



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS  
DEL NOROESTE, S.C.

---

Programa de Estudios de Posgrado

**EFFECTO DE LA ESPERMINA EN LA EXPRESIÓN DEL GEN  
DE LA AMILASA E INMUNOGLOBULINA M DURANTE EL  
DESARROLLO LARVARIO DE LA CABRILLA ARENERA**  
*Paralabrax maculatofasciatus*

**TESIS**

Que para obtener el grado de

**Maestro en Ciencias**

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales  
(Orientación en Biotecnología )

Presenta

**Alicia Mónica Olalde Rodríguez**

La Paz, B.C.S., agosto 2005

## ACTA DE LIBERACION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 12:00 horas del día 29 del Mes de agosto del 2005, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

**"Efecto de la espermina en la expresión del gen de la amilasa e inmunoglobulina M durante el desarrollo larvario de la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus*"**

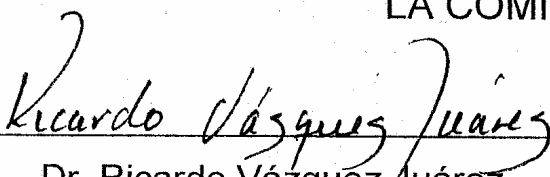
Presentada por el alumno:

Alicia Mónica Olalde Rodríguez

Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACION DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACION EN Biología

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

### LA COMISION REVISORA



Dr. Ricardo Vázquez Juárez  
DIRECTOR DE TESIS



Dr. Dariel Tovar Ramírez  
CO-TUTOR

Dr. Felipe Ascencio Valle  
CO-TUTOR

  
DRA. THELMA ROSA CASTELLANOS CERVANTES  
DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

## **COMITÉ TUTORIAL**

DIRECTOR: Dr. Ricardo Vázquez Juárez (CIBNOR)

CO-TUTOR: Dr. Dariel Tovar Ramírez (CIBNOR)

CO-TUTOR: Dr. Felipe Ascencio Valle (CIBNOR)

## **COMITÉ REVISOR DE TESIS**

Dr. ~~Dr.~~ Felipe Ascencio Valle

Dr. Dariel Tovar Ramírez

Dr. Ricardo Vázquez Juárez

## **JURADO DE EXAMEN**

Dr. Roberto Carlos Vázquez Juárez

Dr. Dariel Tovar Ramírez

Dr. Ricardo Vázquez Juárez

Suplente Dr. Isidro Angel Campa Córdoba

## Resumen

El sistema de cultivo larvario de peces marinos ha sido hasta la fecha un cuello de botella en la acuicultura. Las bajas tasas de supervivencia en dichos sistemas se asocian a la incapacidad de las larvas para adaptarse a la secuencia de alimentación durante las primeras semanas de la crianza (Kolkovsky et al., 1997). El cambio de alimentación endógena a exógena es concomitante a las transformaciones morfológicas y funcionales del tracto digestivo en larvas. Estudios previos indican que algunos componentes de las dietas inertes, así como alimento vivo, regulan la expresión de algunos genes de enzimas digestivas. Un bajo nivel de enzimas citosólicas, asociado a un aumento en las enzimas de la membrana del borde de cepillo, determinan enterocitos maduros en mamíferos y en peces. Aunado a la información sobre los patrones de expresión y actividad enzimática digestiva como indicadores de maduración digestiva (Tovar- Ramirez et al., 2002) éste es el primer informe que considera la Inmunoglobulina M como parámetro de maduración en larvas de peces marinos.

Se obtuvieron huevos de un desove natural de reproductores de cabrilla arenera mantenidos bajo condiciones controladas en el laboratorio de Biología Experimental en CICIMAR-IPN (Rosales-Velásquez, 1997). Las larvas fueron sembradas en un sistema de recirculación cerrada y alimentadas con la microalga *Nannochloropsis oculata* (300,000 cells.ml<sup>-1</sup>) hasta 12dde. Las larvas fueron alimentadas con el rotífero *Brachionus plicatilis* (1-10 rotíferos. ml<sup>-1</sup>) de 2-15dde, con nauplios de *Artemia* sp. después de 15dde, y juveniles de artemia (2-6 nauplios ml<sup>-1</sup>) como tratamiento control. Tres tipos de microcápsulas fueron elaboradas como tratamientos experimentales para el 15dde, conteniendo 0%, 0.1%, y 0.3% de espermina. Las larvas fueron coalimentadas con alimento vivo y las microcápsulas por 5 días. Se obtuvo la cuantificación relativa de la expresión del gene de la amilasa y de la inmunoglobulina M en larvas de cabrilla arenera mediante extracción y la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (RT-QPCR) usando Gene Expression assays de Assays-by-Design SM (Applied Biosystems), consistiendo en una mezcla de unlabeled PCR primers and TaqMan® MGB probes (FAM™ dye-labeled). Las sondas TaqMan® MGB (FAM™ dye-labeled) fueron diseñadas en base a las secuencias parciales de la amilasa y de la inmunoglobulina M de *P. maculatofasciatus*. El rRNA eucariótico 18S (Applied Biosystems) fue utilizado como control endógeno para normalizar los niveles del mRNA del gene blanco. Para la enzima amilasa, el primer sentido fue 5'GTCTGGTTCGGTCTGTTGGA-3' y el primer antisentido fue 5'CTTGTTTCATGAAGTCAGCAACCTT-3'. Para la inmunoglobulina M, el primer forward fue 5'TTCAAACACTGCAGACTGGAACAGA-3' y el primer reversa 5'CACAGTTCCTTGATGGACTCATGAT-3'. El QPCR fue conducido en un sistema 7000 Sequence Detection Systems (Applied Biosystems). obteniendo un aumento en los niveles de expresión de amilasa e IgM en larvas alimentadas con presas vivas del 5-15 dde, seguidos por un decremento significativo, probablemente como consecuencia de la diferenciación digestiva de la zona. Alvarez-González et al. (2001) detectaron actividad de amilasa en larvas de cabrilla arenera desde el 1dde, alcanzando la actividad más alta con la abertura de la boca. Actividad similar de amilasa se ha encontrado en *Dicentrarchus labrax*, *Coregonus lavaretus*, and *Plecoglossus altivelis altivelis* (Tanaka et al., 1972; Rösch and Segner, 1990; Breuil et al., 1997). De 10-15 dde, la expresión de amilasa y de IgM en larvas con dieta viva disminuyo, y el mismo patrón fue observado en larvas con dietas microcapsuladas, pero solamente entre 15-25dde. Se relacionó el aumento de expresión de IgM y de amilasa observados hasta el 25dde en larvas alimentadas con microcapsulados. Reportes previos indican que la abundancia de Amilasa e IgM depende de la absorción completa del vitelo. Estos reportes no indican un decremento de ambos genes en el día 15 dde como nosotros lo observamos. Finalmente, creemos que la cuantificación relativa de la IgM debe reconocerse como una contribución muy importante, puesto que existen escasos trabajos relacionados con los niveles basales de detección y aún menos con la expresión génica en larvas de peces marinos.

Palabras clave: **Larvas de Paralabrax maculatofasciatus; Microcapsulas; Poliaminas; PCR en tiempo real; Cuantificación genica relativa; amilasa; igm**

## Abstract

Large-scale egg production of marine fish has been a bottleneck in aquaculture systems. Low survival rates in rearing systems are associated with the incapacity of the larvae to adapt to the feeding sequence during the first weeks of culture (Kolkovsky et al., 1997). The change from endogenous to exogenous digestion is concomitant with the morphological and functional transformations of the digestive tract in larvae. Previous reports indicate that some components of the artificial diets, as well as live prey, regulate some digestive enzyme genes. Low levels of some cytosolic enzymes, associated with an increase in enzymes of the brush border membranes, dictates enterocyte maturation in mammals and fish. Contrary to the increasing information on digestive enzymes as maturation digestive indicators, this is the first report which considers the immunoglobulin M as a maturation parameter in marine fish larvae

Eggs were obtained from natural spawns of spotted sand bass broodstock maintained under controlled conditions in the Laboratory of Experimental Biology at CICIMAR-IPN (Rosales-Velázquez, 1997). The larvae were reared in a closed recirculating system. Microalgae *Nannochloropsis oculata* (300 000 cells.ml<sup>-1</sup>) was added until 12 dah. Larvae were fed rotifers *Brachionus plicatillis* (1-10 rotifers. ml<sup>-1</sup>) from 2-15dah, with *Artemia* sp. nauplii after 15dah, and juveniles (2-6 nauplii ml<sup>-1</sup>) as a control treatment. Three types of microcapsules were supplied as experimental treatments on 15dah, with 0%, 0.1%, and 0.3% espermine. Larvae were fed live prey and microcapsules for 5 days. We obtained relative quantification of amylase and immunoglobulin M gene expression in larvae of spotted sand bass by RNA extraction and quantitative polymerase chain reaction (RT-QPCR) using Gene Expression assays from the Assays-by-Design SM (Applied Biosystems), consisting of a mix of unlabeled PCR primers and TaqMan® MGB probes (FAM™ dye-labeled). The TaqMan® probes were designed based on the amylase and immunoglobulin M partial sequences of *P. maculatofasciatus*. The eukaryotic 18S rRNA (Applied Biosystems) was used as the endogenous control for normalizing mRNA levels of the target gene. For the enzyme amylase, the forward primer was 5'GTCTGGTCGGTCTGTTGGA-3' and the reverse primer was 5'CTTGTTTCATGAAGTCAGCAACCTT-3'. For immunoglobulin M, the forward primer was 5'TTCAAACACTGCAGACTGGAACAGT-3' and the reverse primer was 5'CACAGTTCCTTGATGGACTCATGAT-3'. Thermal cycling and fluorescence detection were conducted with the 7000 Sequence Detection Systems (Applied Biosystems).

QPCR was monitored by the ABI Prism 7000 SDS software and we obtained the Amylase and IgM expression levels of spotted sand bass larvae fed with live prey, which show a increase from 5-15dah, followed by a significant decrement, probably by a consequence of digestive tract differentiation. Alvarez-González et al. (2001) reported amylase activity in the spotted sand bass larvae at 1dah, reaching highest activity at mouth opening. Similar amylase activity has been reported in *Dicentrarchus labrax*, *Coregonus lavaretus*, and *Plecoglossus altivelis altivelis* (Tanaka et al., 1972; Rösch and Segner, 1990; Breuil et al., 1997). From 10-15dah, the amylase and IgM expression in larvae fed live prey decreased, and the same pattern was observed in larvae fed microcapsulated diet, but only from 15-25dah. Levels of IgM and amylase expression correlates with growth observed until 25dah in microcapsulated feed provided to larvae. While previous reports indicate that amylase and IgM abundance depends on complete yolk absorption, those reports did not show amylase and IgM falling after 5dah, as we did. Finally, we think that the relative quantification of the IgM must be recognized as an important contribution, since, reports related to basal levels of gene expression in marine fish larvae are rather scarce yet.

## Key words:

Paralabrax maculatofasciatus larvae; microcapsules; polyamines; real time PCR; gene relative quantitation; amylase, IgM

## **Dedicatoria**

**A mi madre Alicia Rodríguez León**

**A mi familia**

**A los seres que cuidan de mi siempre, mis ángeles**

## **Agradecimientos**

**Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, CIBNOR, por permitirme realizar un sueño en sus instalaciones. Por todo el apoyo brindado.**

**Al Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas, CICIMAR, por permitirme realizar el cultivo larvario en sus instalaciones.**

### **Al CONACyT**

**Al Dr. Ricardo Vázquez Juárez, por ser mi guía en el camino hacia la meta tan esperada, por los excelentes comentarios que realizo a lo largo de las duras jornadas de trabajo.**

**Al Dr. Dariel Tovar Ramírez, por trabajar a mi lado hombro con hombro, por la paciencia, por los conocimientos, por ser un amigo más que un asesor. Sin su ayuda este trabajo no hubiera podido realizarse. De verdad, gracias!**

**Al Dr. Felipe Ascencio Valle, por el apoyo brindado a través del tiempo, por los excelentes comentarios en el escrito de tesis. Por tener siempre una palabra de esperanza para mí.**

**Al M en C José Luis Ortiz Galindo por su asesoría, su amistad y su espacio, los cuales me brindo siempre,... incondicionalmente.**

**Al M en C Jesús Neftalí Gutiérrez Rivera, por las largas tardes frente al termociclador, por enseñarme que debo ser “irreprendible”, lo sigo intentando. Por la excelente asesoría técnica en la parte molecular.**

**Al Biol. Mar. Rubén Estebán García Gómez, por el apoyo brindado en la parte del acuacultivo, y sobre todo por la parte estadística. Por los comentarios que lograron hacer menos denso el camino hacia el aprendizaje.**

**A mi madre, por estar siempre conmigo, en las buenas y en las malas, porque gracias a ti, soy lo que soy. Lo logramos, porque nunca te rendiste, ni me permitiste hacerlo. Por tus palabras, por escuchar siempre cosas buenas, por la enseñanza, por la fortaleza que has tenido. Por estar, y por ser. Gracias. Porque me enseñaste que podía hacer lo que quisiera, si me lo proponía.**

**A mi padre, por que silenciosamente me apoyaste, por estar ahí, por enseñarme que la vida que cada uno de nosotros elige, se debe vivir con la frente en alto.**

**A mis hermanos, por estar ahí siempre soportando la ausencia tan prolongada. Por que se que siempre seguirán conmigo.**

**A Inés, Nazario, Socorro a toda mi familia, primos, primas, tíos y tías. A esas convivencias en la casa de los abuelos. Consistió la fuerza que me impulso a seguir adelante.**

**A Ferh, mi amigo más querido, el mejor. Sigues apoyándome a pesar de circunstancias tan diversas. Nunca me dejas caer, gracias por hacerlo. Por estar ahí en las horas oscuras, por estar ahí en los días llenos de luz. Por ser tan regañón, cuando más lo necesitaba y tener una frase delicada cuando me quebraba. Aquí la tienes, es un logro tuyo también.**

**A mis amigos del alma, mis tesoros, mis ángeles: Jesús , Cristina, Burrito, Julito con C, Alec (sonríe!) A todos los Cristians, Fercho, Pablo, por supuesto Viole, Mirians, Pao, Normix, Checita, Luke, Sal, Jushiro, Gabriel, Ramón, Negrito, Mara, Alberts, a los que olvido por presión cerebral, no por falta de amor o agradecimiento. A Netza, Kiki. A los amigos que están lejanos, y a los que se quedaron atrás, muy a pesar mío. A los no amigos también...Porque no? Gracias por todo el amor que he recibido de todos ustedes. Gracias por dejarme entrar en sus almas, aunque sea a ratos y en cachitos. A los muchos buenos momentos que pasamos juntos en La Paz, por siempre. Gracias. Soy afortunada, me rodean amigos sinceros. Pero sobre todo por aguantar mi ausencia, y ahora mi posible olvido ante lo inminente, la meta, mi examen.**

**A JRGB, por estar ahí las últimas semanas, por ser mi ángel guardián, por la poesía, por las promesas y los planes. Porque siempre merecemos una segunda oportunidad. Por tu corazón, que a veces es mío. Por intentarlo. Por constituir una cúspide en mi esperanza.**



## Contenido

	Página
<b>Introducción</b>	
Situación actual de la acuicultura	1
<i>Paralabrax maculatofasciatus</i>	2
Desarrollo larvario de peces	3
Larvicultivos	4
Las poliaminas	8
Microencapsulados	13
<b>Antecedentes</b>	16
Amilasa	21
Inmunoglobulina M	22
PCR en tiempo real	23
<b>Justificación</b>	26
<b>Objetivo general</b>	29
Objetivos específicos	29
<b>Materiales y métodos</b>	30
Cultivo Larvario	30
Incubación de Eleuteroembriones	31
Determinación del porcentaje de eclosión del desove	32
Siembra de Eleuteroembriones	32
Alimentación de larvas	32
Dietas microencapsuladas	34
Limpieza del sistema	36
Evaluación del crecimiento	37
Evaluación de supervivencia	38
Obtención de muestras	38
Elaboración de sondas de cDNA para la detección específica y cuantificación de Amilasa e Inmunoglobulina M.	39
Extracción de ARN de larvas de <i>Cabrilla arenera</i>	42
Cuantificación de los ARNm	43
<b>Resultados</b>	47
Cultivo Larvario	47
Conteo inicial de eleuteroembriones	47
Determinación del porcentaje de eclosión del desove	47
Principales parámetros físico-químicos	47
Porcentaje de supervivencia	48
Longitud de larvas de <i>Paralabrax maculatofasciatus</i>	48
Peso de larvas <i>Paralabrax maculatofasciatus</i>	50
Diseño de oligonucleótidos	52
<b>Discusión</b>	60
<b>Conclusiones</b>	72
<b>Literatura citada</b>	74
<b>Apéndices</b>	

## Índice de Tablas

Tabla		
I	Secuencia de alimentación utilizada durante el experimento	33
II	Relación de la secuencia de alimentación suministrada a larvas de Cabrilla arenera en la fase de coalimentación.	34
III	Formulación utilizada para la fabricación de las microcápsulas	36
IV	Concentraciones y cantidades utilizadas para la amplificación específica del gen IgM y Amilasa	41
V	Temperaturas y tiempos utilizados en el PCR de punto final, para la amplificación específica de amilasa e inmunoglobulina M.	41
VI	Porcentaje de eclosión del desove de cabrilla arenera <i>Paralabrax maculatofasciatus</i>	47
VII	Relación de los parámetros físico-químicos del sistema de cultivo larvario durante todo el experimento.	48
VIII	Relación de la longitud de larvas de <i>Paralabrax maculatofasciatus</i> por tratamiento, por días después de eclosión.	49
IX	Relación del peso promedio húmedo total de larvas de <i>Paralabrax maculatofasciatus</i> , por tratamiento y día, $\pm$ (desviación estándar)	51
X	Relación de los oligonucleótidos utilizados en este estudio	52
XI	Secuencias de los oligonucleótidos utilizados para Syber Green	53
XII	Relación de $\Delta$ Ct para la validación de los ensayos. Validación de amilasa, en los diferentes tratamientos.	53
XIII	Cuantificación relativa para la amilasa mediante el método $2^{-\Delta\Delta$ Ct	55
XIV	Cuantificación relativa para la inmunoglobulina M el método $2^{-\Delta\Delta$ Ct.	58

## Índice de Figuras

Figura		Pág.
1	Unidad Piloto de Maricultivos, CICIMAR-IPN	30
2	Condiciones de temperatura y tiempos para la amplificación específica de amilasa e inmunoglobulina M en PCR en tiempo real	44
3	Comportamiento del crecimiento en longitud de larvas de <i>Paralabrax maculatofasciatus</i>	49
4	Comportamiento del crecimiento en peso larvas de <i>Paralabrax maculatofasciatus</i>	51
5	Curva de validación para el rango dinámico de amilasa	54
6	Curva de validación para el rango dinámico de inmunoglobulina M	55
7	Eficiencia de amplificación para el gen 18s Cycle threshold o Umbral de detección (Ct) versus Logaritmo de la Concentración Inicial de cinco diferentes diluciones seriadas decimalmente	56
8	Eficiencia de amplificación para el gen Amilasa. Cycle threshold o Umbral de detección (Ct) versus Logaritmo de la Concentración Inicial de cinco diferentes diluciones seriadas decimalmente	57
9	Eficiencia de amplificación para el gen IgM. Cycle threshold o Umbral de detección (Ct) versus Logaritmo de la Concentración Inicial de cinco diferentes diluciones seriadas decimalmente	57
10	Comportamiento de la expresión génica de amilasa en larvas de cabrilla arenera <i>P. maculatofasciatus</i> . Días después de la eclosión versus $2\Delta\Delta Ct$	58
11	Comportamiento de la expresión génica de inmunoglobulina M en larvas de cabrilla arenera <i>P. maculatofasciatus</i> . Días después de la eclosión versus $2\Delta\Delta Ct$	59
12	Ontogenia de la actividad amilasa de la cabrilla arenera. A) expresada en U/mg de proteína soluble. B) expresada en mU/larva. C) Zimograma de la actividad amilasa en condiciones nativas.	67
13	Niveles de IgM en huevos, embriones y alevines de <i>Oncorhynchus mykiss</i> .	69

## **Introducción**

### Situación actual de la acuicultura

Según reportes de la FAO (2004), la producción mundial de la acuicultura continúa creciendo, tanto en volumen como en proporción del suministro mundial de pescado para consumo humano directo. La producción mundial de la pesca de captura y la acuicultura suministraron alrededor de 101 millones de toneladas de pescado para el consumo humano en 2002, cuyo crecimiento desde 2000 se debió a la acuicultura. La producción acuícola de pescado para la alimentación humana continúa siendo principalmente (57.7%) de agua dulce. Los países en desarrollo representaron el 90.7% de la producción de 2002, consistente sobre todo en peces omnívoros/ herbívoros o especies que se alimentan por filtración.

La producción de los principales grupos de especies siguió aumentando rápidamente, a pesar de que, en 2000-02, se hayan registrado síntomas de una reducción de ese crecimiento. La adopción de prácticas de cultivo y estrategias de desarrollo sostenibles es algo que se encuentra todavía en marcha y constituye un objetivo fundamental; algunos países (principalmente desarrollados) han conseguido avances importantes al respecto, pero en muchos otros queda aún mucho por hacer.

El cultivo de peces marinos se ha venido desarrollando de manera experimental desde hace más de cincuenta años, aunque comercialmente, no es sino hasta hace unas tres décadas que en países como Japón, Francia, España, Noruega y Canadá, entre otros, se han logrado los mayores avances (Tucker, 1998). Desafortunadamente, las producciones alcanzadas no se comparan con las obtenidas a través de la pesca (Castelló -Orvay, 1993). Sin

embargo, se observa un incremento en las producciones por acuicultura, pero no a la velocidad que el crecimiento mundial requiere (Coll-Morales, 1986).

México aparece entre los primeros diez lugares de los productores en la acuicultura con mayor crecimiento, teniendo en el 2002, 73.7 toneladas, representando un incremento de la tasa anual media del 16.9%. A pesar de estos avances, la acuicultura no ha recibido, en muchos de los países, el nivel de reconocimiento e importancia como una actividad económica nacional.

#### *Paralabrax maculatofasciatus*

La cabrilla arenera es una especie de pez marino, que por su facilidad de manipulación, merece nuestra atención, sobre todo en etapas larvarias tempranas. Algunas características son determinantes para delimitar las etapas de desarrollo de algunos peces. Antes que la edad, la longitud es un patrón mas preciso para definir el estado de madurez de un pez, por la marcada influencia del medio ambiente en el desarrollo de éste, como sucede con la temperatura, la cual es crucial para determinar la velocidad a la cual se presentan los cambios morfológicos propios de cada especie, manteniendo una relación temperatura/velocidad directamente proporcional (Osse y Van den Boogaart, 1995).

La cabrilla arenera está bajo presión de pesca, incrementándose la densidad o el número de esa población en las bajas aguas del sur de California. En California meridional, la cabrilla arenera se restringe en gran parte a las áreas bajas, de agua caliente, tales como bahías, a los estuarios, y a los puertos, que parecen servir como refugios de agua caliente para dicha especie básicamente subtropical (Allen et al., 1995). Históricamente, la cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*) está distribuida desde el norte de Bahía

San Francisco, EE.UU. hasta el sur de Mazatlán, México. En el Norte del Golfo de California (Mar de Cortés) ocurren densas poblaciones (Miller y Lea, 1972). Se cree que la población de cabrilla arenera que habita en el Norte del Golfo de California es hermafrodita protogínica (Allen *et al.*, 1995).

#### Desarrollo larvario de peces

Dentro del desarrollo del pez, al momento de la eclosión finaliza la etapa de huevo y se inicia la de larva, en la que depende nutricionalmente de las reservas presentes en el saco vitelino; además de verse expuesta a nuevas fuerzas como abrasión, corrientes y ondas hídricas e, incluso, a cambios de comportamiento, como su nueva capacidad de evitar activamente a los predadores. La finalización de la alimentación de vitelo y el inicio de la alimentación exógena es crucial, por lo que allí se puede considerar que finaliza la etapa de larva e inicia la de juvenil. No obstante, definir ese cambio de etapa presenta ciertas dificultades en algunos peces, ya que poseen un corto periodo con alimentación combinada mientras agotan los remanentes de vitelo e inician el consumo de plancton, como es el caso de la carpa. Por otro lado, cambian la pigmentación característica de la anterior etapa por la pigmentación que mantendrán hasta la etapa de adulto, además de presentar cambios en la forma, talla, respiración, locomoción e incluso nuevamente de conducta. La etapa juvenil finaliza con el completo desarrollo de los rayos divergentes de las aletas y la total, o casi total osificación del esqueleto, entre otros cambios significativos. La terminología de los primeros estadios puede ser aplicada en general a varios grupos taxonómicos y por ende a una gran variedad de especies que están inmersas dentro de estos grupos taxonómicos (Osse y Van den Boogaart, 1995).

El periodo larvario está dividido en tres fases: la fase de preflexión que inicia a partir de la completa absorción de las reservas endógenas y termina con el inicio de la flexión de la notocorda, donde comienza la segunda fase la cual finaliza antes de la completa formación de la placa hipúrica y termina con la completa formación de los elementos de las aletas pares e impares. En esta última fase, la larva está casi completamente formada, aunque todavía no se presentan todas las características morfológicas finales de un juvenil; sin embargo, su capacidad de búsqueda y captura es total y puede alimentarse de presas de mayor talla (Kendall et al., 1984, modificado por Ortiz-Galindo, 1991).

