

Programa de Estudios de Posgrado

**EFFECTO DE LA LEVADURA *Debaryomyces hansenii* SILVESTRE E
INHIBIDA DE SU ACTIVIDAD ORNITIN-DESCARBOXILASA
SOBRE EL DESARROLLO LARVARIO DE LA CABRILLA
ARENERA (*Paralabrax maculatofasciatus*)**

T E S I S

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

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

present a

Laura Teresa Guzmán Villanueva

La Paz, Baja California Sur, agosto de 2008

ACTA DE LIBERACION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 12 horas del día 18 del Mes de Julio del 2008, 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 levadura *Debaryomyces hansenii* silvestre e inhibida de su actividad ornitín-descarboxilasa sobre el desarrollo larvario de la cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*)"

Presentada por el alumno:

Laura Teresa Guzmán Villanueva

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

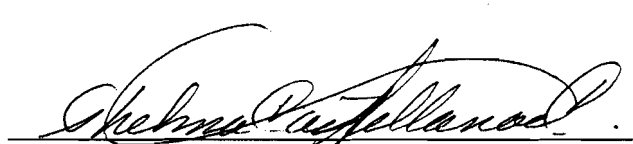
Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISION REVISORA


DR. DARIEL TOVAR RAMIREZ
DIRECTOR DE TESIS


DR. HUMBERT MEJIA
CO-TUTOR


DR. VICENTE GRACIA
CO-TUTOR


DRA. THELMA ROSA CASTELLANOS CERVANTES,
DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

COMITÉ TUTORIAL Y REVISIÓN DE TESIS

Dr. Dariel Tovar Ramírez

Director de Tesis

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C. (CIBNOR)

La Paz, B.C.S., México

Dr. Humberto Mejia Ruiz

Asesor

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C. (CIBNOR)

La Paz, B.C.S., México

Dr. Vicente Gracia López

Asesor

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C. (CIBNOR)

La Paz, B.C.S., México

JURADO DE EXAMEN DE GRADO

Dr. Dariel Tovar Ramírez

Dr. Humberto Mejia Ruiz

Dr. Vicente Gracia López

Suplentes:

Dra. Minerva Maldonado

Dra. Martha Reyes Becerril

RESUMEN

El interés por el uso de probióticos en la acuicultura se ha incrementado en los últimos años, con fines de mejorar los rendimientos de los cultivos larvarios. Tal es el caso del uso de la levadura *Debaryomyces hansenii*, que secreta a las poliaminas putrescina (put), espermidina (spd) y espermina (sp), moléculas indispensables para el crecimiento y diferenciación celular. El objetivo de este trabajo fue evaluar la inclusión de la levadura *D. hansenii* silvestre e inhibida químicamente de su actividad ornitín-descarboxilasa (ODC), sobre el desarrollo del sistema digestivo larvario de la cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*), especie con potencial de cultivo y demanda comercial.

Para conocer la producción de poliaminas se realizó la cinética de crecimiento de *D. hansenii* en condiciones normales y en presencia del inhibidor DFMO (α -Difluoro-metil-ornitina) para bloquear irreversiblemente la actividad enzimática ODC y se cuantificaron por HPLC. Larvas de la cabrilla arenera fueron alimentadas a partir del día 20 después de la eclosión con diferentes dietas microparticuladas conteniendo levaduras silvestres (ODC +) equivalente a 10^6 UFCg⁻¹, levaduras inhibidas en su actividad ODC (ODC -) y una dieta control sin levaduras. Durante el tiempo de administración de las dietas, se tomaron muestras cada 5 días para conocer el crecimiento, supervivencia, actividad y expresión (por RT-PCR cuantitativo mediante sondas Taqman®) de enzimas digestivas (tripsina, lipasa, amilasa y aminopeptidasa) de la larva.

Los resultados obtenidos muestran que el inhibidor DFMO (2mM) no afectó el crecimiento ni la producción de poliaminas en *D. hansenii* ($P > 0.05$) por lo que suponemos que puede existir una vía alterna en la biosíntesis de estas moléculas o que la ruptura de la pared celular de las levaduras no se realizó adecuadamente. En cuanto al cultivo larvario, la supervivencia larval fue significativamente diferente con el $13.05 \pm 0.54\%$ para ODC (+), $11.60 \pm 0.92\%$ con ODC (-) y del $10.34 \pm 1.23\%$ para la dieta control. La actividad de las enzimas tripsina, lipasa y aminopeptidasa presentaron los niveles más altos en los grupos alimentados con ODC (+); en cuanto a la actividad amilasa, el grupo control presentó los niveles de actividad más altos, lo que nos indica un mayor retraso en la maduración digestiva de la larva con esta dieta. De la expresión de genes observamos que los niveles de ARN codificantes para tripsina y aminopeptidasa pueden ser estimulados positivamente con la dieta que contiene ODC (-), mientras que para lipasa se observan mayores niveles para el control, sin embargo existe un incremento progresivo en las larvas alimentadas con ODC (-). Los niveles de ARN para amilasa, presentan el mismo patrón que la actividad, mayor en la dieta control con respecto a las alimentadas con ODC (-).

