndose fluctuante hasta el día 60 dde (Fig. 3e). La fosfatasa ácida se detecta desde los primeros días incrementándose el día 3 dde y alcanzando una actividad máxima el día 13 dde, después decrece y se mantiene fluctuante hasta el día 60 dde (Fig. 3g). La actividad individual de las fosfatasas alcalinas y ácidas presentaron el mismo patrón de incremento hasta alcanzar la actividad máxima el día 60 dde (Fig. 3f-h).

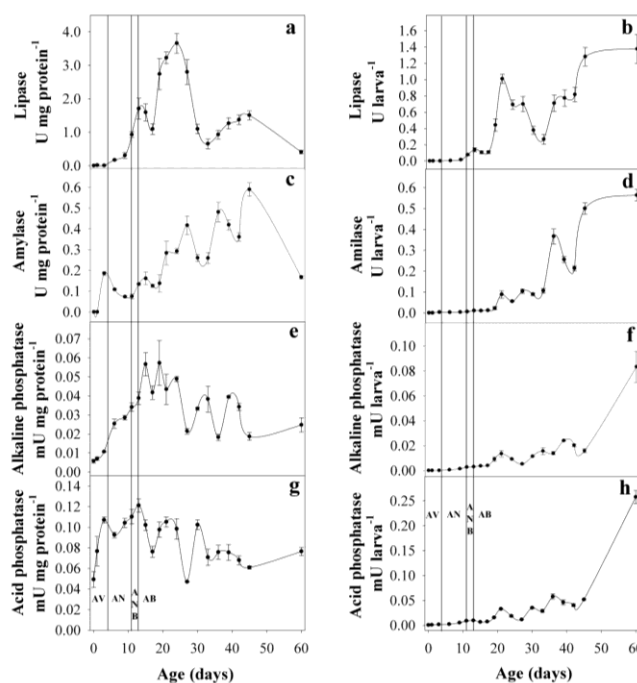


Figura 3. Actividad enzimática digestiva durante la ontogenia inicial de *C. trimaculatum* (promedio $\pm$ S.D. $n=3$). a) actividad específica de lipasa, b) actividad individual de la lipasa, c) actividad específica de la amilasa, d) actividad individual de la amilasa, e) actividad específica de la fosfatasa alcalina, f) actividad individual de la fosfatasa alcalina, g) actividad específica de la fosfatasa ácida, h) actividad individual de las fosfatasa ácida.

AV: Alimentación de vitelo; AN: Alimentación con nauplios; ANB: Alimentación con nauplios y balanceado; AB: Alimentación con balanceado.

El zimograma de proteasas alcalinas SDS-PAGE reveló seis tipos de bandas divididas en tres grupos, entre pesos moleculares de 113.4 a 20.4 KDa. Las primeras tres bandas de actividad aparecieron en el día 6 dde con peso molecular de 113.4, 84.5 y 35.4 kDa, respectivamente. El día 9 dde se reveló la cuarta banda de 25.1 kDa y el día 11 dde se pudieron distinguir las últimas dos bandas con pesos moleculares de 38.0 y 20.4 kDa. Es a partir del día 11 dde cuando se completan todas las bandas y se mantienen hasta el día 60 dde (Fig. 4).

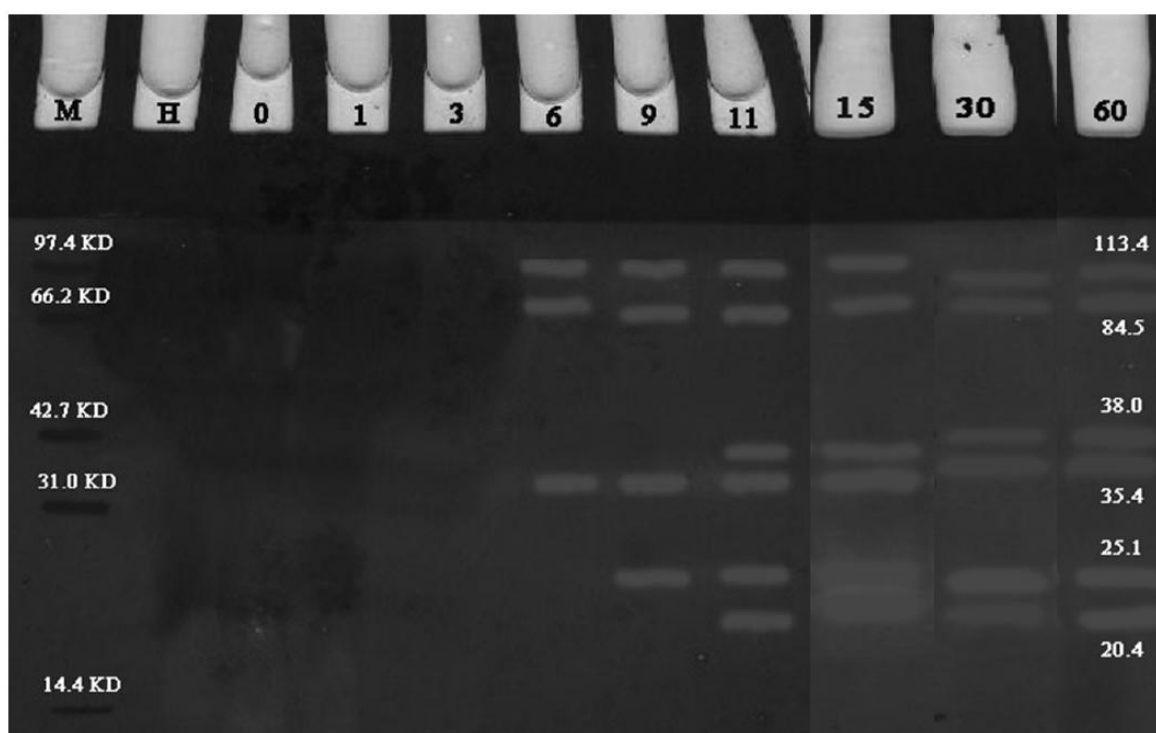


Figura 4. Electroforesis SDS-PAGE de las enzimas digestivas durante la ontogenia inicial de *C. trimaculatum*. M= Marcador de pesos moleculares: fosforilasa B de conejo 97.4 KD, albúmina bovina sérica 66.2 KD, Ovoalbúmina 42.7 KD, anhidrasa carbónica 31.0 KD y lisozima 14.4 KD; H= Muestra de huevos; Números= Días después de eclosión.

Caracterización de las proteasas digestivas en juveniles

Materiales y métodos

Las muestras se obtuvieron de juveniles cultivados en el Laboratorio de Nutrición y Producción Acuícola del Campus del Mar de la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas, con un peso promedio de 29.43 ± 10.85 g. Los cuales, se alimentaron tres veces al día a saciedad aparente con alimento Silvercup Pedregal® (45% de proteína y 16% lípidos). Dejándose en inanición 24 horas antes de ser sacrificados con una sobredosis de metasulfonato de tricaina (MS-222). A cada organismo se le registró el peso y longitud total corporal; también el peso del estómago e intestino y por último la longitud total del intestino. Se determinó el valor promedio del índice de longitud intestinal relativa de 35 organismos de acuerdo a lo descrito por Sáenz *et al.* (2005). La extracción de los estómagos e intestinos se realizó en frío y se homogenizaron en una proporción de 200 mg/ml, con buffer glicina-HCl 100 mM pH 2 y buffer tris-HCl 30 mM + CaCl₂ 12.5 mM pH 7.5 respectivamente. El homogenizado se centrifugó a 14,000 rpm por 30 min a 4 °C, se extrajo el extracto multienzimático y se almacenó a -20 °C hasta el análisis. La concentración de proteína soluble en los extractos multienzimáticos de estómago e intestino se determinó con la técnica descrita por Bradford (1976). En la determinación de la actividad enzimática de las proteasas ácidas se aplicó la técnica descrita por Anson (1938), usando como sustrato hemoglobina bovina al 1% con buffer glicina-HCl 100 mM a pH 2. La actividad enzimática de las proteasas alcalinas se determinó con la técnica descrita por Kunitz (1947) modificado por Walter (1984), usando como sustrato caseína al 1% con buffer tris-HCl 100 mM + CaCl₂ 10 mM a pH 9. La actividad de tripsina se determinó con el método descrito por Erlanger *et al.* (1961), usando como sustrato N α -Benzoyl-DL-arginine-4-nitroanilide hydrochloride con buffer tris-HCl 100mM + CaCl₂ 10 mM a pH 8. La actividad de quimotripsina se midió por la técnica de DelMar *et al.* (1979) usando con sustrato SAAPNA (N-succinyl-ala-ala-pro-phe p-nitroanilide) al 0.1 mM en solución tris-HCl 100 mM + CaCl₂ 10 mM pH 7.8. El pH óptimo de las proteasas ácidas y alcalinas se determinó en rango de pH de 2 al 12 con la solución universal de Stauffer (1989), sustituida en la técnica de Anson (1938) y Walter (1984) respectivamente. Para la estabilidad al pH, se preincubaron los extractos multienzimáticos a los diferentes pH's a un tiempo de 0, 30, 60

y 90 min, la incubación se realizó a temperatura ambiente. La temperatura óptima de las proteasas ácidas y alcalinas se determinó modificando la temperatura de incubación en un rango de 15 a 75 °C con intervalos de 10 °C, en las técnicas descritas por Anson (1938) y Walter (1984) respectivamente. Para determinar la estabilidad de las proteasas a los cambios de temperatura, los extractos multienzimáticos se preincubaron a las diferentes temperaturas antes mencionadas durante 0, 30, 60 y 90 min. Para la estabilidad del pH y la temperatura el tiempo 0 min (sin preincubar) se utilizó como control para determinar la actividad residual expresada en porcentaje.

La sensibilidad de la actividad de las proteasas se determinó utilizando inhibidores específicos, se realizó de la siguiente manera: Para las proteasas ácidas se utilizó el inhibidor Pepstatin A y la actividad residual se determinó con la técnica descrita por Anson (1938). En las proteasas alcalinas se aplicaron los inhibidores específicos descritos por García-Carreño *et al.* (1993) y la actividad residual de las proteasas alcalinas se determinó con la técnica descrita por Kunitz (1947) modificada por Walter (1984). En ambas pruebas se utilizó un control sin inhibir y la actividad residual se expresó en porcentaje, todas las pruebas se realizaron por triplicado. El efecto de los inhibidores en las proteasas alcalinas se acompañó con análisis de electroforesis SDS-PAGE en un gel discontinuo de poliacrilamida. El gel almacenador al 4% y gel de corrimiento al 10% de acuerdo con la metodología descrita por Laemmli (1970) modificada por García-Carreño *et al.* (2002). En donde, se emplearon los siete inhibidores antes descritos por García-Carreño *et al.* (1993). Los cuales, se preincubaron en una proporción 1:1 (enzima/inhibidor) por 1 hora. También se empleó el marcador de pesos moleculares Bio Basic Inc BM523 y con el programa Quantity One 1-D Analisis Software de Bio-Rad® para el cálculo del peso molecular de cada banda.

Resultados

La actividad de proteasas digestivas de *C. trimaculatum* resultó mayor en los extractos de intestinos, así como la actividad de quimotripsina en relación a la tripsina (Tabla 1). El índice de la longitud intestinal relativa resultó de 1.45 ± 0.33 (n=35). El pH óptimo para la actividad de las proteasas ácidas es de pH 2 (Fig. 1a). En el caso de la estabilidad a cambios

de pH, la actividad enzimática se mantiene por arriba del 70% para los pH del 2 al 4, y en el resto de los valores de pH disminuye en un 50% a partir de los 30 min de preincubación (Fig. 1b). Para la actividad de las proteasas alcalinas el pH óptimo es de 10 (Fig. 1c). Mientras que la mayor estabilidad a los cambios de pH para las proteasas alcalinas se encontró en el pH 9, llegando por arriba del 200% para el tiempo de 30 minutos de preincubación; disminuyendo hasta alcanzar el 100% para el resto de los tiempos de preincubación. Asimismo, para los valores de 8 y 10 se detectó una alta actividad mayor al 100% en diferentes tiempos de preincubación (Fig. 1d).

Tabla 1. Valores promedios ($\pm$ S.D) de tres determinaciones de las actividades de proteasas en los extractos enzimáticos de *C. trimaculatum*.