#### Larvicultivos

El cultivo de organismos marinos, específicamente peces, representa una alternativa económica con un gran potencial de desarrollo para México (Civera *et al.* 2002), a pesar de que uno de los principales limitantes para el crecimiento de la piscicultura es el desarrollo de tecnología para la producción de semilla. La baja supervivencia larvaria obtenida en la mayoría de los sistemas, es el resultado de la incapacidad de las larvas para adaptarse a los cambios de la secuencia de alimentación durante las primeras semanas del cultivo, aunado a las técnicas de producción de semilla han sido desarrolladas sobre bases empíricas y no en conocimientos biológicos del sistema. Hasta ahora, se ha hecho un gran número de aproximaciones empíricas evaluando diversos programas de alimentación así como componentes de la dieta compuesta, orientadas a optimizar el proceso. Sin embargo, la información que existe sobre los procesos de adaptación de las larvas a nivel molecular, es aún escasa; por lo anterior, resulta evidente la necesidad de generar conocimientos que subsanen esa deficiencia con el fin de plantear estrategias para diseñar

programas de alimentación óptimos sobre bases más científicas y no empíricas.

Actualmente, en los sistemas de producción de larvas de peces los esquemas de alimentación se basan principalmente en suministro de rotíferos (*Brachiorus plicatilis*) y *Artemia salina* durante los primeros 20-25 días dependiendo de la especie, continuando con una combinación de alimento vivo y una dieta compuesta hasta completar el destete (Kolkovsky *et al.*, 1997). La alimentación exógena principia pocos días antes de la absorción completa del vitelo mientras que el alimento comienza a ser digerido en un sistema poco desarrollado. La principal problemática asociada a este período larvario se relaciona principalmente con aspectos de nutrición y sanidad.

*Nutrición.* Las mortalidades asociadas con los estadios larvales tempranos de peces marinos en buena medida se deben a la incapacidad del sistema digestivo para asimilar los nutrientes de una manera eficiente. El tracto digestivo en larvas de peces marinos es bastante inmaduro al momento de la eclosión y sufre importantes cambios durante las primeras semanas de desarrollo. En particular, el cambio de una alimentación endógena a una exógena es concomitante con las transformaciones morfológicas y funcionales del tracto digestivo.

Hasta ahora, la mayoría de las estrategias que se han hecho para establecer si existe una posible regulación de la actividad enzimática digestiva por factores externos, son la medición de actividades enzimáticas por métodos colorimétricos convencionales con lo se ha que tales estudios se restringido a posibles mecanismos de regulación postraduccionales. No obstante, los genes que codifican para dichas enzimas, posiblemente están sujetos a diferentes



niveles o factores de regulación y/o son parte de una secuencia genéticamente programada. Un inadecuado manejo al destete, sin embargo, podría alterar este tipo de programa previniendo un desarrollo normal de las larvas.

El desarrollo de algunas enzimas digestivas en la Lubina Europea (*Dicentrarchus labrax*), pez de alto potencial económico en Europa (FAO Fisheries Circular, 1986-1995; Josupeit, 1995) así como la influencia de la dieta sobre la expresión de estas enzimas han sido estudiados por Tovar a,b (2000). Dentro de los componentes de la dieta que se han estudiado por su efecto sobre la expresión de enzimas digestivas están la forma molecular del nitrógeno incorporado a la dieta (Cahu and Zambonino, 1994), las dietas compuestas vs alimento vivo, así como la inclusión al alimento de algunas poliaminas. De acuerdo a lo especulado, el perfil de actividades enzimáticas y su patrón durante el desarrollo larvario, es un reflejo del tipo y composición de la dieta.

*Sanidad.* El componente microbiano es un factor que indudablemente debe ser considerado como un criterio de calidad en el desarrollo de larvas de peces. Algunos efectos nocivos de microflora asociada han sido observados en las tasas de supervivencia de las larvas (Nicolás *et al.*, 1989) por lo que existe una urgente necesidad de un control de la microbiota en los laboratorios de crianza larvaria. El establecimiento óptimo de una microflora normal, eventualmente viviendo en una asociación benéfica a la aportación ya sea de algunos componentes nutricionales y/o excluyendo competitivamente algunos patógenos, es lo que definimos como un balance microbiano adecuado y el objetivo último del uso de microorganismos probióticos. Una microbiota adherente no patógena y relativamente densa presente en los huevos de peces

podría potencialmente ser la barrera que protege contra la formación de colonias por patógenos sobre la superficie del huevo. Posteriormente, después del desove ocurre el establecimiento de una microbiota normal del tracto digestivo que bajo condiciones normales también sirve de barrera contra el establecimiento de patógenos.

Si bien el estado actual del conocimiento ha permitido desarrollar algunos criterios para definir la maduración del tracto digestivo de larvas de peces, nosotros proponemos que los niveles de expresión de algunos genes podrían estar directamente asociados al proceso de maduración del tracto digestivo. Lo que tendría una aplicación práctica en el desarrollo de microarreglos que de manera eficiente pudieran diagnosticar la calidad larvaria.

Existen antecedentes que indican que algunos componentes de las dietas compuestas, así como componentes bióticos (microflora) pueden regular algunos genes de enzimas digestivas. Este conocimiento se suma a la información que existe sobre la importancia de las funciones digestivas para la supervivencia de larvas de peces. No obstante, existen muy pocos estudios a nivel molecular que permitan explicar mecanismos de regulación a nivel de la transcripción de genes involucrados en procesos digestivos, mecanismos de reparación de daño, de defensa, etcétera.

### Las poliaminas

Las poliaminas son un grupo de pequeñas moléculas alifáticas (no cíclicas) cuya característica es poseer dos o más grupos amino en su estructura, policatiónicas (Tabor y Tabor, 1984).. Aunque existen en la naturaleza varias con estas características, tres de ellas han sido las más estudiadas, ya que se da una estrecha relación en su biosíntesis e

interconversión en el organismo, además de que se han implicado en numerosos procesos celulares. Estas moléculas son la putrescina  $[\text{NH}_2(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2]$ , la espermidina  $[\text{NH}_2(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2]$  y la espermina  $[\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2]$ .

Son moléculas que participan en numerosos procesos biológicos (Tabor y Tabor, 1984), incluyendo crecimiento, multiplicación y diferenciación celular, y la biosíntesis de ácidos nucleicos y proteínas (Bardócz *et al.*, 1995). Participan en la modulación de la expresión génica y actividades enzimáticas, y la activación de la síntesis de ADN, entre otros (Tabor y Tabor, 1984; Pegg, 1988; Heby, 1981; Tkachenko *et al.*, 2001; Marton y Pegg, 1995; Cohen, 1998; Casero y Woster, 2001; Thomas y Thomas, 2001). Entre otras funciones, han sido están relacionadas con la protección del ADN contra agentes externos (Ha *et al.*, 1998; Ha *et al.*, 1998b;) y de igual manera al daño por radiación (Oh y Kim, 1998; Douki y Bretonniere, 2000). En general, la espermidina y la espermina están presentes en concentraciones milimolares *in vivo*, mientras que los niveles de la putrescina son considerablemente más bajos (Morgan, 1990; Watanabe *et al.*, 1991; Igarashi y Kashiwagi, 2000). Sin embargo la más importante característica de las poliaminas en las células es la unión con ácidos nucleicos y en particular con ADN, como ya hemos mencionado con anterioridad (Tabor y Tabor, 1984; Pegg, 1988; Heby, 1981; Tkachenko *et al.*, 2001; Marton y Pegg, 1995;) Cohen, 1998).

El descubrimiento de la función de estas moléculas, ha despertado gran interés por su estudio en diversas áreas de investigación. Estas moléculas a semejanza de los ácidos nucleicos, los aminoácidos y las proteínas, se encuentran distribuidas en los sistemas vivientes, lo que quizá constituye un

indicativo de que su presencia es esencial para la realización de los procesos básicos de algunas funciones celulares. Gracias a su carga neta positiva a pH fisiológico, los grupos amino que poseen, pueden unirse a macromoléculas cargadas negativamente como el ADN, ARN, proteínas y fosfolípidos, para proporcionarles estabilidad en su estructura, alterando la expresión génica y la actividad de ciertas enzimas, así como variando la fluidez y permeabilidad de las membranas biológicas. Están presentes tanto en organismos eucariontes como en procariontes (Gallardo *et al.*, 1996).

El nombre de la espermina lo debemos a A. Landenburg y J. Abel, quienes en 1888 las encontraron en cantidades particularmente altas en el semen humano. Las poliaminas están ampliamente distribuidas en los sistemas biológicos, aunque las concentraciones relativas de putrescina, espermidina y espermina varían notablemente en tipos celulares diferentes.

La participación fisiológica de las poliaminas ha sido conocida mediante la realización de estudios en células incapaces de biosintetizar poliaminas, empleando inhibidores de la síntesis de estos compuestos y usando animales de laboratorio. Así se ha comprobado que las poliaminas son compuestos indispensables para el crecimiento y el buen funcionamiento celular. Son componentes importantes de todas las células en mamíferos y esencialmente están implicadas en una variedad de pasos durante la regulación normal, adaptativa, y maligna de proliferación celular (Tabor y Tabor, 1984; Pegg y McCann, 1982; Pegg, 1988).

La homeostasis intracelular de las poliaminas está regulada por la síntesis de novo y la interconversión de poliaminas intracelulares de diversas fuentes (Pegg, 1988; Séller, 1990; Seiler *et al.*, 1996; Seidel *et al.*, 1997). El

tracto gastrointestinal es la fuente principal de poliaminas extracelulares y lumbinales. Estas poliaminas se derivan de la dieta o de la flora bacteriana (Seidel y Scemama 1997; Hessels et al., 1989; Sarhan et al., 1989; Seiler *et al.*, 1990; Quemener *et al.*, 1994)

La administración vía oral de espermina o espermidina induce la maduración morfológica y funcional prematura del intestino delgado, ya que en la mucosa del tracto gastrointestinal, especialmente en el intestino delgado, se renuevan rápidamente y tienen un incremento en la demanda de estas moléculas (Katsuhiko *et al.*, 2003). La actividad clave en la biosíntesis de las poliaminas es la enzima ornitina decarboxilasa (ODC), cuya presencia es alta en la mucosa del intestino delgado y juega un papel importante en el metabolismo de las poliaminas (Katsuhiko *et al.*, 2003).

Debido a su alta tasa de proliferación, y recambio celular la mucosa intestinal y el colon tienen una demanda especial para las poliaminas (Luk, 1992; Dowling, 1992). Se encontró que la toma de poliaminas extracelulares vía luminal o por distintos acarreadores de poliaminas de la membrana basolateral (Kobayashi *et al.*, 1992; Milovic *et al.*, 1995) o por difusión pasiva (Bardócz *et al.*, 1990; Bardócz *et al.*, 1995), son mecanismos reguladores importantes del metabolismo de estas moléculas durante la adaptación del intestino delgado y el colon. Creemos por tanto que la administración oral de espermina o espermidina es capaz de inducir la maduración y el desarrollo morfológico y funcional precoz del intestino delgado (Dufour *et al.*, 1988; Buts *et al.*, 1993; Kaouass *et al.*, 1996).

El papel de las poliaminas en la dieta de mamíferos ha sido estudiado extensamente, para inducir el desarrollo del tracto digestivo (Buts *et al.* 1993;

Buts *et al.* 1994; Dufour, *et al.* 1988). Se ha demostrado que las poliaminas juegan un papel importante en el desarrollo del tracto gastrointestinal de mamíferos, incluyendo páncreas, hígado e intestino (Bardocz, 1995; Buts *et al.* 1993). Por otro lado, la literatura concerniente a sus efectos en peces es escasa, pero se ha demostrado que el suministro de 0.33% de espermina en las etapas larvianas de *Dicentrarchus labrax*, incrementa la supervivencia hasta un 33 % con respecto a la dieta control, libre de poliaminas (Péres *et al.* 1997)

Desde hace años, se ha creído que las larvas de peces no poseen las enzimas necesarias para digerir las dietas compuestas y que la digestión del alimento vivo se realiza por autólisis de estos microorganismos en el tracto digestivo (Zambonino-Infante y Cahu, 1999); por otro lado, también algunos autores han sugerido que las larvas de peces no pueden asimilar las dietas compuestas debido a la insuficiente actividad enzimática (Lauff y Hofer, 1984) y que puede ser compensada por la actividad enzimática del alimento vivo (Dabrowski y Glogowski, 1977). Recientes resultados demuestran que la actividad enzimática de larvas alimentadas con dietas compuestas y con alimento vivo es similar (Zambonino-Infante y Cahu, 1994a). De igual forma, el hecho de sustituir completamente el alimento vivo por dietas compuestas se obtiene la misma supervivencia y crecimiento (Péres *et al.* 1997). En la búsqueda de encontrar sustitutos del alimento vivo para la industria del cultivo de larvas de peces, se ha despertado un enorme interés por el uso de los probióticos como suplementos de los alimentos vivos y elaborados para la acuicultura, y de mejorar los rendimientos en el cultivo de larvas bajo un esquema de cultivo amigable con el ambiente (Gatesoupe, 1999). Especial atención se ha puesto en aquellos microbios que contrarrestan la invasión de

patógenos y aumentan la salud del hospedero al incrementar su resistencia contra éstos, y en aquellos también que aporten moléculas de importancia fisiológica para el hospedero (Tovar *et al.*, 2000a). Desde un amplio sentido, el término de probiótico se aplica a aquellos microbios que son administrados de tal manera que entran al sistema gastrointestinal del hospedero, y que se mantienen vivos con la finalidad de aportar salud (Gatesoupe, 1999). Sin embargo, consideramos importante hacer alusión a las moléculas que son aportadas por el microorganismo y que desempeñan una función benéfica para el hospedero, participando en su desarrollo o cubriendo alguna necesidad fisiológica.

#### Microencapsulados

La microencapsulación puede ser considerada como una forma especial de empaquetar, en la que un material en particular puede ser cubierto de manera individual para protegerlo del ambiente y de influencias deletéreas. En un sentido amplio, la microencapsulación provee un medio de envasar, separar y almacenar materiales en escala microscópica para su liberación posterior bajo condiciones controladas. Dentro del término de microencapsulación, se incluyen las microcápsulas, las micropartículas, nanocápsulas y sustancias activas atrapadas o embebidas, aunque existe una terminología específica dependiendo de la industria de aplicación, por ejemplo la farmacéutica hace una distinción entre microcápsulas y microesferas dependiendo de cómo se encuentre distribuido el material encapsulado dentro de la partícula (Re, 1998). Hoy en día se aplica para preservar y/o proteger numerosos ingredientes comerciales (Pszczola, 1998; Brazel, 1999; Gibbs *et al.*, 1999). El material que es cubierto se refiere como fase interna y el material que recubre es llamado

pared y generalmente no reacciona con el material a encapsular (Balassa & Brody, 1968). Los procesos de encapsulación fueron desarrollados entre los años 1930 y 1940 por la National Cash Register para la aplicación comercial de un tinte a partir de gelatina como agente encapsulante mediante un proceso de coacervación (Fanger, 1974) La microencapsulación se ha utilizado desde hace algunos años en la elaboración de dietas para especies acuícolas, en la búsqueda de obtener alimentos que provean una calidad nutritiva adecuada y controlable con el propósito último de sustituir el alimento vivo y de favorecer el desarrollo de las fases larvarias.

Las microcápsulas presentan una variedad amplia de estructuras, algunas son de geometría esférica con una fase interna continua rodeada por una pared también continua (estructura de partícula simple), mientras que otras pueden tener una geometría irregular y pueden tener la fase interna distribuida en una matriz de material de pared (estructuras agregadas) (Shahidi & Han, 1993; Thies, 1996), y aunque hay diversas opiniones del intervalo de tamaño al que pertenecen, puede decirse que van desde 0.2 a 5000  $\mu\text{m}$  (Luzzi, 1970; Bakan, 1973; King, 1995; Re, 1998). Para elaborar las microcápsulas hay numerosas técnicas, y se ha sugerido que podrían identificarse más de 200 métodos en la literatura de patentes (Magdassi & Vinetsky, 1996; Brazel, 1999). No obstante algunos autores clasifican a los métodos de encapsulación en: físicos o mecánicos y químicos. Como métodos químicos pueden citarse: coacervación compleja, polimerización interfacial, gelificación iónica, incompatibilidad polimérica y atrapamiento en liposomas (Thies, 1996; Gibbs *et al.*, 1999). Entre los métodos físicos se encuentran: el secado por aspersion y la encapsulación por lecho fluidificado como los más comunes (Shahidi & Han,



1993; Magdassi & Vinetsky, 1996; Thies, 1996; Gibbs, Kermasha, Alli & Mulligan, 1999). La selección del método estará en función del presupuesto, los costos, las propiedades del material a encapsular, el tamaño deseado de las microcápsulas, la aplicación y de los mecanismos de liberación (Re, 1998; Brazel, 1999; Popplewell, 2001).

### Polimerización interfacial

Es un proceso donde se hace polimerizar a un monómero en la interfase de dos sustancias inmiscibles, formando una membrana que dará lugar a la pared de la microcápsula. Se distinguen tres pasos en su preparación: 1) Dispersión de una solución acuosa de un reactante soluble en agua en una fase orgánica (aceite) para producir una emulsión agua en aceite (W/O); 2) Formación de una membrana polimérica en la superficie de las gotas de agua iniciada por la adición de un reactante soluble en aceite a la emulsión W/O; 3) Separación de las microcápsulas de la fase orgánica y su transferencia en agua para dar una suspensión acuosa (Kondo, 1990). La separación de las microcápsulas puede hacerse por centrifugación.

Este proceso ha sido utilizado para encapsular proteínas, enzimas, anticuerpos y células (Watheley, 1996). Para efectos de esta investigación se eligió este método ya que ha sido el más utilizado para encapsular dietas para larvas de especies acuícolas utilizando proteínas como encapsulantes (Jones, Kanazawa & Rahman, 1979; Kanazawa *et al.*, 1982; Jones, Kurmaly & Arshard, 1987; Jones, Holland & Jaborie, 1984).

## **Antecedentes**

México ocupa el séptimo lugar entre los diez productores con mayor crecimiento en acuicultura teniendo 53.9 mil toneladas en 2000 y 73.7 miles de toneladas para 2003. Gracias al auge que ha tenido este rubro en los últimos años, se deben implementar técnicas con mayor eficacia para la producción de semilla y por tanto la obtención de peces con talla comercial, para de esta manera obtener una alternativa viable de producción y una fuente de proteína para alimentación humana. La nutrición y la sanidad en la etapa larvaria son los principales factores que limitan el éxito de un acuacultivo.

Algunas de las especies de peces marinos que actualmente se cultivan en el mundo de manera comercial son: *Sparus aurata*, *Sciaenops ocellatus*, *Seriola quinqueradiata*, *Scophthalmus maximus*, *Dicentrarchus labrax*, entre otras, además, son muchas las especies de potencial acuicultural que se están estudiando con el fin de desarrollar aun más su tecnología (Webster y Lovell, 1990; Fernández-Palacios *et al.*, 1994; Leu, 1994; Riley *et al.*, 1995).

Actualmente, existe en México un interés primordial de investigar y proponer el desarrollo de sistemas y tecnologías de cultivo aplicables a las especies locales de importancia comercial. Dentro de este grupo de especies, destaca en particular la cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*). En nuestro país, el recurso "cabrilla" lo constituyen las especies *Paralabrax maculatofasciatus*, *Epinephelus analogus* y *E. labriformis* (SEPESCA, 1994) y constituyen parte del volumen de captura de las pesquerías artesanales, las cuales se llevan a cabo en zonas relativamente cercanas a la costa. Las cabrillas tienen una fuerte demanda comercial. En el año 2000, se tuvo una captura nacional de 4,007 TM, de las cuales el 88 % correspondió a Baja

California Sur (SAGARPA/CONAPESCA, 2000). Siendo así, se entiende por que en la entidad se ha visto la posibilidad de aumentar la oferta a través de la piscicultura marina, como una alternativa para incrementar la producción del recurso. Los estudios para desarrollar la tecnología de cultivo de la cabrilla los inician Matus-Nivón *et al.* (1990), quienes la señalan como una especie con potencial acuacultural, debido al crecimiento obtenido en sus primeros dos meses de vida, la baja territorialidad y su resistencia al manejo. Posteriormente en el CRIP-La Paz, Avilés-Quevedo *et al.* (1995), con base a su experiencia de la cría larvaria en un laboratorio de producción con sistema abierto, y con la engorda en jaulas de cultivo en el exterior, desarrollan un esquema teórico en el que establecen la obtención de organismos de talla comercial (25-30 cm Longitud Total) a los 8-11 meses de edad; sin presentar datos de supervivencia en las diferentes etapas del cultivo. Más adelante, el grupo de investigación del CICIMAR, conjunta la experiencia desarrollada y aplica un esquema integral para obtener el desarrollo biotecnológico de la cabrilla arenera, en el cual se contemplan cinco rubros: 1) producción de alimento vivo; 2) producción de huevecillos; 3) cría larvaria; 4) engorda de juveniles, y 5) calidad del agua y enfermedades. En la producción de alimento vivo, se busca un alimento de talla intermedia entre el rotífero y la *Artemia*, así se establecen las condiciones para la producción intensiva de un copépodo marino *Pseudodiaptomus euryhalinus* (Osorio-Galindo, 1998). Esto, permite incorporarlos al esquema de alimentación para la cabrilla arenera utilizado por Alvarez-González *et al.* (2001), junto con el enriquecimiento de los rotíferos y los nauplios y metanauplios de *Artemia* con emulsificantes comerciales. Este esquema, da un crecimiento por arriba de lo reportado por Roldán-Libenson *et al.* (1999), al alimentar larvas de cabrilla

arenera con rotíferos enriquecidos con aceite de langostilla por un lado y por otro Avilés-Quevedo *et al.* (2002) quienes alimentan los rotíferos con mezclas de microalgas y levadura de pan.

Los resultados de producción de semilla, permiten establecer las condiciones de fotoperíodo (13 L: 11 O) y temperatura (23° C) en un sistema de circulación cerrada, para inducir a la maduración gonádica y obtener el desove espontáneo en diferentes estaciones a lo largo del año (Rosales-Velázquez, 1997), con lo que se obtienen huevos de la calidad y cantidad necesaria para los desarrollos experimentales requeridos. La cría larvaria, se logró llevar hasta el período juvenil en sistemas estáticos, con una supervivencia a los 17 días de edad de 5.3 % (Martínez-Díaz *et al.*, 2001). Posteriormente, al utilizar sistemas de circulación cerrada y al probar diferentes densidades de siembra, se elevó a 11.1 % a los dos meses de edad (Alvarez-González *et al.*, 2001). De igual forma, se determinó la mejor densidad de siembra para la preengorda y la engorda en jaulas flotantes (Grayeb del Alamo, 2001), logrando una talla por debajo de la esperada en el esquema teórico de Avilés-Quevedo *et al.* (1995), debido en parte a la maduración temprana de los organismos bajo cultivo. Se obtuvo el seguimiento de los parámetros de calidad del agua (físicoquímicos y microbiológicos) durante la cría de larvas y el estudio de enfermedades en adultos (Martínez-Díaz, 1995). De acuerdo al estado actual de la tecnología del cultivo de la cabrilla arenera, una vez logrado establecer los sistemas de cultivo y las densidades de siembra de las distintas etapas de producción, los principales puntos a resolver son la madurez precoz y la nutrición durante las diferentes etapas del cultivo. En el caso de la madurez precoz, se pretende evitar mediante la producción de organismos triploides infértiles o con la

producción de monosexos, aprovechando la condición de hermafrodita protogínico que tiene la especie (Hastings, 1989).

Otra información relacionada que ha aparecido en estudios ontogenéticos es la relativa a la dimensión de los huevos. Los huevos de *P. maculatofasciatus* son de 0.80-0.89 mm de diámetro (Butler *et al.*, 1982)

Cada uno de los períodos y fases de los peces tienen distintas problemáticas. Primeramente, los factores ambientales no afectan al mismo nivel a una larva que a un adulto o un juvenil. Por ejemplo, una misma salinidad puede afectar de manera drástica el crecimiento y supervivencia de una larva de pez, mientras que el efecto es menor en un juvenil de la misma especie (Losordo *et al.*, 1998; Boeuf *et al.*, 1999). Aún cuando los factores ambientales han podido ser adecuados y emulados con relativa facilidad de acuerdo a las características y requerimientos de cada período, las condiciones alimenticias y nutricionales están sujetas a otro tipo de problemas que no han sido resueltos por completo (Ehrlich *et al.*, 1989; Bernabé y Guissi, 1994)

Los peces que tienen una ontogenia directa pueden ser alimentados con una dieta inerte a muy temprana edad debido a que su morfofisiología al momento de eclosionar del huevo es la de un juvenil, además de que en muchos casos presenta un saco vitelino que le dura largo tiempo, aun después de haber eclosionado, por lo que no tiene problemas para aceptar una dieta inerte; sin embargo, los peces que presentan un período larvario (ontogenia indirecta) deben de ser alimentados con presas vivas, ya que requieren aprender a cazar y tienen la desventaja de que no están completamente formados y presentan una reserva vitelina limitada (que generalmente se

mantiene durante un par de días), por lo que la alimentación larvaria tiene una problemática específica que debe ser resuelta (Bernabé y Guissi, 1994).

Indistintamente del tipo de alimentación que un pez presente en el período adulto, todas las larvas de los peces tienden a la depredación planctívora selectiva, esto es, la alimentación de sólo algunos integrantes del plancton, que en muchos casos se restringen a especies de copépodos (Cox y Pankhurst, 2000). Es por ello que en el cultivo larvario de peces marinos se ha utilizado zooplancton vivo como primer alimento (principalmente rotíferos y *Artemia*), con el problema que estos necesitan enriquecerse con emulsiones lipídicas por su carencia en ácidos grasos esenciales. Recientemente, se ha iniciado la utilización de copépodos que al ser el alimento natural de las larvas, no requieren de emulsificantes (Erlich *et al.*, 1989; Watanabe *et al.*, 1989; Øyvind *et al.*, 1997, Cox y Pankhurst, 2000).

