

# Avances en la Fisiología Digestiva de la Mojarra Castarrica

## *Cichlasoma urophthalmus*

Carlos Alberto Cuenca-Soria<sup>1,3</sup>, Carlos Alfonso Álvarez-González<sup>2</sup>, Dariel Tovar-Ramírez<sup>4</sup>, José Luis Ortiz-Galindo<sup>1</sup>, Sandra Aguilar-Hernández<sup>3</sup>, Martha Alicia Perera García<sup>3</sup>, Raúl Hernández Gómez<sup>3</sup>, Alfonso Castillo-Domínguez<sup>3</sup>, Enric Gisbert-Casas<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas, Av. Instituto Politécnico Nacional s/n, Col. Playa Palo de Sta. Rita, Apdo. Postal 592, La Paz B.C.S. 23096, México.

<sup>2</sup>Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Laboratorio de Acuicultura Tropical UJAT-DACBIOL. Carretera Villahermosa-Cárdenas km. 0.5, Villahermosa Tabasco 86139, México.

<sup>3</sup>Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. UJAT-DAMR. Carretera Tenosique-Estapilla km 1, Tenosique Tabasco 86901, México. Email: [carlos.cuenca@ujat.mx](mailto:carlos.cuenca@ujat.mx); ccuencas0900@ipn.mx

<sup>4</sup>Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C. Mar Bermejo No. 195, Col. Playa Palo de Santa Rita Apdo. Postal 128; La Paz, BCS 23090, México.

<sup>5</sup>Recerca I Tecnologia Agroalimentàries. Carretera Poble Nou km 5.5, P. O. Box 200, 43540 Sant Carles de la Ràpita. Tarragona, España.

### Resumen

Para mejorar los protocolos de alimentación en los larvicultivos, es menester conocer los cambios morfofuncionales, durante la ontogenia inicial de los peces. El objeto del presente trabajo fue estudiar los cambios morfológicos y de expresión génica ligada a enzimas digestivas en período larvario (0 al 30 después de la eclosión (dde)), así como caracterizar enzimas digestivas en juveniles de *C. urophthalmus*. Para los estudios morfológicos, las muestras fueron teñidas por H&E y PAS/AB; mientras que para los estudios moleculares, se realizó PCR en tiempo real, utilizando cebadores específicos diseñados para amplificación de  $\alpha$ -amilasa, lipasa (dependiente de sales biliares) y fosfatasa alcalina, a partir de cDNA de *C. urophthalmus*, y determinar su expresión génica. También se valoró la actividad específica de tripsina, quimiotripsina, leucina aminopeptidasa, carboxipeptidasa A,  $\alpha$ -amilasa y fosfatasas, presentes en extractos multienzimáticos de estómago e intestino. Se realizaron pruebas de inhibición enzimática y se determinó el pH y temperatura óptimos, de proteasas en condiciones ácidas y alcalinas; así como el efecto de ambos factores, sobre la estabilidad de ambos tipos de enzimas. Los resultados histológicos mostraron que *C. urophthalmus* desarrolla cambios morfofuncionales relativamente rápidos en estómago, con glándulas gástricas funcionales a los 14

dde. Los estudios moleculares revelaron importante expresión génica de lipasa dependiente de sales biliares y  $\alpha$ -amilasa, a partir de los 3 dde, indicando diferenciación y funcionalidad pancreática. Los estudios de caracterización enzimática en *C. urophthalmus* demostraron importante actividad de proteasas ácidas y alcalinas (con cierto predominio de éstas últimas), evidenciando hábitos omnívoros, con tendencia a carnivoría.

Palabras clave: Fisiología, digestiva, *Cichlasoma*, *urophthalmus*.

## Introducción

Actualmente, el larvicultivo de los peces es quizá uno de las etapas más críticas en acuicultura, debido a las altas mortalidades que se presentan, frecuentemente asociadas a deficiencias nutricionales, deficientes protocolos de alimentación, entre otros. El crecimiento y la supervivencia de las larvas de peces dependen del éxito de la alimentación y la efectiva digestión y absorción de nutrientes (Tanaka *et al.*, 1995). En este contexto, uno de los aspectos a considerar en el diseño de protocolos de alimentación, basados en presas vivas o alimentos inertes, es la morfología y fisiología del sistema digestivo de los peces. Las larvas pueden ser morfológicamente capaces de capturar presas, a la primera alimentación (Segner *et al.*, 1994; Bisbal y Bengtson, 1995), pero el sistema digestivo requiere una serie de cambios de desarrollo antes de ser completamente funcional (Govoni *et al.*, 1986). Muchos trabajos han enfatizado la importancia de conducir estudios específicos acerca de la organogénesis del tracto digestivo, con el fin de comprender mejor la fisiología nutricional y la funcionalidad (Lazo *et al.*, 2011). Por lo tanto, el conocimiento acerca de los cambios morfológicos y funcionales durante la ontogenia inicial de los peces es de capital importancia, con miras a sentar las bases para la tecnología de cultivo, de acuerdo a la habilidad digestiva, durante la ontogenia inicial de los peces (Zambonino-Infante *et al.*, 2008; Lazo *et al.*, 2011). Aunque los peces son un grupo taxonómico diverso, los mecanismos básicos del desarrollo de órganos y sistemas son similares en todos los teleósteos, aún cuando hay considerables diferencias interespecíficas, con relación al “timing” de su diferenciación, desarrollo y funcionalidad, durante su ontogenia inicial (Lazo *et al.*, 2011). Sin embargo, existen considerables diferencias en lo que concierne al timing de cambios morfológicos y citológicos, durante la ontogenia inicial de los peces, dado que depende de varios factores. Entre estos factores, la temperatura, composición del alimento, así como la calidad del agua, son algunos factores importantes (Zambonino-Infante y Cahu, 2007). El timing del desarrollo de órganos y las funciones fisiológicas son afectadas por la historia general de vida y las estrategias reproductivas de cada especie (Lazo *et al.*, 2011). Por consiguiente, existen diferencias específicas en el timing de la diferenciación de órganos, como en los cíclidos, lo cual ha sido relacionado a su estrategia reproductiva. (Treviño *et al.*, 2010). El cíclido maya *C. urophthalmus*

(Günther, 1862), es una de las especies neotropicales en la que se han enfocado más estudios en la actualidad, debido a su alto potencial para la acuicultura. Esta especie goza de una alta demanda en el mercado, a lo cual se agrega su alta adaptabilidad en cautiverio, alta fertilidad, elevada tasa de crecimiento y supervivencia. Sin embargo, actualmente el cultivo de esta especie es aún limitado, debido al poco conocimiento de su desarrollo digestivo a lo largo de su ontogenia inicial. El objeto del presente estudio fue dilucidar la organogénesis, durante la ontogenia inicial de la mojarra castarrica *C. urophthalmus*.

## **Antecedentes**

Es necesario enfatizar que el éxito de los protocolos de alimentación en peces, dependen sumariamente del conocimiento de los tiempos en los que se dan los cambios morfológicos y de la capacidad digestiva y fisiológica, los cuales están estrechamente relacionados con la estrategia reproductiva de la especie. Es necesario llevar a cabo estudios sobre la organogénesis según la especie, para una mejor comprensión de su fisiología nutricional (Treviño *et al.*, 2010). Por tanto, es menester el conocimiento acerca de los cambios morfológicos y en los tiempos en los que tienen lugar estos cambios,

## ***Estudios histológicos y morfológicos***

El conocimiento acerca del desarrollo digestivo en peces, facilitará la resolución de los cuellos de botella en los larvicultivos de peces, hacia la substitución total o parcial del alimento vivo, por formulaciones inertes. En este sentido, la ontogenia del tracto digestivo de larvas de peces ha sido objeto de muchos estudios en los pasados 25 años, principalmente en peces de importancia comercial (Lazo *et al.*, 2011). Entonces, los trabajos en lo que concierne a los cambios morfológicos e histológicos a lo largo de la ontogenia inicial son notoriamente vastos, principalmente en peces marinos, tales como *Diplodus sargus* (Ortiz-Delgado *et al.*, 2003), *Paralabrax maculatofasciatus* (Peña *et al.*, 2003), *Paralichthys californicus* (Gisbert *et al.*, 2004), *Pagellus erythrinus* (Micale *et al.*, 2006) y *Scophthalmus rhombus* (Hachero-Cruzado *et al.*, 2009); y de agua dulce como en *Sander lucioperca* (Ostaszewska, 2005) y cíclidos como *Oreochromis niloticus* (Morrison

*et al.*, 2001) y *Petenia splendida* (Treviño *et al.*, 2010). Las técnicas histológicas han permitido disponer de una base importante, para contribuir a dilucidar los cambios morfológicos que se suscitan en la ontogenia inicial de peces.

### ***Estudios de expresión de genes de enzimas digestivas***

Los estudios con relación a la expresión molecular de enzimas digestivas durante la ontogenia inicial en peces, cobran cada vez importancia capital, pues permiten realizar estudios de modo que se tenga una visión más integral de la dinámica de cambios morfofuncionales, en estos períodos críticos de cultivo. El conocimiento de la expresión de genes constituye una herramienta invaluable que complementa la información acerca de la condición nutricional de un organismo, obtenido a través de sus indicadores enzimáticos (Lazo *et al.*, 2011). Sobresalen los trabajos en el pez *Hippoglossus hippoglossus* (Murray *et al.*, 2006), *Pagrus pagrus* (Darias *et al.*, 2006) y *Sphoeroides annulatus* (García-Gasca *et al.*, 2006) entre otros.

### ***Estudios de caracterización enzimática***

Existen diversos estudios sobre enzimas digestivas en peces marinos, como la lobina europea marina *Dicentrarchus labrax*, la sardina Monterey *Sardinops sagax caerulea*, el atún azul *Thunnus orientalis*, y la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* (Lindnerl *et al.*, 1995; Castillo-Yáñez *et al.*, 2005; Matus de la Parra *et al.*, 2007; Álvarez-González *et al.*, 2008, respectivamente). Asimismo, cada vez son más relevantes los estudios sobre la fisiología digestiva en peces de agua dulce. Natalia *et al.*, (2003) realizaron la caracterización de enzimas digestivas del pez carnívoro ornamental *Scleropages formosus*, revelando que pese a sus hábitos carnívoros, puede asimilar alimentos inertes artificiales. Lundstedt *et al.*, (2004) trabajaron niveles entre 20 y 50% de proteína cruda y entre 1.9 y 36.2% de almidón en la dieta para encontrar su relación con la actividad enzimática en el bagre de agua dulce *Pseudoplatystoma corruscans*, encontrando las mejores niveles de proteína y almidón dietarios entre 30-40% y 13-25%, para el pez respectivamente con base a la respuesta enzimática. Furné *et al.*, (2005) realizaron un estudio comparativo, al evaluar

la actividad de proteasas, amilasas y lipasas del esturión *Acipenser naccarii* y la trucha de agua dulce *Oncorhynchus mykiss*, indicando que el primero mostró características de un pez omnívoro, por su alta actividad de amilasas y en menor grado de proteasas y lipasas. Debnath *et al.*, (2007), estudiaron el efecto de la composición de la dieta, sobre la actividad de enzimas digestivas en la carpa rohu *Labeo rohita*, determinando que un 30% de proteína cruda en la dieta, fue la que mejor respondió a la maquinaria enzimática del pez y por tanto, obtuvo el menor índice hepatosomático y uno de los mayores rendimientos en peso. Zhong-yi *et al.*, (2008), aislaron catepsina D, a partir de intestino de carpa herbívora *Ctenopharyngodon idellus* con el fin de efectuar pruebas de inhibición y obtener el pH y temperatura óptimas. Perales-García (2009) caracterizó las proteasas de la tenhuayaca *Petenia splendida*, encontrando que sus proteasas digestivas son similares a la de otras especies, y que posee una maquinaria enzimática típica de un pez de hábitos carnívoros estricto. Guerrero-Zarate (2010) exploró las enzimas digestivas presentes en el pejelagarto tropical *Atractosteus tropicus*, evaluando la actividad de lipasas y demostrando resistencia de proteasas ácidas medios alcalinos y de proteasas alcalinas en medios ácidos, observando entonces actividad enzimática conjunta de proteasas ácidas y alcalinas en intestino.