	Actividad específica		Tripsina	Quimotripsina
	(U/mg proteína)	(U/g tejido)	(mU $\times 10^{-5}$ /mg proteína)	(mU $\times 10^{-5}$ /mg proteína)
Estómago	2.01 $\pm$ 0.57	1,121.61 $\pm$ 318.38	-	-
Intestino	3.95 $\pm$ 0.32	1,136.34 $\pm$ 91.24	68.17 $\pm$ 1.42	171.48 $\pm$ 1.60

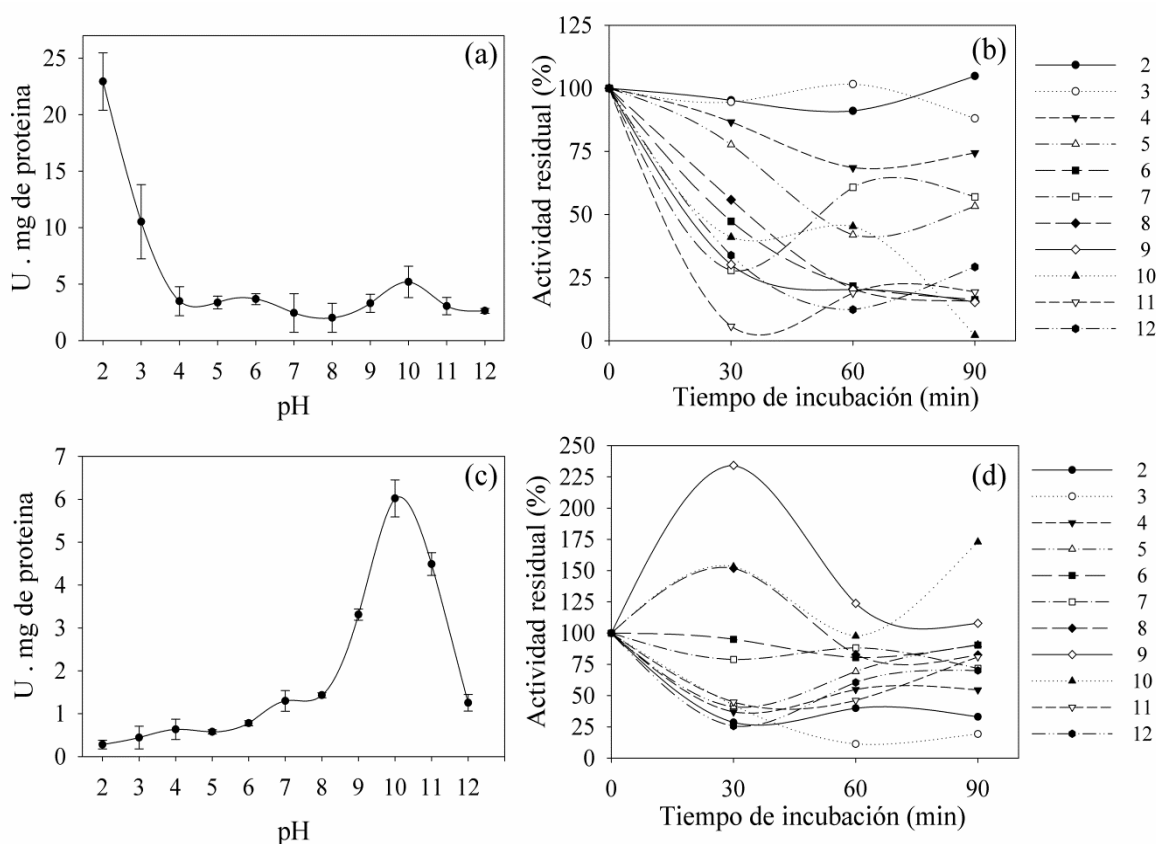


Figura 1. Efecto del pH en las proteasas digestivas de juveniles de *C. trimaculatum*: a) pH óptimo de las proteasas ácidas, b) estabilidad de las proteasas ácidas, c) pH óptimo de las proteasas alcalinas, d) estabilidad de las proteasas alcalinas.

La temperatura óptima de la actividad de las proteasas ácidas es de 55 °C (Fig. 2a). Asimismo, en la estabilidad de la actividad de las proteasas ácidas disminuye en más del 50% desde los 30 minutos de preincubación, a partir de la temperatura de 55 °C en adelante (Fig. 2b). Mientras que la actividad de proteasas alcalinas se incrementa a partir de los 35 °C, alcanzando la máxima actividad a los 65 °C (Fig. 2c). Finalmente, la estabilidad de la actividad de las proteasas alcalinas se reduce en un 40% únicamente para las temperaturas de 65 y 75 °C a partir de los 30 minutos de preincubación (Fig. 2d).

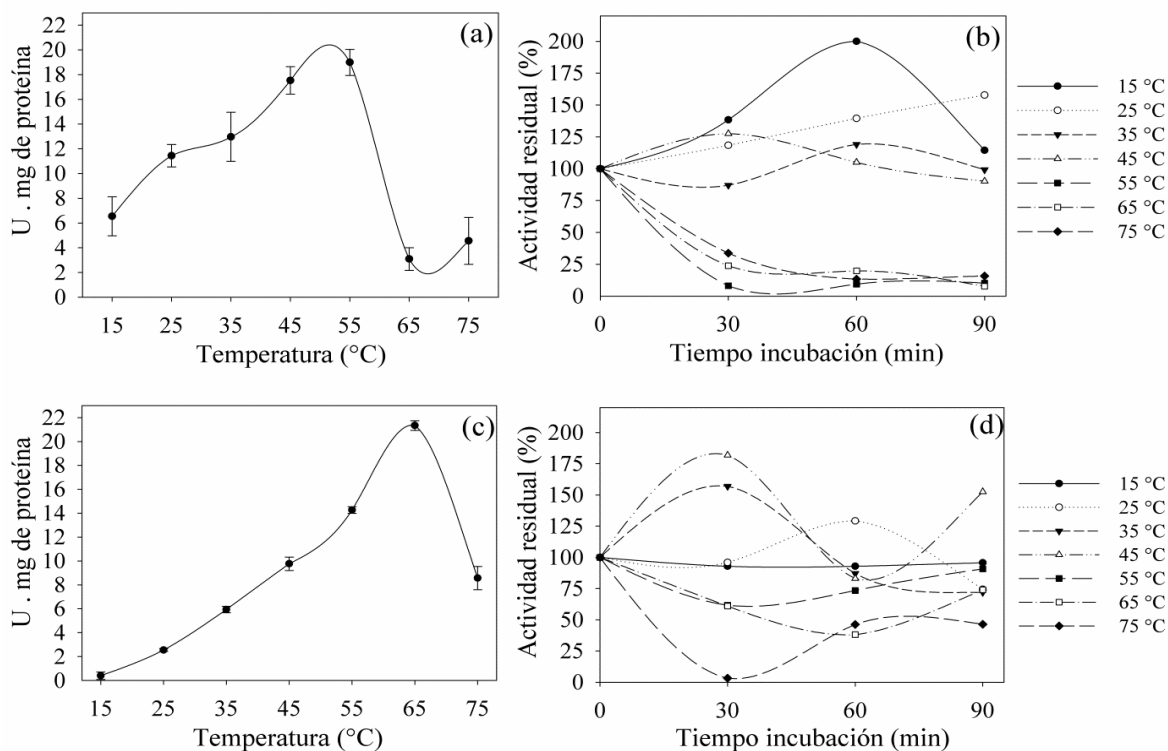


Figura 2. Efecto de la temperatura en las proteasas digestivas de juveniles de *C. trimaculatum*: a) temperatura óptima de las proteasas ácidas, b) estabilidad a la temperatura de las proteasas ácidas, c) temperatura óptima de las proteasas alcalinas, d) estabilidad a la temperatura de las proteasas alcalinas.

El análisis con inhibidores indica que la actividad de las proteasas ácidas es inhibida en más del 98% por el pepstatin A, inhibidor específico de la pepsina tipo A. Los inhibidores para la actividad de las proteasas alcalinas muestran una inhibición mayor al 50% para TPCK, el cual es un inhibidor específico de quimotripsina, para TLCK que es un inhibidor específico de tripsina, para Ovoalbúmina y SBT1 los cuales inhiben serina-proteasas. Mientras que con la Fenantrolina y el EDTA, inhibidores de metal-proteasas, y el PMSF, inhibidor general de serina-proteasa, presentan una inhibición mayor al 75% (Fig. 3).

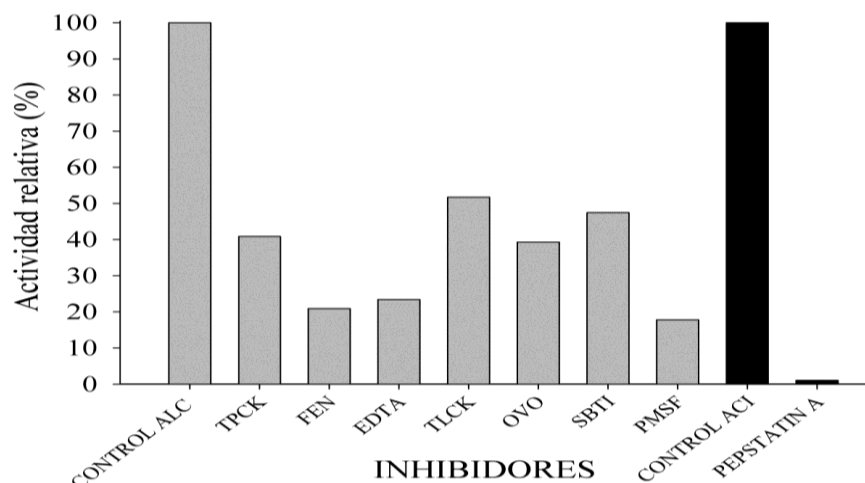


Figura 3. Efecto en la reducción de la actividad de las proteasas digestivas de extractos multienzimáticos de juveniles de *C. trimaculatum* por distintos inhibidores. Alk control (proteasas alcalinas sin inhibidor), TPCK (tosil-fenilalanina-clorometil cetona), FEN (fenantrolina), EDTA (ácido etilendiaminotetraacético), TLCK (tosil-lisina-clorometil cetona), OVO (ovoalbúmina), SBT1 (inhibidor trípico de soya), PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo). Aci control (proteasas ácidas sin inhibidor), Pepstatin A.

El análisis de electroforesis SDS-PAGE para proteasas alcalinas reveló para el control siete bandas con pesos moleculares desde 139.8 hasta 20.4 kDa. La Ovoalbúmina inhibió tres bandas (139.8, 38.0 y 20.4 kDa), mientras que el SBT1 y el PMSF inhiben cuatro bandas (139.8, 84.5, 35.4, 20.4 y 84.5, 38.0, 25.1, 20.4 kDa respectivamente). Los inhibidores TPCK y TLCK únicamente inhiben la primera banda (139.8 kDa). Por su parte, la Fenantrolina inhibe solamente la segunda banda (113.4 kDa) y el EDTA inhibe la primera y segunda banda (Fig. 4a).

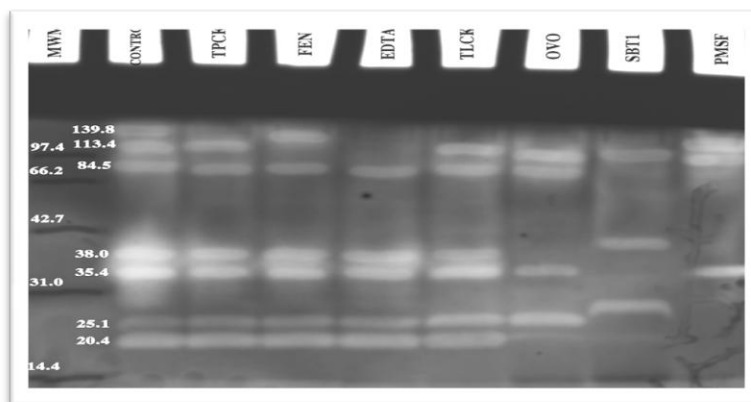


Figura 4. Electroforesis SDS-PAGE de las proteasas digestivas de *C. trimaculatum*: a) proteasas alcalinas; MWM (marcador): fosforilasa B de conejo 97.4 KD, albúmina bovina sérica 66.2 KD, Ovoalbúmina 42.7 KD, anhidrasa carbónica 31.0 KD y lisozima 14.4 KD; Control (sin inhibidor); Inhibidores: TPCK (tosil-fenilalanina-clorometil cetona), FEN (fenantrolina), EDTA (ácido etilendiaminotetraacético), TLCK (tosil-lisina-clorometil cetona), OVO (ovoalbúmina), SBT1 (inhibidor trípico de soya), PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo).