La producción de alimentos vivos eleva el costo de producción del cultivo principal. Esto debido a que se requieren instalaciones especiales para producir las cantidades necesarias de alimento vivo, el cual a su vez, debe de ser alimentado con una elevada cantidad de microalgas cultivadas en instalaciones adecuadas. Al mismo tiempo, resulta difícil controlar la concentración de los distintos nutrientes contenidos en el alimento vivo y adecuarlos a los requerimientos de las distintas especies, exceptuando quizá los lípidos que, como ya se mencionó, pueden agregarse por medio de emulsiones comerciales (Watanabe *et al.*, 1989; Bromage y Shepard, 1990; Tucker, 1998).

### Amilasa

El estudio de la evolución de las principales actividades enzimáticas digestivas (proteasas, amilasas, lipasas, etcétera) durante el desarrollo larvario

puede proporcionar una información muy útil para evaluar el estado general del cultivo. Con este fin, se han empleado diversas técnicas bioquímicas y electroforéticas, que permiten conocer de manera más detallada y precisa el tipo y niveles de enzimas digestivas presentes a lo largo del desarrollo larvario. Dado que estas técnicas se fundamentan en una medición de la actividad, cualquier intento para entender un proceso de regulación, se restringe a eventos postraduccionales. No obstante, la síntesis de enzimas digestivas puede ser modulada por factores genéticos, hormonales y nutricionales (Péres *et al.*, 1997) lo que demanda el uso de técnicas que permitan evaluar además la expresión de estas enzimas a un nivel transcripcional. Estudios análogos han permitido evaluar una regulación de niveles de ARNm de tripsina y amilasa por la dieta (Péres, 1998) lo que, sin duda, le ha dado una nueva perspectiva a la optimización de dietas compuestas. El diseño y optimización de estas dietas es objeto de múltiples estudios ya que representa ventajas técnicas y económicas importantes por la reducción que significa en espacios de laboratorio, mejor control de calidad, problemas comúnmente asociados al uso de dietas vivas.

#### Inmunoglobulina M

La protección de larvas de peces está mediada por mecanismos de defensa tanto no-específica (Ingram, 1980) como específica, tales como la transferencia de anticuerpos de la madre a los huevos y larvas (Mor, 1990) y el desarrollo de una inmunocompetencia propia. No obstante, la información sobre la adquisición de una inmunidad protectora durante el desarrollo de peces es escasa. Hasta ahora, el uso de anticuerpos monoclonales específicos contra inmunoglobulinas en técnicas de tipo ELISA así como sofisticadas técnicas de citometría de flujo han permitido en algunos casos

establecer niveles de IgM a diferentes estadios del desarrollo en salmón (Nagae *et al.*, 1993), trucha arcoiris (Castillo, 1993) y tilapia (Takemura, 1993). En el lenguado (*Scophthalmus maximus*) y en particular durante el desarrollo larvario, también han sido utilizadas técnicas de ELISA para demostrar que existe una correlación entre los niveles totales de IgM (en  $\mu\text{g}$  por larva) y el crecimiento larvario.

En varias especies como el bacalao (*Gadus morhua* L.) y trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*), se ha demostrado que los niveles de inmunoglobulinas plasmáticas en hembras maduras coinciden con los niveles encontrados en huevos, razón por la que se ha considerado que la transferencia de IgM de la madre al embrión ocurre en salmónidos (Castillo *et al.*, 1993). En el período de fertilización, los niveles de Inmunoglobulinas disminuyen, prolongándose en algunas especies hasta el inicio de la alimentación externa (Olsen, 1997), probablemente a consecuencia de una síntesis *de novo* de estas moléculas como lo demuestran la detección de células expresando el ARNm de la cadena pesada de inmunoglobulinas (IgH) en experimentos de hibridización *in situ* en salmón (*Salmo salar*) (Schroder, 1998).

En tilapia (*Oreochromis mossambicus*) se ha demostrado que los niveles de inmunoglobulinas decrecen hasta alcanzar un mínimo al inicio de la alimentación exógena. Posteriormente, hay un incremento gradual en los niveles de Ig, sugiriendo que las Ig detectadas en el período pre-larval son de origen materno y esta protección se limita únicamente hasta el inicio de la alimentación exógena (Takemura, 1993).

Siendo la expresión del gen de la IgM dependiente del crecimiento larvario, es posible especular que la expresión puede ser modulada por



factores externos como ha sido el caso de genes correspondiente a enzimas digestivas. En un experimento en donde se evaluó la influencia de diferentes dietas sobre la respuesta del salmón del Atlántico (*Salmo salar*) a un reto con el patógeno *Aeromonas salmonicida*, se observó que una dieta conteniendo frijol de soya y malazas causó un incremento significativo tanto de los niveles de lisosima como de IgM lo que confirma que esta inmunoglobulina es sintetizada en respuesta a estímulos del lumen del intestino al igual que en otros modelos (Takemura, 1993). Así, los niveles de expresión del gen de esta inmunoglobulina eventualmente podrían considerarse un marcador de maduración (en un sentido funcional) del tracto digestivo de larvas de peces.

#### PCR en tiempo real

La importancia fundamental de los métodos de amplificación de ácidos nucleicos en investigación básica, farmacogenómica y diagnósticos moleculares (Schweitzer y Kingsmore 2001) continúa ayudando mediante efectos directos para proveer las metodologías corrientes así como también el desarrollo de nuevas tecnologías. Las técnicas moleculares han sido de gran importancia para resolver muchas incógnitas.

El PCR en tiempo real constituye la técnica más precisa conocida para la cuantificación de la expresión génica. El método genera una gran cantidad de datos numéricos crudos y este proceso puede influenciar los resultados finales. Los datos procesados están basados en curvas estándares o en tasas de eficiencia de amplificación. Hasta el momento, la prueba de la eficiencia del PCR es preferida para la cuantificación relativa, mientras que las curvas estándar son comúnmente usadas para cuantificaciones absolutas. Sin

embargo, no hay barreras para emplear curvas estándares en la cuantificación relativa.

Esta técnica se basa en que existe una relación lineal entre el logaritmo de la cantidad inicial del ADN templado y el valor de  $C_T$  (Valor umbral en que la fluorescencia de una molécula reportera se incrementa considerablemente sobre el valor de fondo, de tal manera que alcanza un valor medible por el instrumento). Así, es ahora posible cuantificar de manera más precisa los niveles de expresión en valores absolutos o relativos a un gene de referencia constitutivo.

Dependiendo del tipo de aplicación, existen varios métodos de análisis:

#### Cuantificación Absoluta

Nos permite determinar el número exacto de moléculas de ADN o ARN presentes en una muestra determinada, para lo cual es necesario utilizar una curva de calibración a partir de un stock de estándares de concentración finamente conocida y determinada por otra técnica en la cual las unidades estén expresadas en número de copias, ng/ $\mu$ L,  $\mu$ mol/ $\mu$ L de la secuencia blanco en específico.

Curva estándar para cuantificación absoluta.

La curva tipo o curva de calibración se construye a partir de los valores de  $C_t$  obtenidos para cada estándar o tejido blanco y graficados versus el logaritmo de la concentración correspondiente.

#### Ensayos de cuantificación

Utilizando esta metodología es posible ver que aun muestras con diferentes concentraciones iniciales de templado pueden tener el mismo número de copias al final de la reacción, a partir de una misma cantidad inicial

de material genético, es posible obtener productos de amplificación de distintas intensidades al ser analizado en un gel de agarosa. Los primeros trabajos efectuados en tiempo real fueron reportados por Higushi en 1993, utilizando bromuro de etidio como agente intercalante, por medio de un termociclador modificado que permitía irradiar las muestras con luz ultravioleta y detectar la fluorescencia mediante una cámara CCD. Con esta técnica se efectuaron los primeros ensayos de PCR en tiempo real, sin embargo, tenía muchas desventajas, tales como la baja sensibilidad del bromuro de etidio, la falta de especificidad y además el riesgo a la salud que involucra trabajar con este agente. Las características que los agentes detectores o reporteros deben cumplir son: que la fluorescencia generada sea directamente proporcional al número de copias obtenidas en cada ciclo de la PCR.

La desviación estándar entre los diferentes puntos debe ser menor a 0.2 unidades de Ct. La correlación lineal entre los puntos determina la eficiencia de amplificación, y no se ve afectada por la cantidad de templado inicial y es la misma en el rango de detección probado. Finalmente, la pendiente de la recta obtenida como producto de la amplificación de diferentes diluciones debe ser cercana a  $-3.32$ , lo que corresponde a una eficiencia de amplificación igual al 100%, para llevar a cabo un ensayo de PCR cuantitativo en tiempo real un valor de hasta el 92% de eficiencia de amplificación es aceptable. Este ensayo se debe llevar a cabo al menos una vez para cada ensayo de PCR en tiempo real que se deba analizar. Es posible llevar a cabo esta evaluación de amplificaciones monoplex para un solo blanco biológico o en modelos multiplex, para dos o más blancos biológicos amplificados simultáneamente.

Cuantificación relativa

Este método describe cambios en la cantidad de la secuencia blanco comparados con su nivel en una matriz relacionada.

### **Justificación**

La cabrilla arenera es una de las especies de peces marinos con mayor esfuerzo de investigación en México (Civera *et al.*, 2002). Esta especie tiene una fuerte demanda comercial por su carne blanca y buen sabor. En el año 2000, se tuvo una captura nacional de 4,007 Tm, de las cuales el 88% correspondió a Baja California Sur (SAGARPA/CONAPESCA, 2000)

La viabilidad de larvas de peces en sistemas de crianza es un reflejo directo de la funcionalidad del tracto digestivo. Hasta ahora se han utilizado algunos indicadores del estado nutricional del cultivo, siendo los más comunes aquellos basados en parámetros histológicos (diámetro nuclear y tamaño de los enterocitos) y bioquímicos tales como el índice ARN/ADN y medición de actividades enzimáticas. No obstante la importancia y relevancia de la problemática asociada a las altas mortalidades, no existen estudios a nivel molecular del estatus funcional del tracto digestivo lo que ofrece la posibilidad de poder manipular factores externos con potencial de regular la funcionalidad del tracto digestivo.

En contraparte a la gran cantidad de información que existe sobre enzimas digestivas, no hay reportes sobre la participación de inmunoglobulina M como marcador de maduración en peces por lo que el reporte de la cuantificación de los niveles basales de estas moléculas es una aportación relevante desde una perspectiva de investigación básica y aplicada dentro de este proyecto.

Dado que un bajo nivel de enzimas citosólicas asociado a un incremento en las enzimas del borde de cepillo de las células epiteliales caracteriza enterocitos maduros en mamíferos y peces, la expresión de los genes correspondientes podría ser utilizada como marcadores de maduración del tracto digestivo. Con este modelo como antecedente, en el proyecto plantea como hipótesis que la expresión de Amilasa e Inmunoglobulina M durante el desarrollo larvario de la cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*), está asociada al proceso de maduración del tracto digestivo. Los genes que pretendemos evaluar, corresponden a fenotipos asociados a mecanismos de defensa (Inmunoglobulina M) y actividad digestiva (Amilasa). De manera conjunta hipotetizamos que la espermina inducirá cambios benéficos morfológicos y funcionales en el desarrollo larvario de peces, gracias a su capacidad para la diferenciación y proliferación celular, lo cual beneficiará la expresión de los genes mencionados, obteniendo una mejora en los patrones de maduración gastrointestinal acelerada, y por tanto un mayor crecimiento y supervivencia

## **Objetivo general**

Determinar si la incorporación de una poliamina sintética puede modificar los patrones de expresión de los genes de la Inmunoglobulina M y de la Amilasa durante el desarrollo larvario de la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus*.

## **Objetivos específicos**

Obtención de secuencias específicas de cADN para los genes correspondientes a Amilasa e Inmunoglobulina M (IgM) de cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus*

Diseño y evaluación de oligonucleótidos para la amplificación específica de secuencias de cADN del gen correspondiente a Amilasa e Inmunoglobulina M (IgM) de cabrilla arenera.

Establecimiento de los niveles basales de la expresión de los genes mencionados en condiciones estándar de una crianza larvaria de cabrilla arenera.

Evaluación del efecto en el crecimiento y la supervivencia de larvas cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* alimentadas con microcápsulas.

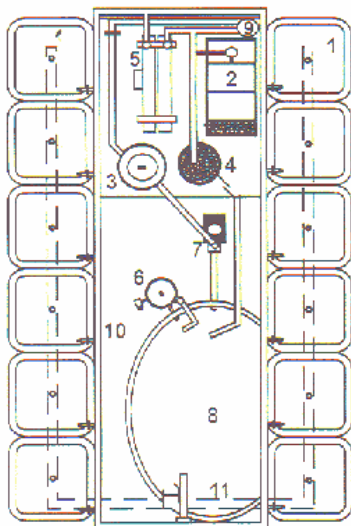
Evaluación del efecto de la incorporación de espermina a la dieta, en el perfil de expresión de los genes mencionados a lo largo de una crianza larvaria de cabrilla arenera.

## MATERIALES Y METODOS

### Cultivo Larvario

Se realizó una crianza de larvas de *Paralabrax maculatofasciatus*, en la Unidad Piloto de Maricultivos (UPIMA) perteneciente al Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas (CICIMAR) del Instituto Politécnico Nacional (IPN). El desove natural se obtuvo de reproductores mantenidos en cautiverio en el Sistema Cerrado para la Inducción al Desove del Laboratorio de Biología Experimental de CICIMAR-IPN, bajo un régimen fototermal de 13L:11O (Luz:Oscuridad), una temperatura controlada de 23°C y según la metodología aportada por Rosales-Velázquez (1997). La longitud patrón (LP) correspondió a 157 a 220 y el peso del cuerpo (PC) a 106 a 211 g.

El Sistema de Recirculación Cerrado consta de 18 tanques de fibra de vidrio (1) con una capacidad de 140 L cada uno, una bomba marca PerformancePro serie Artesian modelo A1/8-35-C de 1/8 de HP, un espumador de albúminas marca Euroreef con una bomba sumergible marca Sedra modelo



**Figura 2 Unidad Piloto de Maricultivos, CICIMAR-IPN**

KSP5000, un filtro de luz ultravioleta de cuatro lámparas marca Tropical Marine Centre modelo PM6, una columna de lodos activados marca Sea Storm, un

filtro mecánico de arena marca PAC-FAB modelo Triton II (Pentair Inc., Golden Vallery, Minnesota, EUA) y un reservorio de agua de 700 L de capacidad (Figura 1). Para corroborar el buen funcionamiento del sistema, este se saturó con aproximadamente 2.5 m<sup>3</sup> de agua de mar durante dos semanas previas a la introducción de las larvas. La temperatura fue controlada mediante un termostato de titanio, manteniéndose en 23°C. Se colectaron 220 mL de embriones viables mediante el uso de recipientes cilíndricos de plástico y depositados en reservorios de agua del mismo sistema. Dichos recipientes poseen en la parte frontal tres aberturas cubiertas con una malla de 200µm. Este mecanismo permite el paso de agua a través de los orificios de la malla y la retención de los embriones, permitiéndoles una oxigenación adecuada por el flujo de agua constante.

#### Incubación de Eleuteroembriones

El desove inicial de 220 mL se sembró a partes iguales en dos tolvas incubadoras cilíndricas con fondo cónico de fibra de vidrio, con una capacidad de 120 L cada una, a temperatura constante de  $25 \pm 0.8$  °C , con una salinidad de  $35 \pm 0.7$  ‰ y oxigenación y flujo de agua moderado y constante. Las condiciones se mantuvieron sin variación durante 24 horas cuando dio lugar la eclosión de los embriones.

#### Determinación del porcentaje de eclosión del desove

Cabe mencionar que, de manera conjunta con la eclosión de los embriones, se realizó la determinación del porcentaje de eclosión del desove, para lo cual se colocó dentro de las incubadoras, un 1 mL de agua de mar conteniendo embriones suspendidos en agua de mar del desove inicial, en un recipiente de plástico con flujo de agua constante bajo las mismas condiciones



que las primeras y durante el mismo período de tiempo, contabilizando el número de embriones eclosionados y no eclosionados. Dicho ensayo se realizó por triplicado.

#### Siembra de Eleuteroembriones

Se determinó el número de eleuteroembriones por mL de agua de mar en las tolvas incubadoras y se procedió a la siembra con una densidad deseada de 37 eleuteroembriones/L en el sistema cerrado 18 (SC-18) de la Unidad Piloto de Maricultivos (UPIMA, CICIMAR-IPN), para lo cual se tomaron 4.5L de agua de mar conteniendo las larvas recién eclosionadas y se sembraron en cada uno de los tanques previamente preparados para tal efecto, con la ayuda de una tabla de números aleatorios. El promedio de larvas por tanque fue de 3275 larvas.

#### Alimentación de larvas

Las larvas se mantuvieron bajo condiciones estándar según la metodología de Alvarez-González *et al.*, (2001). La temperatura promedio fue de  $23.46 \pm 0.31^{\circ}\text{C}$ , la salinidad fue de  $35.79 \pm 0.83\text{‰}$ , el oxígeno disuelto  $5.85 \pm 0.75 \text{ mg O}_2/\text{L}$  con aireación y flujo de agua constante, como se muestra en la Tabla VII.

Durante los primeros 12 días después de la eclosión, fue necesaria la adición de la microalga *Nannochloropsis oculata* (1, 208,400 cels./ml). Las larvas fueron alimentadas desde el día 1 dde hasta el día 15 dde con el rotífero *Brachionus plicatillis*. Los días 1 y 2 dde se adicionaron los rotíferos sin enriquecer y desde el día 4 dde se enriquecieron durante 6 horas antes de ser administrados a las larvas, con la emulsión comercial RATIO HUFA<sup>®</sup> (Salt Creek, Inc., Salt Lake City, UTA, EUA). A partir del día 16 dde las larvas fueron

alimentadas con nauplios de *Artemia sp* (NEPTUNE INDUSTRIES, Salt Lake City, UTA, EUA) sin enriquecer, y a partir del día 17 dde se enriquecieron con la misma emulsión lipídica que se utilizó para los rotíferos, pero con 24 hrs de enriquecimiento. El día 22 dde comenzó la alimentación con juveniles de *Artemia sp*. sembrados con anterioridad, a una densidad de 2 juveniles/mL (240000 juv. art/tanque)

La secuencia de alimentación se muestra en la Tabla I.

Tabla III Secuencia de alimentación utilizada durante el experimento. Los números implementados nos indican la cantidad de organismos/mL. *Mno*= .Microalga *Nannochloropsis oculata*, *RBp*= Rotífero *Brachionus plicatillis* ; *RbpHufa*= Rotífero enriquecido con HUFA; *NAsp*= Nauplios *Artemia sp* sin enriquecer; *JAsp* Juveniles *Artemia sp*; *CoAlim*= Coalimentación; *AlimMCs*= Alimentación con microcápsulas; *DDE*= Días después de la eclosión.

Organismo	Días después de la eclosión (dde)																											
<b>MNo</b>	2																											
<b>RBp</b>	2	2																										
<b>RbpHufa</b>			4	4	2	2	2	1	2	3	3	3	3	2														
<b>NAsp</b>															2	2												
<b>JAsp</b>																	2	2	3	3	4	5	6	4				
<b>CoAlim</b>															2													
<b>AlimMCs</b>															2													
<b>DDE</b>	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25		

Tabla IV Relación de la secuencia de alimentación suministrada a larvas de Cabrilla arenera en la fase de coalimentación.

Días	Rotíferos/ml ( <i>B. plicatilis</i> )	<i>Artemia</i> (nauplios/ml)	<i>Artemia</i> (Juveniles/ml)	Microcápsulas (g)
15	2	2		0.0581
16		2		0.0581
17		2		0.0799
18		2		0.0799
19		3		0.1065
20		3		0.1660
21		4		0.1972
22		5	0.2	0.2897
23		6	0.3	0.4345
24		4	0.4	0.5793
25			0.5	0.7241

La coalimentación se realizó del día 15 de desarrollo hasta el día 20. Se suministraron tres dietas distintas, sustituyendo gradualmente el suministro de alimento vivo, siguiendo las proporciones 80:20, 60:40, 40:60, 80:20 y 0:100 (alimento vivo: dieta inerte). La sustitución se realizó de acuerdo al peso seco de las microcápsulas y del alimento vivo. Cada tratamiento experimental y el tratamiento testigo fueron probados por triplicado.

#### Dietas Microcapsuladas

Las dietas están basadas en el uso de microcápsulas, las cuales fueron realizadas mediante el método polimerización interfacial, elaboradas por el Dr. Francisco Javier Alarcón y procesadas de acuerdo a los métodos de microencapsulación propuestos en las patentes UK GB 2103568 A y UK GB 040863 B, en el Laboratorio de Biología Aplicada de la Escuela Politécnica Superior de la Universidad de Almería, España. El porcentaje de espermina se ajustó por sustitución de la dextrina, manejando dos concentraciones: 0.1% y 0.33%. Fueron utilizados dos tipos de microcápsulas como tratamientos experimentales, una dieta microencapsulada control libre de espermina y un suministro de alimento vivo (rotíferos y *Artemia sp.*) como tratamiento testigo. En las microcápsulas control se sustituyó 50% del contenido de harina de

calamar por hidrolizado de proteína de pescado, como fuente de proteínas. El tratamiento testigo fue basado en el esquema de alimentación propuesto por Alvarez-González *et al.* (2001) modificado para el presente trabajo. De los tanques destinados al experimento se dispusieron dos para Alimento Vivo (AV), dos para la dieta control (Microencapsulado con Hidrolizado (MCH)) y dos para cada una de las concentraciones usadas con espermina, es decir 0.1% y 0.33% (MCH0.1%E y MCH0.33%E, respectivamente), incorporadas a la dieta control o dieta MCH

Cabe señalar que previo al suministro de la dietas a las larvas, se realizó un bioensayo conteniendo larvas en un recipiente transparente y pequeño con el fin de observar si las larvas podían alimentarse con la microcápsula, resultando exitoso. Además se midió la tasa de hidratación de las microcápsulas realizando este proceso 15 min antes de cada alimentación de la larva durante el experimento, con el fin de conocer las dimensiones de la microdieta al momento de ser ingerida por el organismo para, de esta manera, evitar un posible atragantamiento.

Tabla V. Formulación utilizada para la fabricación de las microcápsulas. MCH= Microcápsulas con hidrolizado de proteína de pescado; MCH0.1%E= Microcápsulas con hidrolizado de pescado adicionada con 0.1% de espermina, MCH0.33%E= Microcápsulas con hidrolizado de pescado adicionada con 0.33% de espermina.

Ingrediente	MCH	MCH0.1%E	MCH0.33%E
Caseína <sup>a</sup>	7.500	7.500	7.500
Harina de calamar <sup>b</sup>	2.400	2.400	2.400
Hidrolizado de pescado (CSPS) <sup>c</sup>	2.400	2.400	2.400
Lípidos y vitaminas liposolubles (Kurios) <sup>d</sup>	1.710	1.710	1.710
Lecitina <sup>e</sup>	0.300	0.300	0.300
Dextrina <sup>a</sup>	0.750	0.735	0.700
Espermina <sup>a</sup>		0.015	0.050
Premezcla de vitaminas <sup>e</sup>	0.131	0.131	0.131
Premezcla de minerales <sup>f</sup>	0.093	0.093	0.093
Vitamina Stay-C 35% <sup>g</sup>	0.015	0.015	0.015
<i>Total mezcla (en gramos)</i>	15.299	15.299	15.299
<b>Análisis químico</b>			
Proteína (%)	61.50 ± 0.31		
Extracto Etéreo (%)	7.12 ± 0.09		

<sup>a</sup> Sigma Co., Madrid, España; <sup>b</sup> Promotora Industrial Acuasistemas S.A. de C.V., México; <sup>c</sup> Norse fish powder, Norway; <sup>d</sup> Kurios, Libourne, Francia; <sup>e</sup> CIBNOR (mg/Kg de dieta): Vit. A (retinol), 0.6 (ICN); Vit. D3 (colecalfiferol), 0.0042 (SIGMA); Vit. E (tocoferol), 35 (SIGMA); Vit. K (menadiona), 7 (SIGMA); Vit. B<sub>1</sub> (tiamina), 0.7 (SIGMA); Vit. B<sub>2</sub> (riboflavina), 2.8 (SIGMA); Vit. B<sub>6</sub> (piridoxina), 2.1 (SIGMA); Ácido pentanoico, 14 (SIGMA); Niacina (ácido nicotínico), 7 (SIGMA); Biotina, 0.112 (ICN); Inositol, 210 (SIGMA); Vit. B12 (cianocobalamina), 0.014 (SIGMA); Ácido fólico, 0.7 (SIGMA); Vehículo harina de sorgo. <sup>f</sup> CIBNOR (g/kg de dieta; SIGMA): CaCl<sub>2</sub>\*5H<sub>2</sub>O, 2.57; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 5.72; MgSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O, 1.49; FeSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O, 0.18; ZnSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O, 0.028; MnCl<sub>2</sub>\*4H<sub>2</sub>O, 0.0096; CuSO<sub>4</sub>\*5H<sub>2</sub>O, 0.0025; KI, 0.0003 mg; SeS<sub>2</sub>, 0.42 mg. <sup>g</sup> ROVIMIX-ROCHE, Basel, Suecia.

### Limpieza del sistema

Debido a que las larvas suelen estresarse con mucha facilidad y con cualquier movimiento, para la limpieza del sistema se utilizó una tira de malla de 35µm en las salidas de flujo de cada tanque, flujo que se mantuvo cerrado durante el día, mientras que por la noche se dejaba un flujo muy lento en los tanques, además de que se cambiaban las mallas de 35µm por unas de 100µm con la finalidad de que el alimento suministrado pudiera ser eliminado del tanque por el tubo de desagüe.