Lo anterior sugiere que la dieta que contiene levaduras productoras de poliaminas, puede modificar o inducir cambios importantes en el patrón de

secreción y expresión enzimática digestiva, permitiendo que la maduración pancreática e intestinal ocurra.

Palabras clave: probióticos, poliaminas, levadura *Debaryomyces hansenii*, maduración digestiva.

ABSTRACT

The interest in the use of probiotics in aquaculture has increased in the last years with aims to improve the yields of the larvae cultures. In the case of the use of the *Debaryomyces hansenii* yeast, that secrete the polyamines putrescine (put), spermidine (spd) and spermine (sp), indispensable molecules for growth and cellular differentiation. The objective of this work was to evaluate the inclusion of wild *D. hansenii* yeast and those yeast inhibited of its activity ornithine-decarboxylase (ODC), on the development of the digestive system of the spotted sand bass *Paralabrax maculatofasciatus* larvae, fish with culture potential and commercial demand. In order to understand the polyamines production we made growth kinetic of *D. hansenii* in normal conditions and in the presence of the irreversibly ODC inhibitor, α Difluoro-methyl-ornithine (DFMO). Polyamines yeast productions were quantify by HPLC. 20 day old spotted sand bass larvae were fed with three microparticulate diets: 1) containing wild yeast (ODC +) equivalent to 10^6 UFCg⁻¹ and 2) a diet containing yeast inhibited in their ODC activity (ODC -) and 3) a microparticulated control diet without yeast. During the time of administration of the diets, every 5 days samples were taken to measure the growth, survival, activity and expression (by quantitative RT-PCR by means of Taqman® probes) of digestive enzymes of the larvae (trypsin, lipase, amylase and aminopeptidase). Our results show that the inhibitor DFMO (2mM) did not affect the growth or the production of polyamines in *D. hansenii* ($P > 0.05$). Two hypothesis should be probe 1) that an alternate route of polyamines bio synthesis exists or 2) that the yeast's cell walls did not break adequately with our procedure. In the case of larvae culture, the larval survival was significantly different in those larvae fed ODC (+) $13.05 \pm 0.54\%$ comparing with ODC (-) $11.60 \pm 0.92\%$ and the control diet $10.34 \pm 0.54\%$. The activity of trypsin, lipase and aminopeptidase presented the highest levels in the groups fed with yeast ODC (+). In the case of amylase activity, the control group presented the highest levels of this enzyme, which indicates a greater delay in the maturation process with this diet. In the case of gene expression of these enzymes, we observed that the codifying levels of RNA for trypsin and aminopeptidase can positively be stimulated with the diet containing yeast ODC (-), whereas for lipase, major levels are observed in the control diet, nevertheless there exists a progressive increase in the larvae fed with yeast (ODC-). The levels of RNA for amylase, present the same pattern of that observed in activity in the control diet as well as in that contains yeast ODC (-). This suggests that a diet containing yeast is capable to produce polyamines and can modify or induce important changes in the secretion pattern and digestive enzymatic expression, allowing intestinal and pancreatic maturation.

Key words: probiotics, polyamines, *Debaryomyces hansenii* yeast, digestive maturation.

DEDICATORIA

A Paul:

Hermanito, este éxito es tuyo, tu eres el regalo mas grande que me dio la vida, gracias por tu gran amor.

A mi mamá y mi hermana:

Gracias por ser mis amigas y la felicidad de mi vida, por su paciencia, apoyo y amor incondicional.

A Fabito y Alex: Las luces de mi vida.

A Pablo:

Gracias por permitirme amarte, por tu risa, por tu cariño, tu amor y paciencia que son regalos invaluableles en mi vida.

AGRADECIMIENTOS

A CONACyT y a Posgrado por todos los apoyos otorgados beca núm. 201358 y al proyecto SAGARPA-CONACYT 2004 -044.

Al CIBNOR por aceptarme como su estudiante y permitirme concluir la maestría, así como a mis profesores que siempre fueron amables, especialmente a Martha Haro, Leonardo Soberanis y Diana Dorantes.

Al Dr. Dariel Tovar por creer en mí, por abrirme puertas, por su amabilidad, por apoyarme en todo y principalmente por su valiosa amistad.

A Alma Millan por su amistad y sus valiosos consejos.

Al Dr. Humberto Mejia por sus revisiones y apoyo para el examen y al Dr. Vicente Gracia por sus comentarios y correcciones para mejorar este trabajo.

Al IRTA Barcelona, a Karl, Laura Mónica, Emilia y Enric, así como a todas las personas que me recibieron en España por su ayuda y su amistad.

A todos los técnicos que me ayudaron en la realización de este trabajo, Orlando L., Carmen R., Ernesto G., Hever B., Laura C., Talí G. y especialmente a Paty Hinojosa.

A mi familia.