## **Estudios histológicos**

### **Material y métodos**

Las larvas de *C. urophthalmus* fueron recolectadas a partir de un desove espontáneo (hembras: machos, 3:1), mantenidas en cautiverio dentro de las instalaciones de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Tabasco, México. Las larvas eclosionadas fueron alimentadas con nauplios de *Artemia* no enriquecidos (INVE Aquaculture Nutrition, Bélgica) tres veces por día a saciedad, a partir de los 6 días después de la eclosión (dde) a los 15 dde. De esta edad a los 30 dde, las larvas fueron alimentadas con alimento comercial para trucha (45% de proteína y 16% de lípidos), Nelson and Sons Inc. Las larvas fueron muestreadas del 1 al 30 dde, fijadas en líquido de Bouin y formol al 4% y preservadas en etanol al 50%. Las larvas fueron fotografiadas con un microscopio equipado con cámara fotográfica (ANALYSIS<sup>TM</sup> Soft Imaging Systems GmbH, Münster, Alemania). Las imágenes fueron utilizadas para las medidas morfométricas (longitud

estándar, altura y saco vitelino). El volumen del saco vitelino fue estimado con la fórmula propuesta por Heming y Buddington, (1988),  $V = (1/6)ab^2$ , donde  $V$  ( $\text{mm}^3$ ) = volumen del saco,  $a$  y  $b$  longitud máxima y mínima (mm), respectivamente. Las larvas muestreadas fueron deshidratadas con series crecientes de alcohol (50, 75 y 100%) y embebidas en parafina, con el procesador automático de tejidos Histolab ZX-60 Myr (Especialidades Médicas MYR SL, Tarragona, España). Los bloques de parafina fueron elaborados en un dispensador de parafina AP280-2 Myr y cortados en secciones sagitales de 3  $\mu\text{m}$  de grosor, con un micrótopo automático Microm HM (Leica Microsystems Nussioch GmbH, Alemania). Los cortes fueron mantenidos a 40 °C, toda la noche. Posteriormente, las muestras fueron desparafinadas en series crecientes de xileno y teñidas con Hematoxilina-Eosina (H&E), para las observaciones morfológicas generales del tracto digestivo de larvas. La tinción histoquímica a base de ácido peryódico, Reactivo de Schiff (PAS) y Alcian Blue (AB) a pH 0.5, 1.0 y 2.5 fueron realizados para la detección de compuestos neutros, carboxílicos y sulfatados (respectivamente), en células mucosas (Pearse, 1985) del tracto digestivo. Finalmente, las preparaciones histológicas de larvas fueron observadas en un microscopio, Leica DMLB, equipado con una cámara digital Olympus DP70 (Leica Microsystems Nussioch GmbH, Alemania).

## Resultados

En la figura 1, es posible visualizar el crecimiento en longitud estándar, de larvas de *C. urophthalmus* hasta los 30 días dde. Se puede observar un crecimiento tipo potencial, según la ecuación  $SL$  (mm) = 2.08 Ln (T) + 0.58 ( $R^2 = 0.99$ ,  $p < 0.05$ ), donde  $SL$  = Longitud estándar (mm) y  $T$  = Edad (días). De modo paralelo, a la eclosión, el saco vitelino ocupa la mayor parte de la cavidad abdominal, con un volumen promedio de  $1.08 \pm 0.05 \text{ mm}^3$  no obstante, tal volumen se reduce en 59.3% ( $0.44 \pm 0.07 \text{ mm}^3$ ) después de 3 dde ( $3.14 \pm 0.01 \text{ mm}$ ) y 81.2% a los 5 dde ( $3.91 \pm 0.13 \text{ mm}$ ). El consumo del saco vitelino está correlacionado con la edad larvaria y descrita por la ecuación  $YSV = -0.18 (T) + 0.18$  ( $R^2 = 0.98$ ,  $p < 0.01$ ), donde  $YSV$  = volumen del saco vitelino ( $\text{mm}^3$ ) y  $T$  = edad (días) (figura interior de la figura 1).

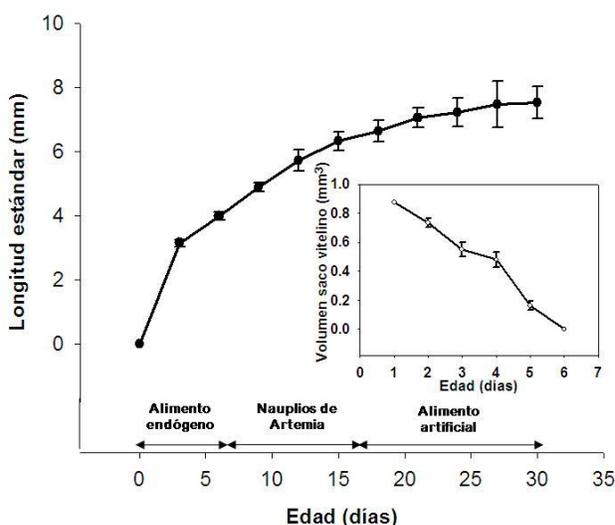


Figura 1. Crecimiento en longitud estándar, y decaimiento del saco vitelino, durante la ontogenia inicial de *Cichlasoma urophthalmus*.

### *Saco vitelino*

Macroscópicamente, el saco no fue más visible a los 6 dde sin embargo, remanentes de saco vitelino fueron microscópicamente visibles junto al tejido hepático, el cual rodea los remanentes a los 16 dde ( $6.61 \pm 0.4$  mm). Microscópicamente, el saco vitelino se encontró rodeado por un epitelio sincitial, el cual consistió en cúmulos eosinofílicos de acumulación de proteína (yolk platelets) (figura 2a).

### *Bucofaringe*

A la eclosión, la cavidad bucofaringea fue corta y linealizada con escasas células mucosas. Estas células secretoras se tiñeron de azul y púrpura con PAS y AB pH 2.5, 1.0 y 0.5, indicando la presencia de una combinación de mucinas neutras y ácidas (carboxiladas y sulfatadas). Al 3 dde ( $3.14 \pm 0.11$  mm) comenzó la aparición de los primeros dientes caninos hacia el lumen bucofaríngeo. Se observaron ionocitos distribuidos en la parte anterior de la cavidad oral, mientras los primeros corpúsculos gustativos (figura 2b), estuvieron presentes en la región posterior de la bucofaringe. Al 7 dde ( $4.45 \pm 0.23$  mm), surgieron las primeras papilas bucofaringeas. El número de células mucosas, dientes

caninos y papilas bucofaringeas se incrementó conforme tuvo lugar el desarrollo larvario (figura 2c).

### ***Esófago***

Entre el 1 y los 2 dde, el esófago comenzó a diferenciarse como un ducto corto linealizado por epitelio cúbico con células mucosas ( $18 \pm 4$  células in  $100 \mu\text{m}$  de epitelio), conectado por la cavidad faríngea con el intestino anterior. Los estudios histoquímicos revelaron que la mayoría de las células mucosas fueron teñidas en magenta (PAS positivo), mientras pocas fueron teñidas en azul pálido (AB pH 0.5, 1.0, 2.5), lo cual indica que contienen glicoproteínas neutrales y acídicas (carboxiladas y sulfatadas), respectivamente. A esta edad, la mayor parte de las células mucosas en esófago producen una mezcla de glicoproteínas neutrales (PAS positivo) y acídicas (AB pH 0.5, 1.0 y 2.5). A los 24 dde, todo el epitelio esofageal estuvo cubierto por células mucosas ( $21.3 \pm 2.5$  células en  $100 \mu\text{m}$  de tejido esofageal) (figura 2d). En etapas posteriores de desarrollo, el esófago no sufre cambios mayores.

### ***Estómago***

Entre los 3 y 4 dde el estómago cardiaco comenzó a formarse, como producto de una dilatación entre el esófago y el intestino medio (figura 2e). Esta área fue linealizada por epitelio columnar pseudoestratificado, carente de células mucosas y los distinguibles incipientes pliegues mucosales. La constricción que separó el estómago del intestino fue visible a los 4 dde, (futuro esfínter pilórico). A los 9 dde ( $4.86 \pm 0.09$  mm), los primeros clusters de células cúbicas formando las glándulas gástricas fueron observadas en la región media-posterior de un estómago en desarrollo (figura 2g), mientras que en la superficie interna en forma de pólipo se observaron los micropliegues que se tornan eosinófilos con PAS 2.5 (figura 2f). A los 9 dde ( $4.88 \pm 0.14$  mm), las primeras células mucosas secretaron glicoconjugados neutros (PAS positivo) las cuales, fueron visibles en la mucosa gástrica. A los 14 dde ( $6.35 \pm 0.17$  mm) su número y reactividad al PAS positivo, incrementó. A los 19 dde ( $7.02 \pm 0.25$  mm) es posible distinguir tres regiones en el estómago: estómago

cardias, estómago fundus y estómago pilórico (figura 2i). El primero consiste en una amplia cavidad, linealizada por epitelio simple ciliado columnar y una delgada capa de mucosa y otra capa de tejido muscular liso. El segundo ocupó la mayoría del estómago y estuvo linealizado por epitelio ciliado columnar simple, con células mucosas y glándulas gástricas alargadas. La región pilórica del estómago fue corta y linealizada por epitelio columnar, desprovista de glándulas gástricas. Los rasgos histológicos del estómago no experimentaron cambios remarcables hasta el final del estudio, con la excepción del crecimiento en tamaño y cantidad de glándulas gástricas.

### ***Intestino***

A la eclosión, el intestino fue un tubo recto linealizado por tejido columnar con micropliegues y desprovisto de células mucosas. A los 2 dde, la mucosa intestinal comenzó a formar incipientes pliegues y las primeras células mucosas aparecieron entre los enterocitos del epitelio intestinal. A esta edad, cuerpos de inclusión supranucleares eosinofílicos (PAS positivo) fueron detectados en enterocitos del intestino anterior (figura 2L). A los 3 dde, estas células fueron teñidas de magenta (PAS positivo), mientras algunas otras en azul pálido (AB, pH 0.5, 1.0, 2.5 positivo), indicando diferentes contenidos de glicoproteínas neutrales y acídicas (carboxiladas y sulfatadas), respectivamente. A los 4 dde ( $3.94 \pm 0.03$  mm), el intestino experimentó una curvatura y la válvula intestinal separando la región anterior de la posterior (figura 2m). Ambas regiones fueron linealizadas con epitelio columnar simple con núcleos basales, un citoplasma ligeramente basofílico y prominentes micropliegues eosinófilos. Entre el 5 y 6 dde, coincidiendo con el inicio de la primera alimentación exógena, las primeras vacuolas lipídicas estuvieron presentes dentro de los enterocitos en ambas regiones del intestino. Las células mucosas fueron teñidas en púrpura, indicando que su contenido fue una mezcla de glicoproteínas neutrales (PAS positivo) y acídicas (AB pH 0.5, 1.0 y 2.5 positivo), mientras unas pocas contenían glicoproteínas neutrales o acídicas. Entre los 6 y 8 dde ( $4.52 \pm 0.14$  mm) varias diferencias morfológicas fueron visibles entre el intestino anterior y posterior, particularmente en la cantidad de vacuolas lipídicas (más abundantes en el primero que en el segundo), indicando que el intestino anterior fue el sitio primario de absorción de lípidos

en intestino. Por otro lado, los pliegues intestinales fueron más altos y abundantes en intestino posterior que en intestino anterior ( $12.3 \pm 1.9$  vs.  $2.7 \pm 0.4$  células en  $100 \mu\text{m}$  de epitelio). Los pliegues del intestino incrementaron considerablemente entre los 11 y 14 dde, coincidiendo con el desarrollo de las glándulas gástricas en el estómago. A partir de los 11 dde, no se hallaron cambios morfoanatómicos de significancia en la mucosa intestinal hasta el final del estudio, con la excepción del progresivo aumento de la longitud del intestino y grosor de la mucosa intestinal, así como en el incremento en tamaño y cantidad de pliegues intestinales. De manera atípica, entre los 21 y 24 dde ( $7.05 \pm 0.41$  mm) se visualizaron cuerpos supranucleares eosinófilos (PAS positivo) en intestino posterior.