Con la ayuda de un sifón se retiraron diariamente las heces fecales o restos de comida no ingeridos a partir del día 15 dde, y se contabilizaron las

larvas muertas en cada tanque, de esta manera se pudo mantener el sistema mas limpio.

Los parámetros de temperatura, salinidad y oxígeno disuelto fueron tomados diariamente con la ayuda de un Multiparámetros marca YSI® modelo MPS 556 (YSI Incorporated, Yellow Springs, Ohio, EUA), con una precisión de 0.01°C, 0.1 mg O<sub>2</sub>/l y 0.01‰.

#### Evaluación de crecimiento

Para evaluar el crecimiento de las larvas, se tomaron muestras cada cinco días desde el inicio del experimento (10 organismos / réplica) con aproximadamente 30 mg de peso húmedo. Los organismos se anestesiaron con Metil sulfonato de tricaína (MS-222) para ser analizados en un digitalizador de imágenes con ayuda de un microscopio marca Olympus modelo SZ-ST (Olympus optics, Tokyo, Japón), una cámara Hitachi modelo KP-D50 Color (Hitachi America, Ltd., Brisbane, California, EUA) y del paquete ImagePro plus ver. 4 (Media Cybernetics, Maryland, EUA). La longitud notocordal de las larvas, así como su longitud patrón, se registró con ayuda del paquete SigmaScan Pro ver. 5 (Spss, Chicago, Illinois, EUA). El peso húmedo de las larvas fue determinado con ayuda de una balanza analítica modelo Adventurer (Ohaus, Pine Brook, Nueva Jersey, EUA). El análisis de los resultados se realizó mediante un análisis de Varianza (ANOVA) de una vía con el programa SPSS ver. 11.00, por casa uno de los diferentes tipos dietarios en función de la Longitud Notocordal/ Longitud Patrón. Adicionalmente se realizó una prueba de Tukey y Tukey's b, para los días 20 y 25, con la finalidad de demostrar diferencias significativas entre los distintos tratamientos.

#### Evaluación de supervivencia

Fue registrado el número de peces muertos diariamente a partir del inicio de la sustitución de alimento vivo por las microcápsulas. La supervivencia total (ST) fue calculada como:

$$ST = \frac{JC}{ES} \times 100 \quad \text{donde:}$$

JC = Juveniles cosechados al final del experimento.  
ES = Eleuteroembriones sembrados al inicio del experimento.

#### Obtención de muestras

Durante la crianza de las larvas se tomaron muestras con especial precaución para las destinadas a extracción de ARN total las cuales fueron procesadas de inmediato. Las muestras fueron tomadas cada 5 días desde el inicio del experimento, correspondiendo a la primer muestra el estadio larvario de huevo, tomado como día 0. Se tomaron aproximadamente 100mg, por tratamiento, los cuales se sumergieron en 1 mL de RNA<sup>later</sup><sup>®</sup> (Ambion, Inc.) por muestra e inmediatamente se almacenó a -80°C hasta su manejo posterior.

#### Elaboración de sondas de cADN para la detección específica y cuantificación de Amilasa e Inmunoglobulina M.

Antes de proceder a la extracción de ARN total de las larvas, se diseñaron los oligonucleótidos (primers, en inglés) para la detección específica de los genes de Amilasa e Inmunoglobulina M en un individuo adulto de cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus*. Lo anterior se realizó seleccionando los segmentos más conservados del resultado del alineamiento con el ARNm de nuestro interés. de la secuencia para la lubina europea, *Dicentrarchus labrax*, obtenida en la base de datos de GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Los primers se muestran en la Tabla X. Posteriormente se realizó la disección de un ejemplar adulto de cabrilla

arenera, *Paralabrax maculatofasciatus*, obteniendo el segmento anterior del intestino, para inmediatamente realizar la extracción de ARN total, mediante el reactivo **TRIZOL<sup>®</sup> Reagent**, siguiendo las instrucciones del fabricante (INVITROGENE, The Netherlands). El ARN total obtenido se cuantificó mediante un biofotómetro Eppendorf y se almacenó en alícuotas de 15 µg a -80°C.

El siguiente paso consistió en realizar la retrotranscripción a ADNc para poder tener un mejor manejo de las muestras, mediante el kit de Amersham READY TO GO y siguiendo las instrucciones del fabricante. Con el ADNc obtenido se amplificaron los segmentos de los genes de interés, por medio de la Reacción en Cadena de la polimerasa, optimizando los parámetros en términos de temperatura y concentración de Mg (Tabla V)

Se utilizaron los primers diseñados en el año 2001, específicos para la lubina europea, *Dicentrarchus labrax*, que se muestran en la Tabla X. Amylase (alignent: 50°C) 564bp Dir4 5' TT Y GAG TGG CGC TGG 3' PM 4886 T°C 51.9 (%GC) Rev5 5' RGG CCA CAT GTG CTT 3' PM 4814 T°C 49.2 (%GC) Y=(CT), R=(A,G). Los primers para IgM, se obtuvieron de las secuencias registradas para el bagre de canal *Ictalurus punctatus*.

#### Secuencias y temperaturas de alineamiento

La tabla V explica las concentraciones y cantidades utilizadas en PCR para realizar la mezcla maestra con la que se amplificaron las secuencias deseadas.



Tabla VI Concentraciones y cantidades utilizadas para la amplificación específica del gen IgM y Amilasa

<b>Mezcla maestra</b>	<b>1 Reacción</b>
H2O para PCR	8.48 $\mu$ L
Buffer para PCR 10x	1.25 $\mu$ L
MgCl2 25 mM	0.75 $\mu$ L
dNTP's	0.66 $\mu$ L
Taq polimerasa 5 unidades/ $\mu$ L	0.1 $\mu$ L
Primer Forward	0.13 $\mu$ L
Primer Reversa	0.13 $\mu$ L
Templado	1 $\mu$ L
TOTAL	12.5 $\mu$ L

Las temperaturas utilizadas para la amplificación de los fragmentos de IgM y Amilasa fueron las siguientes:

Tabla V. Temperaturas y tiempos utilizados en el PCR de punto final, para la amplificación específica de amilasa e inmunoglobulina M.

<b>Desnaturalización</b>	<b>Desnaturalización</b>	<b>Alineamiento</b>	<b>Extensión</b>	<b>Extensión</b>	
94°C	94°C	52°C	72°C	72°C	4°C
30 seg <b>1 ciclo</b>	1 minuto	1min 30 seg <b>35 ciclos</b>	2 minutos	7 minutos <b>1ciclo</b>	$\infty$

Los amplicones obtenidos fueron secuenciados mediante la técnica de Sanger (Sanger *et al.* 1977) empleando inhibidores de terminación con marcadores fluorescentes para uso del secuenciador automático modelo ABI 310 (Applied Biosystems). Basándose en esta secuencia se diseñaron los primers que se utilizarían mas adelante en nuestro experimento al realizar las cuantificaciones por medio de PCR en tiempo real. Los primers fueron diseñados mediante el programa primer 3, el cual puede ser utilizado en la página [http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)).

### Extracción de ARN de larvas de *Cabrilla arenera*

La extracción del ARN total se realizó en larvas recién colectadas en ayunas. La recolección de las muestras se realizó tomando larvas al azar de los tanques para los diferentes tratamientos. Se tomaron aproximadamente 100 mg, se sumergieron en 1 mL de RNA $\text{later}^{\text{®}}$  (Ambion, Inc.) por muestra e inmediatamente se almacenó a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis posterior.

La extracción de ARN total se realizó con aproximadamente 100 mg para las etapas iniciales larvarias día 0-15 y 200 mg para los días 15-40, utilizando el protocolo establecido por el reactivo de Trizol (Invitrogene).

El ARN así obtenido se almacenó en alícuotas de 15  $\mu\text{g}$  a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su uso para la retro-transcripción. Del ARN total se tomaron 5  $\mu\text{g}$  para ser transcritos a ADN complementario (cADN) utilizando la reverso transcriptasa del virus de la leucemia murina-maloney (MMLV) de acuerdo a las instrucciones del kit READY TO GO de Amersham Pharmacia Biotech Inc., NJ, USA. La amplificación del ADNc se realizó en un Termociclador iCycler de Bio-Rad con sistema de gradiente de temperatura, optimizándose en términos de temperatura de alineamiento y concentración de  $\text{Mg}^{2+}$

Los productos de amplificación fueron separados por electroforesis en agarosa al 1.2% y después analizados en un fotodocumentador (Gel-Pro transiluminator). La recuperación y purificación del cADN se obtuvo cortando las bandas de interés con un bisturí estéril en un transiluminador y en base al protocolo del kit GENE CLEAN SPIN KIT (BIO 101 INC, CA USA). Finalmente, los segmentos amplificados por PCR fueron clonados de acuerdo al protocolo del kit TOPO TA CLONING (INVITROGENE, The Netherlands) utilizando células competentes de *E. coli* y el plásmido pCR 2.1 como vector. Una vez

clonados, se obtendrán los plásmidos de las células de *E. coli* usando el procedimiento del kit RPM (BIO 101 INC, CA USA) para enviarse a secuenciar y obtener sus homologías con los bancos de secuencias.

### Cuantificación de los mRNA

Para conocer los niveles basales de ARNm se realizó una cuantificación relativa en un termociclador de tiempo real ABI Prism 7000 (Applied biosystems) generando un rango dinámico con una curva estándar de calibración usando diluciones seriadas de las muestras de interés. En primera instancia se diseñaron primers para trabajar con la tecnología SyberGreen, los cuales se hicieron mediante el programa Primer 3 ([http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)). El uso de la tecnología Syber Green exige una temperatura de alineamiento para los oligonucleótidos de 60°C, lo cual se comprobó, así como la ausencia de dímeros en la secuencia mediante el programa Oligo Analyzer V.3.0 de Bioinformatics, Genomics, Proteomics, Biotechnology and Molecular Biology Directory, (<http://www.bioinformatics.vq/biolinks/bioinformatics/PCR%2520and%2520Primer%2520Design.shtml>).

Desgraciadamente los resultados no fueron los esperados por lo que se optó por el diseño de sondas Taqman, las cuales fueron diseñadas por Applied Biosystems. El protocolo para el uso de las sondas se siguió de forma exacta como lo exigen los fabricantes.

Para el análisis de secuencias, alineamientos múltiples, diseño de primers, ensamblaje de secuencias se utilizó el software Lasergene (DNASTAR). Para validar el ensayo de cuantificación, se generó un rango dinámico donde se determinó la eficiencia de amplificación y el nivel de sensibilidad de la

técnica empleada. Para lo anterior se utilizó una curva estándar, a partir de una muestra de ADNc de adulto de cabrilla arenera *P. maculatofasciatus*. Se usaron diluciones decimales seriadas amplificándolas bajo las condiciones mostradas en la Figura 2.

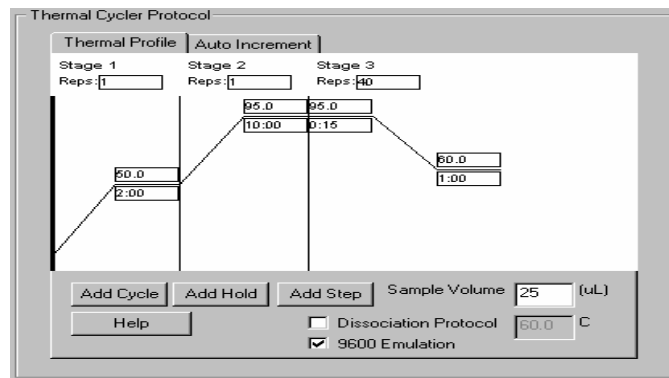


Figura 2. Condiciones de temperatura y tiempos para la amplificación específica de amilasa e inmunoglobulina M en PCR en tiempo real. Se realizó una curva estándar para cada uno de los genes estudiados.

Cabe señalar que se seleccionó como control endógeno al gen 18s, el cual es comúnmente utilizado como referencia activa. Las amplificaciones se determinaron por cuadruplicado. A partir de estos resultados se construyó una gráfica con los valores de Ct (Cycle threshold o Umbral de detección) versus el logaritmo de la concentración, obteniendo así una gráfica que representa el incremento en el número de copias de ADN amplificado con respecto a cada ciclo. Si fijamos un nivel de fluorescencia dentro de la fase geométrica de la amplificación (es decir, si fijamos el número de moléculas de ADN finales, (P), entonces el número de ciclos (n) que son necesarios para que la fluorescencia alcance este valor fijo, será directamente proporcional a la concentración inicial (T). A este valor se le conoce como Ct o Threshold cycle.

Para normalizar y asegurar que las variaciones observadas entre los valores de los genes blanco Amilasa e IgM y la referencia activa 18s sean

realmente debidas a cambios de expresión y ni a cantidad variable de muestra añadida entre dos ensayos se divide el valor obtenido del gen de interés entre el valor obtenido para la referencia activa.

Con estos resultados se procedió a hacer la cuantificación de cada una de las muestras amplificadas mediante PCR en tiempo real, hechas por triplicado y con los mismos rangos de temperatura y tiempo que los utilizados para la obtención de los datos iniciales utilizados para la elaboración de la curva estándar.

Una vez normalizado el resultado de expresión de Amilasa e IgM con respecto control endógeno o referencia activa 18s, se divide este valor entre el valor de otro ensayo elegido como calibrador (en este caso elegimos el día 0 o etapa de huevo) lo que resulta en un orden de magnitud con respecto al calibrador.

Existen dos métodos gracias a los cuales se efectúa el análisis para cuantificación relativa: la realización de una curva de calibración estándar o bien el método de  **$\Delta Ct$**  (Delta Cycle Threshold).

En el presente trabajo se utilizó el método de  **$\Delta Ct$** . (Para referencias del procedimiento para la curva estándar, ver Apéndice III)

Se construyó una curva de rango dinámico para el gen blanco y el control endógeno, y se obtuvo  $\Delta Ct$  (Ct blanco-Ct control endógeno) para cada uno de los puntos. Este  $\Delta Ct$  se grafica versus la concentración de cada uno de los puntos, y la línea obtenida tiene que tener una pendiente menor o igual a 0.1, la cual valida la utilización del método de  $\Delta Ct$  que requiere que la eficiencia de amplificación de los genes (endógeno y blancos) sea la misma.

La cuantificación relativa se obtuvo mediante el algoritmo de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$

## RESULTADOS

### Cultivo Larvario

Se realizó una corrida de crianza para determinar el efecto de espermina en el desarrollo larvario de la cabrilla arenera, *Paralabrax maculatofasciatus*. Dicho efecto se estudió a un nivel molecular analizando de manera integral la expresión de los genes de IgM y Amilasa.

### Conteo inicial de eleuteroembriones

El conteo inicial de eleuteroembriones dio un total de 198.5 por cada 100  $\mu$ L (1985 eleuteroembriones/mL)

### Determinación del porcentaje de eclosión del desove

Al realizar la siembra de larvas para su posterior eclosión, se determinó el porcentaje de eclosión del desove inicial. Se realizó el ensayo por triplicado y se obtuvo un porcentaje de 96.26% (Tabla VI).

Tabla VI. Porcentaje de eclosión del desove de cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus*

Conteo	Larvas	Huevos	Porcentaje
1°	151	8	95%
2°	141	1	99%
3°	159	10	94.8%
		<b>Promedio</b>	<b>96.26%</b>

### Principales parámetros físico-químicos.

La temperatura, salinidad, oxígeno disuelto, nitritos y amonio totales, son parámetros importantes para lograr una crianza larvaria exitosa, los resultados mostrados en la tabla VII, son producto del promedio de los datos obtenidos diariamente.

Tabla VII. Relación de los parámetros físico-químicos del sistema de cultivo larvario durante todo el experimento.

Parámetro	Promedio
-----------	----------

<b>Temperatura</b>	23.46± 0.31°C
<b>Salinidad</b>	35.79± 0.83‰
<b>Oxígeno disuelto</b>	5.85± 0.75 mg O <sub>2</sub> /L
<b>Nitritos totales</b>	0.62 ± 0.32 mg NO <sub>2</sub> /l
<b>Amonio total</b>	0.31 ± 0.13 mg NH <sub>4</sub> /l

### Porcentaje de supervivencia

Fue registrado el número de peces muertos diariamente a partir del inicio de la sustitución de alimento vivo por las microcápsulas. La supervivencia total (ST) fue de 6.2% para el alimento vivo y -1% para el resto de los tratamientos (MCH 0%, MCH0.1%E y MCH0.33%).

### Longitud de larvas de *Paralabrax maculatofasciatus*.

Los resultados del promedio de crecimiento por talla para los distintos tratamientos se muestran en la tabla VIII. La gráfica 1 presenta el comportamiento del crecimiento de larvas de *Paralabrax maculatofasciatus*. Podemos apreciar que la dieta con alimento vivo y las microcápsulas con hidrolizado de proteína de pescado presentaron el mayor crecimiento, sobre el crecimiento obtenido de las dietas adicionadas con espermina en las concentraciones 0.1% y 0.33%.

Tabla VIII. Relación de la longitud de larvas de *Paralabrax maculatofasciatus* por tratamiento, por días después de eclosión. Promedio de Longitud Notocordal (LN)/ Longitud Patrón (LP) ± (desviación estándar). Abreviaturas AV= Alimento Vivo; MCH= Microcápsulas con hidrolizado de proteína de pescado (dieta control); MCH0.1%E= Dieta control (MCH) adicionado con 0.1% de Espermina; MCH0.33%E= Dieta control (MCH) adicionada con 0.33% de Espermina.

Promedio de	Tratamiento
-------------	-------------

LN/LP				
Día	AV	MCH	MCH0.1%E	MCH0.33%E
1	2.46±0.11			
5	2.69±0.21	2.69±0.29		
10	3.20±0.26	3.27±0.29		
15	4.19±0.38	3.94±0.54		
20	4.65±0.68	4.37±0.71	4.17±0.55	3.97±0.55
25	5.58±0.95	5.47±0.86	4.66±0.54	4.62±0.51

LN/LP Promedio de *P. maculatofasciatus*

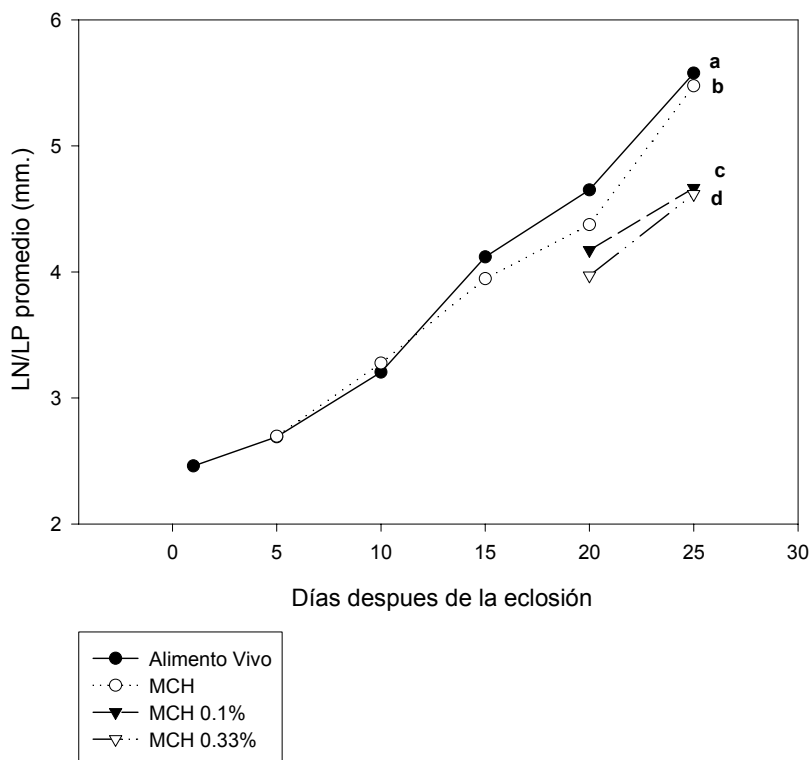


Figura 3. Comportamiento del crecimiento en longitud de larvas de *Paralabrax maculatofasciatus*. Promedio de la Longitud Notocordal/ Longitud Patrón vs. días después de la eclosión. Las literales significan las diferencias entre tratamientos ( $P < 0.05$ ). Abreviaturas: LN= Longitud Notocordal; LP= Longitud Patrón.

Los resultados de Análisis de varianza de una vía con Tukey, aplicados para el día 20, muestran que el efecto del alimento vivo sobre las larvas presenta un crecimiento mayor que en los demás tratamientos, sin embargo no hay diferencias significativas ( $P = 0.000$ ). En el día 25 de desarrollo, con cinco días de suministro de las diferentes dietas, podemos apreciar dos grupos, los tratamientos con alimento vivo y microcápsulas con hidrolizado presentan un crecimiento mayor que las dietas adicionadas con espermina, cuya diferencia



es significativa, entre ambos grupos. Sin embargo no se presentan diferencias significativas entre las larvas alimentadas con alimento vivo y con hidrolizado de proteína de pescado, así como las larvas que consumieron las microcápsulas como dieta control con la adición de 0.1% y 0.33% de espermina.

Peso de larvas *Paralabrax maculatofasciatus*

Los promedios de los pesos obtenidos en este estudio son mostrados en la tabla IX. En la gráfica 2 podemos apreciar que se presentó un mayor crecimiento en aquellas larvas que fueron alimentadas con Microcápsulas conteniendo hidrolizado con proteína de pescado y 0.1% de espermina. Las larvas que tuvieron el menor crecimiento fueron aquellas a las que se les suministro la concentración 0.33% de espermina, Es importante hacer notar que la dieta de alimento vivo tuvo un menor crecimiento que la que contenía 0.1% de espermina, y mayor al crecimiento obtenido por la dieta control (MCH)

Tabla IX. Relación del peso promedio húmedo total de larvas de *Paralabrax maculatofasciatus*, por tratamiento y día, ± (desviación estándar). Abreviaturas AV= Alimento Vivo; MCH= Microcápsulas con hidrolizado de proteína de pescado (dieta control); MCH0.1%E= Dieta control (MCH) adicionado con 0.1% de Espermina; MCH0.33%E= Dieta control (MCH) adicionada con 0.33% de Espermina.

Dia	Tratamiento			
	AV	MCH	MCH0.1%E	MCH0.33%E
5	3.97E-04(2.00E-04	3.52E-04(2.00E-04		
10	4.81E-04(2.00E-04	6.21E-04(3.00E-04		
15	9.95E-04(5.00E-04	1.06E-03(6.00E-04		
20	1.46E-03(3.70E-03	1.17E-03(2.90E-03	4.52E-03(2.90E-03	1.13E-03(3.30E-03
25	2.63E-03(3.60E-03	1.55E-03(3.20E-03	5.33E-03(3.30E-03	1.14E-03(3.10E-03

□

Peso promedio en larvas de *P. maculatofasciatus*

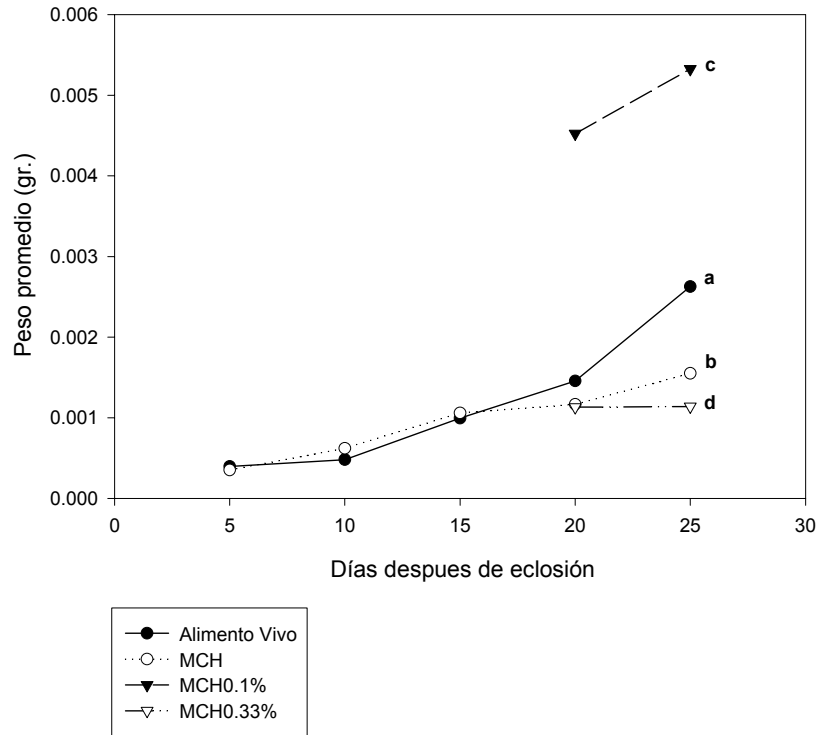


Figura 4. Comportamiento del crecimiento en peso larvas de *Paralabrax maculatofasciatus*. Promedio del peso (grs.) vs. días después de la eclosión. Las literales significan las diferencias entre tratamientos ( $P < 0.05$ ).

### Diseño de oligonucleótidos

Para obtener la secuencia de los genes Amilasa y GAPDH, se utilizaron los oligonucleótidos diseñados para la Lubina europea, *Dicentrarchus labrax*, y los de IgM para el bagre de canal *Ictalurus punctatus* y son mostrados en la Tabla X.

Tabla X. Relación de los oligonucleótidos utilizados en este estudio.