A Roberto Carlos Vázquez por tu gran amistad, por haberme dejado conocerte, por ser apoyo y alegría, por estar presente en momentos difíciles y aunque ya no puedo verte, siempre vas conmigo, en mi corazón como mi gran amigo.

A mis compañeros de la maestría y amigos del CIB: Vero, Yorsh, Anna Belia, Mao, Pedro, Ricardo, Fercho, Luzali, Erika, Perla, Mara, Esthercita, Kenny,

Rigo, Jorge Ivan, Hugo, Mario, Eliana, Christian, Oscar, Gracia, Normita, Yosef, Lucia y a todas las personas que comparten conmigo este momento.

A Martita y Marcela por ayudarme en varios experimentos de este trabajo y su amistad sincera.

A Izmene Gutierrez y Claudia Morales y Wendy Gomez por nuestras diferencias y similitudes que han hecho crecer una gran amistad.

A Itzel, Car y Rox por su amistad, escucharme, ser apoyo y amigas.

A Erika, Oscar, Ricardo, Fercho y Luzali mis amigos, que compartieron conmigo la maestría, mis alegrías y también días tristes, gracias por dejarme entrar en sus vidas, y por su ayuda para concluir mi trabajo.

A Pablo por ayudarme con el inglés, Alex con la compu y a César con las impresiones.

A Paty Guzmán por estar conmigo en las buenas y en las malas, por todas tus palabras de aliento, por tu amistad incondicional, por nuestras diferencias y similitudes.

A Itzel, Lety, Pamela, Olga, Alejandro, Roman, Alberto, Zugasti, Lalo, Tere y Ruth por estar conmigo sin importar el tiempo y la distancia.

A mis primos Tavio, Rosy y Aidi, los quiero mucho, soy muy afortunada de tenerlos en mi vida.

A Teresa Morales (antes Magie, en su negro pasado) y Madeline Rosales, por ser amigas y ejemplo de vida para mí.

A todas las personas que están en mi vida dándome su cariño y amistad.

CONTENIDO

1. 1. INTRODUCCIÓN	1
Probióticos	2
Ventajas del uso de probióticos	2
Uso de levaduras como probióticos.....	3
Poliaminas.....	3
Funciones de las poliaminas.....	4
Metabolismo de las poliaminas.....	5
Inhibidor de la actividad ODC	7
ANTECEDENTES	8
Cabrilla arenera <i>Paralabrax maculatofasciatus</i>	8
Desarrollo del aparato digestivo de la cabrilla arenera	8
Desarrollo larval	10
Actividad enzimática digestiva	12
Papel de los probióticos en la acuicultura	14
α -difluorometilornitina (DFMO)	15
JUSTIFICACIÓN	17
HIPÓTESIS	18
OBJETIVOS.....	19
Objetivo general	19
Objetivos particulares	19
MATERIAL Y MÉTODOS.....	20
Levadura	20
Medio de cultivo para el crecimiento de la levadura.....	20
Cinética de crecimiento de las levaduras	21
Cuantificación de poliaminas biogénicas por HPLC	21
Método de extracción de poliaminas biogénicas.....	21
Dansilación.....	22
Detección de poliaminas por HPLC	23
Cuantificación de poliaminas	24
Elaboración de las dietas microparticuladas	24

Cultivo de Levaduras	25
Cuenta viable de levaduras en el alimento.....	25
Elaboración del alimento microparticulado.....	27
Cultivo Larvario	28
Incubación de Eleuteroembriones	29
Siembra de las larvas	29
Alimentación de larvas.....	30
Diseño experimental	31
Limpieza del sistema	31
Obtención de muestras.....	33
Cuantificación de la expresión de genes codificantes para las enzimas digestivas, lipasa, amilasa, tripsina y aminopeptidasa.....	33
Extracción de ARN.....	33
Homogenización del tejido.....	34
Procedimiento	34
Tratamiento con DNasa I.....	36
Procedimiento	36
SINTESIS DE cDNA	36
Procedimiento	36
Preparación de gel de agarosa al 1%.....	38
PCR en tiempo real.....	38
Cuantificación de los ARN codificantes para las enzimas tripsina, lipasa, amilasa y aminopeptidasa.	39
Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real (PCRq)	39
Cuantificación de enzimas digestivas por métodos espectrofotométricos.....	40
Lipasa (Versaw et al., 1989).....	41
Tripsina (Erlanger et al., 1961)	42
Aminopeptidasa N (Maroaux, 1973).....	42
Amilasa (Almidón como sustrato) Vega- Villasante et al., 1993.....	43
Determinación de proteínas solubles por el método de Bradford (Bradford, 1976).....	44
Crecimiento de las larvas de peces.....	44