### ***Glándulas accesorias***

A la eclosión, el hígado de *C. urophthalmus* ya se encuentra desarrollado y aparece como una masa lobular que cubre gran parte de la cavidad abdominal (casi hasta el poro anal). El tejido hepático consistió de hepatocitos poliédricos con núcleo central, reducido citoplasma eosinófilo y pocas y pequeñas inclusiones lipídicas ( $10.7 \pm 1.5 \mu\text{m}$  de diámetro). Los ductos biliares fueron visibles entre el 2 y los 3 dde y estuvieron linealizados por epitelio ciliado columnar con núcleos basales, ocupando la mayor parte del citoplasma. A los 7 dde, los hepatocitos comienzan a acumular gran cantidad de lípidos (figura 2ñ), ya que el diámetro de las vacuolas incrementó ( $16.8 \pm 2.2 \mu\text{m}$ ). Coincidiendo con el inicio de la alimentación exógena, los depósitos de lípidos y glicógeno (PAS positivo) incrementaron progresivamente dentro de los hepatocitos. A los 16 dde ( $6.61 \pm 0.40$  mm), las vacuolas lipídicas ocuparon la mayor parte del citoplasma ( $71.1 \pm 5.3 \mu\text{m}$ ), desplazando a los núcleos a la periferia de los hepatocitos lo cual, resultó en un decremento en el almacenamiento de glicógeno (PAS positivo) en el hígado. El páncreas fue organizado por células basofílicas poliédricas, en cúmulos de células acinares en forma de roseta, con gránulos de zimógeno (PAS positivo). Entre los 2 y 4 dde, estos gránulos se tiñeron intensamente, lo que indica su aumento marcado dentro de las células acinares, con implicaciones de una importante síntesis de precursores de enzimas pancreáticas. A los 3

dde, el páncreas endócrino y exocrino fueron notoriamente visibles, aumentando en tamaño, con respecto al tiempo.