Oligonucleótido	Secuencia
IgM Dir	5' GTT TAC TTG CTC GCT CC 3'
IgM Rev	5' CTG GAT ATG TGG CGC AC 3'
Amilasa Dir	5' TTY GAG TGG CGC TGG 3'
Amilasa Rev	5' RGG CCA CAT GTG CTT 3'
GADPH Dir	5' GCC ATC AAT GAC CCC TT 3'

GADPH Rev	5'GGT GCA GGA TGC ATT GC 3'
-----------	-----------------------------

Se obtuvieron las secuencias parciales de Amilasa e IgM, registradas en el Banco de Secuencias GenBank <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Los resultados obtenidos se muestran en la Apéndice I y II. La secuencia parcial de Amilasa se puede consultar en línea en la dirección <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&val=58429132> y la secuencia parcial del gen de Inmunoglobulina M en la dirección <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&val=58429131>.

Una vez obtenidas las secuencias, se rediseñaron oligos para la cuantificación por tiempo real usando la bioquímica de Syber Green® (Applied Biosystems) que consiste en el uso de oligonucleótidos marcados con moléculas de bajo peso molecular, que emiten fluorescencia al encontrarse intercalados en la hebra de ADN y de esta manera poder ser detectada.

Tabla XI. Secuencias de los oligonucleótidos utilizados para Syber Green

Nombre del Oligonucleótido	Gen	Secuencia
<b>AmilcaF</b>	Amilasa	5'GAA GTC CTT CTT GGC AGC AC 3'
<b>AmilcaR</b>	Amilasa	GATCACCAGATGCAACAACG
<b>IgMCaF</b>	Inmunoglobulina M	GTG AAC AAT GAC CCT GAC TT
<b>IgMCaR</b>	Inmunoglobulina M	AAT TCA GCT GGC CGT ACA CT
<b>GAPDHCaF</b>	GADPH	GCT TCA AGG GTG AGG TCA AG
<b>GAPDHCaR</b>	GADPH	CTG GGT GCA GAG ATG ATG ACC

A partir de que la tecnología Syber Green no funcionó conforme lo esperado, se nos propuso implementar la bioquímica de Taqman® (Applied Biosystems) que consiste en el uso de sondas específicas que funcionan como tercer iniciador actuando como un reportero del número de copias que se producen en cada ciclo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Las

sondas fueron diseñadas por Applied Biosystems ([www.appliedbiosystems.com](http://www.appliedbiosystems.com)), de la secuencia obtenida previamente de cabrilla arenosa *Paralabrax maculatofasciatus* y publicada en GenBank.

Los resultados obtenidos con Taqman se muestran en las Tablas XII a XIV.

Tabla XII. Relación de  $\Delta C_t$  para la validación de los ensayos. Validación de amilasa, en los diferentes tratamientos. Abreviaturas AV= Alimento Vivo; MCH= Microcápsulas con hidrolizado de proteína de pescado (dieta control); MCH0.1%E= Dieta control (MCH) adicionado con 0.1% de Espermina; MCH0.33%E= Dieta control (MCH) adicionada con 0.33% de Espermina

<b>Tratamiento Amilasa</b>				
<b>Día</b>	<b>AV</b>	<b>MCH</b>	<b>MCH0.1%E</b>	<b>MCH0.33%E</b>
<b>0</b>	9.29			
<b>5</b>	10.74333			
<b>10</b>	14.35667			
<b>15</b>	1.22	9.6	3.869967	11.37667
<b>20</b>	15.52667	10.08333		11.32667
<b>25</b>	9.973333	8.406667	11.4	8.216667

### Curva Validación Amilasa

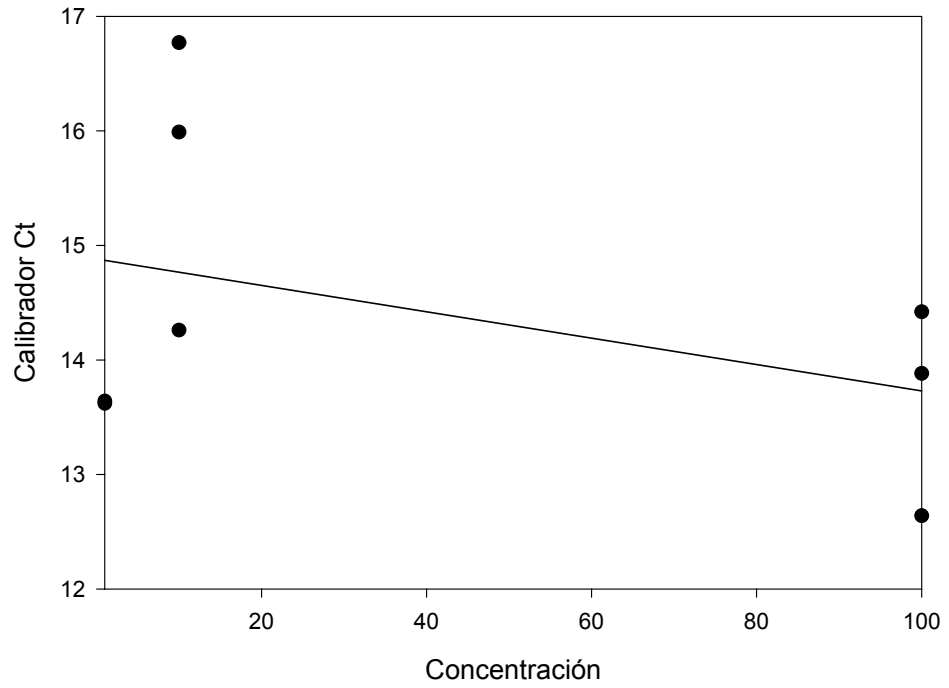
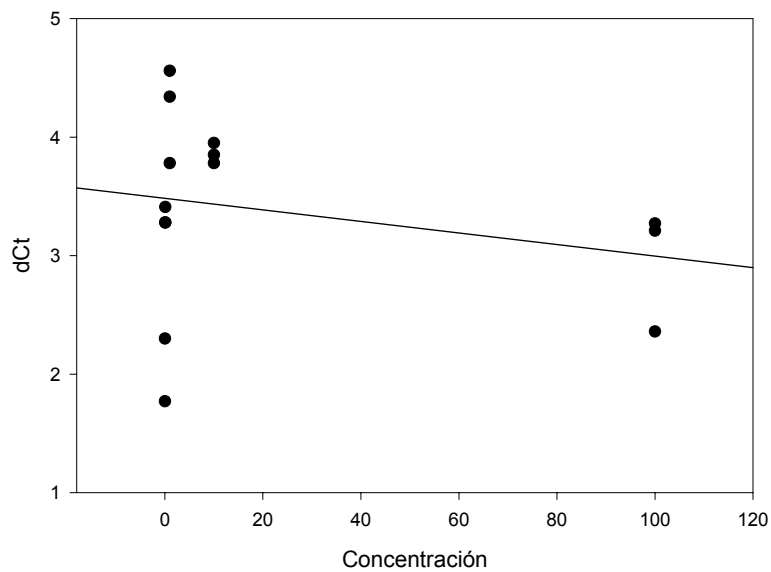


Figura 5. Curva de validación para el rango dinámico de amilasa. Concentración de cuatro diluciones seriadas de ADNc de cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* versus  $\Delta Ct$  (calibrador).

Tabla XII. Relación de  $\Delta Ct$  para la validación de los ensayos. Validación de inmunoglobulina M, en los diferentes tratamientos. Abreviaturas AV= Alimento Vivo; MCH= Microcápsulas con hidrolizado de proteína de pescado (dieta control); MCH0.1%E= Dieta control (MCH) adicionado con 0.1% de Espermina; MCH0.33%E= Dieta control (MCH) adicionada con 0.33% de Espermina

Día	Tratamiento IgM			
	AV	MCH	MCH0.1%E	MCH0.33%E
0	1.97333			
5	8.383333			
10	14.20333			
15	-3.08333	6.98	1.0233	11.54333
20	17.72	7.68		9.226667

Curva validación IgM



25	12.67333	3.883333	11.03333	2.95
----	----------	----------	----------	------

Figura 6. Curva de validación para el rango dinámico de inmunoglobulina M. Concentración de cuatro diluciones seriadas de ADNc de cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* versus  $\Delta Ct$  (calibrador).

Se realizaron ensayos de amplificación mediante la tecnología Taqman y en base al umbral de detección (punto de intensidad de fluorescencia en la fase

geométrica de la reacción) o Ct por sus siglas en ingles (Cycle threshold), se realizó una cuantificación relativa.

Las Figs. 7, 8 y 9 muestran la eficiencia de amplificación obtenida para Inmunoglobulina, Amilasa y 18s respectivamente, obtenidas mediante un rango dinámico en diluciones seriales.

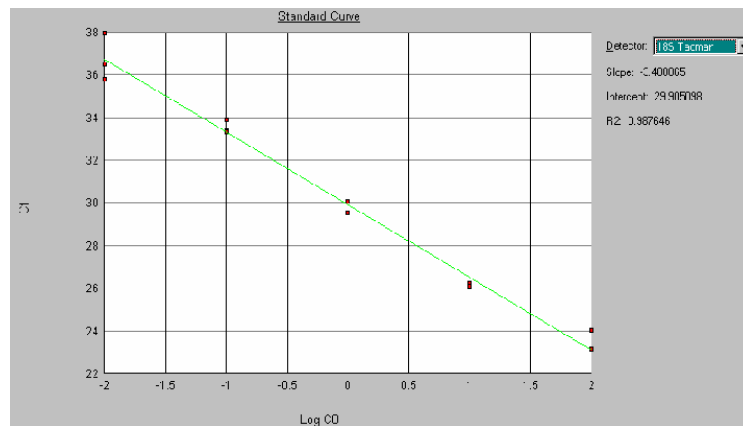


Figura 7. Eficiencia de amplificación para el gen 18s Cycle threshold o Umbral de detección (Ct) versus Logaritmo de la Concentración Inicial de cinco diferentes diluciones seriadas decimalmente.

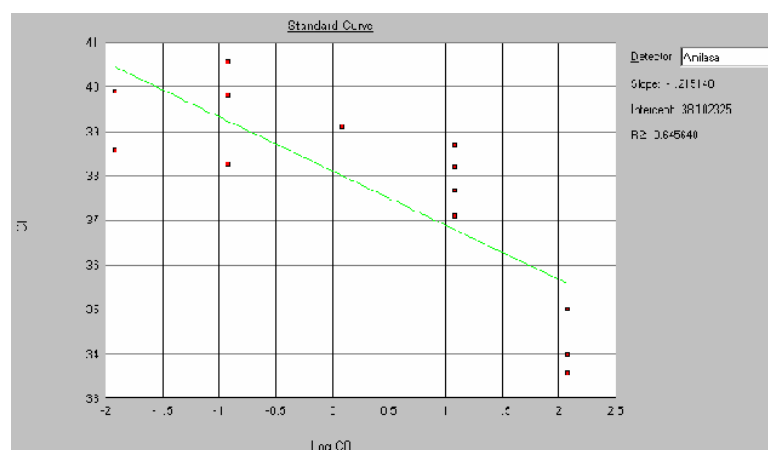


Figura 8. Eficiencia de amplificación para el gen Amilasa. Cycle threshold o Umbral de detección (Ct) versus Logaritmo de la Concentración Inicial de cinco diferentes diluciones seriadas decimalmente.

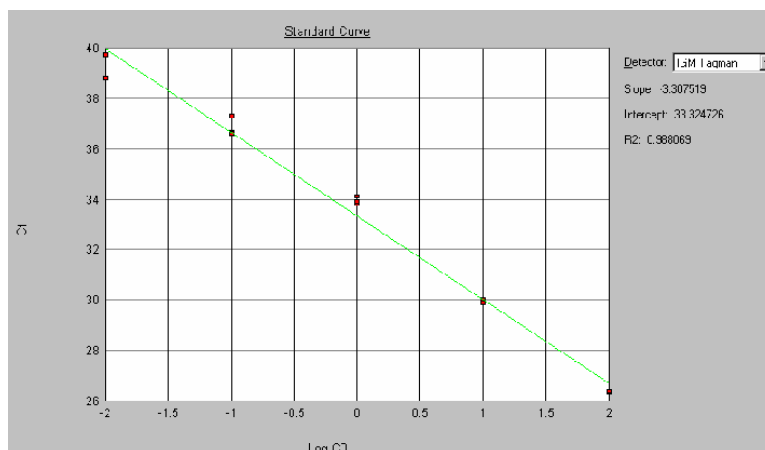


Figura 9. Eficiencia de amplificación para el gen IgM. Cycle threshold o Umbral de detección (Ct) versus Logaritmo de la Concentración Inicial de cinco diferentes diluciones seriadas decimalmente.

Podemos observar que la desviación estándar entre los diferentes puntos fue menor a 0.2 unidades de Ct. Finalmente, la pendiente de la recta obtenida como producto de la amplificación de diferentes diluciones de IgM y 18s, fue cercana a -3.32. En IgM obtuvimos una eficiencia de amplificación igual a 93.75% y en 18s el porcentaje corresponde a 96.875%, lo que se considera como un porcentaje de amplificación aceptable.

Tabla XIII. Cuantificación relativa para la amilasa mediante el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

Dia	Tratamiento		$2^{-\Delta\Delta Ct}$ AMYL	
	AV	MCH	MCH0.1%	EMCH0.33%E
5	0.365177			
10	0.029839			
15	268.72750	806642	42.81467	0.235424
20	0.013261	0.577009		0.243726
25	0.622725	1.844632	0.231647	2.10429



### ddCt de la expresión génica de Amilasa

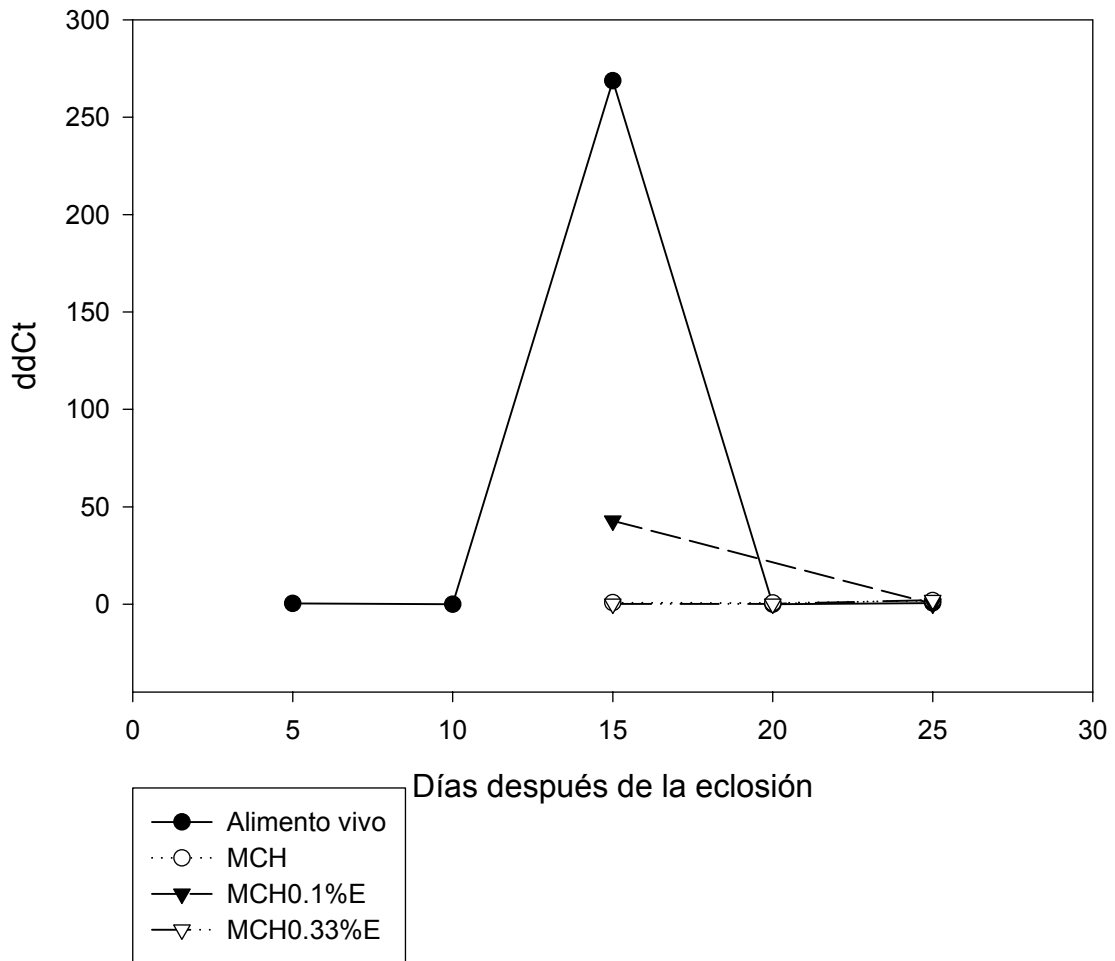


Figura 10. Comportamiento de la expresión génica de amilasa en larvas de cabrilla arenera *P. maculatofasciatus*. Días después de la eclosión versus  $2^{\Delta\Delta Ct}$

Tabla XIV. Cuantificación relativa para la inmunoglobulina M el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

Dia	Tratamiento		$2^{-\Delta\Delta Ct}$ IGM	
	AV	MCH	MCH0.1%E	MCH0.33%E
5	0.01176			
10	0.000208			
15	33.281920	0.031106	1.931917	0.001316
20	1.82E-050	0.019148		0.006554
25	0.0006010	0.266093	0.001874	0.508152

## ddCt Expresión génica Inmunoglobulina M

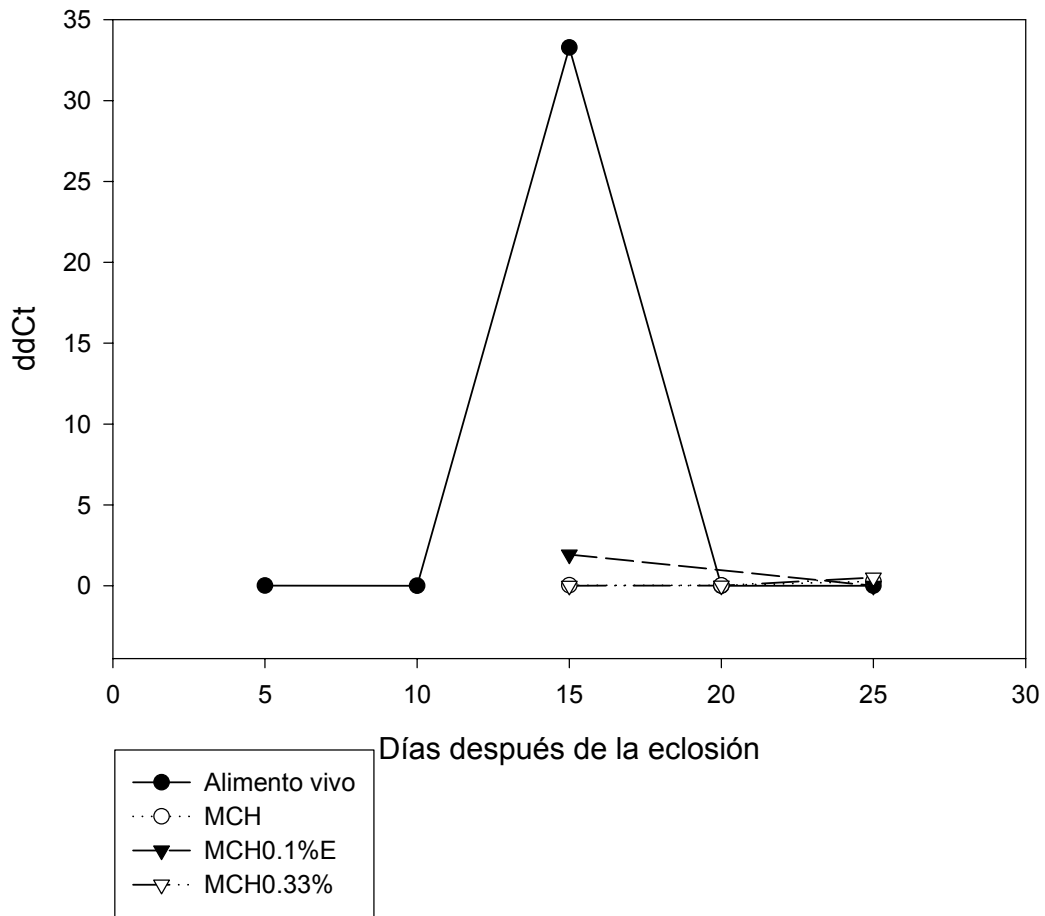


Figura 11. Comportamiento de la expresión génica de inmunoglobulina M en larvas de cabrilla arenera *P. maculatofasciatus*. Días después de la eclosión versus  $2\Delta\Delta Ct$

## DISCUSIÓN

En relación al crecimiento de las larvas (Figs 3 y 4), podemos apreciar que solo en el tratamiento con alimento vivo no observamos una diferencia significativa ( $P \leq 0.05$ ) con respecto a los demás días en el día 20, que marca el día final de la coalimentación; sin embargo, este mismo tratamiento cinco días después del destete, podemos apreciar que ya se presenta una diferencia marcada entre dos grupos, por un lado tenemos un incremento de las larvas a las que se les suministro alimento vivo y microcápsulas con hidrolizado de proteína de pescado (MCH), y por el otro, un menor crecimiento en las dietas inertes con adición de espermina (MCH0.1%E y MCH0.33%E). Entre los días 20 y 25 se observa un incremento en el crecimiento con la dieta control (MCH) sin diferencia significativa con la del alimento vivo. A pesar que esperábamos que las larvas alimentadas con algunas de las concentraciones de espermina tuvieran un crecimiento mayor al observado, no fue así, por lo que podemos concluir que el tratamiento con la dieta control (MCH) tuvo un efecto positivo en el crecimiento en talla de la larva. Al no existir una diferencia de crecimiento entre larvas alimentadas con presas vivas y aquellas alimentadas con microcápsulas, podemos afirmar que se pueden incorporar los microcápsulas con hidrolizado de proteína de pescado y aunque no tiene un efecto positivo en el crecimiento de las larvas y los resultados sean muy parecidos entre sí, las microcápsulas no requieren tanto esfuerzo de producción como lo hace el alimento vivo con el cultivo de rotíferos y *Artemia sp.*, y sus efectos adicionales a este respecto en crecimiento.

Con respecto a los análisis de varianza realizados para los datos normalizados de peso de larvas de *Paralabrax maculatofasciatus*, y como

podemos apreciar en la Gráfica 13425, hubo un aumento significativo en el peso de larvas alimentadas con la dieta de microcápsulas con hidrolizado de proteína de pescado adicionado con 0.1% de espermina (MCH0.1%E); el peso obtenido con alimento vivo, es significativamente menor, así como las dietas control (MCH) y con la adición de espermina 0.33%. Osse y Van den Boogaart, (1995), mencionan que en ciertas especies de peces, es más adecuado tomar en cuenta el crecimiento antes que la edad, pues el tamaño nos ofrece una aproximación más clara del estado nutricional del organismo. Por tanto, podemos concluir que la dieta con microencapsulados de hidrolizado de proteína de pescado con 0.1% de espermina adicionada (MCH0.1%E) tuvo un efecto positivo en el crecimiento por peso en las larvas, observando resultados en tan solo cinco días de consumo (20-25 dde) y así, podemos confiar que estos resultados nos darán una pauta para dar un paso adelante en los sistemas de crianza larvaria. Cabe mencionar que el hecho que la dieta con 0.33% de espermina no halla tenido el efecto deseado en el crecimiento larvario, puede deberse a la formulación de la misma, puesto que alteró considerablemente la apariencia física, ocasionando una consistencia terrosa la cual formaba agregados y resultó en la partición de las microcápsulas.

García-Gómez (comentario personal, 2005) realizó una evaluación de la eficiencia de microencapsulación en el tratamiento control con hidrolizado de proteína de pescado, la cual determinó la estabilidad de las microcápsulas en el agua de mar. Esta prueba consistió, en la cuantificación del amonio lixiviado de las microcápsulas, utilizando 100 mg de cada tipo de microcápsula. Dicha cantidad fue colocada por separado en pequeños paquetes de malla con una luz de 300  $\mu$ m. Los paquetes fueron colocados en vasos de precipitado con

agua de mar filtrada y mantenida a temperatura ambiente. Las microcápsulas fueron mantenidas en agua de mar durante 30 minutos y se tomaron muestras de agua cada 10 minutos. La cuantificación de amonio disuelto en agua fue lograda mediante el método propuesto por Strickland y Parson (1972). Los resultados muestran un 65% de estabilidad en el agua de mar. Esto nos indica que al término de los 30 minutos la calidad de la microcápsula pierde un 35%, por lo cual creemos que, como observamos en la apariencia física de los microencapsulados con la adición de espermina de 0.33% mostró un cambio físico desfavorable, entonces pensamos que la calidad de las microcápsulas fue inferior al término de los 30 minutos, por lo tanto suponemos que la larva no pudo completar los requerimientos adecuados con las concentraciones de espermina. A este respecto podemos mencionar, que dado que los resultados en el crecimiento por talla demostraron un crecimiento similar entre el alimento vivo y las microcápsulas control (MCH) y en aquellos resultados de crecimiento por peso tienen efectos positivos con la dieta de microencapsulados de hidrolizado de proteína de pescado con 0.1% de espermina, entonces recomendamos utilizar un método de alimentación inerte adicional para corroborar que el efecto del aumento en talla de las larvas alimentadas con las microcápsulas fraccionadas, sea realmente por este hecho y no descartar aun la posibilidad, de que la espermina siendo suministrada adecuadamente sea un importante aditivo utilizado en los larvicultivos, sobre todo en la concentración 0.33%. Sin embargo, si observamos particularmente los resultados con la adición de espermina 0.1% en el crecimiento de la larva en peso, podemos recomendar entonces el uso de este probiotico y además el uso de microcápsulas desde el día 15 a 20 dde.