Análisis estadísticos.....	44
Preparación de las dietas	45
Cinética de crecimiento de la levadura <i>Debaryomyces hansenii</i>	45
Producción de poliaminas.....	45
Efecto de las dietas con levaduras sobre la supervivencia y el crecimiento de larvas de cabrilla arenera (<i>Paralabrax maculatofasciatus</i>).....	47
Efecto de la inclusión en la dieta de <i>Debaryomyces hansenii</i> sobre la actividad enzimática digestiva de larvas de la cabrilla arenera	50
Actividad Lipasa	50
Actividad tripsina	52
Actividad amilasa	53
Actividad aminopeptidasa	54
Obtención de la sonda de cDNA para aminopeptidasa.....	54
Cuantificación relativa de los niveles de ARN codificantes para las enzimas digestivas de la cabrilla arenera.	56
DISCUSIÓN	61
Detección y cuantificación de poliaminas en la levadura	61
Efecto de las dietas con levaduras sobre la supervivencia y el crecimiento de larvas de cabrilla arenera (<i>Paralabrax maculatofasciatus</i>).....	63
Efecto de la inclusión en la dieta de <i>Debaryomyces hansenii</i> sobre la actividad enzimática digestiva de larvas de la cabrilla arenera	67
Lipasa.....	71
Tripsina.....	73
Amilasa.....	75
Aminopeptidasa	78
Prospección a futura investigación	84
LITERATURA CITADA	86

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. El metabolismo de las poliaminas.....	7
Figura 2. Larva de 5 días DDE.....	9
Figura 3. Larva de 9 días DDE.....	10
Figura 4. Sistema de cultivo cerrado.....	29
Figura 5. Cinéticas de crecimiento de la levadura <i>Debaryomyces hansenii</i> en condiciones normales y en presencia del inhibidor de la enzima ODC.....	46
Figura 6. Concentraciones (ng/ μ L) de las poliaminas durante la fase exponencial de crecimiento de la levadura <i>Debaryomyces hansenii</i>	46
Figura 7. Concentraciones de poliaminas (%) de <i>Debaryomyces hansenii</i> en presencia del inhibidor de la enzima ODC (DFMO).....	47
Figura 8. Concentraciones de poliaminas (%) de <i>Debaryomyces hansenii</i> en ausencia del inhibidor DFMO.....	47
Figura 9. Supervivencia larvaria de la cabrilla arenera.....	48
Figura 10. Microfotografías (10x) mostrando larvas de cabrilla arenera de 10 días después de la eclosión.....	49
Figura 11. Microfotografías (10x) mostrando larvas de cabrilla arenera de 10 días después de la eclosión.....	49
Figura 12. Crecimiento de larvas de la cabrilla arenera alimentada con levadura (1.1 % de inclusión). Se muestran las medias y el error estándar, donde diferentes literales indican diferencias significativas ($P < 0.05$).	50
Figura 13. Actividad enzimática lipasa (U/ mg de tejido) <i>in vitro</i> , durante los días 20 al 35 DDE.....	51
Figura 14. Actividad enzimática tripsina (U/ mg de tejido) <i>in vitro</i> , durante los días 20 al 35 DDE.....	52
Figura 15. Actividad enzimática amilasa (U/ mg de tejido) <i>in vitro</i> , durante los días 20 al 35 DDE.....	53
Figura 16. Actividad enzimática de la aminopeptidasa (U/ mg de tejido) <i>in vitro</i> , durante los días 20 al 35 DDE.....	54
Figura 17. Gel de agarosa que muestra la banda correspondiente a la aminopeptidasa.....	55

Figura 18. Cuantificación relativa de ARN codificantes para amilasa.....	58
Figura 19. Cuantificación relativa de ARN codificantes para tripsina. Se muestran medias y desviación estándar..	58
Figura 20. Cuantificación relativa de ARN codificantes para lipasa.....	59
Figura 21. Cuantificación relativa de ARN codificantes para aminopeptidasa..	60

LISTA DE TABLAS

Tabla I. Poliaminas más comunes.....	5
Tabla II Composición de ingredientes del medio YPD	20
Tabla III. Concentraciones de agua/acetonitrilo utilizados para el HPLC	23
Tabla IV. Tiempos de retención (TR) y Espectros de las poliaminas.	24
Tabla V. Formulación usada para la fabricación de las dietas microparticuladas (1.1% de inclusión en peso seco).....	26
Tabla VI. Composición química proximal de las tres dietas utilizadas para la alimentación de larvas de la cabrilla arenera.	27
Tabla VII. Relación de la secuencia de alimentación suministrada a larvas de cabrilla arenera en la fase de coalimentación..	32
Tabla VIII. Componentes para la primera reacción de síntesis de cDNA.....	37
Tabla IX. Componentes para la segunda reacción de síntesis de cDNA	37
Tabla X. Componentes utilizados para realizar PCRq	39
Tabla XI. Enzimas determinadas por métodos espectrofotométricos.....	41

I. INTRODUCCIÓN

La acuicultura es una actividad económica muy importante en el mundo, (Balcázar *et al.*, 2006) puesto que la producción de organismos acuícolas constituye una de las principales fuentes de alimento y trabajo en los países que se dedican a ella (Gatesoupe, 1999). Sin embargo, en México se encuentra en plena fase de desarrollo y experimental (Gomez-Gil *et al.*, 2000; Lluch-Cota, 1995). El éxito limitado de la larvicultura de peces marinos en parte, se debe a un conocimiento insuficiente del desarrollo funcional del sistema digestivo y de los requerimientos alimenticios y nutricionales de las larvas, lo cual es fundamental puesto que la actividad de algunas enzimas puede ser utilizado como indicador de las capacidades digestivas de las larvas (Cara-Torres *et al.*, 2002).