Discusión

En *C. trimaculatum* la actividad enzimática de las proteasas ácidas apareció en bajas actividades desde el momento de la eclosión de las larvas (día 0 dde), la cual se incrementó para los días 9 y 15 dde, coincidiendo con los días en que se inicia la alimentación exógena con nauplios de *Artemia* o se cambia a alimento balanceado. Estos resultados son similares a los reportados para otras especies de ambientes tropicales como *P. splendida* (Uscanga-Martínez *et al.* 2011); *A. tropicus* (Frías-Quintana 2009) y *C. urophthalmus* (López-Ramírez *et al.* 2011), en las que se describe una pronta detección de la proteasa ácida. Es probable que esta pronta actividad ácida se deba a hidrolasas como las catepsinas, que también actúan en condiciones ácidas (Álvarez-González 2003). Estas no necesariamente son de origen estomacal, pero son detectadas en los ensayos in vitro con extractos enzimáticos debido a que cuando se realizan los homogenizados se procesa todo el cuerpo de la larva, aumentando la posibilidad de contaminación con otras enzimas (Moyano *et al.* 1996). En cambio, la detección de la actividad de la pepsina es considerada como un

Toledo *et al.*, 2013. Avances en la Fisiología Digestiva de la Mojarra Tahuina *Cichlasoma trimaculatum*. 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. 405-459.

indicativo de la completa formación y funcionalidad del estómago; así como de la transformación de la larva en juvenil (Ueberschäer 1993; Gawlicka *et al.* 2001). Esto se debe a que las células gástricas del estómago son las que secretan el pepsinógeno, que se transformará a su forma activa (pepsina) por las condiciones ácidas generadas por el ácido clorhídrico, producido también por las glándulas gástricas (Gildberg 1988; Kageyama 2002; Yúfera *et al.* 2004; Zaiss *et al.* 2006; Yúfera y Darias 2007). Es por ello, que en años recientes este tipo de trabajos se ha acompañado con estudios de histología y genética, en la detección de las células gástricas y pepsinógenos, como los realizados en *Oplegnathus fasciatus* (He *et al.* 2012) y *L. guttatus* (Galaviz *et al.* 2012). Sin embargo, cuando se detecta la enzima pepsina se relaciona con el comienzo de la digestión ácida, aumentando la capacidad de hidrólisis de las proteínas y mejorando la eficiencia de la digestión extracelular de las proteínas, para dejar al intestino la absorción de nutrientes (Govoni *et al.* 1986; Yúfera y Darias 2007), dando por hecho la funcionalidad del estómago y la posibilidad del comienzo de una alimentación exógena con alimento vivo o bien realizar la sustitución de alimento vivo a dietas inertes (Galaviz *et al.* 2012). La actividad de las proteasas alcalinas se detectó a partir el día 6 dde durante la alimentación exógena con nauplios de *Artemia* y antes del incremento de la proteasas ácidas; lo anterior pone en evidencia que *C. trimaculatum* en primera instancia lleva a cabo el proceso de digestión por las enzimas pancreáticas, debido a que la digestión ácida se inicia con la funcionalidad del estómago ocurriendo días después (Alarcón y Martínez 1998; Zambonino-Infante & Cahu 2001; Kvåle *et al.* 2007). En especies como en *Paralichthys californicus* (Álvarez-González *et al.* 2006); *Seriola lalandi* (Chen *et al.* 2006); *Sciaenops ocellatus* (Lazo *et al.* 2007), *P. maculatofasciatus* (Álvarez-González *et al.* 2008), *Chelon labrosus* (Zouiten *et al.* 2008) se ha reportado que la actividad proteolítica alcalina es llevada a cabo en primer instancia por las endopeptidasas tripsinas y quimotripsina, siendo la enzima tripsina la primera en mostrar actividad y en realizar la mayor parte de la digestión de proteínas. Lo anterior es opuesto a lo encontrado en *C. trimaculatum* donde se detectó primeramente la actividad de tipo quimotripsina; coincidiendo con lo descrito en *C. urophthalmus* (López-Ramírez *et al.* 2011), lo que es posible debido a que en especies omnívoras y herbívoras la actividad de la quimotripsina se encuentra en mayor proporción a la tripsina, siendo inverso en especies carnívoras y marinas (Jonas *et al.* 1983). Por lo tanto, en *C. trimaculatum* la

baja cantidad de tripsina en los primeros días es compensada con quimotripsina, mientras que la tripsina mostro una actividad días después; la cual también se ha relacionado con la transformación de larva a juvenil (Kolkovski 2001). También estas dos enzimas se han relacionado con el estado nutricional de las larvas, ya que en condiciones normales la secreción de tripsina va en aumento en demanda a la hidrólisis de proteínas, pero si hay una restricción de alimento en cantidad y calidad, la actividad de la proporción de tripsina-quimotripsina se estanca o disminuye, debido a que se produce relativamente menos tripsina frente a una secreción constante de quimotripsina (Moyano 2006). Este tipo de relación se observó notablemente en las actividades de *C. trimaculatum*, similar a lo encontrado en *Sparus aurata* (Moyano *et al.* 1996) y *Diplodus sargus* (Cara *et al.* 2003) y dando la pauta a pensar que los esquemas de alimentación y el tipo de alimento suministrado para *C. trimaculatum* podría no ser los más adecuados. Por otra parte, se determinaron las exopeptidasas carboxipeptidasa A y leucina-aminopeptidasa, las cuales mostraron actividades desde el momento de la eclosión de las larvas, de forma similar a lo encontrado en *C. urophthalmus* (López-Ramírez *et al.* 2011); mientras que la pronta actividad de leucina-aminopeptidasa se ha descrito en especies como *P. splendida* (Uscanga-Martínez *et al.* 2011) y *Oreochromis niloticus* (Tengjaroenkul *et al.* 2002). En cambio en especies como en *S. ocellatus* (Lazo *et al.* 2007); *P. maculatofasciatus* (Álvarez-González *et al.* 2008); *C. undecimalis* (Jiménez-Martínez *et al.* 2012) al inicio se detecta una baja actividad de leucina-aminopeptidasa incrementándose con el transcurso de los días o en los cambios de alimentación. Esta enzima tiene la función de finalizar la digestión a nivel luminal hidrolizando los péptidos para liberar aminoácidos a partir de su lado amino terminal, de la digestión iniciada en primera instancia por las endoproteasas tripsina y quimotripsina (Moyano 2006; Lazo *et al.* 2007; Su-Hua *et al.* 2011). La leucina-aminopeptidasa se encuentra situada en la membrana del borde del cepillo, indicando la maduración de los enterocitos al realizarse el cruce del incremento de la actividad de la fosfatasa alcalina y el descenso de leucina-aminopeptidasa (Ma *et al.* 2005; Moyano 2006; Lazo *et al.* 2007). En *C. trimaculatum* esto se efectúa en el día 15 dde, donde también se registra la mayor actividad de esta enzima. Por otra parte, la carboxipeptidasa A mostró actividad desde el momento de la eclosión, incrementándose al suministrar alimento vivo (nauplios de *Artemia*) teniendo una actividad máxima el día 9 dde. Esta pronta actividad ha

sido detectada en *Paralichthys olivaceus* (Srivastava *et al.* 2002) y *C. undecimalis* (Jiménez-Martínez *et al.* 2012), pero en esta última especie también se incrementó la actividad al momento de suministrar el alimento vivo (nauplios de *Artemia*). Esta enzima es considerada una metaloproteasa al depender de Zn^{+2} para llevar a cabo la catálisis; asimismo, actúa a nivel luminal y su función es hidrolizar los péptidos sobre el lado carboxilo terminal para la liberación de aminoácidos. Además de la importancia en el área nutricional se ha utilizado como indicador en la presencia de posibles enfermedades (Vendrell *et al.* 2000). El zimograma SDS-PAGE de las proteasas alcalinas reveló seis bandas de actividad con un rango de peso molecular de 113.4 a 20.4 kDa. En el día 6 dde aparecen las tres primeras bandas (113.4, 84.5 y 35.4 kDa) las cuales podrían corresponder a las enzimas de tipo exopeptidasas, como la carboxipeptidasa A o la leucina-aminopeptidasa, debido a que muestran actividad primero que las endopeptidasas; y además tienen un incremento considerable en el día 6 dde, cuando se suministra alimento vivo (nauplios de *Artemia*). Asimismo, se ha mencionado que estas enzimas tienen un peso molecular de 25 a 105 kDa, descrito de músculos y enzimas digestivas de algunos peces, así como de forma purificada (Vonk and Western 1984; Liu *et al.* 2008; Li-Gen *et al.* 2010; Su-Hua *et al.* 2011; López-Ramírez *et al.* 2011; Jiménez-Martínez *et al.* 2012). Para el día 9 dde aparece una cuarta banda con peso molecular de 25.1 kDa, la cual podría ser una endopeptidasas de tipo tripsina o quimotripsina, debido a que estas enzimas tienen pesos moleculares de 22 a 28 kDa para tripsina y de 22 a 30 kDa para quimotripsina respectivamente (Simpson, 2000; Castillo-Yáñez *et al.* 2005; Castillo-Yáñez *et al.* 2006; Castillo-Yáñez *et al.* 2009; Ben *et al.* 2011). En este caso, podría ser la quimotripsina debido a que es la primera en mostrar actividad con respecto a la tripsina. Es hasta el día 11 dde cuando se completan las bandas de actividad, con la expresión de las dos últimas bandas con pesos moleculares de 38.0 y 20.4 kDa. El número de isoformas de las enzimas digestivas expresadas en las diferentes especies está relacionado con los hábitos alimenticios de las especies, por lo que al contar con seis bandas de actividad de proteasas, *C. trimaculatum* puede ser considerada como una especie de hábitos omnívoros similar a *C. urophthalmus* (López-Ramírez *et al.* 2011); además, este tipo y número de isoformas han sido detectadas en otras especies de peces como *Solea senegalensis* con siete tipos de bandas (Sáenz *et al.* , 2005); mientras que en especies carnívoras el número de bandas es

bajo como en *Thunnus thynnus* con tres isoformas (Essed *et al.* 2002); *P. maculatofasciatus* con 2 isoformas (Álvarez-González *et al.* 2010a) y *C. undecimalis* con 2 isoformas (Álvarez-González *et al.* , 2010b).

Por otra parte, la actividad lipasa se registró a partir del día 6 dde posterior a lo descrito en otras especies como *O. niloticus* (Tengjaroenkul *et al.* 2002), *S. ocellatus* (Lazo *et al.* 2007), *P. maculatofasciatus* (Álvarez-González *et al.* 2008), *D. dentex* (Gisbert *et al.* 2009) y *C. undecimalis* (Jiménez-Martínez *et al.* 2012), donde se ha mostrado actividad de lipasas desde el momento de la eclosión e incluso se ha registrado una actividad máxima en estos días. Esta primera actividad ha sido relacionada con las esterasas, las cuales llevan a cabo la hidrólisis de lípidos en la absorción del saco vitelino (Díaz *et al.* 2002; Chakrabarti *et al.* 2006; Álvarez-González *et al.* 2008). Pero no en todas las especies se registra esta pronta actividad, como es el caso de nuestro estudio y de *P. californicus* (Álvarez-González *et al.* 2006), en donde la actividad se detectó hasta la apertura de la boca coincidiendo con el inicio de la alimentación exógena. La máxima actividad de la lipasa se registró para el día 24 dde, antes de lo encontrado en otros cíclidos tropicales como *P. splendida* (Uscanga-Martínez *et al.* 2011) y *C. urophthalmus* (López-Ramírez *et al.* 2011), los cuales han presentado esta actividad alrededor del día 40 dde. Esta segunda actividad de lipasas la han relacionado con la acción de las lipasas verdaderas dependientes de sales biliares, las cuales llevan a cabo la digestión de lípidos exógenos para la liberación de ácidos grasos altamente poli-insaturados; también sugieren el completo desarrollo y funcionalidad del páncreas exócrino así como la maduración del tracto digestivo (Tengjaroenkul *et al.* 2002; Comabella *et al.* 2006; Álvarez-González *et al.* 2008). Con ello, y tomando en cuenta la capacidad digestiva en las primeras etapas de desarrollo, se pueden suministrar o enriquecer las dietas inertes con lípidos esenciales para favorecer el crecimiento y la supervivencia de las larvas (Díaz *et al.* 2002; Uscanga-Martínez *et al.* 2011). La actividad amilasa se detectó a partir del día 3 dde, antes de la alimentación exógena con nauplios de *Artemia*, y se mantuvo en incremento de manera fluctuante. La pronta actividad durante los primeros días de eclosión también se ha descrito en especies como *C. labrosus* (Zouiten *et al.* 2008) y *Miichthys miiuy* (Xiu-Juan *et al.* 2009), esta temprana actividad la adjudican a que está programada genéticamente para aprovechar los nutrientes del vitelo y no es estimulada por