Entre los días 1 y 5 dde hubo un bajo recambio de agua y en los días 14 y 15 se disminuyó la cantidad de rotíferos /mL suministrada a las larvas, aunado al comienzo de la coalimentación. Estos factores afectaron el desempeño de las larvas, puesto que el día 16 dde se presento una alta mortandad. Si pensamos en que condiciones pudieron producir este efecto, podemos pensar que las condiciones que imperaron anteriores al destete como la falta de un suministro adecuado de rotíferos, pudo haber retrasado en cierta medida la maduración del tracto gastrointestinal, y la larva, por tanto no estaba capacitada para el cambio de dieta con alimento vivo a inerte. Alvarez *et al.* (2001) y Peña (2003) mencionan que las larvas tienen todos los mecanismos enzimaticos adecuados para poder completar un destete en el día 15 del desarrollo embrionario, por lo que se decidió implementar en este momento el destete, sin embargo, podríamos señalar que debería realizarse una revisión mas minuciosa de las condiciones gastrointestinales que imperan en la larva y que les permita subsistir este momento particularmente delicado. Se recomienda realizar un ensayo en las mismas condiciones que el presente trabajo, pero quizás con otros genes marcadores para así conocer la expresión adicionando la espermina en microcápsulas que sean elaboradas con otros métodos como lo son la coacervación (donde el agente encapsulante es una gelatina) o encapsulamiento en liposomas y se recomienda también el uso de dietas microparticuladas de igual manera. Esto nos daría una aproximación más acertada para conocer la maduración gastrointestinal. En este sentido, también sugerimos aumentar los días de muestreo, en la medida de lo posible.

Adicionalmente al análisis de los datos de supervivencia y crecimiento con la adición de espermina a la dieta en microcápsulas, nosotros obtuvimos

los niveles basales en la expresión génica de la enzima digestiva Amilasa y de la inmunoglobulina M. Hemos mencionado que la larva presenta una maduración gastrointestinal hasta el día 15 después de la eclosión. En este sentido, podemos discutir la expresión de los dos genes por separado.

La desviación estándar entre los diferentes puntos fue menor a 0.2 unidades de Ct. La correlación lineal entre los puntos determinó la eficiencia de amplificación, y no se ve afectada por la cantidad de templado inicial y es la misma en el rango de detección probado. Finalmente, la pendiente de la recta obtenida como producto de la amplificación de diferentes diluciones de IgM y 18s, fue cercana a  $-3.32$ . En IgM obtuvimos una eficiencia de amplificación igual a 93.75% y en 18s el porcentaje corresponde a 96.875%, lo que se considera como un porcentaje de amplificación aceptable. Por lo que la validación del método empleado nos permite discutir los resultados obtenidos en la expresión genica de amilasa e inmunoglobulina M en detalle.

Los resultados del ANOVA de una vía con datos normalizados para la expresión de la amilasa, nos indican que los diferentes tratamientos al final de la corrida larvaria (25dde) no presentaron diferencias significativas entre ellos ( $P \geq 0.05$ ). La expresión de amilasa con la dieta viva se mantiene constante en los 5-10 dde, e inmediatamente observamos un incremento significativo entre los días 10 y 15 dde, para presentarse un decremento en los siguientes 5 días (15-20 dde), coincidiendo con los días en los que se realizó la coalimentación. En los días 20 y 25, la expresión génica de la amilasa se mantiene constante.

Desde la eclosión hasta el día 2 dde, las larvas de la cabrilla arenera dependen exclusivamente de una nutrición endógena. Peña *et al.* (2003) reportan que los primeros signos de absorción de nutrientes se observa dos

días después que la alimentación exógena comienza, y donde podemos relacionar el incremento observado en la expresión de la enzima digestiva amilasa a partir del día 10 dde. De igual modo podemos citar que el borde de cepillo y algunos gránulos en los enterocitos de ambos intestinos son PAS-positivo, lo que indica la presencia de glicógeno (Peña, 2003)

El desarrollo de larvas de *Paralabrax maculatofasciatus* fue descrito por Tanaka (1973) y más tarde por Alvarez-González y colaboradores (2001), reportando una actividad amilasa desde el 1 dde, comprobándose esto último mediante análisis histoquímico. La larva comienza a alimentarse con presas vivas a partir de que se presenta la apertura bucal. La cual se observa a partir del 2 dde, al igual que la apertura anal. Este aumento en la expresión génica coincide con una diferenciación del tracto digestivo en seis regiones: bucofaringe, esófago y estómago; intestino anterior; intestino posterior y recto. El intestino anterior y posterior están delineados por una capa simple de células epiteliales columnares con borde de cepillo (Peña *et al.*, 2003). Las células de la mucosa son más abundantes en el intestino anterior. Es muy importante recordar que la maduración del tracto digestivo comienza con el aumento de células epiteliales de tipo borde de cepillo en el intestino anterior. Se sabe que en el 10 dde, la mucosa superior de la bucofaringe aparece más densa. Aparecen los dientes faríngeos y algunos brotes del gusto. El páncreas está totalmente difuso en el estómago, hígado, y el intestino anterior tal y como se observan en juveniles y adultos (Peña, 2003).

Alvarez-González y colaboradores (2001) encontraron que la actividad amilasa durante la ontogenia de *Paralabrax maculatofasciatus*, presenta un incremento durante los 3 primeros días de vida de la larva, para después



mantenerse constante hasta el día 15 y elevarse nuevamente para el día 18. En los días 25 y 30, la actividad amilasa disminuye fuertemente hasta casi desaparecer. Nosotros encontramos que la expresión de amilasa se mantuvo constante hasta los 10 dde para presentar un incremento hasta los 15 dde. La expresión génica disminuye considerablemente hasta los 20 dde. Esto puede ser debido a que en día 15 se inició con el destete utilizando una dieta completa. Los datos de la actividad de Amilasa de Alvarez y colaboradores (2001) presentaron un incremento exponencial por organismo hasta el día 45 después de la eclosión, lo que permite suponer que la actividad amilasa de las larvas de la cabrilla arenosa es baja, pero es suficiente para aprovechar en cierta medida la cantidad de carbohidratos disponibles en el alimento vivo y en la dieta completa. Al observar el zimograma de actividad amilasa, se marcaron cuatro bandas de actividad en la parte superior de la electroforesis, aunque aparentemente son isoformas de una misma enzima. Además, estas cuatro bandas se mantienen durante los primeros 7 días de vida de la larva, para después solamente observarse una en la misma posición. Se debe mencionar, que al realizar las técnicas electroforéticas, no fue posible revelar la actividad amilasa en los alimentos vivos, por lo que los resultados deben ser interpretados con cierta cautela en este punto. En conclusión, se puede decir que las larvas de la cabrilla arenosa presentan las herramientas enzimáticas completas a partir del día 12 DDE, aunque su máxima capacidad se denota entre el día 18 y el 25 dde, período en el cual se podría realizar un destete con mayores posibilidades de éxito (Alvarez *et al.*, 2001).

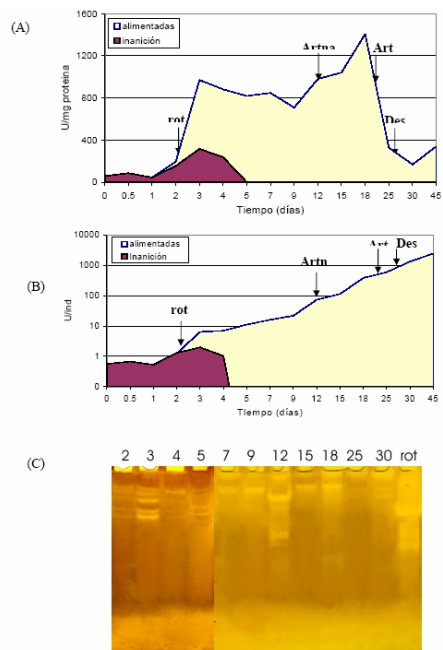


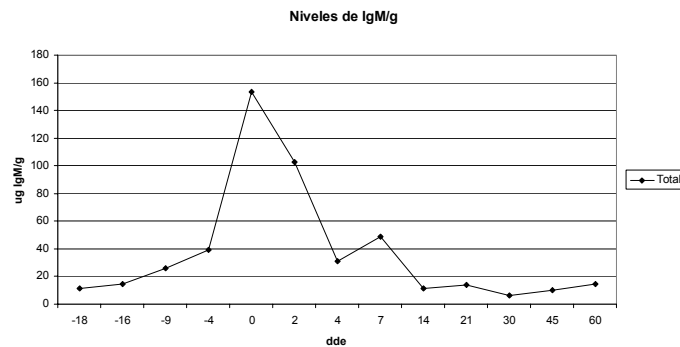
Figura 12. Ontogenia de la actividad amilasa de la cabrilla arenera. A) expresada en U/mg de proteína soluble. B) expresada en mU/larva. C) Zimograma de la actividad amilasa en condiciones nativas. Los números indican el DDE; rot: rotíferos; Des: Destete. (Graficas extraídas de Civera *et al.*, 2002)

Lo anterior confirma nuestros resultados al tener el pico de expresión génica para las larvas con alimento vivo para la amilasa mas alto en este periodo, es decir en el día 15, y teniendo un decremento significativo a partir de ese día y hasta el día 25 que es cuando se terminó la toma de muestra para las dietas control y aquellas adicionadas con espermina. Dentro de estos tres tratamientos, es decir Microcapsulado con Hidrolizado (MCH) y MCH adicionados con 0.1% y 0.33% de espermina, podemos observar que no existen diferencias significativas entre ellos y tampoco con la alimentación con presas vivas en los días 20 y 25 dde.

En el día 16 dde, encontramos un número muy bajo de larvas vivas en los tanques, teniendo entre los días 16 y 20 los mayores porcentajes de mortalidad. Nosotros suponemos que, por una parte las larvas no tenían los nutrientes adecuados para soportar un destete y además la consistencia de la dieta determino fuertemente la alta mortalidad.

Asimismo, se considera que esta especie tiene un comportamiento fisiológicamente similar a especies como la dorada, al tener un equipamiento enzimático variado y completo, capaz de aprovechar la mayoría de los nutrientes del alimento. Además, de que esta especie se podría catalogar no como un organismo totalmente carnívoro, sino como un omnívoro oportunista que puede aprovechar una amplia diversidad de presas.

Las glándulas gástricas y el primer ciego pilórico no son observados sino hasta el 16 dde. Las primeras estaban delineadas por un epitelio simple cúbico y estaban localizadas en la región intermedia y anterior del estomago (Peña,



2003). En este último se observan dos regiones: una glandular antero-media y una no glandular posterior, las cuales corresponden al corpus y píloro, respectivamente. Una capa muscular incrementada en talla en la región pilórica en el 22 dde se convierte en el esfínter pilórico. El ciego pilórico esta unido al intestino anterior, justo por detrás del esfínter pilórico. Varias células PAS-positivas están intercaladas en la mucosa. En el 22 dde, cuatro ciegos pilóricos están presentes. Su estructura es similar a aquellos observados en el intestino anterior.

Figura 13. Niveles de IgM en huevos, embriones y alevines de *Oncorhynchus mykiss*. (Tomado y modificado de Mor y Avtalion, 1990)

Diversos estudios confirman que es natural la ocurrencia de la transferencia maternal de Inmunoglobulinas en diversas especies de peces

tales como *Pleuronectes plateas* (Bly et al., 1986), *Poecilia reticulata* (Takahashi y Kawahara, 1987) y *Oreochromis aureus* (Mor y Avtalion, 1988, 1990). Castillo y colaboradores, (1993) cuantificaron los niveles de IgM en huevos sin fertilizar, en embriones y alevines de la Trucha arcoiris *Oncorhynchus mykiss* demostrando con esto que los niveles aumentan hasta el momento de la eclosión, comprobando así que hay una transferencia maternal de IgM al huevo y por tanto al embrión (Grafica xx). Aunque esta especie es dulceacuícola, y posee ontogenia directa a diferencia de la cabrilla arenera, este trabajo marca una base muy importante, puesto que hay muy pocos trabajos de esta naturaleza para peces marinos, y los niveles de Inmunoglobulina no se han estudiado a nivel molecular. Por lo que nuestro trabajo, es una base para el estudio de los niveles basales de expresión de IgM en larvas de peces marinos alimentadas con alimento vivo y dietas microencapsuladas. Con este trabajo, demostramos que las larvas de cabrilla arenera poseen un decremento de expresión génica en los primeros días de cultivo, coincidiendo el pico mas alto de este aumento en el día 15, justo cuando nuestros organismos poseen la maquinaria enzimática lista, marcando con esto la maduración gastrointestinal. La grafica 87432982792 nos muestra la cuantificación relativa de la expresión de IgM, con respecto a la cuantificación de niveles basales en huevos. Este patrón de la IgM, coincide con el observado en los niveles de expresión génica de la amilasa para el mismo organismo y podemos concluir que pudiera ser debido a que la larva esta madura en el día 15 de desarrollo. No debemos olvidar que en esta etapa la coalimentación comienza, y que ésta se eligió porque la cabrilla parece

poseer la maquinaria enzimática lista para poder tener una alimentación exógena exitosa.

Existen varios eventos que conducen a la generación de una larva morfológicamente y fisiológicamente activa: la expresión de la IgM en células del intestino anterior, una vez establecida la mucosa intestinal, cuando ocurre una actividad enzimática digestiva extracelular y la decadencia de la actividad amilasa.

Sin embargo, y analizando todos los aspectos aquí expresados, podemos decir que la larva tiene su máximo de expresión de amilasa e IgM entre los días 15 y 20 de desarrollo coincidiendo con el hecho de que en estos días la larva posee las herramientas enzimáticas completas para poder obtener una alimentación exitosa. También podemos concluir que aun cuando los resultados son mostrados en días después de la eclosión, deberíamos relacionar el crecimiento del pez, para tener una mayor aproximación, algunos autores manejan la idea de dar énfasis al peso de larva, mas que a la edad, de esta manera podemos darnos cuenta si la larva esta desnutrida con resultados reales y no basado en el tiempo que ha transcurrido a partir de la eclosión, que a diferencia podemos decir que como en nuestro caso se presentaron situaciones adversas a lo largo de la crianza, podemos tomar decisiones en cuanto a la fecha exacta en que se puede llevar a cabo la coalimentación. Pensamos que a pesar de que los resultados terminan en el día 25, larvas mejor nutridas responderían de manera mas exitosa a los diferentes tratamientos, enfocando nuestra atención al elemento adicionado con espermina en concentración 0.1%.

Nuestra mirada se debe centrar ahora en poder concluir si se puede evitar la fragmentación de las diferentes dietas con espermina, y si no es así, podríamos probar otra manera de suministro para las mismas, tales como los microparticulados, tradicionalmente usados en cultivos larvarios, o incluso adicionando levaduras secretoras de poliaminas, las cuales ya se ha demostrado su efecto benéfico en adultos de lubina y cabrilla Tovar et al., 2002-2004).

Los patrones en los niveles basales de expresión de Amilasa e IgM coinciden con diversos trabajos. Esto nos permite enfocar nuestra atención en estos genes y recomendarlos como marcadores moleculares de maduración gastrointestinal en larvas de cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus*.

## **Conclusiones**

El crecimiento por talla de las larvas se vio afectado positivamente por el suministro de dietas microcapsuladas de hidrolizado de pescado, a diferencia del suministro de aquel alimento adicionado con espermina (concentraciones 0.1% y 0.33%). No así comparado con el efecto de la dieta con alimento vivo, mismo en el que no se encontró ningún incremento.

Se encontró un efecto mayor en el crecimiento por peso de las larvas alimentadas con dieta microcapsulada de hidrolizado de proteína de pescado con la adición 0.1% de espermina, mientras que los demás tratamientos experimentales no resultaron con efectos significativos.

El PCR en tiempo real es sin duda una herramienta muy potente para la cuantificación de la expresión génica, puesto que gracias a su naturaleza, en tiempo real, pudimos encontrar los niveles basales de la larva en condiciones estándar de una corrida larvaria de los genes Amilasa e Inmunoglobulina M

En el caso de la inmunoglobulina M la cuantificación relativa de la expresión genica en este trabajo se reconoce como un avance muy importante, puesto que existen escasos trabajos relacionados con la actividad, y aún menos con la expresión génica en larvas de peces marinos.

De cualquier manera el objetivo de conocer los niveles basales en la expresión de los genes anteriormente expuestos, es muy importante por si mismo, pues nos permite entender la forma como opera la expresión génica como primer aproximamiento.

La expresión de los niveles basales de amilasa e inmunoglobulina M sirven como marcadores moleculares de maduración gastrointestinal en larvas de cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus*.



## Literatura citada

- Allen, L.G. 1985. A habitat analysis of the nearshore marine fishes from southern California. Bulletin Southern California Academic Science. 84:133-155.
- Allen, L.G., Hovey, T.E., Love, M.S. y Smith J.T.W. 1995. The life history of the Spotted Sand bass (*Paralabrax maculatofasciatus*) within the southern California bight. CalCOFI Rep., Vol. 36.
- Alvarez-González, C.A., Ortiz-Galindo, J.L., Dumas, S., Martínez-Díaz, S.F., Hernández-Ceballos, D.E., Grayeb del Alamo, T., Moreno-Legorreta, M., Peña-Martínez, R., y Civera-Cerecedo, R. 2001. Effect of stocking density on the growth and survival sand bass *Paralabrax maculatofasciatus* larvae in a closed recirculating system. Journal. World Aquaculture Soc. 32, 130-137.
- Andlid, T., Juárez, R.V. y Gustafsson, L. 1995. Yeast colonizing the intestine of Rainbow Trout (*salmo gairdneri*) and Turbot (*Scophthalmus maximus*) Microb. Ecol. 30:321-324.
- Avilés-Quevedo, A., McGregor-Pardo, U., Rodríguez-Ramos, R., Morales-Castro, O., Huerta-Bello, M. A., Lizawa, M. 1995. Biología y cultivo de la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* (Steindachner,1868). Secretaría de Pesca. Instituto Nacional de la Pesca. JICA. México, 85 pp.
- Avilés-Quevedo, A., Rodríguez-Ramos, R., y Méndez-López, L., 2002. Evaluación de *Brachionus plicatilis* cultivado con cinco dietas de fitoplancton y levadura, en el crecimiento y mortalidad de larvas de

- Paralabrax maculatofasciatus*. Acta Científica. CRIP-La Paz, B.C.S. 1, 11-17.
- Bakan, J., 1973. Microencapsulation of foods and related products. *Food Technology* November. Pp. 34-44.
- Balassa, L., Brody, J., 1968. Microencapsulation. *Food Engineering* November, 88-91.
- Bardocz S. 1993. The role of dietary polyamines. *European Journal of Clinical Nutrition*, 47, 683-690
- Bardocz S, Brown DS, Grant G. 1990. Luminal and basolateral polyamine uptake by rat small intestine stimulated to grow by *Phaseolus vulgaris* lectin phytohaemagglutinin in vivo. *BBA* 1990;**1034**:46–52.
- Bardocz S, Duguid TJ y Brown DS, 1995. The importance of dietary polyamines in cell regeneration and growth. *Br J Nutr* 1995;**73**:819–28.
- Bernabé, G. y Guissi, A. 1994. Adaptation of the feeding behavior of larvae of the sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.), to an alternating live-food/compound-food regime. *Aqua. Fisher. Man.* 25, 537-546.
- Boeuf, G., Boujard, D. y Person-Le Ruyet, J. 1999. Control of the somatic growth in turbot. *J. Fish Biol.* 55, 128-147.
- Brazel, C. S., 1999. Microencapsulation: Offering solutions for the food industry. *Cereal Foods World* 44(6): 388-393.
- Bromage, N. y Shepard, J. 1990. Intensive fish farming. BSP. Inglaterra.
- Buts, J.P., De Keyser, N., Kolanowsky, J., Sokal, E., Van Hoof, F., 1993. Maturation of villus and crypt cell functions in rat small intestine. *Digestive Diseases and Sciences*, 38 (6), 1091-1098.

- Buts, J.P., Keyser, N., Raedemaeker, L.. 1994. *Saccharomyces boulardii* enhances rat intestinal enzyme expression by endoluminal release of polyamines, *Pediatric Research*, 36 (4), 522-527.
- Butler J.L. , Moser H.G., Hageman G.S. y Nordgren L.E. 1982. Development stages of three California Sea basses (*Paralabrax*, Pisces, Serranidae) *CalCOFI Rep.*, Vol. XXIII, 1982.
- Cahu, C.L. y Zambonino-Infante, J.L. 1994. Early weaning of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae with a compound diet: effect on digestive enzymes. *Comp. Biochem. Physiol.* , 2:213-222.
- Cahu, C.L. y Zambonino Infante, J.L. 1995. Maturation of the pancreatic and intestinal digestive functions in sea bass (*Dicentrarchus labrax*): effect of weaning with different protein sources. *Fish Physiol. Biochem.*, 14(6): 431-437.
- Casero, R. A., and Woster, P. M. (2001) Terminally alkylated polyamine analogues as chemotherapeutic agents. *J. Med. Chem.* **44**, 1–26
- Castelló-Orvay, F. 1993. *Acuicultura marina: Fundamentos biológicos y tecnológicos de la producción*. Publicaciones de la Universidad de Barcelona. 739 p. Tesis de Alfonso
- Castillo A. 1993. Ontogeny of IgM and IgM bearing cells in rainbow trout. *Developmental and comparative Immunol.* 17: 419-424
- Civera, R., Ortiz, J.L., Dumas, S., Nolasco, H., Alvarez, A., Anguas, B., Peña, R., Rosales, M., Carrasco, V., García, R. y Goytortúa, E. 2002. Avances en la nutrición de la cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*). In: Cruz-Suárez, L. E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Gaxiola-Cortés, M. G., Simoes, N. (Eds.). *Avances en Nutrición Acuícola VI. Memorias del VI*

Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 3 al 6 de Septiembre del 2002. Cancún, Quintana Roo, México.

Cohen, S. S. (1998) *A Guide to the Polyamines*, Oxford University Press, New York

Cox, E.S. y Pankhurst, P.M. 2000. Feeding behaviour of greenback flounder larvae, *Rhombosolea tapirina* (Günther) with differing exposure histories to live prey. *Aquaculture* 183, 285-297.

Dabrowski, K., Glogowski, J., 1977. Studies on the role of exogenous proteolytic enzymes in digestion process in fish. *Hydrobiologia*, 54, 129-134.

Douki, T., and Bretonniere, Y. (2000) Protection against radiation-induced degradation of DNA bases by polyamines. *J. Cadet. Radiat. Res.* **153**, 29–35

Dowling RH. Cellular and molecular basis of intestinal and pancreatic adaptation. *Scand J Gastroenterol* 1992;**27**(suppl 193):64–7.

Dufour, C., Dandrifosse, G., Forget, P., Vermesse, F., Romain, N., Lepoint, P., 1988. Spermine and spermidine induce intestinal maturation in the rat. *Gastroenterology*, 95, 112-116.

Ehrlich, K.F., Cantin, M.C., Rust, M.B. y Grant B. 1989. Growth and survival of larval and postlarval a smallmouth bass fed a commercially prepared dry feed and/or *Artemia nauplii*. *J. World Aqua. Soc.* 20. 1-6.

FAO, 1986-1995. *Aquaculture Statistics*, Fisheries Circular No. 815, Revision 9.

FAO. 2004. *El Estado mundial de la pesca y la acuicultura (SOFIA)*.  
[www.fao.org](http://www.fao.org)

Fanger G. O., 1974. *Microencapsulation*. Plenum Press, Nueva York.

- Fernández-Palacios, H., D. Montero, J. Socorro, M.S. Izquierdo y J.M. Vergara. 1994. First studies on spawning, embryonic and larval development of *Dentex gibbosus* (Rafinesque, 1810) (Osteichthyes, Sparidae) under controlled conditions. *Aquaculture* 122:63-73.
- Fioramonti, J., Fargeas, M.J., Bertarnd, B., Pradayrol., L. y Buéno, L. 1994. Induction of postprandial intestinal motility and release of cholecystokinin by polyamines in rats. *Am. J. Physiol.* 267: G960-G965.
- Gallardo M., Matilla, A., Muñoz, de Rueda, P., y Sánchez Calle M. 1996. El papel de las poliaminas en el crecimiento y desarrollo. *ARS Pharm.* 37 (1), 17-27.
- Gatesoupe, J.F. 1993. Development of fish larvae and rearing conditions in hatcheries. Costal and stuarine studies. In: Lahlou, B. and Vitiello P. (eds). American Geophysical Union. Washington DC. Capítulo 10. pp. 159-172.
- Gatesoupe, J.F. 1999. The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture.* 180: 147-165.
- Gibson U.E.M., Heid C.A., Williams P.M. Año A Novel Method for Real Time Quantitative PCR Real Time. *Genome Res.* 1996;6:995-1001.
- Gibbs, B. F., Kermasha, S., Alli, I., Mulligan, C. N., 1999. Encapsulation in the food industry: A review. *International J. Food Sciences and Nutrition* 50(3): 213-224.
- Grayeb del Alamo, T. 2001. Efecto de la densidad en el crecimiento de la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* (Percoidei: Serranidae) cultivada en jaulas. Tesis de Maestría. CICIMAR-IPN. La Paz, B.C.S., México. 110 pp.