Otro de los principales problemas en el cultivo de peces es la alta mortalidad larvaria (Alvarez-González *et al.*, 2001a; Avilés-Quevedo e Itzawa, 1993) debida a factores tales como, el desarrollo incompleto del tracto digestivo de la larva al eclosionar, el cual no es 100% funcional, lo que se traduce en una inadecuada asimilación de nutrientes, además de que el alimento vivo que necesitan estos organismos representa un costo muy elevado para el acuicultor (50-60% del costo de producción) (Barnabé, 1994; Aviles-Quevedo *et al.*, 1995).

Para intentar solucionar esta problemática, en los últimos años se ha iniciado el uso experimental de alimentos microparticulados adicionados con probióticos con fines de mejorar los rendimientos en el cultivo de larvas debido a

su capacidad de adherencia y persistencia en el tracto digestivo, así como su capacidad antagónica hacia patógenos (Gatesoupe, 1999).

1.1 Probióticos

El término probiótico se aplica a aquellos microorganismos que al ser administrados por vía oral, pueden llegar y colonizar el sistema gastrointestinal del hospedero, manteniéndose vivos para promover la salud (Gatesoupe, 1999).

1.1.2 Ventajas del uso de probióticos

El uso de probióticos en humanos y nutrición animal es bien documentado (Fuller, 1992; Mulder *et al.*, 1997; Rinkinen *et al.*, 2003) y recientemente se ha comenzado su aplicación en la acuicultura (Gatesoupe, 1999; Gómez-Gil *et al.* 2000; Verschuere *et al.* 2000; Irianto y Austin, 2002; Bachère, 2003).

Se han sugerido múltiples beneficios ligados a la administración de probióticos tales como: (1) exclusión competitiva de bacterias patógenas (Garriques y Arevalo, 1995; Moriarty, 1997; Gómez-Gil *et al.*, 2000; Balcázar, 2003; Balcázar *et al.*, 2004; Vine *et al.*, 2004a); (2) son fuente de nutrientes y enzimas que contribuyen a la digestión (Sakata, 1990; Prieur *et al.*, 1990; Garriques y Arevalo, 1995); (3) asimilan material orgánico de desechos bacterianos (Garriques y Arevalo, 1995; Moriarty, 1997); y otros que aun están siendo investigados como: (4) aumento de la respuesta inmune contra microorganismos patógenos (Andlild *et al.*, 1995; Schloz *et al.*, 1999; Rengpipat *et al.*, 2000; Gullian y Rodríguez, 2002; Irianto y Austin, 2002; Balcázar, 2003;

Balcázar *et al.*, 2004; Reyes *et al.*, 2008a,b); (5) efecto antiviral (Kamei *et al.*, 1988; Girones *et al.*, 1989; Direkbusarakom *et al.*, 1998); (6) aportan moléculas de importancia fisiológica para el hospedero como son proteínas, vitaminas y poliaminas (Péres *et al.*, 1997; Tovar *et al.* 2004), las cuales son consideradas como factores de crecimiento naturales (Bardócz *et al.*, 1993).

1.1.3 Uso de levaduras como probióticos

En la última década, inició el uso de levaduras como probióticos, entre las que destacó la levadura *Debaryomyces hansenii* (Tovar *et al.*, 2002; Tovar *et al.*, 2004) debido a que puede adherirse a la superficie de la mucosa intestinal y colonizar el tracto digestivo, dicho mecanismo protege contra organismos patógenos a través de la competencia por sitios de fijación y nutrientes (Tovar *et al.*, 2002; Vázquez-Juárez *et al.*, 1997). Esta habilidad es considerada como uno de los principales criterios de selección de un potencial probiótico (Vine *et al.* 2004b; Balcázar *et al.*, 2006), además es inocua y produce tres de las más importantes poliaminas, putrescina, espermidina y espermina (Tovar *et al.*, 2002; Tovar *et al.*, 2004; Vázquez-Juárez *et al.*, 1997).

1.2.1 Poliaminas

Son un grupo de pequeñas moléculas de bajo peso molecular alifáticas (no cíclicas) cuya característica es poseer dos o más grupos amino en su estructura, policatiónica (Tabor y Tabor, 1984a; Tabor y Tabor, 1984b). Las poliaminas tienen dos características principales: (1) poseen cargas positivas diferencialmente espaciadas con un esqueleto de carbono flexible, lo cual

permite que haya interacciones electrostáticas con otros componentes celulares como macromoléculas cargadas negativamente y, (2) poseen una sofisticada maquinaria metabólica para regular y mantener la homeostasis intracelular (Juhäni *et al.*, 2004).