el suministro de la dieta (Xiu-Juan *et al.* 2009; Jiménez-Martínez *et al.* 2012). Sin embargo, también se ha descrito que el tipo de dieta y los cambios de alimentación, generan cambios o fluctuaciones en la actividad de la amilasa (Xiu-Juan *et al.* 2009). Lo anterior se observó en nuestro estudio, ya que al momento de suministrar el alimento vivo (nauplios de *Artemia*) la actividad amilasa disminuyó, pero se incrementó cuando se comenzó la coalimentación de alimento vivo y alimento balanceado, similar a lo descrito en *M. miiuy* (Xiu-Juan *et al.* 2009). En cambio en otras especies, se ha demostrado una alta actividad en las primeras etapas para después disminuir y mantenerse en bajas concentraciones para el aprovechamiento de carbohidratos (Jiménez-Martínez *et al.* 2012). En peces dulceacuícolas como en lo descrito en los cíclidos tropicales de *P. splendida* (Uscanga-Martínez *et al.* 2011), *C. urophthalmus* (López-Ramírez *et al.* 2011) y en nuestro estudio, la cantidad de amilasa no disminuye, sino que muchas veces va en aumento, lo que le permite poder aprovechar los nutrientes del medio. Además, se ha mencionado que en especies herbívoras y omnívoras la cantidad o relación de amilasa es mayor a lo encontrado en especies carnívoras (Hidalgo *et al.* 1999; Fernández *et al.* 2001; Zouiten *et al.* 2008). Por lo que todas estas características deberán ser tomadas en cuenta para la formulación del alimento, debido a que se puede incluir cierta cantidad de carbohidratos para enriquecer el aporte de nutrientes en las primeras etapas de crecimiento de las larvas (Cahu *et al.* 2004). La actividad de las fosfatasa, en particular la fosfatasa alcalina, se ha tomado como un indicador de desarrollo de los enterocitos y por consiguiente la maduración del intestino (Zambonino Infante y Cahu 2001). Con ello, se establece el proceso de absorción y se logra una digestión eficiente a nivel luminal en las membranas del borde del cepillo característico de peces adultos (Zambonino Infante y Cahu 2001, Zamani *et al.* 2009). Este momento es considerado cuando se realiza el cruce de la disminución de la actividad de la alanina-aminopeptidasa y el incremento de la fosfatasa alcalina (Ma *et al.* 2005; Moyano 2006; Lazo *et al.* 2007). Las fosfatasas además de formar parte en el proceso de absorción con el transporte de nutrientes a través de la membrana celular, se ha visto que están involucradas en la hidrólisis de fosfatos inorgánicos que son utilizados para la producción de energía (Álvarez-González *et al.* 2008). La actividad de las fosfatasas se registró desde los primeros días incrementándose hasta alcanzar su actividad máxima en el día 13 dde para la fosfatasa ácida y para el día 15 dde para la fosfatasa alcalina, esta última tuvo una menor actividad.

Los resultados son similares a los de *C. urophthalmus* (López-Ramírez *et al.* 2011), pero diferentes de lo encontrado en *P. splendida* (Uscanga-Martínez *et al.* 2011), donde se registra una actividad alta de inicio y disminuye con el transcurso del tiempo. La actividad máxima se alcanzó cuando se suministró la dieta balanceada, sugiriendo la posibilidad del aprovechamiento de los nutrientes. Por lo consiguiente, la detección de la actividad en especial de algunas enzimas digestivas, se ha tomado como un indicativo de la maduración y funcionalidad del aparato digestivo para poder digerir alimento exógeno (Moyano *et al.* 1996). Además, este tipo de estudios en conjunto con otros sobre fisiología digestiva y nutrición, han sido esenciales en el establecimiento de los protocolos de alimentación para lograr una producción constante de larvas (Díaz *et al.* 1997; Gisbert *et al.* 2009; Zambonino-Infante *et al.* 2008). En conclusión, la mayoría de las actividades de las enzimas determinadas en *C. trimaculatum*, se muestran desde los primeros días de eclosión; pero es entre los días 6 y 9 dde cuando se registran el incremento de las actividades coincidiendo con el suministro de la alimentación exógena (nauplios de *Artemia*), y para el 15 dde se registra la mayor actividad de casi todas las enzimas digestivas, coincidiendo con el inicio de la alimentación de la dieta comercial, lo que es similar a lo reportado por Zambonino-Infante y Cahu (2007), quienes mencionan que en las primeras etapas de crecimiento las actividades de las enzimas digestivas suelen ser modificadas por la proporción y el tipo de alimento suministrado, mientras que otras ya se encuentran programadas genéticamente para su expresión (Xiu-Juan *et al.* 2009; Jiménez-Martínez *et al.* 2012), y otras hasta cuando los órganos secretores son completamente funcionales para llevar a cabo la secreción de las enzimas (Álvarez-González *et al.* 2008). Es por ello, *C. trimaculatum* se encuentra equipada enzimáticamente desde el día 9 después de eclosión, pero se recomienda iniciar el proceso de deshabitación con alimento balanceado a partir del día 15 después de eclosión.

La mojarra tahuina (*C. trimaculatum*) es una especie que además de representar un recurso importante desde el punto de vista pesquero y comercial en la región Sur de México, por lo que recientemente está siendo investigada para desarrollar su cultivo a escala comercial; sin embargo, existe el desconocimiento sobre aspectos básicos, incluyendo la capacidad digestiva que permita el desarrollo de alimentos balanceados. Considerando lo anterior,

nuestros resultados demuestran que esta especie tiene una alta actividad de proteasas digestivas, siendo mayor la actividad de proteasas alcalinas en relación a las proteasas ácidas, y también hay una mayor actividad de quimotripsina en relación a la tripsina. Lo que indica que esta especie presenta hábitos omnívoros a diferencia de otros peces como *S. formosus* (Natalia *et al.* , 2004) y *S. maximus* (Hai-ying *et al.* , 2006), las cuales tienen hábitos carnívoros presentando altas actividades de proteasas ácidas en el estómago, siendo este el órgano más importante para la digestión de proteínas y una menor actividad de proteasas alcalinas en el intestino donde se realizan los procesos finos de hidrólisis de proteínas a péptidos y aminoácidos, los cuales son absorbidos por los enterocitos (Yúfera y Darias, 2007). Otro de los aspectos que se toman en cuenta para determinar los hábitos alimenticios en peces, es la longitud intestinal relativa, relación que existe entre la longitud corporal y la longitud del tubo digestivo. Este índice según lo descrito por Elliot y Bellwood (2003), menciona que por lo general peces de hábitos omnívoros y herbívoros poseen índices mayores a los peces carnívoros, ya que estos últimos muestran un índice con valor inferior a 1. En *C. trimaculatum* este valor resultó mayor (1.45 ± 0.33), pero es próximo al valor de 1. Por lo tanto, considerando los aspectos bioquímicos, anatómicos y fisiológicos esta especie apunta a ser considerada de hábitos omnívoros pero próximos a la carnivoría, coincidiendo con Yáñez-Arancibia (1978), quien la describe como una especie omnívora. Sin embargo, Violante (1995) menciona que es una especie omnívora, pero con tendencia a la carnivoría en algunos meses del año dependiendo de la disponibilidad de presas, lo cual es similar a lo encontrado en los análisis bioquímicos y de longitud intestinal relativa. Por otro lado, se encontró que las proteasas ácidas alcanzan su mayor actividad a pH 2; lo que coincide con lo encontrado en la mayoría de los estudios como en *Symphysodon aequifasciata* (Chong *et al.* , 2002), *S. formosus* (Natalia *et al.* , 2004), *Diplodus puntazzo* (Tramati *et al.* 2005), *Latimeria chalumnae* (Tanji *et al.* 2007), *Nemipterus spp.* (Nalinanon *et al.* 2008), *T. alalunga* (Nalinanon *et al.* 2010a). Sin embargo, en el cíclido *P. splendida* y en la trucha *Oncorhynchus mykiss* se han determinado valores de pH óptimos poco comunes para la digestión ácida de 5 y 4 respectivamente (Perales-García, 2010; Furné *et al.* 2005). El que las proteasas tengan un determinado valor de pH en donde alcanzan su mayor actividad, es también el punto donde sus centros activos

presenta una adecuada conformación iónica para llevar a cabo la catálisis con gran eficiencia (Álvarez-González, 2003).

También se pone en manifiesto la presencia y abundancia de tal vez una sola isoforma para la digestión ácida, en este caso de tipo pepsina al comprobarlo con una inhibición mayor al 98% por el pepstatin A, inhibidor específico de la enzima pepsina A. La cual, en conjunto con el HCl segregado por las células gástricas, lleva a cabo en primera instancia la hidrólisis de las proteínas en condiciones ácidas por la enzima pepsina A; para después continuar la digestión y absorción de nutrientes en condiciones alcalinas en el intestino. En *C. trimaculatum*, las proteasas alcalinas tienen un pH óptimo de 10, lo cual es algo común encontrar en las distintas especies ya sea de hábitat marino o dulceacuícola; valores de pH óptimos entre 9 y 10 se han reportado en *Brycon orbignyanus* (García-Carreño *et al.* 2002); *Labeo rohita* y *Hypophthalmichthys molitrix* (Kumar *et al.* , 2007); *Thunnus orientalis* (Matus *et al.* 2007); *Ctenopharyngodon idella* (Liu *et al.* 2008); *O. niloticus* x *O. aureus* (Jun-Sheng *et al.* 2006); *D. puntazzo* (Tramati *et al.*, 2005). Sin embargo, se han reportado especies con diferentes valores de pH óptimos; incluso en una misma especie se han indicado dos valores de máxima actividad ejemplo de ello se ha dado para *P. maculatofasciatus* (Álvarez-González, 2003) y *C. undecimalis* (Álvarez-González *et al.* 2010). Esto puede ser posible porque las proteasas alcalinas están constituidas por varios tipos de enzimas, las cuales tienen diferentes pH óptimos (Alarcón *et al.* 1998). El encontrar en *C. trimaculatum* un pH óptimo bien marcado, da la pauta a suponer que se encuentre un solo tipo o varios tipos de enzima en mayor proporción o que comparten el mismo valor de pH; en este caso podrían ser tipo carboxipeptidasa, elastasas o colagenasas; las cuales llegan a mostrar su máxima actividad en un rango de pH 9 a 10 (Matus *et al.* 2007). En *C. trimaculatum* esto también es posible porque se encontró una inhibición mayor al 75% por los inhibidores Fenantrolina y EDTA específicos de estas metal-proteasas. Las proteasas ácidas son estables a pH ácidos y su actividad disminuye al alcalinizarse el pH; mientras que las proteasas alcalinas son estables a pH alcalino y son resistentes a pH ligeramente ácidos, estas condiciones son similares a lo reportado en cíclido *P. splendida* (Perales-García, 2010). Pero en otros peces con tendencia a la carnivoría y de hábitat marino, las proteasas ácidas son estables por cierto tiempo a pH alcalinos como lo descrito para *T. thynnus* (Essed *et al.* 2002) y *S. maximus* (Hai-ying *et al.*