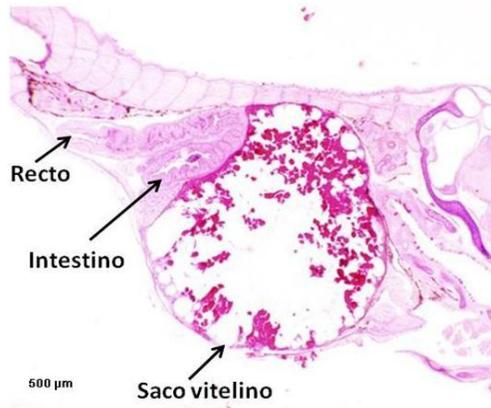


Figura 2a. Saco vitelino 3 dde, PAS 2.5

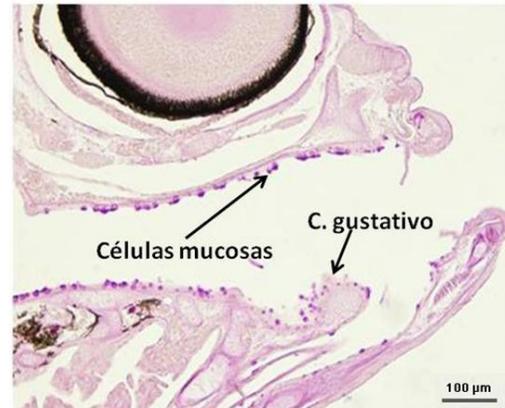


Figura 2b. Bucofaringe, células mucosas 3 dde, PAS 2.5

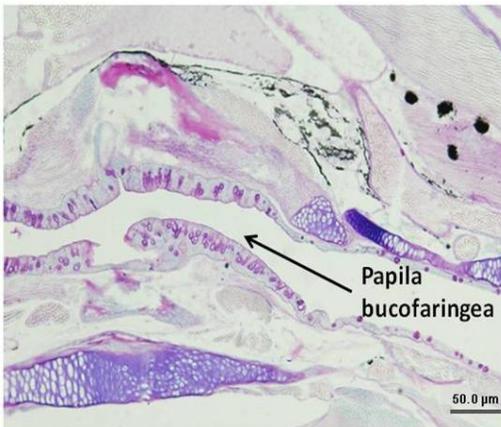


Figura 2c. Bucofaringe: papila bucofaringea 19 dde, PAS 2.5

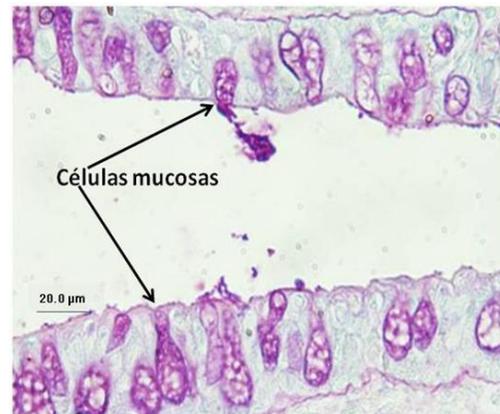


Figura 2d. Esófago: células mucosas 24 dde, PAS 2.5

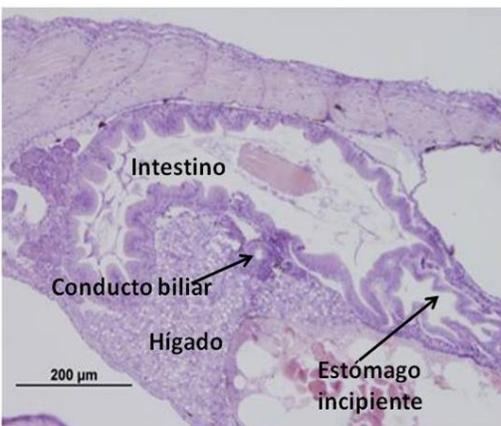


Figura 2e. Esófago diferenciado 4 dde, H&E

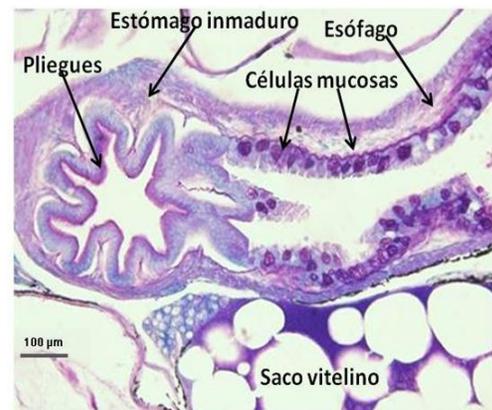


Figura 2f. Estómago: microplegues 7 dde, PAS 2.5

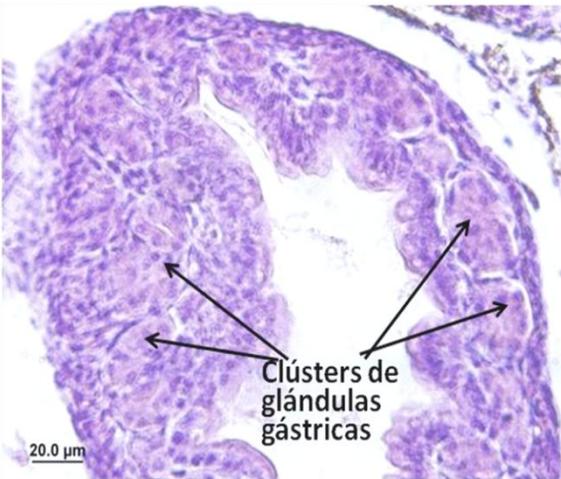


Figura 2g. Estómago: glándulas gástricas 9 dde, H&E

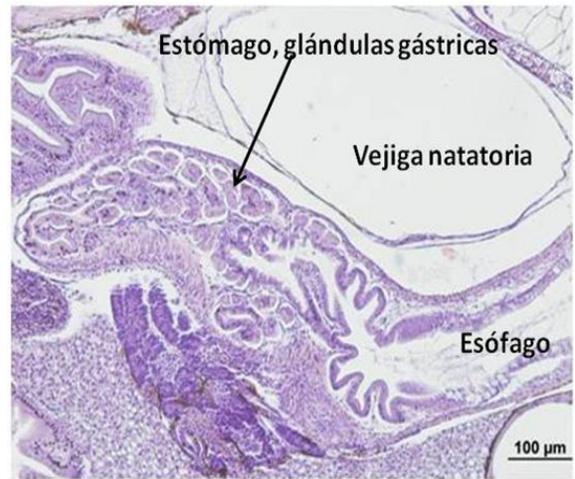


Figura 2h. Estómago: mucopolisacáridos 24 dde, PAS 2.5

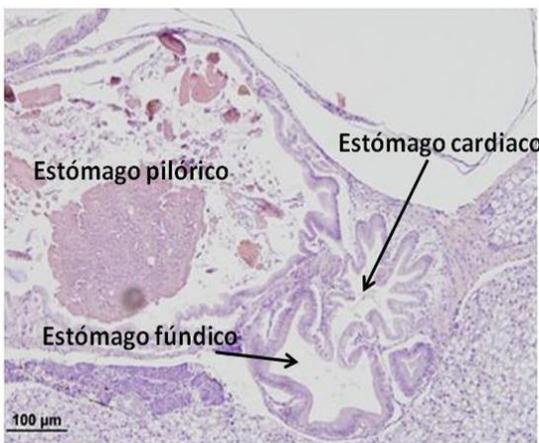


Figura 2i. Estómago, regionalización 19 dde, H&E

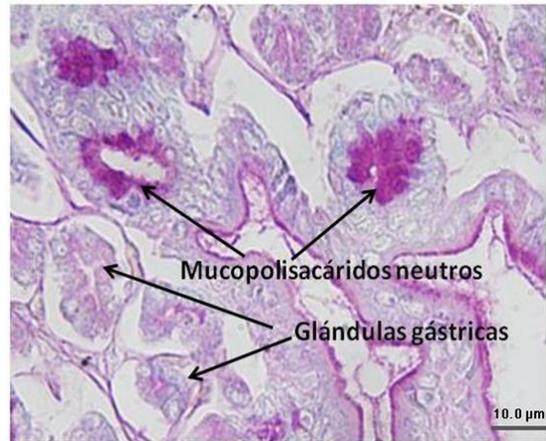


Figura 2j. Estómago: mucopolisacáridos 24 dde, PAS 2.5

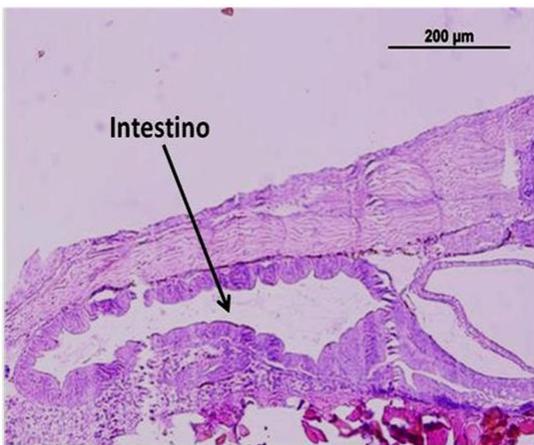


Figura 2k. Intestino incipiente 2 dde, H&E

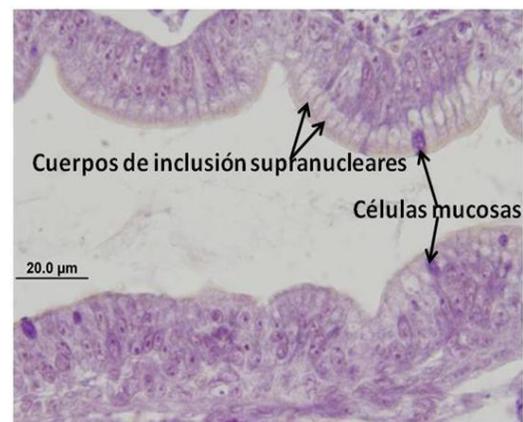


Figura 2L. Intestino, elementos incipientes 2 dde, H&E

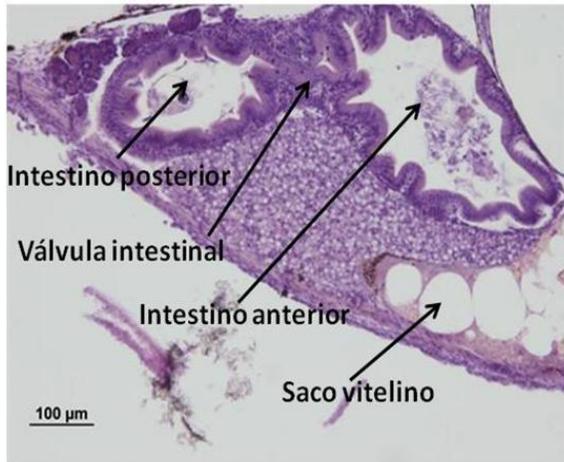


Figura 2m. Intestino: división 4 dde, H&E

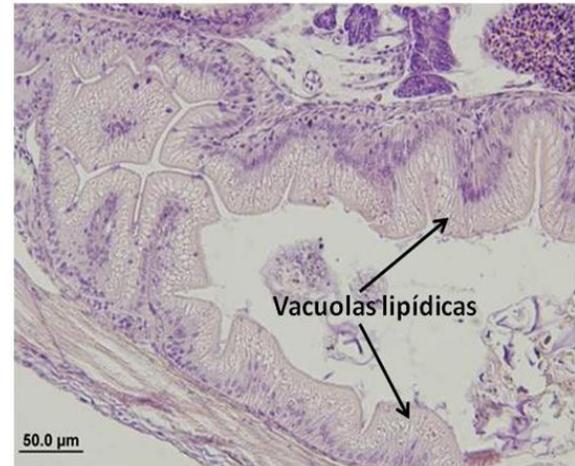


Figura 2n. Vacuolas lipídicas 23 dde, H&E

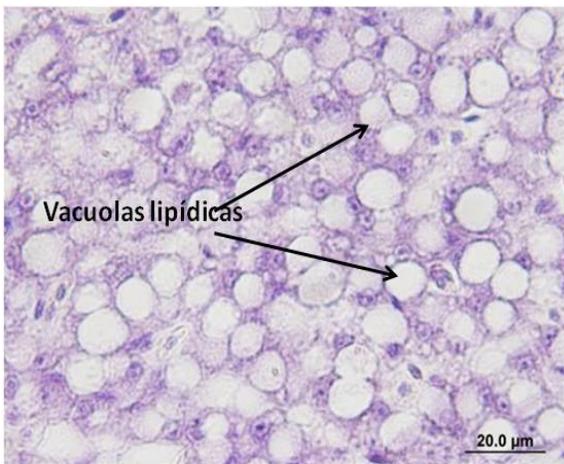


Figura 2ñ. Hígado, lípidos abundantes 7 dde, H&E

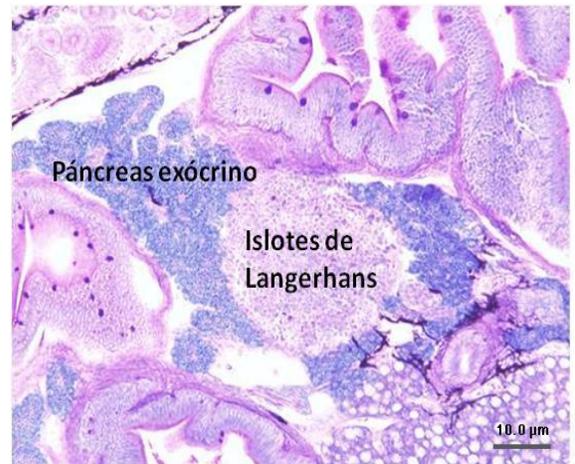


Figura 2o. Páncreas exócrino y endócrino 4 dde PAS 2.5

## Estudios moleculares

### Material y métodos

#### *Extracción y purificación de RNA*

La extracción de RNA a partir de huevos, troncos de larvas de *C. urophthalmus*, se efectuó mediante el método del Trizol™. La homogenización de muestras fue a razón de 1:10 (muestra/Trizol). La precipitación de RNA tuvo lugar con isopropanol absoluto (1:2 isopropanol/Trizol). El lavado de RNA fue con etanol al 75% (1:1 etanol/Trizol) y la

resuspensión del RNA fue en 50  $\mu\text{L}$  de agua DEPC (libre de ribonucleasas). Para la purificación de RNA las muestras resuspendidas fueron tratadas con DNAsa, que degrada otros ácidos nucleicos presentes en las muestras. Las muestras con RNA fueron mezcladas con buffer de reacción y DNAsa (8:1:1, respectivamente) e incubadas a temperatura ambiente por 15 min. Las reacciones fueron interrumpidas con EDTA al 25 mM, calentadas a 65 °C por 10 min, y finalmente conservadas a -80 °C, hasta la síntesis de cDNA.

### ***Síntesis de cDNA***

Se sintetizó cDNA a partir de RNA de las muestras previamente extraído de *C. urophthalmus*. A 5  $\mu\text{L}$  se añadió 1  $\mu\text{L}$  de Random primer (oligonucleótido) e incubados a 70 °C por 10 min. La mezcla para una reacción (1X) de RT-PCR fue como sigue: 5.3  $\mu\text{L}$  de agua DEPC, 4.0  $\mu\text{L}$  de buffer 5X imProm II, 2.4  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  25 mM, 1.0  $\mu\text{L}$  de dNTPs 10 mM, 0.5  $\mu\text{L}$  de RNAsin, 0.8  $\mu\text{L}$  de enzima Improm II y los 6  $\mu\text{L}$  de reacción (RNA) previamente incubada. Las condiciones de la RT-PCR fueron 25 °C por 10 min, 45 °C por 60 min y 90 °C por 5 min. Las muestras de cDNA fueron almacenadas a -20 °C.

### ***Amplificación de cDNA por PCR***

Se realizó PCR por gradiente, utilizando oligonucleótidos específicos previamente diseñados (a partir del pez marino *Pleuronectes americanus*), para genes de enzimas pancreáticas  $\alpha$ -amilasa, lipasa dependiente de sales biliares (BAL), la intestinal fosfatasa alcalina (APH); así como para el control interno EF $\alpha$ -1 (factor de elongación). Para una reacción de 25  $\mu\text{L}$ , a 1  $\mu\text{L}$  de cDNA se añadieron 16.05  $\mu\text{L}$  de agua mQ, 2.5 de buffer PCR 10X, 0.75  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$ , 2.0  $\mu\text{L}$  de primer direct, 2.0  $\mu\text{L}$  de primer reverse (ambos 10 mM), 0.5  $\mu\text{L}$  de 10 mM dNTPs y 0.2  $\mu\text{L}$  de enzima amplificadora Taq polimerasa (5 U  $\mu\text{L}^{-1}$ ). Las condiciones de PCR por gradiente fueron 95 °C (0.5 min) para la desnaturalización; 52-60 °C (0.75 min) para la alineación y 72 °C (0.5 min) para la extensión.

### ***Electroforesis en gel de agarosa***

La electroforesis se realizó a 90 V durante 30 min, con un gel de agarosa 1.5%, en presencia de buffer TAE 1X y bromuro de etidio (0.7  $\mu\text{L}$  para 35  $\mu\text{L}$  de gel). Cada muestra (5  $\mu\text{L}$ ) fueron mezcladas con 2  $\mu\text{L}$  de azul de bromofenol y cargadas junto con marcador de peso molecular de 50 pb.

### ***Purificación en gel de bandas de electroforesis***

Se efectuó purificación en gel de bandas de genes asociados a enzimas digestivas empleando el kit GeneClean<sup>®</sup> Spin y se procedió a la clonación.

### ***Clonación y transformación de células***

La solución de clonación consistió de 1  $\mu\text{L}$  del plásmido pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO<sup>®</sup>, 1  $\mu\text{L}$  de agua estéril, 1  $\mu\text{L}$  NaCl y 3  $\mu\text{L}$  de productos de PCR (correspondiente a cada banda de los genes de expresión enzimática). La transformación de células competentes de *Escherichia coli* fue a 42 °C por 30 seg, en presencia de medio SOC (250  $\mu\text{L}$ ). Los tubos con las distintas mezclas (un tubo por gen de expresión enzimática) se agitaron horizontalmente por 60 min. Las células transformadas con plásmidos inserto fueron sembradas en medio sólido LB con ampicilina (100 mg mL<sup>-1</sup>), solución X Gal (40 mg mL<sup>-1</sup>) y solución IPTG 100 mM, a 37 °C toda la noche. Las colonias de color blanco (bacterias con el plásmido inserto) fueron resembradas posteriormente en medio LB líquido con ampicilina (100 mg mL<sup>-1</sup>). Los plásmidos clonados (con los genes insertos de expresión) fueron liberados de las células a 95 °C por 10 min mediante lisis de membranas celulares y reamplificados por PCR bajo las mismas condiciones antes descritas.

### ***Purificación de plásmidos***

La técnica de mini-prep, mediante la cual los plásmidos con genes de expresión enzimática fueron purificados, tuvo lugar con el Kit RMP<sup>®</sup>, para posteriormente ser secuenciados

(Sigma-Aldrich®), con miras a diseñar los oligonucleótidos específicos, de genes asociados a las enzimas digestivas de *C. urophthalmus*.

### ***Determinación de la expresión relativa génica de enzimas digestivas por PCR en tiempo real***

Se realizó PCR en tiempo real, utilizando cebadores específicos diseñados para amplificación de  $\alpha$ -amilasa, lipasa (dependiente de sales biliares) y fosfatasa alcalina para *C. urophthalmus*. La mezcla de reacción qPCR (40  $\mu$ L), consistió en reactivo Sybr Green, cebadores direct y reverse, agua mQ estéril y 20  $\mu$ L de solución génica (con el gen codificante para las enzimas mencionadas, por separado). Las muestras fueron puestas para su amplificación en un termociclador para PCR en tiempo real, 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystem, Foster City CA, USA). Las condiciones de PCR fueron: inicio (2 min, 50 °C y 10 min, 95 °C, 1 ciclo), desnaturalización (15 s, 95 °C), alineación/extensión (10 min, 95 °C y 1 min, 60 °C, 40 ciclos). Las expresiones relativas fueron determinadas utilizando el método del  $\Delta\Delta$ Ct y las expresiones relativas génicas fueron analizadas por pruebas de “randomización” (Pfaffl, Horgan & Dempfle 2002), haciendo uso del software REST (<http://www.gene-quantification.info>).

### **Resultados**

Por ahora, ha sido posible la secuenciación para las enzimas  $\alpha$ -amilasa, lipasa dependiente de sales biliares, fosfatasa alcalina y el factor de elongación EF $\alpha$ -1, utilizado como control interno en *C. urophthalmus* (ya que es un gen que se expresa permanentemente). Los respectivos pesos moleculares (en kDa), son 565, 187, 832 y 232. Las secuencias nucleotídicas de los genes de expresión (y cebadores en color verde), así como correspondientes secuencias aminoacídicas, resultaron ser como sigue.