1.2.2 Funciones de las poliaminas

Participan en numerosos procesos biológicos, incluyendo el 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 así como la activación de la síntesis de ADN, entre otros (Casero y Woster, 2001; Thomas y Thomas, 2001). Estas poliaminas se derivan de la dieta o de la flora bacteriana (Seidel Scemama, 1997).

El papel de las poliaminas en la dieta de mamíferos ha sido estudiado extensamente, para inducir el desarrollo del tracto digestivo (Dufour *et al.*, 1998). Se ha demostrado que las poliaminas juegan un papel importante en el desarrollo del tracto gastrointestinal de mamíferos, incluyendo páncreas, hígado e intestino (Bardócz *et al.*, 1993).

Las poliaminas, especialmente espermidina y espermina pueden interactuar con la matriz nuclear del ADN, por lo que pueden influenciar alterando su estructura, convirtiéndolo de la forma B a Z, lo cual afecta su función (Wallace *et al.*, 2003). Además, en el nucleosoma al agotarse las poliaminas provoca un parcial desenrollamiento del ADN y con ello pone en

evidencia secuencias que son potencialmente unidas a factores que regulan la transcripción (Wallace *et al.*, 2003).

Es un hecho que las poliaminas pueden tener un papel dual en las funciones celulares promoviendo el crecimiento celular o induciendo la apoptosis cuando están en exceso (Wallace *et al.*, 2003).

1.2.3 Metabolismo de las poliaminas

Las poliaminas putrescina, espermidina y espermina (Tabla I) son cationes orgánicas que participan en múltiples reacciones celulares. En la década pasada se tuvieron grandes avances en su conocimiento gracias a estudios de ingeniería genética del metabolismo de las poliaminas (Juhäni *et al.*, 2004).

Tabla I. Poliaminas más comunes.

NOMBRE	FÓRMULA	ABREVIACIÓN
Putrescina	$H_2N(CH_2)_4NH_2$	Put
Espermidina	$H_2N(CH_2)_3NH(CH_2)_4NH_2$	Spd
Espermina	$H_2N(CH_2)_3NH(CH_2)_4NH(CH_2)_3NH_2$	Sp

De acuerdo a las condiciones en las que son generadas, se dice que las poliaminas verdaderas son sintetizadas de *novo*, y las biogénicas son generadas por reacciones no específicas como descarboxilación de aminoácidos. La vía metabólica de biosíntesis de las poliaminas involucra dos aminoácidos, L-ornitina y L-metionina, estos son los precursores primarios de

las poliaminas. La L-ornitina es separada de la L-arginina por la enzima arginasa II mitocondrial o derivada de la dieta (Göth *et al.*, 1996).

La L-metionina es primero convertida a S-adenosil-L-metionina (AdoMet). En seguida Adomet y ornitina son descarboxiladas por dos enzimas citosólicas llamadas ornitindescarboxilasa (ODC) y AdoMet descarboxilasa (AdoMet DC). Esta reacción forma putrescina. La siguiente reacción de descarboxilación ocurre cuando AdoMet DC dona un grupo aminopropil a la putrescina en una reacción catalizada por una transferasa para formar la espermidina.

La espermidina es catalizada por otra transferasa llamada espermina sintetasa para formar espermina (Casero *et al.*, 1991).

La descarboxilación y la transferencia de propilaminas son prácticamente irreversibles por lo que existe un sistema alternativo para convertir las poliaminas a la putrescina. Este sistema utiliza dos enzimas diferentes una espermidina/espermina N-acetiltransferasa citosólica (SSAT) (Casero *et al.*, 1991) y una flavoproteína peroxisomal poliamina oxidasa (PAO) (Höltä, 1977).

PAO tiene preferencia por acetilar poliaminas como sustrato (Höltä, 1977; Casero y Pegg, 1993) y SSAT está controlando las enzimas de reconversión de esta vía (Casero y Pegg, 1993), como indica la Fig. 1.

La espermina puede ser nuevamente mono o diacetilada por SSAT (Vujcic *et al.*, 2000). SSAT es absolutamente necesaria para la conversión de espermidina a putrescina mientras la espermina es fácilmente convertida a espermidina en ausencia de SSAT (Niiranen *et al.*, 2002).