2006). Esto también se ha encontrado en especies carnívoras dulceacuícolas como *A. tropicus* (Guerrero-Zarate, 2010) y en especies omnívoras marinas como *S. senegalensis* (Sáenz *et al.* 2005). Desde el punto de vista fisiológico, el que las proteasas ácidas sean resistentes a pH alcalinos, permite a las proteasas ácidas seguir actuando en la degradación del alimento cuando éste pasa al intestino, hasta alcalinizarse, dando paso a la hidrólisis por parte de las proteasas alcalinas. Esto difícilmente podría suceder en *C. trimaculatum* debido a que las proteasas ácidas pierden actividad a pH neutro y alcalinos. Sin embargo, esta situación de pérdida de actividad es compensada por la hidrólisis que las proteasas alcalinas realizan a pH ácido, y que además se compensa con un largo intestino y fuertes esfínteres, que mantienen el alimento durante más tiempo, y la acción conjunta de las hormonas digestivas como la colecistoquinina que provoca los movimientos peristálticos, incrementando la superficie de contacto en la relación enzima-sustrato (Álvarez-González, 2003). De esta forma, las proteasas digestivas alcalinas podrían comenzar a actuar desde que el alimento entra al intestino aún con pH ácido. Es importante mencionar que por lo general las proteasas alcalinas son más estables a los diferentes pH, por el hecho de tener un mayor número de isoformas que las constituyen (tripsina, quimotripsina, l-aminopeptidasa y carboxipeptidasa A) como se demuestra en el zimograma al detectarse 7 bandas con actividad en el control sin inhibición, lo que aumenta la posibilidad de hidrolizar las proteínas del alimento a pesar de la variación del pH (Alarcón *et al.* , 1998). En cambio las proteasas ácidas suelen ser más susceptibles a los cambios de pH, al solo encontrarse una isoforma que corresponde a la pepsina, la cual al ser sometida a diferentes valores de pH, sufre cambios en su configuración estructural o desnaturalización y por lo consiguiente genera pérdida parcial o total en su actividad (Nalinanon *et al.* 2010b). Es decir, que estas variaciones de la actividad enzimática digestiva, son diferentes entre las especies, dependiendo de sus propios aspectos genéticos, y las condiciones de su hábitat. En este aspecto, la temperatura óptima de las proteasas alcalinas es 10 °C más elevadas a la temperatura óptima de las proteasas ácidas, y son más termoestables. Por lo regular esta diferencia entre las temperaturas óptimas de las proteasas alcalinas y ácidas se ha descrito en especies de hábitos carnívoros como en *T. thynnus* (Essed *et al.*, 2002); *B. orbignyanus* (García-Carreño *et al.* 2002) y *P. maculatofasciatus* (Álvarez-González, 2003). La temperatura óptima en las proteasas ácidas resultó de 55 °C igual a la descrita en el híbrido

de *O. niloticus* x *O. aureus* (Jun-Sheng *et al.* 2006), pero mayor a las encontradas en *S. senegalensis* (Sáenz *et al.* , 2005) y *T. orientalis* (Matus *et al.* 2007) con temperaturas óptimas de 37 y 45 °C. La actividad de las proteasas ácidas es estable hasta los 45 °C, incluso con actividades arriba del 100% en algunos de los tiempos de incubación, pero pierden su estabilidad en más del 60% a los 55 °C en adelante; esto podría deberse a la desnaturalización de la pepsina después de los 55 °C, coincidiendo con lo descrito por Nalinanon *et al.* (2008). En cambio las proteasas alcalinas tienen una temperatura óptima de 65 °C mayor a lo encontrado en *Carank hippos*, *Pseudupeneus maculatus*, *Sparisoma sp.*, *Hoplias malabaricus* (Alencar *et al.* 2003) y en *O. niloticus* (Bezerra *et al.* 2005), las cuales tienen una temperatura óptima de 50 a 55 °C. Además resultaron ser más termoestables, al verse afectadas únicamente en un 50% la actividad a temperaturas de 65 y 75 °C, aspecto parecido a lo encontrado para *C. undecimalis* (Álvarez-González *et al.* 2010) y *A. tropicus* (Guerrero-Zarate, 2010). Cabe mencionar que los valores de temperaturas óptimas y de estabilidad térmica de la actividad de las proteasas digestivas, son solamente parámetros operacionales de las enzimas, más que resultados de importancia fisiológica; los cuales pueden estar asociados a la configuración de las enzimas así como por el hábitat, medio ambiente y aspectos genéticos de las especies (Gildberg, 1998; Alarcón *et al.* 1998; Álvarez-González, 2003; Nalinanon *et al.* 2008). Sin embargo, esta deficiencia en la actividad se compensa con un mayor tiempo de retención de los alimentos en el sistema digestivo para efectuar la hidrólisis de las proteínas a temperaturas más bajas de su óptimos operacionales (Alarcón *et al.* 1998; Álvarez-González, 2003; Moyano, 2006; Uscanga *et al.* 2010). La determinación del tipo de enzimas que constituyen a las proteasas ácidas de *C. trimaculatum*, se realizó utilizando el inhibidor específico Pepstatin A, el cual inhibió en más del 98% la actividad de las proteasas ácidas, resultado menor al encontrado en especies de hábitos carnívoros como *S. maximus* (Hai-ying *et al.* 2006), *Siniperca chuatsi* (Zhou *et al.* 2008) y *Katsuwonus pelamis* (Nalinanon *et al.* 2010b) en donde se purifico y se inhibió totalmente la enzima pepsina con el inhibidor Pepstatin A. Por lo tanto, se pone en manifiesto que la hidrolisis en condiciones ácidas es llevada a cabo en mayor grado por la enzima de tipo pepsina.

Por otra parte, los siete tipos de inhibidores específicos para las proteasas alcalinas afectaron en por lo menos un 50% la actividad enzimática. De estas el grupo de las serina-proteasas resultaron inhibidas en más del 80% por el PMSF y reduciendo su actividad en un 50% ovoalbúmina y SBT1. Este patrón donde las serina-proteasas son bastante afectadas en relación al resto de las otras enzimas, resultó parecido a lo encontrado en *S. aequifasciata* (Chong *et al.*, 2002); *T. thynnus* (Essed *et al.* 2002) y *C. idella* (Liu *et al.* 2008). El otro grupo con una alta inhibición son las metal-proteasas con alrededor de un 80% de inhibición por Fenantrolina y EDTA. Esto indica que la digestión alcalina de *C. trimaculatum* tiene la capacidad de poder hidrolizar las proteínas a partir de los extremos carboxilo y amino, liberando aminoácidos, lo cual debe de ser considerado para la formulación de alimentos o para delimitar el uso de harinas o ingredientes que contengan inhibidores de metal-proteasas y serina-proteasas. El TPCK inhibió en un 60% la actividad de quimotripsina y el TLCK inhibió el 50% de la actividad de tripsina, confirmando la mayor proporción de quimotripsina en relación a tripsina, esto es diferente a lo encontrado en *B. orbignyianus* (García-Carreño *et al.*, 2002); *S. formosus* (Natalia *et al.*, 2004); donde se ha encontrado una mayor inhibición de tripsina por el inhibidor TLCK, por lo que la importancia de determinar los tipos de enzima que componen proteasas digestivas de las especies por medio de inhibidores específicos, permite delimitar el uso de ciertos ingredientes que pudieran reducir la actividad de ciertas enzima y limiten la digestibilidad de los alimentos (Essed *et al.* 2002).

En otros aspectos, el estudio de los inhibidores específicos de las proteasas alcalinas se acompañó con el análisis de electroforesis SDS-PAGE, en donde se presentaron siete bandas en el control conformadas en tres grupos de isoformas bien establecidas. El primero grupo de tres bandas con peso molecular entre 139.8 a 84.5 kDa, el segundo con dos bandas con peso molecular promedio de 36.7 kDa y el tercero con dos bandas con promedio de peso molecular de 22.75 kDa. El número de bandas encontradas en *C. trimaculatum* es igual al de *S. senegalensis* (Sáenz *et al.*, 2005) especie de hábitos omnívoros; pero mayor a los determinados en *P. maculatofasciatus* (Álvarez-González, 2003), *P. splendida* (Perales-García, 2010), *C. undecimalis* (Álvarez-González *et al.* 2010), *A. tropicus* (Guerrero-Zarate, 2010) especies de hábitos carnívoros las cuales presentan de tres a cinco isoformas.

Asimismo, los inhibidores Ovoalbúmina, SBT1 y PMSF, específicos de serina-proteasas, resultaron los que mayor inhibición ejercieron al eliminar entre 3 a 4 bandas, siendo las más afectadas las bandas del tercer grupo. Las cuales pueden ser de tipo tripsina ó quimotripsina, debido a que este tipo de enzimas en forma purificada se han reportado en un rango de distribución de peso molecular de 22 a 28 kDa para tripsina y de 22 a 30 kDa para quimotripsina (Simpson, 2000; Castillo-Yáñez *et al.* 2005; Castillo-Yáñez *et al.* 2006; Castillo-Yáñez *et al.*, 2009; Ben *et al.* 2011). Sin embargo, los inhibidores específicos de tripsina (TLCK) y quimotripsina (TPCK) no inhibieron estas bandas, si no únicamente la primer banda con peso molecular de 139.8 kDa, lo cual es un poco contradictorio a lo antes mencionado por los inhibidores Ovoalbúmina, SBT1 y PMSF. Debido a que en especies como *S. sagax caerulea* (Castillo-Yáñez *et al.* , 2005) y *Sardinella aurita* (Ben *et al.*, 2011), la tripsina purificada mostró un peso molecular entre 25 kDa y 28.8 kDa respectivamente. Mientras que la quimotripsina purificada en *S. sagax caerulea* mostró un peso molecular de 25.5 kDa (Castillo-Yáñez *et al.* 2009), y adicionalmente, los inhibidores fenantrolina y EDTA específicos de metal-proteasas inhibieron de una y dos bandas en el primer grupo. Por lo que se sugiere realizar estudios con enzimas purificadas para determinar el tipo de enzimas específicas presentes para *C. trimaculatum*.

Conclusión

Considerando los aspectos bioquímicos y fisiológicos de esta investigación se pone en manifiesto que la digestión en *C. trimaculatum* es llevada a cabo tanto por proteasas ácidas como por proteasas alcalinas. En las proteasas ácidas, la enzima pepsina es la que lleva a cabo la mayor parte de la hidrólisis, pero es poco resistente a los parámetros de pH y temperatura. En cambio la digestión de las proteasas alcalinas es más estable a estos parámetros. Condiciones que le permiten a *C. trimaculatum* aprovechar las proteínas de su entorno y de alimentos formulados. Por lo tanto, esta especie desde el punto de vista de su capacidad digestiva apunta a ser considerada de hábitos omnívoros, con tendencia a la carnívora.

Referencias bibliográficas

Toledo *et al.*, 2013. Avances en la Fisiología Digestiva de la Mojarra Tahuina *Cichlasoma trimaculatum*. 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. 405-459.

- Alarcón, F.J. (1997). Procesos digestivos en peces marinos: Caracterización y aplicaciones prácticas. Tesis de Doctorado, Universidad de Almería, España. 187 pp.
- Alarcón, F.J. y Martínez-Díaz, M.I. (1998). Fisiología de la digestión en larvas de peces marinos y sus aplicaciones al cultivo larvario en masa. *AQUANIC* 5:1-14.
- Alencar, B.R., Biondi, M.M., Paiva, M.V.L., Carvalho-Junior, B.L., Bezerra, S.R., 2003. Alkaline proteases from the digestive tract of four tropical fishes. *Braz. J. Food Technol.* 6(2), 279-284.
- Alvarez del Villar, J. (1970). Peces mexicanos (Claves). Sec. Ind. Com. Direc. Gral. de Pesca e Ind. Conexas, 1-166.
- Álvarez-González, C.A. (2003). Actividad enzimática digestiva y evaluación de dietas para el destete de larvas de la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* (Percoidei: serranidae). Tesis doctoral. CICIMAR. La Paz, Baja California Sur, México. 180 pp.
- Álvarez-González, C.A., Cervantes-Trujano, M., Tovar-Ramírez, D., Conklin, D.E., Nolasco, H., Gisbert, E. y Piedrahita, R. (2006). Development of digestive enzymes in California halibut *Paralichthys californicus* larvae. *Fish Physiology and Biochemistry* 31:83–93.
- Álvarez-González, C.A., Gabriela-Cortés, G., Jiménez-Martínez, L.D., Sánchez-Zamora, A., Arena-Ortiz, G., Martínez-Bruguete, T., Tovar-Ramírez, D., Concha-Frias, B., Márquez-Couturier, G., Perales-García, N., Asencio-Alcudia, G.G., Jesús-Ramírez, F. (2010a). Avances en la fisiología digestiva del robalo blanco (*Centropomus undecimalis*) en Tabasco, México. En: Cruz-Suarez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D.A., Gamboa-Delgado, J., (Eds). *Memorias del X Avances en Nutrición Acuicola y X Simposio Internacional de Nutrición Acuicola*. 8-10 de Noviembre, San Nicolás de los Garza, N. L., México. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México. 99-232 pp.
- Álvarez-González, C.A., Márquez-Couturier, G., Arias-Rodriguez, L., Contreras-Sánchez, W.M., Uscanga-Martínez, A., Perales-García, N., Moyano-López, F.J., Hernández-Jiménez, R., Civera-Cerecedo, R., Goytortua-Bores, E., Isidro-Olán, L., Almeida-Madrigal, J.A., Tovar-Ramírez, D., Gutiérrez-Ribera, J.N., Arévalo-Galán, L.M., Eric, G., Treviño, L. y Morales-Sánchez, B., 2008. Avances en la Fisiología Digestiva y Nutrición de la Mojarra Tenguayaca *Petenia splendida*. En: Cruz, S.E., Ricque, M.D., Tapia, S.M., Nieto, L.M.G., Villareal, C.D.A.,
- Álvarez-González, C.A., Moyano-López, F.J., Civera-Cerecedo, R., Carrasco-Chávez, V., Ortiz-Galindo, J.L. y Dumas, S. (2008). Development of digestive enzyme activity in larvae of spotted sand bass *Paralabrax maculatofasciatus*. 1. Biochemical analysis. *Fish Physiol Biochem* 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. y Dumas S. (2010b). Development of digestive enzyme activity in larvae of spotted sand bass *Paralabrax maculatofasciatus* II: Electrophoretic analysis. *Fish Physiol Biochem* 36:29–37.