## Secuencia nucleotídica y aminoacídica del factor de elongación EF $\alpha$ -1

$\xrightarrow{\text{RT-AM15'}}$   
**GCTTCGAGGAAATCACCAAGGAAGTGAGCGCCTACATCAAGAAGATCGGC** 50  
 A S R K S P R K \* A P T S R R S A 17

**TACAACCCCGCTGCCGTTGCCTTCGTCCCCATCTCTGGATGGCACGGAGA** 100  
 T T P L P L P S S P S L D G T E T 34

$\xleftarrow{\text{RT-AM13'}}$   
**CAACATGTTGGAGACCAGTGACAAGGTGAGGACTTAAACCATTGAGTGA** 150  
 T C W R P V T R \* G L K P F S V 50

**TCCACTTGC TAATTTGACTGAACGTGGACTAAACTGTCAC TTTGATTCT** 200  
 S T C \* F D \* T W T K L S L \* F L 67

**GTAGATGAGCTGGTTCAAGGGATGGAAGGTTG** 232  
 \* M S W F K G W K V 77

## Secuencia nucleotídica y aminoacídica de $\alpha$ -amilasa

$\xrightarrow{\text{RT-AM15'}}$   
**TTT GAGTGGCGCTGGGC TGACATTTGCTCAAGAGTGTGAACGTTTCCTGGG** ..... 50  
 F E W R W A D I A Q E C E R F L G 17

**TCCCAAAGGCTTTGGTGGAGTTCAGATTC TCC TCCAAA TGATCACA TTC** ..... 100  
 P K G F G G V Q I S P P N D H I L 34

**TGGTGAACAGTCCC TGGAGGCCA TGGTGGCAGAGATACCAGCCAA TCAGC** 150  
 V N S P W R P W W Q R Y Q P I S 50

$\xleftarrow{\text{RT-AM13'}}$   
**TACGACC TC TGTTCGAGA TCTGGCAGTGAGGCAGAAC TGAAGGACATGAT** 200  
 Y D L C S R S G S E A E L K D M I 67

**CACACGA TGCAACAACGTTGGGGTAAAA TC TA TGTGGA TGC TGATCA** 250  
 T R C N N V G V K I Y V D A V I N 84

**ACCACA TGTGTGGA TC TGGTGGTGGATCAGGAACCCACTC TTCATGTGGA** 300  
 H M C G S G G G S G T H S S C G 100

**AACTGGTTTAATGC TGGCAGTGAAGAGTCCCCAGTGCCCTTATTCCAA** 350  
 N W F N A G S E E F P S V P Y S K 117

**ATTGGAC TTCAATGACCAAAAA TGCAAGACTGGCAGTGCCGAAA TTGAGA** 400  
 L D F N D Q K C K T G S G E I E N 134

**ACTATGGTGACATATATCAGGTACGTGACTGCCGCTCGGTGGGTCTGCTG** 450  
 Y G D I Y Q V R D C R L V G L L 150

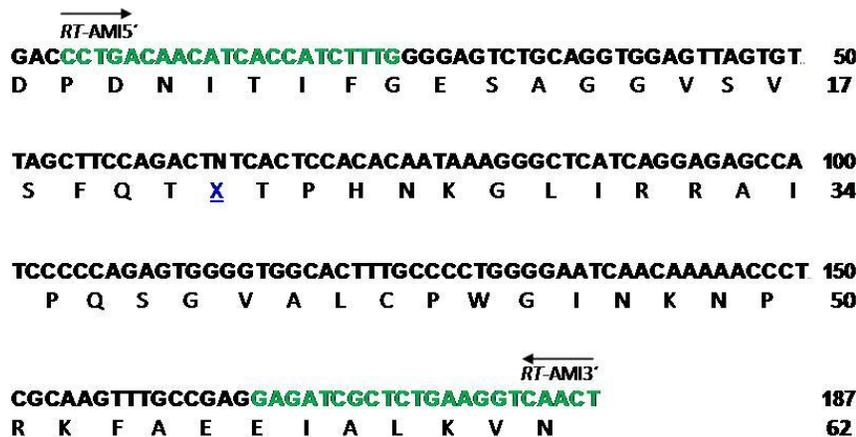
**GATCTCGCCC TGGAGAAAGA TTACGTTAGGGGCAAAGTGAGCGACTACAT** 500  
 D L A L E K D Y V R G K V S D Y M 167

**GAACAAGCTGATTGGCA TGGGTGTGGCTGGATCCGAGTGGATGCCTGCA** 550  
 N K L I G M G V A G F R V D A C K 184

## Secuencia nucleotídica y aminoacídica de fosfatasa alcalina

**ACTGTGACGGCTGCTCGTATACTGAAGGGTCAGCTGAATGGACAGAGCGG. 50**  
**T V T A A R I L K G Q L N G Q S G 17**  
**AGAAGAAACACAATTGGAAA TGGACAAGTCCCTTTTGTATCTTTATCCA. 100**  
**E E T Q L E M D K F P F V S L S K 34**  
**AGACATACAACAC TAACGCACAGGTGCCAGACAGTGCTGGCACAGCCACG. 150**  
**T Y N T N A Q V P D S A G T A T 50**  
**GCTTACCTCTGTGGGGTTAAGGCCAACGAGGGCACAGTGGGCGTGAGTGC. 200**  
**A Y L C G V K A N E G T V G V S A 67**  
**AGCTGCTGTCCGATCCAGTGTAACACCACACAGGGCAATGAGGTCACCT. 250**  
**A A V R S Q C N T T Q G N E V T S 84**  
**CCATCCTCAAATGGGCCAAGGATGCGAGGCAAGTCAGTGGGAATAGTGACC. 300**  
**I L K W A K D A G K S V G I V T 100**  
**ACAACGCGCGTCAACCATGCGACTCCAGTGCTGCTTACGCACAC TG TGT. 350**  
**T T R V N H A T P S A A Y A H C V 117**  
**GGACCGAGACTGGTACTCCGACAACGAGATGCCAGAAGAAGCGCTGAACG. 400**  
**D R D W Y S D N E M P E E A L N A134**  
**CTGGCTGCAAGGATATCGCCAGGCAACTCTTTGAAAACA TCGCAACATT. 450**  
**G C K D I A R Q L F E N I R N I 150**  
**GATGTGATTATGGGCGGAGGAAGGAAGTATATGTTCCCAAGAACCAGTC. 500**  
**D V I M G G G R K Y M F P K N Q S 167**  
**GGATGTAGAA TACCCTAATGTGCTGAAGCACAGCGGCACACGGAAAGATG. 550**  
**D V E Y P N V L K H S G T R K D G 184**  
**GGATGTAGAA TACCCTAATGTGCTGAAGCACAGCGGCACACGGAAAGATG. 550**  
**D V E Y P N V L K H S G T R K D G 184**  
**GAAGAAACCTGGTGCAGGAGTGGACTGAAAGAATGAAGGATAAAAAAGGA. 600**  
**R N L V Q E W T E R M K D K K G 200**  
**CGTTATGTATGGAACAAGAAGCAGCTCTTATCCCTAAACCCTAACAATGT. 650**  
**R Y V W N K K Q L L S L N P N N V 217**  
**→**  
**RT-AMIS'**  
**GGATTACCTCTGGGTCTTTGAACCCGGAGATCTGCCATATGACTTGG. 700**  
**D Y L L G L F E P G D L P Y D L E 234**  
**AAAGGAACACTGACTCTGATCCATCACTGACAGAGATGGTGGATGTGGCT. 750**  
**R N T D S D P S L T E M V D V A 250**  
**ATCAAGATCCTGAAGAAGAACCCAAGTGGATTTTACCTGCTTGTAGAGGA. 800**  
**I K I L K K N P S G F Y L L V E E 267**  
**←**  
**RT-AMIS'**  
**AAGGACGAATTGACCACGGACACCATGAGGGC. 832**  
**R T N \* P R T P \* G 277**

## Secuencia nucleotídica y aminoacídica de lipasa dependiente de sales biliares



Por otro lado, una vez obtenidos los cebadores (oligonucleóticos) propios de enzimas digestivas de *C. urophthalmus*, ha sido posible realizar ensayos PCR en tiempo real, cuyos resultados muestran que la expresión génica relativa para las enzimas pancreáticas  $\alpha$ -amilasa y lipasa dependiente de sales biliares, no observan una supresión génica respecto al tiempo, especialmente ésta última, donde se observa un incremento sostenido de expresión génica relativa, hasta el final de los 30 dde. No obstante, la enzima intestinal fosfatasa alcalina si observa una clara supresión génica (figura 3).

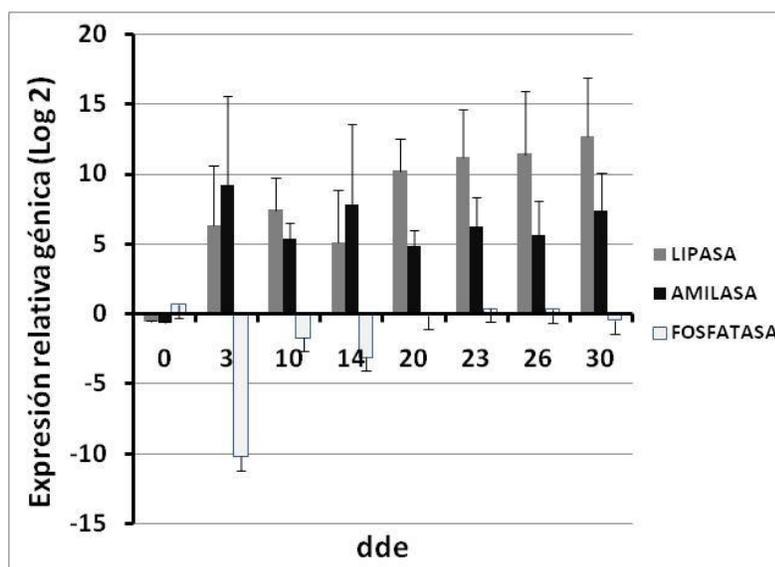


Figura 3. Expresión relativa génica de enzimas digestivas (LIPASA: lipasa dependiente de sales biliares, AMILASA:  $\alpha$ -amilasa y FOSFATASA: fosfatasa alcalina), durante la ontogenia inicial de *C. urophthalmus*.

## Caracterización enzimática de juveniles

### Material y Métodos

#### *Obtención de extractos multienzimáticos de juveniles*

Los juveniles del cíclido maya *C. urophthalmus* ( $5.73 \pm 3.43$  g, peso húmedo) fueron disectados en frío, a fin de aislar estómagos e intestinos de la masa visceral. Se obtuvo el peso húmedo por individuo, estómago e intestino con una balanza analítica (Denver Instrument APX-200, resolución 0.1 mg). Los tejidos fueron homogenizados en un macerador eléctrico (Ultra Turrax<sup>®</sup> Ika T18 Basic), a razón de 1:5 (tejido/agua destilada, p/v). Las mezclas fueron centrifugadas a 14,000 rpm, 4 °C por 30 min, en una centrifuga (Eppendorf 5810-R). Se recuperaron los sobrenadantes y se almacenaron a -20 °C, hasta su análisis posterior.