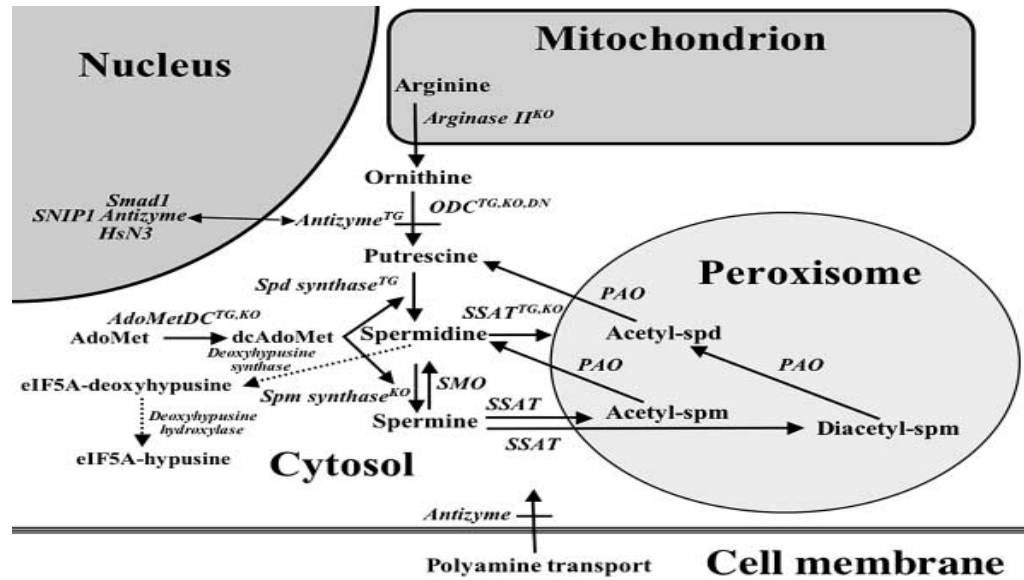


Figura 1. El metabolismo de las poliaminas. ODC, ornitín-descarboxilasa; Spd, espermidina; AdoMetDC, S-adenosilmetionina descarboxilasa; dcAdoMet, descarboxilada AdoMet; Spm, espermina; SSAT, espermidina/espermina N1-acetiltransferasa; PAO, poliamina oxidasa; SMO, espermina oxidasa. Tomado de Juhäni *et al.*, (2002).

1.3.1 Inhibidor de la actividad ODC

Los inhibidores de estas vías metabólicas han sido frecuentemente usados para investigar el papel de las poliaminas en el crecimiento y la proliferación celular así como para entender la regulación de las poliaminas y las enzimas involucradas en el metabolismo (Pegg, 1986). Uno de los inhibidores más usados es el α -difluorometilornitina (DFMO), este potente inhibidor tiene una alta y específica afinidad por la ODC, lo cual ha provisto una poderosa herramienta para el estudio bioquímico de dicha enzima (Seely y Pegg, 1983a).

II. ANTECEDENTES

2.1 Cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*)

La cabrilla arenera es un organismo con un razonable potencial de ser cultivado, debido a que puede presentar desoves inducidos durante todo el año, se adapta fácilmente a los cambios ambientales, es resistente y tiene una demanda comercial regional además de que su carne puede alcanzar un buen precio en el mercado (Alvarez-González *et al.*, 2001a; Gómez-Gil *et al.*, 2000; Aviles-Quevedo *et al.*, 1995; Lluch-Cota, 1995; Matus *et al.*, 1990).

La cabrilla arenera es un pez demersal que habita en fondos arenosos desde la zona intermareal hasta 61 m de profundidad. Se alimenta de pequeños peces y crustáceos bentónicos (Allen, 1994). Es una especie hermafrodita, protoginica (Lluch-Cota, 1995) y se distribuye desde Monterey, California, U.S.A., todo el Golfo de California hasta las costas de Guerrero, México (Allen, 1994).

2.1.2 Desarrollo del aparato digestivo de la cabrilla arenera

Los eleuteroembriones emergen (día 0) con una LT (longitud) promedio de 1.6 mm. Al momento de la eclosión, el tubo digestivo es como un tubo recto indiferenciado, diámetro promedio de 0.8 ± 0.1 mm. A partir del segundo día, da inicio el proceso de diferenciación del tubo digestivo con la aparición de la válvula intestinal, se abren tanto la boca como el ano. Sin embargo, aún se presentan remanentes del saco vitelino y del glóbulo de aceite. Para el día 3 DDE (días después de la eclosión), se agotan tanto las reservas vitelinas como

el glóbulo de aceite y da inicio el proceso de diferenciación del estómago. Durante el mismo día 3 DDE, continúa la diferenciación del resto de los componentes del tubo digestivo. El día 5 DDE, cuando las larvas tienen una LT promedio de 3.0 ± 0.3 mm, el tubo está completamente diferenciado en seis zonas principales: bucofaringe, esófago, estómago, intestino anterior, intestino posterior y recto (Fig.2) (Peña, 2005).

Los primeros indicios del desarrollo del esófago ocurren después de abrirse la boca; al momento de la eclosión, los eleuteroembriones carecen de estómago y éste comienza a formarse a partir del día 3. Para el día 5, el esófago está bien diferenciado (Fig.3) (Peña, 2005).