- Anson ML (1938) The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin. *J Gen Physiol* 22:79–89
- Archibal, A.L. (1987). Comparison of the serum amylases of farm animals. *Comparative Biochemistry and Physiology* 88B (3):963-968.
- Baltazar, P.M. (2007). La tilapia en el Perú: Acuicultura, mercado y perspectivas. *Revista Peruana de Biología*. 13:267-273.
- Barletta, L. (2001). Importancia de la proteína en los peces. *Portal Veterinaria*, © 2003 <http://www.PortalVeterinaria.com> (consultado el 10 de febrero de 2011).
- Behal, F.J., Asserson, B., Dawson, F., Hardman, J. (1965). A study of human tissue aminopeptidase components. *Arch. Biochem. Biophys.* 111:335-344
- Ben KH, Jellouli K, Souissi N, Ghorbel S, Barkia A, Nasri M (2011) Purification and characterization of three trypsin isoforms from viscera of sardinelle (*Sardinella aurita*). *Fish Physiol Biochem* 37:123-133
- Bergmeyer HV (1974) *Phosphatases methods of enzymatic analysis*, vol 2. Academic Press, New York.
- Bezerra, S.R., Lins, J.F.E., Alencar, B.R., Paiva, M.G.P., Chaves, E.C.M., Coelho, C.B.B. L., Carvalho, B.L., 2005. Alkaline proteinase from intestine of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Process Biochemistry* 40,1829-1834
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72,248-54.
- Cara JB, Moyano FJ, Cardenas S, Fernandez-Diaz C, Yufera M (2003) Assessment of digestive enzyme activities during larval development of white bream. *J Fish Biol* 63:48-58
- Carrillo, F.O., Lee, A.M., Álvarez, V.C. (1987). *Bioquímica de la nutrición*. Editorial Pueblo y Educación. Habana, Cuba. 134-140 pp.
- Castillo-Yáñez FJ, Pacheco-Aguilar R, García-Carreño FL, Navarrete-Del Toro MA (2005) Isolation and characterization of trypsin from pyloric caeca of Monterey sardine (*S. sagax caerulea*). *Comparative Biochemistry and Physiology B* 140:91-98
- Castillo-Yáñez FJ, Pacheco-Aguilar R, García-Carreño FL, Navarrete-Del Toro MA, Félix-López M (2006) Purification and biochemical characterization of chymotrypsin from the viscera of Monterey sardine (*S. sagax caerulea*). *Food Chemistry* 99(2):252-259
- Castillo-Yáñez FJ, Pacheco-Aguilar R, Lugo-Sánchez ME, García-Sánchez G, Quintero-Reyes IE (2009) Biochemical characterization of an isoform of chymotrypsin from the viscera of Monterey sardine (*Sardinops sagax caerulea*), and comparison with bovine chymotrypsin. *Food Chemistry* 112:634-639
- Chakrabarti, R., Mansingh, R..R., Mittal P. y Kumar, S. (2006). Functional changes in digestive enzymes and characterization of proteases of silver carp (♂) and bighead carp (♀) hybrid, during early ontogeny. *Aquaculture* 253:694–702.
- Chan R (2004) Efecto de la temperatura sobre el consumo de oxígeno en la mojarra tenguyaca (*Petenia splendida*) Günter 1862. Tesis de Licenciatura. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, México

- Chen BN, Jian GQ, Martin SK, Wayne GH, Steven MC (2006) Ontogenetic development of digestive enzymes in yellowtail kingfish *Seriola lalandi* larvae. *Aquaculture* 256:489-501
- Chong, A.S.C., Hashim, R., Chow-Yang, L., Ali, A.B. (2002). Partial characterization and activities of proteases from the digestive tract of discus fish (*Symphysodon aequifasciata*). *Aquaculture* 203:321-333.
- Chong-Carrillo, O., y Vega-Villasante, F., (eds.) y colectivo de autores (2004). El dicamaron. Diccionario de camaricultura. Editorial CIBNOR, S.C. y Universidad de la Habana. Formato electrónico CD. ISBN 968-5715-15-7.
- Conceição LEC, Aragão C, Richard N, Engrola S, Gavaia P, Mira S, Dias J (2010) Novel methodologies in marine fish larval nutrition. *Fish Physiol Biochem* 36:1-16
- Contreras M (2003) Inversión sexual de las mojarra nativas (*Cichlasoma salvini*) y (*Petenia splendida*), Mediante administración de oral de esteroides sintéticos. Tesis de Licenciatura. División Académica de Ciencias Biológicas. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, México
- Cousin, J.C.B., Baudin-Laurencin, F., y Gabaudan, J. (1987). Ontogeny of enzymatic activities in fed and fasting turbot, *Scophthalmus maximus* L. *J. Fish Biol.* 30:15-33.
- Cruz-Suarez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D.A., Gamboa-Delgado, J., (Eds). Memorias del X Avances en Nutrición Acuícola y X Simposio Internacional de Nutrición Acuícola. 8-10 de Noviembre, San Nicolás de los Garza, N. L., México. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México. pp. 99-232.
- D'Abramo, L., y Lovell, R.T. (1991). Aquaculture research needs for the year 2000. *Fish and Crustacean Nutrition. World Aquaculture* 22(2):57-62.
- Davis, B.J., 1964. Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. *Ann. New York Acad. Sci.* 121,404-427.
- DelMar EG, Largman C, Broderick JW, Geokas MC (1979) A sensitive new substrate for chymotrypsin. *Anal Biochem* 99:316-320
- Diaz JP, Mani-Ponset L, Blasco C, Connes R (2002) Cytological detection of the main phases of lipid metabolism during early post-embryonic development in three teleost species *Dicentrarchus labrax*, *Sparus aurata* and *Stizostedion lucioperca*. *Aquat Living Resour* 15:196-178.
- Díaz M, Moyano FJ, García-Carreño LF, Alarcón FJ, Sarasquete MC (1997) Substrate-SDS-PAGE determination of protease activity through larval development in sea bream. *Aquacult. Int.* 5: 461-471.
- Díaz-Ruiz, S., Aguirre L.A., y Cano, Q.E. (2006). Evaluación ecológica de las comunidades de peces en dos sistemas lagunares estuarinos del sur de Chiapas, México, *Hidrobiológica*, agosto, año/vol. 16, número 002. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. México D.F. pp. 197-210. *Hidrobiológica* 16(2):197-210.
- Dixon, M., y Webb, E. (1979). *Enzymes*. Academic Press 3 th. New York.
- Dupuis, Y., Tardival, S., Poremska, Z., y Fournier, P. (1991). Effect of some alkaline phosphatase inhibitors of intestinal calcium transfer. *The International Journal of Biochemistry* 23:175-180.

Toledo *et al.*, 2013. Avances en la Fisiología Digestiva de la Mojarra Tahuina *Cichlasoma trimaculatum*. 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. 405-459.

- Elliot, J.P., Bellwood, D.R., 2003. Alimentary tract morphology and diet in three coral reef fish families. *J. Fish Biol.* 63,1598-1609.
- Erlanger B, Kokowsky N, Cohen W. (1961). The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Arch Biochem Biophys* 95:271–278
- Essed, Z., Fernández, I., Alarcón, F.J., y Moyano, F.J. (2002). Caracterización de la actividad proteasa digestiva de atún rojo *Thunnus thynnus* (Linnaeus, 1758). *Bol. Inst. Esp. Oceanogr.* 18 (1-4):99-107.
- Fabillo MD, Herrera AA, Abucay JS (2004) Effects of delayed first feeding on the development of the digestive tract y skeletal muscles of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus* L. In: Proceedings 6th International Symposium on Tilapia in Aquaculture Philippine International Convention Center Roxas Boulevard, Manila, Philippines, pp 301-315
- FAO. (2004). Informe de la consulta de expertos sobre la aplicación de cuestiones asociadas con la inclusión de especies acuáticas explotadas comercialmente en los apéndices de la citas. En: Informe de Pesca N° 741. Food and Agriculture Organization (of the ONU). Disponible vía DIALOG. <http://www.fao.org/fi/website/>. (Consultado el 11 de febrero de 2011).
- FAO. (2006). Informe de políticas, Seguridad alimentaria, Numero 2, Junio de 2006, Roma. ftp://ftp.fao.org/es/ESA/policybriefs/pb_02_es.pdf (Consultado el 06 de febrero de 2011).
- Fernández I, Moyano FJ, Diaz M, Martínez T (2001) Characterization of a-amylase activity in five species of Mediterranean sparid fishes (Sparidae, Teleostei). *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 262, 1–12.
- Folk JE, Schirmer EW (1963) The porcine pancreatic carboxypeptidase a system. *J Biol Chem* 238:3884–3894
- Frías-Quintana CA (2009) Diseño de alimentos microparticulados para larvas del pejelagarto *Atractosteus tropicus*, Gill 1863. Tesis de maestría. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, México
- Furné, M., Hidalgo, M.C., López, A., García-Gallego, M., Morales, A.E., Domezain, A., Domezainé, J., Sanz, A., 2005. Digestive enzyme activities in Adriatic sturgeon *Acipenser naccarii* and rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. A comparative study. *Aquaculture* 250,391-398.
- Galaviz M. A, García-Gasca A, Drawbridge M, Álvarez-González CA, López ML (2011) Ontogeny of the digestive tract and enzymatic activity in white seabass, *Atractoscion nobilis*, larvae. *Aquaculture* 318:162-168
- Galaviz M. A, García-Ortega A, Gisbert E, López LM, García GA (2012). Expression and activity of trypsin and pepsin during larval development of the spotted rose snapper *Lutjanus guttatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology B* 161:9-16
- García M. (2003) Determinación de la temperatura preferencial y metabolismo de la rutina de la mojarra tenguyaca (*Petenia splendida*) Günter 1862. Tesis de licenciatura, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, México
- García-Carreño, F.L., Alburquerque-Cavalcanti, M.A., Navarrete del Toro y Zaniboni-Filho, E. (2002). Digestive proteinases of *Brycon orbignyanus* (Characidae, Teleostei): characteristics and effects on protein quality. *Comp. Biochem. Physiol* 132B:343-352.