- Ha, H. C., Sirisoma, N. S., Kuppusamy, P., Zweier, J. L., Woster, P. M., and Casero, R. A., Jr. (1998) . The natural polyamine spermine functions directly as a free radical scavenger. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 11140–11145
- Ha, H. C., Yager, J. D., Woster, P. A., and Casero, R. A., Jr. (1998b) Structural specificity of polyamines and polyamine analogues in the protection of DNA from strand breaks induced by reactive oxygen species. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **244**, 298–303
- Hastings, A.P. 1989. Protogynous hermaphroditism in *Paralabrax maculatofasciatus* (Pisces: Serranidae). *Copeia* 1, 184-188.
- Heby, O. (1981) *Differentiation* **19**, 1–20
- Henning, S.J. 1987. Functional development of the gastrointestinal tract. Physiology of the gastrointestinal tract, pp 285- 300., 2nd edition. edited by L.R. Johnson. Raven Press, New York.
- Hessels J, Kingma AW, Ferwerda H. Microbial flora in the gastrointestinal tract abolishes cytostatic effects of  $\alpha$ -difluoromethylornithine in vivo. *Int J Cancer* 1989;**43**: 1155–64.
- Hong, L., Andersson, E. M. y Helander, H.F. 1999. Reactions from rat gastric mucosa during one year of *Helicobacter pylori* infection. *Digestive Diseases and Sciences* 44:116-124
- Igarashi, K., and Kashiwagi, K. (2000) Polyamines: mysterious modulators of cellular functions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **271**, 559–564
- Ingram, G A. 1980. Substances involved in the natural resistance of fish to infection. A review. *Journal Fish. Biol.* 16: 23-60.

- Jones, D. A., Kanazawa, A., Arman, S. A., 1979. Studies on the presentation of artificial diets for rearing the larvae of *Penaeus japonicus* Bate. *Aquaculture* 17: 33-43
- Jones, D. A., Kurmaly, K., Rasad, A., 1987. Penaeid shrimp hatchery trials using microencapsulated diets. *Aquaculture* 64: 133-146.
- Jones, D. A., Holland, D. L., Jabborie, S., 1984. Current status of microencapsulated diets for aquaculture. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 10: 275-288.
- Josuweit, H., 1995. European markets for seabass, seabream and turbot, *Aquaculture Europ.* 20 (2), 6-12.
- Kanazawa, A., Teshima, S., Inamori, S., Sumida, S., Iwashita, T., 1982. Rearing of larval red seabream and ayu with artificial diets. *Mem. Fac. Fish, Kagoshima Univ* 31: 185-192
- Kaouass M, Deloyer P, Wery I. Analysis of structural and biochemical events occurring in the small intestine after dietary polyamine ingestion in suckling rats. *Dig Dis Sci* 1996;**41**:1434–44.
- Katushiro Uda, Tomoyuki Tsujikawa, Yoshihide Fujiyama, Tadao Bamba. 2003. Rapid absorption of luminal polyamines in a rat small intestine *ex vivo* model **Journal of Gastroenterology and Hepatology** Volume 18, Issue 5, Page 554-559, May 2003
- Kendall A.W., Ahlstrom E.H. y Moser H.G. 1984. Early life history stories of fishes and their characters. En: Molser, H.G., Richards, W.J., Cohen, D.M., Fahay, M.P., Kendall, A.W. y Richadson, S.L. (Eds.), *Ontogeny and Systematics of Fishes*. Amer. Soc. Ichthyol. Herpertol. Spec. Publi. I. Lawrence, 11-24.

- King, A., 1995. Encapsulation of food ingredients. En: *Encapsulation and controlled release of food ingredients* (ed. por S. Risch and G. Reyneccius), pp. 26-39. ACS Symposium Series 590, American Chemical Society, Washington D.C.
- Kobayashi M, Iseki K, Saitoh H. Uptake characteristics of polyamines into rat intestinal brush-border membrane. *BBA* 1992;**1105**:177–83.
- Kolkovsky, S., Tandler, A. e Izquierdo M.S. 1997. Effects of live food and dietary digestive enzymes on the efficiency of microdiets for sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Aquaculture*. 148:313-322
- Kondo, T., 1990. Preparation and permeability characteristics of microcapsule membranes. *J. Controlled Release* 11: 215-224.
- Konturek, P.C. 1997. Role of spasmolytic polypeptide in healing of stress induced gastric lesions in rats. *Regul. Peptides*. 68: 71-79.
- Kurokawa, T., Suzuki, T. y Andoh, T. 2000. Development of cholecystokinin and pancreatic polypeptide endocrine systems during the larval stage of Japanese Flounder, *Paralichthys olivaceous*. *General and Comparative Endocrinology*, 120, 8-16.
- Lauff, M., Hofer, R., 1984. Development of proteolytic enzymes in fish and the importance of dietary enzymes. *Aquaculture* 37, 335-346.
- Lhoste, E., Fiszlewicz, M., Gueugneau, A.M. y Corring, T. 1994. Adaptation of exocrine pancreas to dietary proteins: effect of the nature of protein and rat strain on enzyme activities and RNA levels. *J. Nutr. Biochem*. 5:84-94.
- Leu, M.Y. 1994. Natural spawning and larval rearing of silver bream *Rhabdosargus sarba* (Forssål) in captivity. *Aquaculture*. 120:115-122.



- Chr Löser, A Eisel, D Harms, U R Fölsch Dietary polyamines are essential luminal growth factors for small intestinal and colonic mucosal growth and development. *Gut* . 1999;44:12-16.
- Losordo, T.M. Masser, M.P. y Rako, J. 1998. Recirculating aquaculture tank production systems: an overview of critical considerations. SRAC publication 451, 1-6.
- Luk GD. Polyamines in normal and adaptive gastrointestinal growth. In: Dowling RH, Fölsch UR, Löser C, eds, *Polyamines in the gastrointestinal tract*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1992:205–16.
- Luzzi, L., 1970. Microencapsulation. *J. Pharmaceutical Sci.* 59(10): 1367-1376.
- Magdassi, S., Vinetsky, Y., 1996. Microencapsulation of oil-in-water emulsions by proteins. En: *Microencapsulation*. (ed. por S. Benita), pp. 21-34. Marcel Dekker, Inc. N.Y., EUA.
- Martínez-Díaz, S. F. 1995. Estudio de una enfermedad hemorrágica ulcerativa en un lote de reproductores de cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* (Steindachner, 1868): Osteichthyes; Serranidae. Tesis de Maestría en Ciencias. CICIMAR-IPN. La Paz, B.C.S., México. 94 pp
- Martínez-Díaz, S. F., Martínez-Pecero, R., Rosales-Velázquez, M. O., Alvarado-Castillo, R., Pérez-España, H., Tucker, J. W. Jr. 2001. Voluntary spawning, early development, and completion of the cycle of spotted sand bass *Paralabrax maculatofasciatus* in the laboratory. *J. World Aquaculture Soc.*, 32, 122- 129
- Marton, L. J., and Pegg, A. E. (1995) *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **35**, 55–91

- Masiakowski, P. 1982. Cloning of cDNA sequences of hormone regulated genes from the MCF-7 human breast cancer cell line. *Nucl. Acid Res.* 10: 7895-903.
- Matus-Nivón, E., Ramírez-Sevilla, R., Martínez-Pecero, R., Ortiz-Galindo, J. L. 1990. Potencial acuacultural de ocho especies de peces marinos del Pacífico mexicano, con base en su biología temprana, In: G. De la Lanza-Espino y J.L. Arredondo-Figueroa (eds.). *La acuicultura en México: De los conceptos a la producción.* Instituto de Biología. UNAM. México. pp. 67-74.
- Miller, D.J., y R.N. Lea. 1972. *Guide to the coastal marine fishes of California.* Calif. Fish Game, Fish Bull. 157, 235 p.
- Milovic V, Stein J, Piiper A. Characterization of putrescine transport across the intestinal epithelium: study using isolated brush border and basolateral membrane vesicles of the enterocyte. *Eur J Clin Invest* 1995;**25**:97–105.
- Mor, A. y Avtalion R R. 1990. Transfer of antibody activity from thr immunized mother to embryos in tilapias. *J. Fish. Biol.* 37: 249-255.
- Morgan, D. M. L. (1990) *Biochem. Soc. Trans.* **18**, 1080–1084
- Nicolas J.L., Robic E., Ansquer D. 1989. Bacterial flora associated with a trophic chain consisting of microalgae, rotifers and turbot larvae: influence of bacteria on larval survival. *Aquaculture* 83:237-248
- Oh, T. J., and Kim, I. G. (1998) *Biotech. Techniques* **12**, 755–758
- Olsen, Y A. 1997. Degradation kinetics of immunoglobulin in the egg, alevin and fry of Atlantic salmo, *Salmo salar* L., and the localization of immunoglobulin in the egg. *Fish & Sehlfish Immunol.* 7: 81-91
- Ortiz-Galindo, 1991

- Osorio-Galindo, M., 1998. Efecto de la temperatura y la salinidad en parámetros poblacionales de *Pseudodiaptomus euryhalinus* Johnson (Crustacea: Copepoda: Calanoidea) en condiciones controladas. Tesis de Maestría. CICIMAR-IPN. La Paz, B.C.S., México. 68 pp.
- Øyvind, L., Haaland, H., Hemre, G., Maage, A., Lied, E., Rosenlund, G., Sandnes, K. y Olsen, Y., 1997. Nutritional composition of rotifers following a change in diet from yeast and emulsified oil to microalgae. *Aquacult. Inter.* 5, 427-438.
- Pegg AE, McCann PP. Polyamine metabolism and function. *Am J Physiol* 1982;**243**:C212–21.
- Pegg AE. (1988). Polyamine metabolism and its importance in neoplastic growth and as a target for chemotherapy. *Cancer Res* 1988;**48**:759–74.
- Peña-Martínez, R. 2000. Histología e histoquímica del desarrollo larvario ontogénico del tubo digestivo de larvas de la cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*). Tesis Maestría. CICIMAR, IPN. La Paz BCS, Noviembre 2000.
- Péres, A., Cahu, C.L., y Zambonino-Infante, J.L. 1997. Dietary spermine supplementation induces intestinal maturation in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Fish Physiology and Biochem.*, 16: 479-485.
- Popplewell, L. M., 2001. Evaluating encapsulation economics. *Perfumer & Flavorist* 26(2): 2-6.
- Pszczola, D. E., 1998. Encapsulated ingredients: providing the right fit. *Food Technology* 52(12): 70-77.
- Quemener V, Blanchard Y, Chamailard L. Polyamine deprivation: a new tool in cancer treatment. *Anticancer Res* 1994;**14**:443–8.

- Roldan-Libenson, G., Molina-Camacho, E., Cáceres-Martínez, C., Civera-Cerecedo, R., 1999. Uso del aceite de langostilla como enriquecedor de rotíferos. Efectos sobre el crecimiento y la supervivencia de larvas de cabrilla (*Paralabrax maculatofasciatus*). *Hidrobiológica* 9, 77-82.
- Rosales-Velázquez, M.O., 1997. Efecto de la alimentación sobre los desoves de cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* (Teleostei: Serranidae) mantenida en cautiverio. Tesis de maestría. CICIMAR-IPN. México. 62 pp.
- SAGARPA-CONAPESCA, 2000. Anuario Estadístico de Pesca. México.
- Sanger, F., S. Nicklen y A.R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. **74**: 5463-5467.
- Sarhan S, Knödgen B, Seiler N. The gastrointestinal tract as polyamine source for tumor growth. *Anticancer Res* 1989;**9**: 215–24.
- Schroder M B, Villena A.J, Jorgensen T O. 1998. Ontogeny of lymphoid organs and immunoglobulin producing cells in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) *Development and comparative Immunology*. 1998. 22: 507-517.
- Seidel ER, Scemama JL. Gastrointestinal polyamines and regulation of mucosal growth and function. *J Nutr Biochem* 1997;**8**:104–11.
- Seiler N. 1990. Polyamine metabolism. *Digestion*;**46**(suppl2):319–30.
- Seiler N, Delcros JG, Moulinoux JP. Polyamine transport in mammalian cells. An update. *Int J Biochem Cell Biol* 1996; **28**:843–61.
- Seiler N, Sarhan S, Grauffel C. Endogenous and exogenous polyamines in support of tumor growth. *Cancer Res* 1990;**50**:5077–83.
- SEPESCA, 1994. Atlas Pesquero de México. Secretaría de Pesca, Instituto Nacional de la Pesca. 234 pp.

- Shahidi, F., Han, X., 1993. Encapsulation of Food Ingredients. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 33 (6): 501-547
- Steel J H, Jeffery R E, Longcroft J M, Rogers L A, Poulsom R(a) (1998) Comparison of isotopic and non-isotopic labelling for in situ hybridization of various mRNA targets with cRNA probes. *European Journal of Histochemistry*
- Tabor, C.W. y Tabor, H. (1984). Polyamines. *Annu. Rev. Biochem.* **53**, 749–790
- Takemura A. 1993. Changes in an immunoglobulin M (IgM)-like protein during larval stages in tilapia, *Oreochromis mossambicus*). *Aquaculture*. 115: 233-241.
- Thies, C., 1996. A survey of Microencapsulation processes. En: *Microencapsulation*. (ed. por S. Benita), pp. 1-20. Marcel Dekker, Inc. N.Y., EUA.
- Thomas, T., and Thomas, T. J. (2001) . Polyamines in cell growth and cell death: molecular mechanisms and therapeutic applications. *Cell. Mol. Life Sci.* **58**, 244–258
- Tkachenko, A., Nesterova, L., and Pshenichnov, M. (2001) *Arch. Microbiol.* **176**, 155–157
- Tovar-Ramírez, D. 2000. *Dicentrarchus labrax* partial mRNA for triglyceride lipase, AC AJ275976, 288 bp, European Bioinformatics Institute (EMBL).
- Tovar-Ramírez, D., J.L. Zambonino-Infante, F.J.Gatesoupe y R. Vázquez-Juárez. 2000a. Preliminary study of the potential of yeast as probiotics for the european seabass larvae *Dicentrarchus labrax*. AQUA 2000, NICE FRANCE, 2-6 mayo del 2000.

- D. Tovar-Ramírez, J. Zambonino, C. Cahu, F.J. Gatesoupe and R. Vázquez-Juárez. 2004. Influence of dietary live yeast on European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larval development. *Aquaculture*, vol: 234/1-4, pp 415-427.
- Tovar-Ramírez, D., J.L. Zambonino-Infante, Ch., Cahu, J. Gatesoupe, R. Vázquez-Juárez y Lésel, R. 2002. Effect of live yeast incorporation in compound diet on digestive enzyme activity in sea bass larvae. *Aquaculture* 204/1-2: 113-123.
- Tucker, J.W., 1998. *Marine Fish Culture*. Kluwer Academic Publisher. EUA.
- Vázquez-Juárez, R., Andlid, T. y Gustafsson, L. 1997. Adhesion of yeast isolated from fish gut to crude intestinal mucus of rainbow trout *Salmo gairdneri*. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 6(1), 64-71.
- Watanabe, T., Izquierdo, M.S., Takeuchi, T., Satoh, S. y Kitajama, C., 1989. Comparison between eicosapentanoic and docosahexaenoid acids in terms of essential fatty acid efficacy in larval red seabream. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 55, 1635-1640.
- Watanabe, S., Kusama-Eguchi, K., Kobayashi, H., and Igarashi, K. (1991). Estimation of polyamine binding to macromolecules and ATP in bovine lymphocytes and rat liver *J. Biol. Chem.* **226**, 20803–20809
- Watheley, T., 1996. Microcapsules: Preparation by interfacial polymerization and interfacial complexation and their applications. In: *Microencapsulation*. (ed. By S. Benita), pp. 349-376. Marcel Dekker, Inc. N.Y., USA.
- Webster, C.D. y R.T. Lovell. 1990. Response of striped bass larvae fed brine shrimp from different sources containing different fatty acid combination. *Aquaculture*. 90:49-61.

Zambonino-Infante, J.L. y Cahu, Ch. 1994a. Influence of diet on pepsin and some pancreatic enzymes in seabass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. Comp. Biochem. Physiol. vol. 109A, No. 2, pp. 209-212

Zambonino-Infante, J.L. y Cahu, Ch. 1994b. Development and response to a diet change of some digestive enzymes in seabass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. Fish Physiol. and Biochem., 12:399-408.

Zambonino-Infante, J.L. y Cahu, Ch. 1999. High dietary lipids levels enhance digestive tract maturation and improve *Dicentrarchus labrax* larval development. American Society for Nutritional Sciences. pp. 1195-1200.

APÉNDICE I. Secuencia de ADNc obtenida para la amplificación específica de Inmunoglobulina M en larvas de cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus*

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&val=58429131>

AY846883. Paralabrax maculatofasciatus tissue-type egg immunoglobulin M heavy chain-like mRNA, partial sequence  
gi|58429131|gb|AY846883.1|[58429131]

**LOCUS** AY846883 288 bp mRNA linear VRT 07-FEB-2005

**DEFINITION** Paralabrax maculatofasciatus tissue-type egg immunoglobulin M heavy chain-like mRNA, partial sequence.

**ACCESSION** AY846883

**VERSION** AY846883.1 GI:58429131

**SOURCE** Paralabrax maculatofasciatus (spotted sand bass)

**ORGANISM** [Paralabrax maculatofasciatus](#)

Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Actinopterygii; Neopterygii; Teleostei; Euteleostei; Neoteleostei; Acanthomorpha; Acanthopterygii; Percomorpha; Perciformes; Percoidei; Serranidae; Serraninae; Paralabrax.

**REFERENCE** 1 (bases 1 to 288)

**AUTHORS** Olalde-Rodríguez, A., Tovar-Ramírez, D., Ascencio-Valle, F. and Vázquez-Juárez, R.

**TITLE** Effect of spermine supplementation on mRNA levels coding for IgM and amylase from the spotted sand bass *P. maculatofasciatus* larvae

**JOURNAL** Unpublished

**REFERENCE** 2 (bases 1 to 288)

**AUTHORS** Tovar-Ramírez, D., Olalde-Rodríguez, A., Vázquez-Juárez, R. and Ascencio-Valle, F.

**TITLE** Direct Submission

**JOURNAL** Submitted (02-DEC-2004) Marine Pathology, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste SC, Mar Bermejo 195, La Paz, B.C.S. 23090, Mexico

**FEATURES** Location/Qualifiers

source 1..288

/organism="Paralabrax maculatofasciatus"

/mol\_type="mRNA"

/db\_xref="taxon:[147646](#)"

/tissue\_type="egg"

[misc feature](#) <1..>288

/note="similar to immunoglobulin M heavy chain"

**ORIGIN**

```
1 gtttactgctcgcgctccaccagagagctctggtgaatcaatgaccctgacttgctatggt
61 aaagacttctaccctaagga ggtggctgtg tctggctgt ttaacgatga ataagtggaa
121 gaagtggctcg gctatgaaca gaacaccactgcagttatcg acagaaacaa cctctttca
181 gtgtacggcc agctgattat caaaactgca gactggaaca gtggcagtggttcagctgc
241 ctggtttatc atgagtccat caaggaactg tgtgcgccac atatccag
```

//



APÉNDICE II. Secuencia de ADNc utilizada para la amplificación específica de Amilasa en larvas de cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus*. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&val=58429132>

[AY846884](#) Paralabrax maculatofasciatus alpha-amylase-like mRNA, partial  
séquense gi|58429132|gb|AY846884.1|[58429132]

**LOCUS** AY846884 540 bp mRNA linear VRT 07-FEB-2005

**DEFINITION** Paralabrax maculatofasciatus alpha-amylase-like mRNA, partial  
sequence.

**ACCESSION** AY846884

**VERSION** AY846884.1 GI:58429132

**SOURCE** Paralabrax maculatofasciatus (spotted sand bass)

**ORGANISM** [Paralabrax maculatofasciatus](#)

Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;  
Actinopterygii; Neopterygii; Teleostei; Euteleostei; Neoteleostei;  
Acanthomorpha; Acanthopterygii; Percomorpha; Perciformes; Percoidei;  
Serranidae; Serraninae; Paralabrax.

**REFERENCE** 1 (bases 1 to 540)

**AUTHORS** Olalde-Rodríguez,A., Tovar-Ramírez,D., Ascencio-Valle,F. and  
Vázquez-Juarez,R.

**TITLE** Effect of spermine supplementation on mRNA levels coding for IgM  
and amylase from the spotted sand bass P. maculatofasciatus larvae

**JOURNAL** Unpublished

**REFERENCE** 2 (bases 1 to 540)

**AUTHORS** Tovar-Ramírez, D., Olalde-Rodríguez, A., Carmona-Contreras, J.,  
Linan-Rivera, C., García-Gómez, R., Gleaves-López, V. and Vázquez-Juárez,  
R.

**TITLE** Direct Submission

**JOURNAL** Submitted (03-DEC-2004) Marine Pathology, Centro de  
Investigaciones Biologicas del Noroeste SC, Mar Bermejo 195, La Paz, B.C.S.  
23090, Mexico

**FEATURES** Location/Qualifiers

source 1..540

/organism="Paralabrax maculatofasciatus"

/mol\_type="mRNA"

/db\_xref="taxon:[147646](#)"

[misc feature](#) <1..>540

/note="similar to alpha-amylase"

**ORIGIN**

```
1 agattgaaat ttttttga ggggcgcagg gcgacatta ctgcagagtg tgagcgcttc
61 ctgggtccta atggcttcgg tggagttcag atctcccctg ccaatgagca cattgtgctg
121 aacaatccct ggaggccctg gtggcagaga taccaaccaa cgggctacaa cctgtgctcc
181 agatctggca acgagaacga gctgagagac atgatcacca gatgcaacaa cgttggggtc
241 aatatctacg tggacgctgt catcaaccac atgtgcggcg ccggcggtgg agaggggaact
301 cactcttcat gtggaagctg gttcagtgct gccagaagg acttcccac tatccccttc
361 accactggg acttcaatga ccacaaatgc aggactggca gcggaatat tgagaactat
421 ggtgatgcca atcaggtgcg tgactgtcgt ctggtcggtc tgttgacct cgcctggag
481 aaaattagcg tcaggggcaa ggttgctgac ttcataaaca agctgatgac atggtggcgt
```

//

### **APÉNDICE III. Método para la realización de las microcápsulas utilizadas como tratamiento en el presente trabajo. Polimerización interfacial**

Para la elaboración de las microcápsulas se preparó el emulgente disolviendo lecitina en ciclohexano, mientras que el agente polimerizante fue preparado disolviendo cloruro de trimesoilo (cloruro de ácido 1,3,5-bencenotricarboxílico) en éter dietílico. Las fuentes proteínicas fueron disueltas en TRIS-HCl 0.2 M a un pH 9.0 (fase dispersa).

Se mantuvieron en agitación 500 ml de ciclohexano a 900 rpm (fase de dispersión) en una plancha de agitación magnética. El emulgente fue añadido y fue mezclado durante 8 minutos. Al término de dicho lapso, se agregó la fase dispersa y fue mantenida en agitación durante 8 minutos. Posteriormente se añadió el agente polimerizante y se mantuvo en agitación durante 8 minutos. Las microcápsulas formadas fueron decantadas y fue eliminado el exceso de ciclohexano. Las microcápsulas fueron lavadas dos veces con ciclohexano limpio, manteniéndolas en reposo después del último lavado durante 20 minutos. Finalmente se retiró todo el ciclohexano. Lentamente fue agregándose a las microcápsulas 100 mL de una solución de gelatina al 15 % y la mezcla fue mantenida en agitación durante 5 minutos. Las microcápsulas fueron lavadas con agua destilada y fueron congeladas a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Las microcápsulas fueron finalmente fueron liofilizadas.

## APÉNDICE IV Análisis de Varianza de una vía de la longitud de larvas de *Paralabrax maculatofasciatus*

Día 5 de desarrollo larvario. ANOVA de una vía. Longitud Notocordal/Longitud Patrón (LN/LP)

Origen de la variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	P
Entre los grupos	0.102	1	0.102	1.226	0.273
Dentro de los grupos	5.092	61	0.083		
Total	5.194	62			

Día 10 de desarrollo larvario. ANOVA de una vía. Longitud Notocordal/Longitud Patrón (LN/LP)

Origen de la variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	P
Entre los grupos	0.031	1	0.031	0.349	0.500
Dentro de los grupos	3.756	42	0.89		
Total	3.787	43			

Día 15 de desarrollo larvario. ANOVA de una vía. Longitud Notocordal/Longitud Patrón (LN/LP)

Origen de la variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	P
Entre los grupos	3.289	1	3.289	13.750	0.000
Dentro de los grupos	14.831	62	0.239		
Total	18.120	63			

Día 20 de desarrollo larvario. ANOVA de una vía. Longitud Notocordal/Longitud Patrón (LN/LP)

Origen de la variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	P
Entre los grupos	20.387	3	6.796	28.017	0.000
Dentro de los grupos	27.165	112	0.243		
Total	47.552	115			

Día 20 de ANOVA de una vía Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: LN/LP

Tukey HSD	(I) Tratamiento	(J) Tratamiento	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
	0	0					
	1	2	1.1512	.1294	.000	.8137	1.4887
		3	.7882	.1274	.000	.4558	1.1206
		4	.8093	.1341	.000	.4595	1.1591
	2	1	-1.1512	.1294	.000	-1.4887	-.8137
		3	-.3629	.1251	.023	-.6894	-.0365
		4	-.3418	.1319	.052	-.6860	.0022
	3	1	-.7882	.1274	.000	-1.1206	-.4558
		2	.3629	.1251	.023	.0365	.6894
		4	.0211	.1300	.998	-.3180	.3602
	4	1	-.8093	.1341	.000	-1.1591	-.4595
		2	.3418	.1319	.052	-.0022	.6860
		3	-.0211	.1300	.998	-.3602	.3180

\* The mean difference is significant at the .05 level.