#### *Actividad específica de enzimas digestivas*

La concentración de proteína soluble en estómago e intestino de *C. urophthalmus*, fue realizada según Bradford (1976), empleando una solución madre de ovoalbúmina bovina de 1 mg ml<sup>-1</sup>. Con el fin de conocer la cantidad de unidades de enzimas en extracto de estómago, se hizo uso del método de Anson (1938), con las modificaciones que siguen. Se formó un complejo a partir de 1 ml de hemoglobina (al 1% en tampón glicina-HCl 100 mM, pH 2) y 20 µl de extracto multienzimático de estómago de *C. urophthalmus*. La mezcla fue incubada a 25 °C por 30 min. La reacción se detuvo con 500 µl de ácido tricloroacético (TCA) al 20% y reposadas a 4 °C por 15 min. Las muestras por triplicado, fueron centrifugadas a 12,000 rpm, bajo las mismas condiciones de reposo. Los sobrenadantes fueron recuperados y diluidos con agua destilada (1:10) para la lectura de la absorbancia a 280 nm en un espectrofotómetro (Jenway 6405 UV/Visible), utilizando celdas de cuarzo de 1 cm<sup>2</sup>, definiéndose una unidad de actividad como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 µg de tirosina por minuto. Para determinar la actividad de extracto multienzimático de intestino, se utilizó el método de Kunitz (1947). Se utilizó 1 ml de caseína de Hammarsten al 1% en solución tampón tris-HCl 100 mM,

como sustrato de 5  $\mu\text{l}$  de extracto multienzimático de intestino de *C. urophthalmus*. La mezcla se incubó a 25 °C por 30 min. La reacción fue interrumpida con 500  $\mu\text{l}$  de TCA al 20%. Para el centrifugado y lectura de absorbancias de muestras, se procedió de igual manera que las proteasas estomacales, para obtener la cantidad de tirosina liberada por reacción. Para la determinación de actividad proteolítica de mezclas control, tanto para proteasas ácidas y alcalinas, se añadió extracto multienzimático inmediatamente después de parar la reacción con TCA al 20%. La actividad de la tripsina fue valorada mediante la técnica de Erlanger *et al.* (1961) con las siguientes modificaciones. El BAPNA (N- $\alpha$ -benzoil-DL-arginina 4-nitroanilida) empleado como sustrato, se diluyó previamente en 200  $\mu\text{l}$  de dimetil sulfóxido (DMSO) y se llevó al 3.5 mM en buffer en tris-HCl 50 mM CaCl<sub>2</sub> 20 mM, pH 8. La reacción tuvo lugar con la adición de 10  $\mu\text{l}$  de extracto multienzimático de intestino a 990  $\mu\text{l}$  de sustrato, incubada a 25 °C por 30 min. La reacción fue interrumpida con 250  $\mu\text{l}$  de ácido acético al 30%. La absorbancia fue medida a 410 nm. Haciendo uso de un coeficiente de extinción molar de 8.8 ml  $\mu\text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ , se definió la actividad enzimática como 1  $\mu\text{mol}$  de *p*-nitroanilida liberada por minuto (Dimes *et al.* 1994). Con el fin de conocer la actividad de quimiotripsina, se determinó según Asgeirsson y Bjarnasson (1991) con las modificaciones que se mencionan. El BTEE (N-benzoli-L-tirosina etil ester) al 5 mM en buffer tris-HCl 44.4 mM pH 7.8 (sin CaCl<sub>2</sub>) se diluyó previamente en DMSO. La reacción fue iniciada añadiendo 623  $\mu\text{l}$  de buffer a la celda de cuarzo para llevar el espectrofotómetro a cero. Luego se agregaron 70  $\mu\text{l}$  de sustrato y se leyó a 256 nm cada 20 s por 2 min. Posteriormente se adicionaron 10  $\mu\text{l}$  de extracto multienzimático de intestino de y de nueva cuenta, se obtuvo la absorbancia cada 20 seg por 2 min. El valor delta de absorbancia entre la reacción catalizada y la reacción sustrato se tomó para el cálculo de la actividad, considerando un coeficiente de extinción molar de 0.906 ml  $\mu\text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ . La actividad se definió como 1  $\mu\text{mol}$  de tirosina liberada por min. Para determinación de la actividad de leucina aminopeptidasa, se utilizó el método propuesto por Maraux *et al.*, (1973). Se utilizó como sustrato leucina-*p*-nitroanilida al 1mM en buffer fosfato de sodio 50 mM pH 7.2. A 980  $\mu\text{l}$  de sustrato se añadieron 20  $\mu\text{l}$  de extracto multienzimático de intestino. La mezcla fue incubada a 25 °C por 30 min y la reacción se detuvo con ácido acético al 30%. La lectura de la absorbancia fue a 410 nm, definiéndose la actividad como la cantidad de enzima requerida para obtener 1  $\mu\text{mol}$  de

alanina *p*-nitroanilida por minuto. Se consideró un coeficiente de extinción molar de  $8.2 \text{ ml } \mu\text{mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . La actividad de la carboxipeptidasa A, se obtuvo empleando el método de Folk y Schilmer, (1963). Hyporyl-L-fenilalanina, al 1mM en tris-HCl 25 mM NaCl 500 mM pH 7.5 sustrato fue el utilizado para el ensayo. Se agregaron 600  $\mu\text{l}$  de buffer directamente a la celda de cuarzo. El espectrofotómetro fue llevado a cero y se adicionaron de sustrato y se monitoreó la absorbancia a 254 nm por cada 20 seg durante 2 min. Seguidamente se incorporaron 5  $\mu\text{l}$  de extracto multienzimático de intestino y se volvió a monitorear la absorbancia por 2 min, en lapsos de 2 seg. El cálculo fue computado de la misma manera que para la quimiotripsina. La actividad fue definida como la formación de 1  $\mu\text{mol}$  de ácido hipúrico por minuto. Se empleó un coeficiente de extinción molar de  $0.36 \text{ ml } \mu\text{mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Para evaluación de las fosfatasas ácida y alcalina, se procedió de acuerdo con Bergmeyer (1974), haciendo uso de 50  $\mu\text{l}$  de extracto multienzimático de intestino, para degradación del sustrato 4-nitrofosfato al 2% en buffer citrato de sodio 41.6 mM pH 4.0 (fosfatasa ácida); o buffer glicina hidróxido de sodio al 100mM pH 10,1 (fosfatasa alcalina). La incubación a 37 °C fue durante 10 min. Se definió la actividad como la cantidad de enzima que produce un incremento de la absorbancia de 0.01 a 405nm, considerando un coeficiente de extinción molar de  $17.5 \text{ ml } \mu\text{mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Con miras a evaluar  $\alpha$ -amilasa, se prosiguió según Robyt y Whelan, (1968). A 50  $\mu\text{l}$  de extracto multienzimático (intestino y estómago, por separado) de *C. urophthalmus* se le agregó solución tampón citrato-fosfato pH 7, solución de almidón 1% (después de llegar a máximo hervor). La mezcla se incubó a 37 °C y se leyó a 600 nm. Se definió una unidad como la cantidad de enzima que libera 1 mg de maltosa por minuto.

### **Efecto del pH y la temperatura sobre la actividad de proteasas**

Para determinar el efecto de estos factores sobre la actividad de proteasas, se procedió del mismo modo antes descrito, solo que para el pH se utilizó un intervalo entre 2 y 7 (proteasas ácidas) y entre 8 y 12 (proteasas alcalinas), empleando solución de Stauffer (1989). El intervalo de temperatura empleado fue de 25 a 75 °C para ambos tipos de proteasas. Para los ensayos del efecto de estos factores sobre la estabilidad de proteasas, las muestras fueron por un lado, preincubadas a 25 °C durante 0, 30, 60 y 90 min, para cada

uno de los valores de pH señalados (efecto del pH). Por otro lado, las muestras fueron preincubadas a temperaturas crecientes ( $25 < t \text{ (}^\circ\text{C)} < 75$ ), durante 0, 30, 60 y 90 min (efecto de la temperatura).

### **Inhibición de proteasas**

La caracterización de proteasas se complementó mediante electroforesis y el uso de inhibidores. Se cuantificó el número de bandas de actividad enzimática, los tipos de proteasas que componen los extractos multienzimáticos de *C. urophthalmus*. Para realizar este estudio se preincubaron por 1 h los extractos multienzimáticos con los mismos inhibidores descritos anteriormente, para después tomar una muestra de 20  $\mu\text{l}$  y realizar la electroforesis. En el caso de las proteasas ácidas se corrió la electroforesis en condiciones nativas (PAGE) según Davis (1964), en geles continuos de acrilamida al 10% (80 V por 15 min). Para la detección de actividad proteolítica ácida, los geles se sumergieron en una solución de HCl 100 mM, hasta llevar su pH a 2. Posteriormente, se colocaron en una solución de hemoglobina (0.25% en tampón 100 mM glicina-HCl, pH 2 a 4°C). Para las proteasas alcalinas la electroforesis se corrió en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) de acuerdo con Laemmli (1970) y adaptada por García-Carreño *et al.* (1993). El corrimiento de la electroforesis se realizó con un buffer SDS 0.1%, Tris (25 mM) y glicina (192 mM, pH 8.3 a 100 volts, por 120 min). Para detectar la actividad proteasa alcalina, los geles fueron sumergidos en una solución de caseína Hammerstein (2% en buffer Tris-HCl 100 mM, pH 9, durante 1 h a 4°C). Para la tinción de geles se procedió como describen Weber y Osborn (1969).

### **Resultados**

Los estudios enzimáticos han sido otra de las herramientas preponderantes para el estudio de los cambios enzimáticos, con miras a dilucidar los cambios morfofuncionales, durante la ontogenia inicial de los peces. Los niveles de actividad enzimática ( $\text{U mg}^{-1} \text{ prot}$ ) de juveniles de *C. urophthalmus* se pueden observar en la tabla 1. La proteasas ácidas muestran  $1.8 \pm 0.5$  y las proteasas alcalinas de  $3.1 \pm 0.5$ . Las endopeptidasas tripsina y

quimiotripsina observan actividades de  $0.52 \pm 0.02$  y  $0.8 \pm 0.3$ , respectivamente; en tanto que las exopeptidasas aminopeptidasa y carboxipeptidasa A, observan niveles de actividad de  $0.004 \pm 0.003$  y  $0.4 \pm 0.1$ , de manera respectiva. La actividad de fosfatasa ácida muestra de  $0.0001 \pm 0.00002$  y la de la alcalina es de  $0.0003 \pm 0.00005$ . Por último, la  $\alpha$ -amilasa arroja  $3.5 \pm 1.7$ .

Tabla 1. Caracterización de enzimas digestivas de juveniles de *Cichlasoma urophthalmus*

Actividad	U mL <sup>-1</sup>	U g <sup>-1</sup> (tejid)	U mg <sup>-1</sup> (prot)
Proteasas ácidas	2.7±0.7	13.6±3.6	1.8±0.5
Proteasas alcalinas	10.6±1.9	53.2±9.4	3.1±0.5
Tripsina	1.9±0.1	12.1±0.4	0.52±0.02
Quimiotripsina	3.1±1.4	14.5±6.6	0.8±0.3
Leucina aminopeptidasa	0.014±0.009	0.07±0.04	0.004±0.003
Carboxipeptidasa A	1.3±0.4	6.8±2.1	0.4±0.1
Fosfatasa ácida	0.0002±0.0001	0.001±0.0003	0.0001±0.00002
Fosfatasa alcalina	0.0009±0.0002	0.005±0.001	0.0003±0.00005
$\alpha$ -amilasa	12.3±6.1	61.6±30.4	3.5±1.7

### Inhibición enzimática (técnicas electroforéticas)

En la figura 4a, en el extracto enzimático del estómago de *C. urophthalmus* (carril Control) se observó una sola isoforma la cual se inhibe completamente al usar Pepstatin A (carril CI). Al contrastar con pepsina porcina (carril P) y la pepsina porcina inhibida con pepstatin A (carril PI) se observa la desaparición de la banda. En lo que concierne a la figura 6b, es posible visualizar las bandas de proteasas por efecto de inhibidores en extracto multienzimático de intestino de *C. urophthalmus*, la cual muestra la presencia de seis bandas, correspondientes a seis isoformas con actividad proteolítica alcalina (carril Control), de 16.1, 21.5, 43.1, 72.1, 82.2 y 92.9 KDa. En presencia de ovoalbúmina (carril Ovo) se inhiben las seis bandas. Al hacer uso de los inhibidores SBTI (carril SBTI) y PMSF (carril PMSF), se inhiben todas las bandas, salvo las de mayor peso molecular (82.2 y 92.9 KDa) y (92.9 KDa), respectivamente. Con la fenantrolina (carril Fen), no se inhibieron ninguna de las bandas, con excepción de la banda de menor peso molecular (16.1 KDa), mientras que con EDTA (carril EDTA), se inhibieron la mayoría de las

bandas, con excepción de las bandas que corresponden a los pesos moleculares más extremos (16.1 y 92.9 KDa). Al utilizar los inhibidores específicos TPCK (carril TPCK) y TLCK (carril TLCK), no resultaron inhibidas la mayoría de las bandas, salvo la de menor peso molecular (16.1 KDa).