- García-Carreño, F.L., Dimes, L.E. y Haard, N.F. (1993). Substrate-gel electrophoresis for composition and molecular weight of proteinases or proteinaceous proteinase inhibitors. *Anal. Biochem.* 214:65-69.
- Gawlicka A, Leggiadro CT, Gallart JW and Douglas SE (2001) Cellular expression of the pepsinogen and gastric proton pump genes in the stomach of winter flounder as determined by in situ hybridization. *J. Fish Biol.* 58:529–536
- Gil, S. (1991). Distribución y abundancia de peces, de acuerdo con la salinidad, en la laguna de Tres Palos en Guerrero, México. Tesis. Universidad Autónoma de Guerrero. 78 pp.
- Gildberg A (1988) Aspartic proteinases in fishes and aquatic invertebrates. *Comp Biochem Physiol B* 91:425–435.
- Gisbert E, Gimenez G, Fernandez I, Kotzamanis Y, Estevez A (2009) Development of digestive enzymes in common dentex *Dentex dentex* during early ontogeny. *Aquaculture* 287(3):381–387
- Gómez-González, A., Velázquez-Velázquez, E., y Rivera-Velázquez, G. (2005). Distribución, abundancia y estimación de la relación talla-peso de las mojarras. *Cichlasoma trimaculatum* y *Amphilophus macracanthus* (Perciformes: Cichlidae) en un sistema lagunar-estuarino, de Chiapas, México. Memorias del XVIII Congreso Nacional de Zoología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, N.L. 4 al 7 de Octubre de 2005. 107-108 pp.
- Govoni, J.J. (1980) Morphological, histological and functional aspects of alimentary canal and associated organ development in larval *Leiostomus xanthurus*. *Rev. Can. Biol.*, 39, 69-80.
- Govoni, J.J., Boehlert, G.W., y Watanabe, Y.L. (1986). The physiology of digestion in fish larvae. *Environ. Biol. Fishes* 16, 59-77.
- Guerrero-Zarate, R. (2010). Evaluación de la capacidad digestiva del pejelagarto (*Atractosteus tropicus*). Tesis de maestría. Departamento de Recursos del Mar. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional Unidad Mérida. Mérida, Yucatán, México. 101 pp.
- Hai-ying, W., Yue-jun, W., Qing-yin, W., Chang-hu, X., Mi, S. (2006). Purification and characterization of stomach protease from the turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Fish Physiol Biochem* 32B:179–188.
- Harris, H., (1989). The human alkaline phosphatases: what we know and what we don't know. *Clinica Chimica Acta* 186, 133-150.
- He T, Xiao Z, Liu Q, Ma D, Xu S, Xiao Y, Li J (2012) Ontogeny of the digestive tract and enzymes in rock bream *Oplegnathus fasciatus* (Temminck et Schlegel 1844) larvae. *Fish Physiol Biochem* 38:297–308
- Hepher, B., (2001). Cultivo de peces comerciales. (Eds.), Limusa. México. 316 pp.
- Hidalgo MC, Urea E, Sanz A (1999) Comparative study of digestive enzymes in fish with different nutritional habits. Proteolytic and amylase activities. *Aquaculture* 170:267-283
- Hirikado, M., Hirata, K., Uemarsu, Y., Hatooka, Y., y Kazama, M., (1994). Assay for activities of α -amylase and glucoamylase used in food processing. *Journal of the Food Hygienic Society of Japan* 35:28-33.
- Iracheta, T.I., (2006). Determinación de las principales enzimas digestivas y efecto de diferentes regímenes alimenticios en larvas de pejelagarto (*Atractosteus tropicus*), Tesis de licenciatura. Facultad de ciencias biológicas. Universidad Autónoma de Nuevo León. Nuevo León, México.

- Jellouli, K., Bougatef, A., Daassi, D., Barkia, A. y Nasri, M. (2009). New alkaline trypsin from the intestine of Grey triggerfish (*Balistes capriscus*) with high activity at low temperature: purification and characterization. *Food Chem* 116:644-650.
- Jiménez, C. (2004) Efecto de la temperatura en el crecimiento de crías de mojarra tenguyaca (*Petenia splendida*) Günter 1862. Tesis de Licenciatura. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, México.
- Jiménez-Martínez L. D., Álvarez-González CA, Tovar-Ramírez D, Gaxiola G, Sanchez-Zamora A, Moyano FJ, Alarcón FJ, Márquez-Couturier G, Gisbert E, Contreras-Sánchez WM, Perales-García N, Arias-Rodríguez L, Indy JR, Páramo-Delgadillo S, Palomino-Albarrán IG (2012). Digestive enzyme activities during early ontogeny in common snook (*Centropomus undecimalis*). *Fish Physiol Biochem* 38:441–454
- Jiménez-Martínez, L. D., Álvarez-González, C.A., Tovar-Ramírez, D., Gaxiola G., Sánchez-Zamora, A., Moyano, F.J., Alarcón, F.J., Márquez-Couturier, G., Gisbert, E., Contreras-Sánchez, W.M., Perales-García, N., Arias-Rodríguez, L., Indy, J.R., Páramo-Delgadillo, S., Palomino-Albarrán, I.G. (2012). Digestive enzyme activities during early ontogeny in Common snook (*Centropomus undecimalis*). *Fish Physiol Biochem* 38:441-454 pp.
- Jonas E, Ragyanssszki M, Olah J, Boross L (1983) Proteolytic digestive enzymes of carnivorous (*Silurus glanis* L.), herbivorous (*Hypophthalmichthys molitrix* Val.) and omnivorous (*Cyprinus carpio*) fishes. *Aquaculture* 30:145–154
- Jun-Sheng, L., Jian-Lin, L., Ting-Ting, W., 2006. Ontogeny of protease, amylase and lipase in the alimentary tract of hybrid juvenile tilapia (*Oreochromis niloticus* x *Oreochromis aureus*). *Fish Physiol Biochem* 32,295-303.
- Kageyama T (2002) Pepsinogens, progastricsins, and prochymosins: structure, function, evolution, and development. *Cell Mol Life Sci* 59:288–306
- Kendall, A.W., Ahlstrom, E.H., y Moser, H.G. (1984). En: Molser, H.G., Richards, W.J., Cohen, D.M., Fahay, M.P., Kendall A.W. Richardson, S.L., (Eds.), Ontogeny and systematics of fishes, American Society. Ichthyology. Herpetology. Spec. Public. I. Lawrence. 11-24 pp.
- Kim, K.W., Wang, X.J., y Bai, S.C. (2002). Optimum dietary level for maximum growth of juvenile olive flounder *Paralichthys olivaceus* (Temminck et Schlegel). *Aquaculture Research*, 33: 673-679.
- Kolkovski S (2001) Digestive enzymes in fish larvae and juveniles—implications and applications to formulated diets. *Aquaculture* 200:181–201
- Kumar, S., García-Carreño, F.L., Chakrabarti, R., Toro, M.A.N., Córdova-Murueta, J.H., 2007. Digestive proteases of three carps *Catla catla*, *Labeo rohita* and *Hypophthalmichthys molitrix*: partial characterization and protein hydrolysis efficiency. *Aquaculture Nutrition* 13, 381-388.
- Kunitz M. (1947). Crystalline soybean trypsin inhibitor II. General properties. *J Gen Physiol* 30:291–310
- Kvåle A, Mangor-Jensen A, Moren M, Espe M, Hamre K (2007) Development and characterization of some intestinal enzymes in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) and Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) larvae. *Aquaculture* 264:457–468.

- Laemmli U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685
- Lazo J, Mendoza R, Holt GJ, Aguilera C, Arnold CR (2007) Characterization of digestive enzymes during larval development of red drum (*Sciaenops ocellatus*). *Aquaculture* 265:194–205
- Lazo, J. (2000). Conocimiento actual y nuevas perspectivas en el desarrollo de dietas para larvas de peces marinos. In: Cruz -Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., López-Ramírez *et al.* , 2011 Development of digestive enzymes in larvae of Mayan cichlid *Cichlasoma urophthalmus*. *Fish Physiol Biochem* 37:197–208.
- Lazo, J.P., 1999. Development of the digestive system in Red Drum (*Sciaenops ocellatus*) larvae. P.h.D. Dissertation. The University of Texas at Austin. USA.
- Lazo, J.P., Viana, T.V., (eds.). Memoria del IX Avances en Nutrición Acuicola y IX Simposio Internacional de Nutrición Acuicola. 24-27 Noviembre. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, México. pp. 135-235.
- Lehninger, A.L., (1984). Bioquímica. Omega, Barcelona, España. 1198 pp.
- Li-Gen Z, Bing-Xin L, Le-Chang S, Kenji H, Wen-Jin S, Min-Jie C (2010) Identification of an aminopeptidase from the skeletal muscle of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). *Fish Physiol Biochem* 36:953–962
- Liu BX, Du XL, Zhou LG, Hara K, Su WJ, Cao MJ (2008) Purification and characterization of a leucine aminopeptidase from the skeletal muscle of common carp (*Cyprinus carpio*). *Food Chem* 108:140–147
- Liu, Z.Y., Wang, Z., Xu, S.Y., Xu, L.N., (2008). Partial characterization and activity distribution of proteases along the intestine of grass carp, *Ctenopharyngodon idella* (Val.). *Aquaculture Nutrition* 14,31-39.
- López-Ramírez, G., Cuenca-Soria, C.A., Álvarez-González, C.A., Tovar-Ramírez, D., Ortiz-Galindo, J.L., Perales-García, N., Márquez-Couturier, G., Arias-Rodríguez, L., Indy, J.R., Contreras-Sánchez, W.M., Gisbert, E., Moyano, F.J. (2011) Development of digestive enzymes in larvae of mayan cichlid *Cichlasoma urophthalmus*. *Fish Physiol Biochem* 37:197-208.
- Ma H, Cahu C, Zambonino J, Yu H, Duan Q, Le Gall M, Mai K (2005) Activities of selected digestive enzymes during larval development of large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*). *Aquaculture* 245:239–248
- Maraux S, Louvard D, Baratti J (1973) The aminopeptidase from hog-intestinal brush border. *Biochim Biophys Acta* 321:282–295
- Márquez, C.G. (2011). Producción por acuicultura sustentable de pejelagarto en Comalcalco, Tabasco. Informe técnico MEX/SGP/OP4/Y3/ RAF/2009/22 Programa de Pequeñas Donaciones/FMAM/PNUD–Otot Ibam SPR de RL de CV. Comalcalco, Tabasco. México. 35 pp.
- Martínez J.L. (2004) Desarrollo embrionario larval de la mojarra tenguyaca (*Petenia splendida*) Günter 1862. Tesis de licenciatura. División Académica de ciencias Biológicas Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, México.

- Martínez-Palacios, C.A. y Ross, L.G. (1994) Biología y cultivo de la mojarra latinoamericana *Cichlasoma urophthalmus*. México Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.
- Mathews, C.K., y Van Holde, K.E. (1998). Bioquímica. Mc Graw-Hill Interamericana. Madrid, España.
- Matus de la Parra, A., Rosas A., Lazo, J.P. y Viana, M.T., (2007). Partial characterization of the digestive enzymes of Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis* under culture conditions. *Fish Physiol Biochem* 33:223-231.
- Mendoza, E.A., Páramo, S.D., Contreras, M.W., Márquez, C.G., (1993). Alternativas para el desarrollo piscícola para el manejo complementario de áreas inundadas de Tabasco, México. En: Tabasco realidad y perspectiva, Vol. II. Gobierno del Estado de Tabasco. 263-279 pp.
- Miller, R. R. 1966. Geographical distribution of Central American freshwater Fisher. *Copeia* 1966(4): 773-802.
- Miller, R.R., Minckley, W.L., Norris, S.M. (2009). Peces Dulceacuícolas de México. Comisión Nacional para el conocimiento y Uso de la Biodiversidad/El Colegio de la Frontera Sur/Sociedad Ictiológica Mexicana, A.C. /Desert Fishes Council. México. 559 pp.
- Ming-Ji L, Chin-Feng W (2006) Developmental regulation of gastric pepsin and pancreatic serine protease in larvae of the euryhaline teleost *Oreochromis mossambicus*. *Aquaculture* 261:1403-1412
- Moyano F.J. (2006) Bioquímica Digestiva en Especies Acuicultivadas: Aplicaciones en Nutrición. En editores: Cruz, S.E., Ricque, M.R., Tapia, S.M., Nieto, L.M.G., Villareal, C.D.A., Puella, C.A.C., y García, O.A. Avances en Nutrición Acuicola VIII. VIII Simposium Internacional de Nutrición Acuicola. 15-17 Noviembre. Universidad Autónoma de Nuevo León, México. ISBN 970-694-333-5
- Moyano F.J. Diaz M, Alarcon FJ, Sarasquete MC (1996) Characterization of digestive enzyme activity during larval development of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Fish Physiol Biochem* 15:121-130
- Moyano, F.J., Barros, A.M., Prieto, A., Cañavate, J.P. y Cárdenas S. (2005). Evaluación de la ontogenia de enzimas digestivas en larvas de hurta, *Pagrus auriga* (Pisces: Sparidae) *Revista AquaTIC*, nº 22, 39-47 pp.
- Moyano, L.F.J. (2006). Bioquímica Digestiva en Especies Acuicultivadas: Aplicaciones en Nutrición. En editores: Cruz, S.E., Ricque, M.R., Tapia, S.M., Nieto, L.M.G., Villareal, C.D.A., Puella, C.A.C., y García, O.A. Avances en Nutrición Acuicola VII. VIII Simposium Internacional de Nutrición Acuicola. 15-17 Noviembre. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, México. ISBN 970-694-333-5.
- Nalinanon, S., Benjakul, S., Kishimura, H., 2010a. Biochemical properties of pepsinogen and pepsin from the stomach of albacore tuna (*Thunnus alalunga*). *Food Chemistry* 121,49-55.
- Nalinanon, S., Benjakul, S., Kishimura, H., 2010b. Purification and biochemical properties of pepsins from the stomach of skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*). *European Food Research and Technology* 231,259-269.
- Nalinanon, S., Benjakul, S., Visessanguan, W., Kishimura, H., 2008. Tuna Pepsin: Characteristics and its use for collagen extraction from the skin of threadfin bream (*Nemipterus spp.*) *J Food Sci* 73,C413-C419.