Los números en los tratamientos corresponden a:

- 1) Alimento Vivo
- 2) Microencapsulado con Hidrolizado (dieta control) (MCH)
- 3) Microencapsulado con Hidrolizado adicionada con 0.1% de espermina (MCH0.1%)
- 4) Microencapsulado con Hidrolizado adicionada con 0.33% de espermina (MCH0.33%)

### Homogeneous Subsets

LN/LP

Tukey HSD	Tratamiento	N	Subset for alpha = .05		
			1	2	3
	0				
	2	30	3.8186		
	4	26		4.1605	
	3	32		4.1816	
	1	28			4.9699
	Sig.		1.000	.998	1.000
Tukey B	2	30	3.8186		
	4	26		4.1605	
	3	32		4.1816	
	1	28			4.9699

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 28.827.

b The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

Los números en los tratamientos corresponden a:

- 1) Alimento Vivo
- 2) Microencapsulado con Hidrolizado (dieta control) (MCH)
- 3) Microencapsulado con Hidrolizado adicionada con 0.1% de espermina (MCH0.1%)
- 4) Microencapsulado con Hidrolizado adicionada con 0.33% de espermina (MCH0.33%)

Día 25 de desarrollo larvario. ANOVA de una vía. Longitud Notocordal/Longitud Patrón (LN/LP)

Origen de la variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	P
------------------------	-------------------	--------------------	---------------------------	---	---

<b>Entre los grupos</b>	11.357	3	3.786	6.778	0.001
<b>Dentro de los grupos</b>	34.067	61	0.558		
<b>Total</b>	45.424	64			

## Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: LN/LP

			Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
	(I)	(J)				Lower Bound	Upper Bound
Tukey HSD	1	2	.3295	.2552	.572	-.3446	1.0037
		3	.8243	.2481	.008	.1689	1.4797
		4	1.0456	.2728	.002	.3248	1.7663
	2	1	-.3295	.2552	.572	-1.0037	.3446
		3	.4948	.2991	.357	-.2953	1.2850
		4	.7160	.3199	.125	-.1290	1.5612
	3	1	-.8243	.2481	.008	-1.4797	-.16893
		2	-.4942	.2991	.357	-1.2850	.2953
		4	.2212	.3143	.895	-.6090	1.0515
	4	1	-1.0456	.272880	.002	-1.7663	-.3248
		2	-.7160	.31998	.125	-1.5612	.1290
		3	-.2212	.31433	.895	-1.0515	.6090

\* The mean difference is significant at the .05 level.

Los números en los tratamientos corresponden a:

- 1) Alimento Vivo
- 2) Microencapsulado con Hidrolizado (dieta control) (MCH)
- 3) Microencapsulado con Hidrolizado adicionada con 0.1% de espermina (MCH0.1%)
- 4) Microencapsulado con Hidrolizado adicionada con 0.33% de espermina (MCH0.33%)

## Homogeneous Subsets

LN/LP

		N	Subset for alpha = .05	
Tratamiento			1	2
Tukey HSD	4	10	4.5247	
	3	13	4.7460	
	2	12	5.2408	5.2408
	1	30		5.5703
Sig.			.070	.660
Tukey B	4	10	4.5247	
	3	13	4.7460	
	2	12	5.2408	5.2408
	1	30		5.5703

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 13.624.

b The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

Los números en los tratamientos corresponden a:

- 1) Alimento Vivo
- 2) Microencapsulado con Hidrolizado (dieta control) (MCH)
- 3) Microencapsulado con Hidrolizado adicionada con 0.1% de espermina (MCH0.1%)
- 4) Microencapsulado con Hidrolizado adicionada con 0.33% de espermina (MCH0.33%)

**Apéndice V. Análisis de Varianza de una vía. Peso de larvas de *Paralabrax maculatofasciatus*. Análisis de diferencias significativas en los días 20 y 25 con las diferentes dietas utilizadas en este trabajo.**

**Día 20 Análisis de Varianza de una vía. Crecimiento en peso de larvas**

Origen de la variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Sig.
Entre los grupos	232.981	3	77.660	13.338	.000
Dentro de los grupos	634.646	109	5.822		
Total	867.627	112			

Comparaciones múltiples

Variable Dependiente: Peso de larvas

Tukey HSD	(I)	(J)	Diferencia de la media (I-J)	Error Std.	Sig.	95% Intervalo de confianza	
						Lower Bound	Upper Bound
	1	2	.2889	.64010	.969	-1.3812	1.9590
		3	-3.0686	.64531	.000	-4.7523	-1.3849
		4	.3222	.65673	.961	-1.3913	2.0357
	2	1	-.2889	.64010	.969	-1.9590	1.3812
		3	-3.3575	.62838	.000	-4.9970	-1.7180
		4	.0333	.64010	1.000	-1.6368	1.7034
	3	1	3.0686	.64531	.000	1.3849	4.7523
		2	3.3575	.62838	.000	1.7180	4.9970
		4	3.3908	.64531	.000	1.7071	5.0745
	4	1	-.3222	.65673	.961	-2.0357	1.3913
		2	-.0333	.64010	1.000	-1.7034	1.6368
		3	-3.3908	.64531	.000	-5.0745	-1.7071

\* La diferencia de la media es significativa al nivel 0.05.

**Homogeneous Subsets**

Peso de larvas

N	Subset for alpha = .05

		Tratamiento		1	2
Tukey HSD	4	27	1.1333		
	2	30	1.1667		
	1	27	1.4556		
	3	29		4.5241	
	Sig.		.959	1.000	
Tukey B	4	27	1.1333		
	2	30	1.1667		
	1	27	1.4556		
	3	29		4.5241	

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 28.191.

b The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

## Día 25 Analisis de varianza de uan vía. Datos del crecimiento por peso de las larvas de *Paralabrax maculatofasciatus*

ANOVA

Peso de larvas

	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Sig.
Entre los grupos	134.320	3	44.773	6.658	.001
Dentro de los grupos	443.849	66	6.725		
Total	578.169	69			

## Post Hoc Tests

Comparaciones múltiples

Variable Dependiente: Peso de larvas

Tukey HSD	Tratamiento (I)	Tratamiento (J)	Diferencia de la Media (I-J)	Error Std.	Sig.	Intervalo de confianza 95%	
						Lower Bound	Upper Bound
	1	2	1.0768	.88167	.616	-1.2471	3.4006
		3	-2.6982	.88167	.016	-5.0221	-.3744
		4	1.4868	.81564	.272	-.6630	3.6366
	2	1	-1.0768	.88167	.616	-3.4006	1.2471
		3	-3.7750	1.05869	.004	-6.5654	-.9846
		4	.4100	1.00436	.977	-2.2372	3.0572
	3	1	2.6982	.88167	.016	.3744	5.0221
		2	3.7750	1.05869	.004	.9846	6.5654
		4	4.1850	1.00436	.001	1.5378	6.8322
	4	1	-1.4868	.81564	.272	-3.6366	.6630
		2	-.4100	1.00436	.977	-3.0572	2.2372
		3	-4.1850	1.00436	.001	-6.8322	-1.5378

\* The mean difference is significant at the .05 level.

## Homogeneous Subsets

Peso de larvas

	Tratamiento	N	Subset for alpha = .05	
			1	2
Tukey HSD	4.00	15	1.1400	
	2.00	12	1.5500	
	1.00	31	2.6268	
	3.00	12		5.3250
	Sig.		.401	1.000
Tukey B	4.00	15	1.1400	
	2.00	12	1.5500	
	1.00	31	2.6268	
	3.00	12		5.3250

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 15.061.

b The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.



## Apéndice VI. Análisis de Varianza de una vía para 2-ddCt en la expresión de los genes Inmunoglobulina M y Amilasa.

d15            amyl

Tukey HSD test; variable Cycle Threshold (ddct)  
Approximate Probabilities for Post Hoc Tests  
Error: Between MS = .80816, df = 8.000  
Include condition: v1=15 and v3=1

Tukey HSD test; variable Cycle Threshold (ddct)  
Approximate Probabilities for Post Hoc Tests  
Error: Between MS = .80816, df = 8.0000  
Include condition: v1=15 and v3=1

	tratamiento	{1} 39.297	{2} 37.777	{3} 37.467	{4} 34.147
1	<b>AV</b>		0.240856	0.135820	0.000684
2	<b>MCH</b>	0.240856		0.973119	0.005071
3	<b>O1</b>	0.135820	0.973119		0.008517
4	<b>O3</b>	0.000684	0.005071	0.008517	

d15            **IGM**

Kruskal-Wallis ANOVA by Ranks; Cycle Threshold (ddct)  $p = .3900$   
Include condition: v1=15 and v3=2

**d20            amyl**

Tukey HSD test; variable Cycle Threshold (ddct) MS = .17961, df = 6.0000  
Include condition: v1=20 and v3=1

Tukey HSD test; variable Cycle Threshold (ddct) MS = .17961, df = 6.0000  
Include condition: v1=20 and v3=1

	tratamiento	{1} 33.083	{2} 37.160	{3} 36.040
1	AV		0.000254	0.000531
2	MCH	0.000254		0.040839
3	O3	0.000531	0.040839	

**d20            IGM**

	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	10810.45	1	10810.45	26216.34	0.000000
tratamiento	2.72	2	1.36	3.30	0.107826
Error	2.47	6	0.41		

**d25            AMYL**

	tratamiento	{1} 32.887	{2} 32.690	{3} 38.697	{4} 37.440
1	AV		0.999175	0.019580	0.062581
2	O1	0.999175		0.016430	0.052014
3	O3	0.019580	0.016430		0.834347
4	T6 MCH	0.062581	0.052014	0.834347	

**d25            IGM**

	Hartley F-max	Cochran C	Bartlett Chi-Sqr.	Df	p
Cycle Threshold	879.2703	0.633357	10.71585	3	0.013366

Kruskal-Wallis ANOVA by Ranks; Cycle Threshold  $H ( 3, N= 12) = 5.879532$   $p = .1176$   
Include condition: v1=25 and v3=2

Kruskal-Wallis ANOVA by Ranks; Cycle Threshold  $H ( 3, N= 12) = 5.879532$   $p = .1176$   
Include condition: v1=25 and v3=2

## Apéndice VII. Evaluación de la PCR en tiempo real

Para poder llevar a cabo el análisis comparativo de diferentes productos de PCR, debemos partir de dos condiciones experimentales: tener productos de amplificación con un tamaño menor a 150 pares de bases y emplear iniciadores con una temperatura de fusión cercana a 60°C. A partir de estas dos condiciones podemos dividir el proceso de amplificación en tres fases: fase geométrica, fase lineal y fase estacionaria.

Fase geométrica: Todos los elementos químicos de la reacción se encuentran en abundancia, en esta etapa la eficiencia de amplificación bajo las condiciones experimentales antes descritas es muy cercana al 100%, pero lo más importante, para productos de amplificación de diferentes blancos, la eficiencia de amplificación es la misma y constante. Es en esta etapa en donde la concentración inicial de la muestra es directamente proporcional al número de ciclos para una concentración final de muestra constante.

Si consideramos la eficiencia de amplificación de un producto de PCR, la ecuación que describe el número de copias finales (P) es igual al número de moléculas iniciales (T) multiplicado por  $1 + \text{eficiencia}$ , elevado por el número de ciclos. En esta etapa el valor de eficiencia es casi igual a 1 es decir el 100% y en consecuencia por cada vez que cambiamos la concentración inicial de muestra al doble, necesitamos un ciclo menos de amplificación para alcanzar un número de copias finales siempre constante.

En la fase lineal los oligonucleótidos o el templado comienzan a ser factores limitantes de la amplificación, la eficiencia entonces disminuye de manera constante por lo que es posible llevar a cabo un ensayo cuantitativo en esta parte.

En la fase estacionaria de la reacción de PCR, la cantidad de productos obtenidos se mantiene constante sin importar cuantos ciclos mas se prolongue la reacción de amplificación, inclusive estos productos por la ausencia de oligonucleótidos pueden ser parcialmente degradadas por la polimerasa. En esta etapa es frecuente ver que aun muestras con diferentes concentraciones iniciales tengan el mismo número de copias al final de la reacción.

PCR cuantitativo en tiempo real

Fundamento de las sondas Taqman, principio FRET (Fluorescent Resonant Energy Transfer)

Una sonda Taqman es básicamente un tercer iniciador que participa de manera altamente específica dentro de la reacción de PCR en tiempo real como un reportero del número de copias que se producen en cada ciclo de la PCR. Para llevar a cabo esta función, la sonda Taqman esta compuesta por una secuencia de ADN que incorpora un agente fluorescente en el extremo 5' conocida como reportero y una molécula no fluorescente en el extremo 3' de la sonda llamada apagador. Cuando estas dos moléculas se encuentran unidas por la secuencia de ADN y a una distancia mínima medida en nanómetros, toda la energía emitida en forma de fluorescencia por el reportero cuando este es excitado por una fuente de energía, es absorbida por el apagador, de tal manera que la fluorescencia global observada es igual a cero. Solo cuando la sonda es degradada y la distancia entre el reportero y el apagador supera el mínimo, entonces la cantidad relativa de fluorescencia se incrementará. A este proceso se conoce con las siglas FRET p Fluorescent Resonant Energy Transfer.

Ensayo de PCR empleando una sonda Taqman

En un ensayo de PCR en tiempo real, participan los elementos convencionales de un ensayo de PCR (iniciadores, polimerasa, buffer, oligonucleótidos y cloruro de magnesio), una sonda taqman que alinea entre los iniciadores y una fluorescencia adicional (ROX) que sirve de referencia pasiva para la reacción de amplificación.

Después de la etapa de alineamiento de los iniciadores y la sonda taqman, la polimerasa avanza hasta alcanzar el extremo 5' de la sonda taqman, si la sonda es estable debido a que el 100% de la secuencia es complementaria con la secuencia blanco, entonces, la polimerasa emplea su actividad 5' exonucleasa para degradar la sonda taqman hasta alcanzar el extremo acotado por el iniciador en antisentido. Esta reacción separa el reportero del apagador incrementando la fluorescencia realtiva de manera proporcional al número de copias de ADN que están siendo replicadas.

La posibilidad de emplear diferentes reporteros fluorescentes para amplificar diferentes blancos, permite llevar a cabo ensayos múltiplex, conservando así las condiciones de amplificación dentro del mismo tubo, la fluorescencia cada vez que se lleva a cabo un ensayo de PCR en tiempo real.

Obtenemos una gráfica que representa el incremento en el número de copias de ADN amplificado con respecto a cada ciclo. Si fijamos un nivel de fluorescencia dentro de la fase geométrica de la amplificación (es decir, si fijamos el número de moléculas de ADN finales, P), entonces el número de ciclos (n) que son necesarios para que la fluorescencia alcance este valor fijo, será directamente proporcional a la concentración inicial (T). A este valor se le conoce como Ct o Threshold cycle.

El software del sistema de PCR en tiempo real ABI PRISM 7000 SDS, reporta los resultados de amplificación a partir de estos valores de Ct; ya sea para llevar a cabo cuantificaciones absolutas o relativas.

Ensayo de PCR empleando SYBER Green I.

Es posible llevar a cabo ensayos de PCR en tiempo real sin emplear sondas taqman, para esto es necesario emplear una molécula química de bajo peso molecular que emita fluorescencia al encontrarse intercalado entre una cadena doble de ADN. Este tipo de moléculas están clasificadas en intercaladores (ej. Bromuro de Etidio) y enlazadores a la cadena del ADN (Minor Groove Binder, MGB). El reactivo SYBR Green I es una MGB.

Es necesario que estos intercaladores cumplan con dos condiciones para poder ser utilizados en PCR en tiempo real. La primera, es que la fluorescencia detectada sea directamente proporcional a 1 número de copias obtenido en cada ciclo de la PCR y segundo, que esta molécula fluorescente no inhiba la PCR o disminuya la Eficiencia de amplificación.

Es importante mencionar que este tipo de amplificaciones debe cumplir con dos condiciones; al igual que con las sondas taqman, la eficiencia de amplificación deberá ser cercana al 100% para lograr esto, es necesario emplear iniciadores con una temperatura de alineamiento cercanos a 60°C y tener productos de amplificación de menos de 150 pares de bases; y finalmente, se debe asegurar que los iniciadores son altamente específicos para el blanco de ADN, ya que el SYBER Green I se puede enlazar a los productos de PCR inespecíficos

provocando una desviación en la fluorescencia reportada y afectando la cuantificación final.

Podemos describir el proceso de PCR en tiempo real en tres etapas:

1. Cuando la mezcla maestra de SYBER Green I es agregado a la muestra, de inmediato las moléculas del MGB se enlazan a las dobles cadenas de ADN presentes.
2. Durante el proceso de amplificación se generan nuevas copias de ADN de cadena doble.
3. Las moléculas de SYBER Green I se intercalan a cada nueva copia de ADN de cadena doble obtenido en cada ciclo de la PCR de manera proporcional.

Es necesario evaluar la especificidad de un ensayo de PCR en tiempo real a partir de SYBER Green I con el fin de asegurar que el reporte cuantitativo sea correcto. Para esto es necesario llevar a cabo un protocolo de disociación dentro del termociclador.

Al final de los ciclos de amplificación, el sistema calienta la placa del termociclador en intervalos constantes hasta alcanzar los 96°C, durante este proceso, las cadenas de ADN se desnaturalizan gradualmente provocando la disminución de la fluorescencia detectada a una velocidad constante. A una temperatura en particular la concentración de dobles cadenas y de cadenas sencillas es equivalente, esta temperatura define la  $T_m$  experimental. Si tenemos un solo producto de amplificación, entonces deberemos tener solo una  $T_m$  asegurando así la especificidad en la amplificación.

El software del sistema ABI PRISM 7000 SDS lleva a cabo automáticamente este proceso de detección construyendo una gráfica de la segunda derivada de la función de fluorescencia versus temperatura representando así el  $T_m$  como un pico bien definido a la temperatura detectada por el sistema. Si para cada ensayo podemos ver más de un pico de  $T_m$  menor al esperado, podemos creer que el sistema está detectando la formación de dímeros del iniciador o la amplificación de productos inespecíficos, los cuales usualmente tienen  $T_m$  inferiores a la del producto específico de PCR que nos interesa detectar.

Estos ensayos de PCR cuantitativo a partir de SYBER Green I son muy útiles para tener una evaluación cuantitativa aproximada, para llevar a cabo ensayos de discriminación entre diferentes blancos biológicos o para asegurar que el diseño de los iniciadores es específico para un blanco en particular, sin lugar a dudas este tipo de reacciones no tienen la alta especificidad y sensibilidad de las sondas Taqman por lo que es necesario llevar a cabo esfuerzo de validación más profundos que con las sondas Taqman.

## VALIDACIÓN DE ENSAYOS DE PCR EN TIEMPO REAL

### Rango dinámico de detección

Este análisis se lleva a cabo para determinar la eficiencia de amplificación en un ensayo de PCR específico y el nivel de sensibilidad. Para llevarlo a cabo se selecciona una muestra del blanco biológico (ADN, ADNc O ARN) y un juego de sondas relacionados de manera específica con dicho blanco, bajo las mismas condiciones de amplificación se varía la concentración de muestra a partir de una serie de diluciones decimales seriadas. Este ensayo

se prepara por cuadruplicado en cada punto de la serie de diluciones decimales, del resultado se evalúan tres valores en particular.

1. La desviación estándar entre los diferentes puntos para asegurar que el resultado es reproducible bajo diferentes condiciones de concentración de la muestra original, para poder presumir que los resultados son reproducibles debemos observar desviaciones estandar menores de 0.2 unidades de Ct, Recordemos que por cada unidad de Ct que cambia el resultado de una amplificación, estamos incrementando al doble la concentración inicial de muestra.
2. La correlación lineal entre los puntos determina que existe una perfecta correlación entre la concentración inicial de la muestra y el número de ciclos necesarios para alcanzar el umbral de detección, esta relación es establecida automáticamente por el software de análisis y determina el número menor de copias que pueden ser detectados en dicho ensayo.
3. Finalmente la pendiente entre el número de ciclos contra el logaritmo decimal de la concentración deberá ser teóricamente igual a  $-3.32$  lo que corresponde a una eficiencia de amplificación igual al 100%, para llevar a cabo un ensayo de PCR cuantitativo en tiempo real un valor de hasta el 92% de eficiencia de amplificación es aceptable.

Este ensayo se debe llevar a cabo al menos una vez para cada ensayo de PCR en tiempo real que se deba analizar. Es posible llevar a cabo esta evaluación en amplificaciones monoplex para un solo blanco biológico o en modelos múltiplex, para dos o mas blancos biológicos amplificados simultáneamente. Actualmente el gráfico de rango dinámico es un requisito para la publicación de un ensayo de PCR cuantitativo en tiempo real, y en muchos de los casos los resultados cuantitativos son reportados en forma gráfica como un rango dinámico o una curva de calibración.

#### Cuantificación absoluta

El modelo de cuantificación absoluta, permite determinar el número exacto de moléculas de ADN o ARN presentes en una muestra determinada, para lo cual es necesario utilizar una curva de calibración a partir de un stock de estándares de concentración finamente conocida y determinada por otra técnica en la cual las unidades estén expresadas en números de copias, ng/ $\mu$ L, umol/ $\mu$ L de la secuencia blanco en específico.

Este tipo de análisis es necesario para determinar cargas virales, agentes patógenos, terapia génica, cuantificación de microorganismos genéticamente modificados, etc. En donde es preciso saber el número de copias o cantidad de material genético para la secuencia blanco.

#### Curva estándar de cuantificación absoluta

La curva tipo o curva de calibración se construye a partir de los valores de Ct obtenidos para cada estándar y graficados versus el logaritmo de la concentración correspondiente. Sobre esta curva de calibración se interpola directamente el valor de Ct de las muestras problema para obtener de esta forma su concentración expresada en escala logarítmica, el valor del antilogaritmo expresa el valor exacto en las unidades de los estándares empleados para construir la curva patrón. Es necesario hacer réplicas de cada punto de concentración (al menos tres) para evaluar la exactitud y precisión del ensayo mediante el cálculo de la desviación estándar.

Los estándares para la construcción de la curva patrón para cuantificación absoluta deben cumplir con los siguientes requisitos:

- ADN o ARN puro, ADN plasmídico o ARN transcrito in vitro, específico de la secuencia blanco de concentración finamente conocida mediante la utilización de otra técnica.
- Pipeteo exacto crucial, para preparar estándares (diluciones  $10^{-6}$  –  $10^{-12}$ )

Mantener la estabilidad de los estándares diluidos

No es posible usar DNA como estándar para una cuantificación de ARN, pues no hay control de RT.

Debido a que en muchos casos estos requisitos no se pueden cumplir, es difícil aplicar en todos los casos un análisis de cuantificación absoluta, por otro lado cuando se trabaja con ARN la estabilidad de las muestras es crucial y dada la labilidad del ARN, esta condición es difícil de cumplir, por lo tanto siempre que sea posible es preferible utilizar una cuantificación relativa pues no requiere de tanto control como la cuantificación absoluta.

#### Cuantificación relativa

En este caso al igual que en el método de cuantificación absoluta, es necesario construir al menos una vez una curva estándar de calibración, pero a diferencia de los estándares utilizados para cuantificación absoluta, no es necesario saber la cantidad precisa de la secuencia blanco de interés, basta con saber la cantidad de ADN/ARN total que se está utilizando, ya que la comparación cuantitativa del ácido nucleico blanco se expresa en ordenes de magnitud relativas a un calibrador. En este tipo de cuantificación, es necesario incluir una referencia activa de amplificación, la cual se refiere a la amplificación de un blanco diferente, de expresión constitutiva (constante) a partir de la misma muestra de ARN o ADN de cada muestra o tejido. El valor obtenido del gen de interés, se divide entre el valor obtenido para la referencia activa para normalizar y asegurar que las variaciones observadas en expresión sean realmente debidas a cambios de expresión y ni a cantidad variable de muestra añadida entre dos ensayos. Los controles más comúnmente utilizados como referencia activa son GADPH y 18s, sin embargo existe un gran número de ensayos ya optimizados en distintos genes de expresión constitutiva.

Una vez normalizado el resultado de expresión con respecto al control endógeno o referencia activa, este valor se divide entre el valor de otro ensayo elegido como calibrador (condición, tejido, tratamiento, etc.) lo que resulta en un orden de magnitud con respecto al calibrador.

Para efectuar este análisis es posible utilizar una curva de calibración estándar o bien el método de  $\Delta Ct$ . En el caso de la curva estándar el método es igual que en el caso de la cuantificación absoluta, solo que en este caso la cantidad de ADN obtenida se refiere a ADN o ARN total y no a copias de la secuencia específica. Una vez obtenidos los valores mediante esta técnica, se normaliza con respecto al control endógeno y posteriormente se compara con el calibrador elegido.

En el caso del método de  $\Delta Ct$ , es necesario construir una curva de rango dinámico para el gen blanco y el control endógeno, y obtener el  $\Delta Ct$  (Ct blanco-Ct control endógeno) para cada uno de los puntos. Este  $\Delta Ct$  se

gráfica versus la concentración de cada uno de los puntos, y la línea obtenida tiene que tener una pendiente menor o igual a 0.1, la cual valida la utilización del método de  $\Delta C_t$  que requiere que la eficiencia de amplificación de ambos genes (endógeno y blanco) sea la misma.

Los resultados obtenidos por ambos métodos (curva estándar y  $\Delta C_t$ ) son muy similares sin existir diferencias significativas en los valores analizados por ambos métodos, incluso cuando ambas reacciones para gen blanco y control endógeno se llevan a cabo en el mismo tubo.

Que métodos de análisis se debe utilizar?

Todos los métodos dan resultados equivalentes, ensayos monoplex con curva estándar, requieren menor optimización y validación, pero hay que correr siempre una curva estándar con las muestra problema, mientras que el método comparativo de  $C_t$ , requiere validación para comprobar que la eficiencia de amplificación de muestra y referencia son aproximadamente iguales; pero una vez validado, elimina el uso de curva estándar, permitiendo amplificar más muestras problema, mayor capacidad, elimina efectos adversos por errores de dilución al preparar la curva estándar.