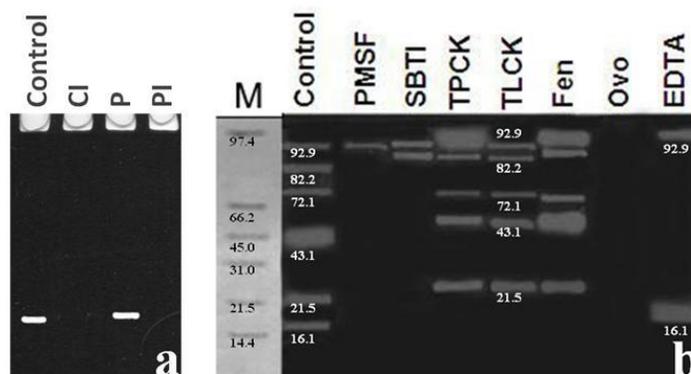


Figura 4. Zimograma de proteasas ácidas (4a) y proteasas alcalinas (4b) con acción de los inhibidores respectivos sobre las isoformas de los extractos multienzimáticos de *C. urophthalmus*. CI: Control con inhibidor Pestatina A, P: Pepsina de cerdo, PI: Pepsina de cerdo con inhibidor Pestatina A, PMSF: luoruro de fenilmetilsulfonilo, SBTI: Inhibidor trípico de soja, TPCK: Tosil-fenilalanina-metil cetona, TLCK: Tosil-lisina-metil cetona, Fen = Fenantrolina, Ovo: Ovoalbúmina, EDTA: Ácido etilendiaminotetracético. M: Marcador de peso molecular (KDa): albúmina de suero bovino (66 kDa), albúmina de huevo (43 kDa), Anhidrasa carbónica (29 kDa), tripsinógeno (24 kDa), Inhibidor de soja tripsica (20 kDa).

### Efecto del pH y preincubación sobre la actividad y estabilidad de proteasas

La actividad de proteasas por efecto del pH; así como su estabilidad por efecto del pH y el tiempo de preincubación se muestra en la figura 5. La actividad de proteasas ácidas muestra diferencias significativas ( $p < 0.05$ ), cuyo valor óptimo se observó a pH 3, disminuyendo drásticamente conforme aumenta el valor del pH (figura 5a). Para la estabilidad de proteasas ácidas existen diferencias significativas, con los distintos valores de pH probados ( $p < 0.05$ ), observándose un aumento de la actividad residual conforme aumenta el tiempo de preincubación conforme el valor de pH disminuye, mientras que

conforme el valor de pH aumenta, la estabilidad de proteasas ácidas disminuye (figura 5b). Por otra parte, la actividad de proteasas alcalinas se ve afectada por el valor del pH ( $p < 0.05$ ) siendo esta actividad óptima a un pH de 9 (figura 5c). A distintos valores de pH, la actividad residual de proteasas alcalinas es significativa ( $p < 0.05$ ), mostrando una alta resistencia a los diferentes valores de pH, incrementándolos hasta por arriba del 650% en relación al 100% de actividad inicial, especialmente para los valores de pH de 6 y 7 a partir de los 30 minutos de preincubación, aunque conforme el tiempo de preincubación aumenta, la actividad residual disminuye alrededor del 450% para los 60 y 90 minutos de preincubación (figura 5d).

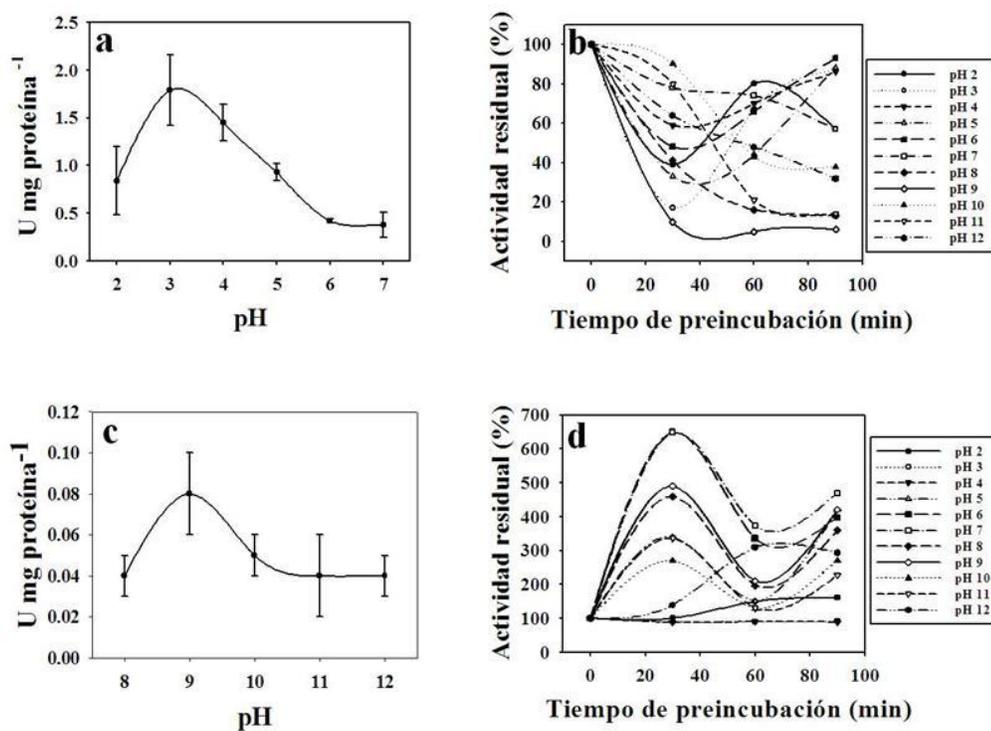


Figura 5. Caracterización de proteasas. 5a) pH óptimo de actividad de proteasas ácidas, 5b) Actividad residual, para evaluar estabilidad de proteasas ácidas, por efecto del pH y del tiempo de incubación, 5c) pH óptimo de actividad de proteasas alcalinas, 5d) Actividad residual, para evaluar estabilidad de proteasas alcalinas, por efecto del pH y del tiempo de incubación.

## **Efecto de la temperatura y preincubación sobre la actividad y estabilidad de proteasas**

El papel de la temperatura sobre la actividad de proteasas, se puede observar en la figura 6. No existieron diferencias significativas en los valores de actividad de proteasas ácidas, por efecto de la temperatura ( $p > 0.05$ ), sin embargo, se observa que la mayor actividad fue obtenida a 55 °C (figura 6a). La estabilidad de proteasas ácidas es muy alta para todas los tiempos de preincubación, a 35 y 45 °C, mientras que para temperaturas mayores, la actividad residual disminuye rápidamente ( $p < 0.05$ ), especialmente al preincubar los extractos a 65 °C (fig. 6b). Para el caso de las proteasas alcalinas, la temperatura es determinante, encontrándose diferencias significativas entre los distintos valores de actividad enzimática ( $p < 0.05$ ), siendo el valor más óptimo de actividad a 55 °C (figura 6c).

La estabilidad de proteasas alcalinas a los cambios de temperatura muestran una alta resistencia a los cambios ( $p < 0.05$ ), especialmente a los 45 °C, alcanzando su máximo valor después de 90 minutos, seguido de los 35 °C, después a los 55 °C; el valor más bajo se obtiene al preincubar el extracto multienzimático a los 65 °C (figura 6d).

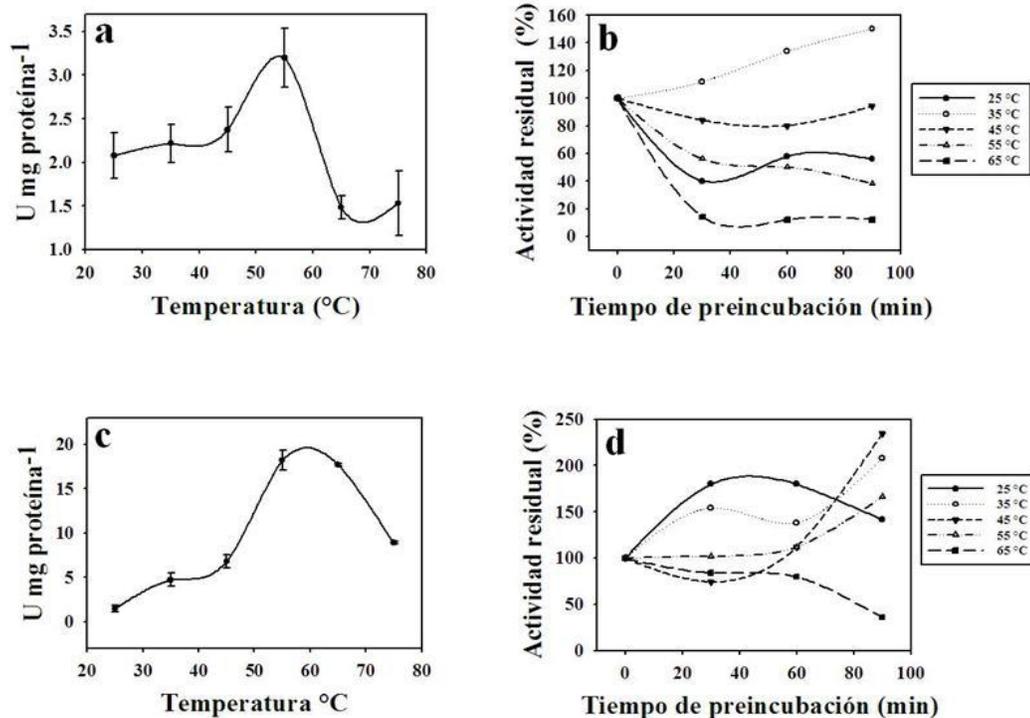


Figura 5. Caracterización de proteasas. 5a) Temperatura óptima de actividad de proteasas ácidas, 5b) Actividad residual, para evaluar estabilidad de proteasas ácidas, por efecto de la temperatura y del tiempo de incubación, 5c) Temperatura óptima de actividad de proteasas alcalinas, 5d) Actividad residual, para evaluar estabilidad de proteasas alcalinas, por efecto de la temperatura y del tiempo de incubación.