- Natalia, Y., Hashim, R., Ali, A., Chong, A. (2004). Characterization of digestive enzymes in a carnivorous ornamental fish, the Asian bony tongue *Scleropages formosus* (Osteoglossidae). *Aquaculture* 233, 305–320.
- Nelson, J.S., E.J. Crossman, H. Espinosa-Pérez, L.T. Findley, C.R. Gilbert, R.N. Lea & J.D. Williams. (2004). *Common and Scientific Names of Fishes from the United States, Canada, and México*. American Fisheries Society, Special Publication 29. Bethesda. 386 pp.
- Orellana-Amador, J.J. (1992). *Inventario preliminar de los peces de agua dulce y marinos de El Salvador, América Central*. Secretaría Ejecutiva del Medio Ambiente.
- Pedersen, B., y Eggum, B.O. (1983). Prediction of protein digestibility by an in vitro enzymatic pH-stat procedure. *J. Anim. Physiol.* 49, 265-277.
- Perales-García, N., (2009). *Ontogenia enzimática de la mojarra tenguayaca Petenia splendida*. Tesis de maestría. División de Académica de Ciencias Biológicas. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Villahermosa, Tabasco, México. 94 pp.
- Real-Ehuan G (2003) *Masculinización de crías de mojarra castarrica Cichlasoma urophthalmus mediante la administración de 17 α -metiltestosterona*. Tesis de licenciatura. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, México.
- Ribeiro L, Zambonino-Infante JL, Cahu C, Dinis MT (1999) Development of digestive enzymes in larvae of *Solea senegalensis*, Kaup 1858. *Aquaculture* 170: 465-473
- Robyt J. F, Whelan WJ (1968) The α -amylase. In: Radley JA (ed) *Starch and its derivatives*. Chapman and Hall, London, pp 430–497
- Rodiles-Hernández R., A. A. González Díaz y C. Chan-Sala. (2005). Lista de Peces Continentales de Chiapas, México. *Hidrobiologica* 15 (2 Especial): 245-253 pp.
- Rojas, C.P., Mendoza, A.R. (2000). *El cultivo de especies nativas en México*. Instituto Nacional de Pesca-SEMARNAP. Dirección General de Investigación en Acuicultura. Estado de salud en la Acuicultura. 1-42 pp.
- Sáenz de Rodrigáñez, M., Alarcón, F.J., Martínez, M.I., Ruiz, F., Díaz, M., y Moyano, F.J. (2005). Caracterización de las proteasas digestivas del lenguado senegalés *Solea senegalensis* Kaup, 1858. *Bol. Inst. Esp. Oceanogr.* 21 (1-4) 95-104.
- Salvensen, G. y Nagase, H. (1989). Inhibition of proteolytic enzymes. pp. 83-104. En: R. Beynon and J.S. Bond (Eds.). *Proteolytic enzymes*. IRL Press Oxford. UK.
- Sarbahi, D.S. (1951). Studies of the digestive tracts and the digestive enzymes of the goldfish *Carassius auratus* (Linnaeus) and the largemouth black bass *Micropterus salmoides* (Lacépède). *Bull. Mar. Biol. Lab. Woods Hole* 100: 24-257.
- Simpson, B.K. (2000). Digestive Proteases from Marine Animals. In: Haard, N.F., Simpson, B.K. (Eds.), *Seafood Enzymes*. Marcel Dekker, New York, NY, 191-213 pp.
- Stauffer, C., 1989. *Enzyme Assays for Food Scientists*. Van Nostand Reinhold/AVI. Nueva York.
- Steeffens, W. 1987. *Principios Fundamentales de la Alimentación de los Peces*. Editorial Acirbia, S. A. Zaragoza, Spain. 273 pp.
- Toledo *et al.*, 2013. Avances en la Fisiología Digestiva de la Mojarra Tahuina *Cichlasoma trimaculatum*. 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. 405-459.

- Stroud, R. (1975). A family of proteins-cutting proteins. *Sci. Am.*, 231 (1), 74-89.
- Su-Hua C, Min-Jie C, Jian-Zhen H, Guo-Ping W (2011) Identification of a puromycin-sensitive aminopeptidase from zebrafish (*Danio rerio*). *Comparative Biochemistry and Physiology B* 159:10-17
- Tanaka, M. (1973). Studies in the structure and function of the digestive system of teleost larvae. D. Agric. Thesis, Kyoto University, Japan.
- Tanji, M., Yakabe, E., Kageyama, T., Shin-ichi, Y., Ichinose, M., Miki, K., Ito, H., Takahashi, K., 2007. Purification and characterization of pepsinogens from the gastric mucosa of African coelacanth, *Latimeria chalumnae*, and properties of the major pepsins. *Comp Biochem Physiol B* 146,412–420.
- Tengjaroenkul B, Smith BJ, Smith SA, Chatreewongsin U (2002) Ontogenic development of the intestinal enzymes of cultured Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L. *Aquaculture* 211:241–251
- Tramati, C., Savona, B., Mazzola, A., 2005. A study of the pattern of digestive enzymes in *Diplodus puntazzo* (Cetti, 1777) (Osteichthyes, Sparidae): evidence for the definition of nutritional protocols. *Aquaculture International* 13,89-95.
- Ueberschär, B. (1993). Measurement of proteolytic enzyme activity: significance and application in larval fish research. In: *Physiological and Biochemical Aspects of Fish Development*. (Walther, B. T. & Fuhn, H. J., Eds.), Univ. of Bergen, Norway.
- Uscanga A (2006) Determinación de requerimiento de proteína en juveniles masculinizados y no masculinizados de la mojarra tenguyaca (*Petenia splendida*). Tesis de Maestría. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, México
- Uscanga, A., Moyano, F. J., Álvarez C. A., 2010. Assessment of enzymatic efficiency on protein digestion in the tilapia *Oreochromis niloticus*. *Fish Physiol Biochem* 36:1079-1085.
- Uscanga-Martínez A, Perales-García N, Álvarez-González CA, Moyano FJ, Tovar-Ramírez D, Gisbert GE, Márquez-Couturier G, Contreras-Sánchez WM, Arias-Rodríguez L, Indy JR (2011) Changes in digestive enzyme activity during initial ontogeny of bay snook *Petenia splendida*. *Fish Physiol Biochem* 37:667–680
- Uscanga-Martínez, A., Velázquez-Velázquez, E., Rodríguez-Valencia, W., y Gómez-Gómez, M.A. (2012). “Estudio reproductivo para el cultivo de mojarra nativa *Cichlasoma trimaculatum*” Libro de resúmenes del XIII congreso nacional de ictiología y 1er simposio latinoamericano de ictiología. Facultad de Ciencias Biológicas-UNICACH. 28 de octubre al 02 de noviembre de 2012, en San Cristóbal de las Casas, Chiapas.
- Velázquez-Velázquez, E., Vega-Cendejas, M.E., y Rivera-Velázquez, G. (2005). Riqueza y distribución de peces en un sistema estuarino-lagunar, de la reserva de la biosfera la encrucijada, Chiapas, México. *Memorias del XVIII Congreso Nacional de Zoología*, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, N.L. 4 al 7 de Octubre de 2005. 64 pp.
- Vendrell J, Querol E, Avilés FX (2000) Metalloproteases and their protein inhibitors. Structure, function and biomedical properties. *Biochim Biophys Acta* 1477:284-298

- Versaw W, Cuppett S. L, Winters D. D, Williams L.E. (1989). An improved colorimetric assay for bacterial lipase in nonfat dry milk. *J Food Sci* 54:232–254
- Versichelle D, Léger P, Lavens P, Sorgeloos P (1989) L'utilisation d'artémia. In: Barnabé G (ed) *Aquaculture. Technique et Documentation*, Lavoisier, Paris, p. 241-259
- Vidal J.M. (2004) Masculinización de crías de la mojarra tenguyaca (*Petenia splendida*) Günter 1862 mediante bioencapsulado del esteroide con 17- α metiltestosterona en nauplios de *Artemia salina*. Tesis de Licenciatura Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, México
- Violante, G.J. (1995). Contribución al conocimiento de la biología de la mojarra nativa *Cichlasoma trimaculatum* (Gunter, 1868), en la laguna de Tres Palos Guerrero, México, y determinación del desarrollo larvario y requerimientos proteicos en condiciones de laboratorio. Tesis de maestría. Facultad de ciencias marinas. Universidad de Colima. Manzanillo, Colima. 70 pp.
- Violante-González, J., Aguirre-Macedo, M.L., y Rojas-Herrera, A., (2008). Comunidad de parásitos metazoarios de la charra *Cichlasoma trimaculatum* en la laguna de Tres Palos, Guerrero, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 79: 405-412.
- Vonk HJ, Western JRH (1984) *Comparative biochemistry and physiology of enzymatic digestion*. Academic Press, London.
- Walter H.E. (1984). Proteinases: methods with hemoglobin, casein and azocoll as substrates. In: Bergmeyer HJ (ed) *Methods of enzymatic analysis*, vol V. Verlag Chemie, Weinham, Pp 270–277
- Whitaker, J.R. (1994). *Principles of enzymology for the food sciences*. 2a ed., Marcel Dekker, INC, New York, 789 pp.
- Williams DE, Reisfeld RA (1964) Disc electrophoresis in polyacrylamide gels: extension to new conditions of pH and buffers. *Ann N Y Acad Sci* 121:373–381
- Xiu-Juan S, Huang W, Cao L, Zhi-Zhong X, Shuo-Zeng D (2009) Ontogenetic development of digestive enzymes and effect of starvation in miiuy croaker *Miichthys miiuy* larvae *Fish Physiol Biochem* 35:385–398
- Yáñez-Arancibia, A. (1978). Taxonomía, ecología y estructura de las comunidades de peces en lagunas costeras con bocas efímeras del Pacífico de México. Centro de Ciencias del Mar y Limnología, Universidad Autónoma de México, México, D.F. Publicaciones especiales (2): 1-306 pp.
- Yúfera M, Darias MJ (2007) Changes in the gastrointestinal pH from larvae to adult in Senegal sole (*Solea senegalensis*). *Aquaculture* 267:94–99.
- Yúfera M, Fernández-Díaz C, Vidaurreta A, Cara JB, Moyano FJ (2004) Gastrointestinal pH and development of the acid digestion in larvae and early juveniles of *Sparus aurata* L. (Pisces: Teleostei). *Mar. Biol.* 144:863–869
- Zaiss MM, Papadakis IE, Maingot E, Divanach P, Mylonas CC (2006) Ontogeny of the digestive tract in shi drum (*Umbrina cirrosa* L.) reared using the mesocosm larval rearing system. *Aquaculture* 260:357–368

- Zamani A, Hajimoradloo A, Madani R, Farhangi M. (2009) Assessment of digestive enzymes activity during the fry development of the endangered Caspian brown trout *Salmo caspius*. Journal of Fish Biology 75:932–937
- Zambonino-Infante J, Gisbert E, Sarasquete C, Navarro I, Gutiérrez J, Cahu CL (2008) Ontogeny and physiology of the digestive system of marine fish larvae. In: Cyrino, J.E.O., Bureau, D., Kapoor, B.G. (Eds.), Feeding and Digestive Functions of Fish. Science Publishers, Inc, Enfield, USA, pp. 277–344
- Zambonino-Infante JL, and Cahu CL (2001) Ontogeny of the gastrointestinal tract of marine fish larvae. Comparative Biochemistry and Physiology C 130:477–487
- Zambonino-Infante JL, Cahu C (1994) Development and response to a diet change of some digestive enzymes in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. Fish Physiol Biochem 12(5): 399–408
- Zambonino-Infante JL, Cahu CL (2007) Dietary modulation of some digestive enzymes and metabolic processes in developing marine fish: Applications to diet formulation. Aquaculture 268:98–105
- Zhou, Q., Guang-Ming, L., Yuan-Yuan, H., Weng, L., Hara, K., Wen-Jin, S., Min-Jie, C., 2008. Pepsinogens and pepsins from mandarin fish (*Siniperca chuatsi*). J. Agric. Food Chem. 56,5401–5406.
- Zouiten, D., Ben K.I., Besbes, R., y Cahu, C. (2008). Ontogeny of the digestive tract of thick lipped grey mullet (*Chelon labrosus*) larvae reared in “mesocosms” Aquaculture 279 166–172.