## Discusión

Entre los 3 y 4 dde, *C. urophthalmus* observa el comienzo del desarrollo del estómago cardias y la aparición del esfínter pilórico. Estos rasgos de desarrollo precoz estomacal han sido observados también en peces cíclidos como *O. niloticus* (Morrison *et al.* 2001) y *P. splendida* (Treviño *et al.* 2010) e incluso, aunque menos precoz, en otros peces de agua dulce como *S. lucioperca* (Ostaszewska, 2005). Es menester hacer notar que, el primer repunte de proteasas ácidas alrededor de los 13 dde en *C. urophthalmus* como reportan López-Ramírez *et al.* (2010), coincide con la total diferenciación de glándulas gástricas en un estómago con notorio avance de desarrollo reveladas en el presente estudio (H&E). Este evento relevante fue sincrónico con la aparición de las primeras células mucosas en

estómago a los 11 dde ( $5.75 \pm 0.36$  mm SL), cuyos glicoconjugados neutros (PAS positivo), permiten amortiguar la autodigestión del epitelio estomacal interno, generada por la actividad del ácido hidroclohídrico y enzimas de las glándulas gástricas (Gisbert *et al.* 2004). Estos hechos, pueden sugerir el cambio de alimentación, mixta a alimento inerte de *C. urophthalmus* a los 13 dde, como sugieren López-Ramírez *et al.* (2010), donde el máximo pico de actividad de proteasas ácidas observado alrededor de los 20 dde, coincide con la observación histológica de un estómago total y plenamente diferenciado a los 19 dde ( $7.02 \pm 0.25$  mm SL), mostrando la regionalización típica del estómago en cardias, fundus y pylorus. Por lo tanto, es posible sugerir que el tipo de digestión que lleva a cabo *C. urophthalmus* es química, lo que coincide con otro cíclido de agua dulce *P. splendida*, así como su correspondiente diferenciación estomacal en regiones, encontrado por Treviño *et al.* (2010). Con los elementos hasta ahora que se disponen, los estudios histológicos revelan que, a los 13 dde *C. urophthalmus*, presenta un estómago desarrollado, con presencia de glándulas gástricas posiblemente funcionales, que le confiere cierta capacidad proteolítica, hecho que se confirma con un pico importante de proteasas ácidas, a esa edad López-Ramírez *et al.* (2010). Por lo que, aunado a la actividad importante de otras más enzimas digestivas, es posible sugerir a los 13 dde para el cambio de régimen alimentario de *C. urophthalmus* (destete). Los estudios moleculares permiten asumir un rápido desarrollo morfofuncional del páncreas, dada la expresión génica de enzimas pancreáticas  $\alpha$ -amilasa y lipasa dependiente de sales biliares, desde muy temprana edad, lo que supone la importancia de estas enzimas digestivas en *C. urophthalmus*.

Por otro lado, los resultados de caracterización enzimática, confirmaron que *C. urophthalmus* es una especie de hábitos omnívoros, con potencial para degradar sustratos propios de una especie carnívora, ya que presenta actividad específica importante de proteasas ácidas, pero también una alta actividad de proteasas alcalinas, con cierto predominio de éstas últimas.

## Agradecimientos

Nuestro agradecimiento al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México, por el otorgamiento de la beca, con número de registro 1100006. A la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco (UJAT), por el otorgamiento de la beca, mediante el de convenio DAMR-02 UJAT-PROFESOR/2010. Al Laboratorio de Acuicultura Tropical, DACBIO-UJAT. Al Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas para la realización del presente trabajo, especialmente a mi comité doctoral, por sus acertadas observaciones.

## Literatura citada

- Álvarez-González C. A., Moyano-López F. J., Civera-Cerecedo R., Carrasco-Chávez V., Ortiz-Galindo J. L., Dumas S. 2008. Development of digestive enzyme activity in larvae of spotted sand bass *Paralabrax maculatofasciatus*, Biochemical analysis. *Fish Physiol Biochem.* 34:373-384.
- Anson M. L. 1938. The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin. *Journal Gen Physiol.* 22:79-89.
- Asgeirsson B., Bjarnason J. B. 1991. Structural and kinetic properties of chymotrypsin from Atlantic cod (*Gadus morhua*). Comparison with bovine chymotrypsin. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 99B(2): 327-335.
- Bergmeyer H. V. 1974. Phosphatases methods of enzymatic analysis, vol 2. Academic Press, New York.
- Bisbal G. A., Bengtson D. A. 1995. Development of the digestive tract in larval summer flounder. *Journal of Fish Biology.* 47: 227-291.
- Bradford M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anales of Biochemistry* 72: 248-25.
- Castillo-Yáñez F. J., Pacheco-Aguilar R., García-Carreño F. L., Navarrete-Del Toro M. A. 2004. Isolation and characterization of trypsin from pyloric caeca of Monterey sardine *Sardinops sagax caerulea*. *Comparative Biochemistry and Physiology.* 140(B): 91-98.
- Darias M. J., Murray H. M., Gallant J. W., Astola A., Douglas S. E., Yúfera M., Martínez-Rodríguez G. 2006. Characterization of a partial  $\alpha$ -amylase clone from red porgy (*Pagrus pagrus*): Expression during larval development. *Comparative Biochemistry and Physiology.* Part B. 143: 209-218.
- Davis B. J. 1964. Disc electrophoresis-II. Method and application to human serum proteins. *Annals of the New York Academy of Sciences* 121: 404-427.
- Debnath D., Pal A. K., Sahu N. P., Yengkokpam S., Baruah K., Choudhury D., Venkateshwarlu G. 2007. Digestive enzymes and metabolic profile of *Labeo rohita* fingerlings fed diets with different crude protein levels. *Comparative Biochemistry and Physiology.* Part B 146:107-114.
- Dimes L. E., Haard N. F. 1994. Estimation of protein digestibility- I. Development of an *in vitro* method for estimating protein digestibility in salmonids. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 108(A): 349-362.
- Erlanger B., Kokowsky N., Cohen W. 1961. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 95: 271-278.
- Folk J., Schirmer E. 1963. The porcine pancreatic Carboxypeptidase A System: Three forms of the active enzyme. *The Journal of Biological Chemistry.* 238, 38-84.
- 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.

- García-Carreño, F. L., Dimes, L. E., Haard, N. F. 1993. Substrate-gel electrophoresis for composition and molecular weight of proteinases or proteinaceous proteinase inhibitors. *Analytical Biochemistry*. 214: 65-69.
- García-Gasca A. A., Galaviz M. N., Gutiérrez J., García-Ortega A. 2006. Development of the digestive tract, trypsin activity and gene expression in eggs and larvae of the bullseye puffer fish *Sphoeroides annulatus*. *Aquaculture*. 251: 366-376.
- Guerrero-Zárate R. 2010. Evaluación de la capacidad digestiva del pejelagarto (*Atractosteus tropicus*). Tesis de maestría, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, División Académica de Ciencias Biológicas.
- Gisbert E., Piedrahita R. H., Conklin D. E. 2004. Ontogenetic development of the digestive system in California halibut (*Paralichthys californicus*) with notes on feeding practices. *Aquaculture*. 232: 455-470.
- Govoni J. J., Boehlert G. W., Watanabe Y. 1986. The physiology of digestion in fish larvae. *Environmental Biology of Fishes*. 16: 59-77.
- Günther A. 1862. Catalog of the Actinopterygii, Pharyngognathi and Anacanthini in the collection of the British Museum. 4(1), pp. 534.
- Hachero-Cruzado I., Ortiz-Delgado J. B., Borrega B. 2009. Larval organogenesis of fl atfi sh brill *Scomphthalmus rhombus* L: histological and histochemical aspects. *Aquaculture*. 286 (1-2): 138-149.
- Heming T. A., Buddington R. K. 1988. Yolk sac absorption in embryonic and larval fishes. In: Fish physiology, Vol. 11A. W. A. Hoar and D. J. Randall (Eds). Academic Press, London, pp. 407-446.
- Kunitz M. 1947. Crystalline soybean trypsin inhibitor II. General properties. *J. Gen. Physiol.* 30:291-310.
- Laemmli U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lazo J. P., Darias M. J., Gisbert E. 2011. Ontogeny of the digestive trac, In: *Larval Fish Nutrition*, First Edition. Edited by Holt G. J. John Wiley & Sons, Inc. Published by John Wiley & Sons, Inc.
- 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. 2010. Development of digestive enzymes in larvae of Mayan cichlid *Cichlasoma urophthalmus*. *Fish Physiol Biochem*. DOI 10.1007/s10695-010-9431-6.
- Lundstedt L. M., Melo J. F., Moraes G. 2004. Digestive enzymes and metabolic profile of *Pseudoplatystoma corruscans* (Teleostei: Siluriformes) in response to diet composition. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 137(B): 331-339.
- Matus de la Parra A., Rosas A., Lazo J. P., 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.
- Micale V., Garaffo M., Genovese L. 2006. The ontogeny of the alimentary tract during larval development in common Pandora *Pagellus erythrinus* L. *Aquaculture* 251 (2-4): 345-365.
- Morrison C. M., Miyake T, Wright J. R. 2001. Histological study of the development of the embryo and early larva of *Oreochromis niloticus* (Pisces: Cichlidae). *Journal of Morphology*. 247 (2): 172-195.

- Murray H. M, Gallant J. W, Johnson S. C, Douglas S. E. 2006. Cloning and expression analysis of three digestive enzymes from Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) during early development: Predicting gastrointestinal functionality. *Aquaculture*. 252: 394-408.
- Natalia Y., Hashim R., Ali A., Chong A. 2003. Characterization of digestive enzymes in a carnivorous ornamental fish, the Asian bony tongue *Scleropages formosus* (Osteoglossidae). *Aquaculture*, [www.elsevier.com/locate/aqua-online](http://www.elsevier.com/locate/aqua-online).
- Ortiz-Delgado J. B., Darias M. J., Cañavate J. P. 2003. Organogenesis of the digestive tract in the white seabream, *Diplodus sargus*: Histological and histochemical approaches. *Histology and Histopathology*. 18 (4): 1141-1154.
- Ostaszewska T. 2005. Developmental changes of digestive system structures in pike-perch (*Sander lucioperca* L.). *Electronic Journal of Ichthyology*. 2 (2): 65-78.
- Pearse A. G. E. 1985: *Histochemistry, Theoretical and Applied*, Vol. 2. Analytic Technology, Churchill Livingston, New York.
- Perales-García N. 2006. Ontogenia enzimática de la mojarra tenguayaca *Petenia splendida*. Tesis de maestría. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, División Académica de Ciencias Biológicas.
- Peña R., Dumas S., Villalejo-Fuerte M., Ortiz-Galindo J. L. 2003. Ontogenetic development of the digestive tract in reared spotted sand bass *Paralabrax maculatofasciatus* larvae. *Aquaculture* 219: 633-644.
- Robyt J. F., Whelan W. J. 1968. Starch and its Derivates. Radley, J. A. (Ed.). Chapman and Hall, London.
- Stauffer C. 1989. Enzyme Assays for Food Scientists. Van Nostand Reinhold/AVI. Nueva York.
- Segner H., Storch V., Reinecke M., Kloas W., Hanke W. 1994. The development of functional digestive and metabolic organs in turbot *Scophthalmus maximus*. *Mar. Biol.* 119: 471-486.
- Tanaka M., Kawai S, Seikai T, Burke J. S. 1995. Development of the digestive organ system in Japanese flounder in relation to metamorphosis and settlement. *Marine and Freshwater Behavior Physiology*. 28: 19-31.
- Treviño L., Alvarez-González C. A., Perales-García N., Arévalo-Galán L., Uscanga-Martínez A., Márquez-Couturier G., Fernández I., Gisbert E. 2010. A histological study of the organogenesis of the digestive system in bay snook *Petenia splendida* Günther (1862), from hatching to the juvenile stage. *Journal of Applied. Ichthyology*. 1-10.
- Weber K, Osborn M (1969) The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. *The Journal of Biological Chemistry* 244: 4406-4412.
- Zambonino-Infante J. L., Cahu C. L. 2007. Dietary modulation of some digestive enzymes and metabolic processes in developing marine fish, applications to diet formulation. *Aquaculture*. 268(1-4): 98-105.
- Zambonino-Infante J., Gisbert, E., Sarasquete C. 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, NH , pp. 277-344.
- Zhong-yi L., Zhang W., Jian Z. 2008. An acidic protease from the grass carp intestine (*Ctenopharyngodon idellus*). *Comparative Biochemistry and Physiology*. 149(B): 83-90.