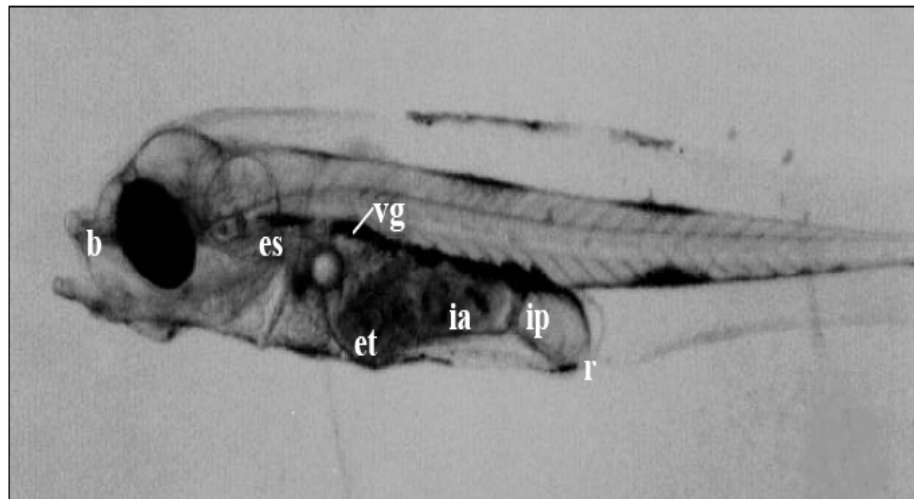


Figura 2. Larva de 5 días DDE. LT promedio = 3.0 ± 0.3 mm. Diferenciación del tubo digestivo en seis zonas principales: bucofaringe (b), esófago (es), estómago (et), intestino anterior (ia), intestino posterior (ip) y recto (r). Nótese la vejiga gaseosa (vg). (Tomado de Peña, 2005).

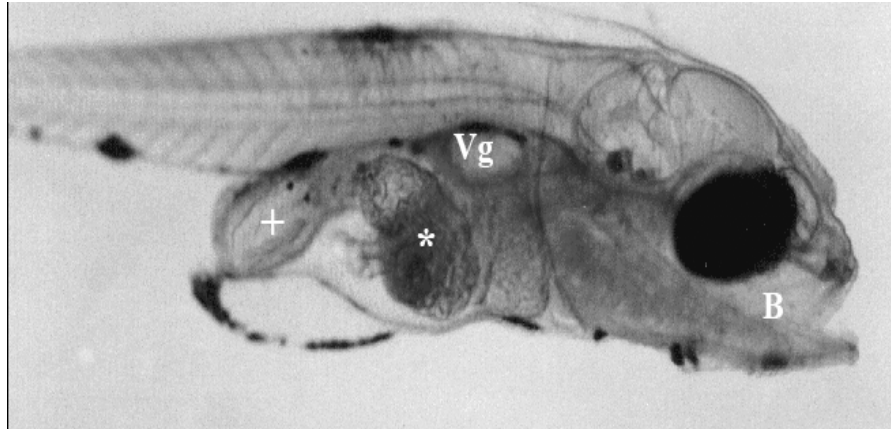


Figura 3. Larva de 9 días DDE. LT promedio = 3.9 ± 0.4 mm. Se observa la diferencia de pliegues entre el intestino anterior-estómago (*) y el intestino posterior (+). Vg: Vejiga gaseosa B: Bucofaringe. (Tomado de Peña, 2005).

Para el día 2 DDE, se forma la válvula intestinal conformada por tejido conectivo y epitelio cilíndrico simple, la cual permite distinguir el intestino anterior y el intestino posterior. La torsión del tubo digestivo, que involucra al intestino anterior, inicia en el día 6 DDE, y finaliza el día 9. Por su parte, el páncreas se presenta en el día 1 como un parche celular, para el día 3 es compacto y se encuentra en posición dorsal del intestino anterior. Al día 5, el páncreas emigra hacia la zona ventral y proximal del intestino anterior (Peña *et al.*, 2003).

2.2 Desarrollo larval

En las últimas dos décadas se han realizado muchas investigaciones, de las habilidades digestivas y los requerimientos nutricionales específicos de las larvas y juveniles de peces (Cahu y Zambonino, 2001).

El proceso de maduración del tracto digestivo ocurre varias semanas después de la eclosión en las larvas de peces y corresponde al cambio en el tipo de digestión larval a la forma adulta (Zambonino y Cahu, 2001). También se han estudiado los cambios dependientes de la edad en el tracto digestivo anatómica y morfológicamente durante la metamorfosis larval, con respecto a la dieta, las características bioquímicas y la utilización de los nutrientes. En la mayoría de los estudios realizados se ha observado un incremento progresivo en la actividad de las enzimas digestivas con la edad, aunque en muchos casos puede verse interrumpido temporalmente por descensos bruscos, posiblemente debidos a los cambios morfológicos, como son la maduración del sistema digestivo y/o cambios nutricionales por el tipo de alimentación que tiene lugar durante los distintos estadios del desarrollo larvario (Cahu y Zambonino, 1994). Las larvas de peces regulan su actividad enzimática a la composición de la dieta y las variaciones detectadas en la actividad se relacionaron fundamentalmente con los cambios en la alimentación a lo largo del desarrollo larvario (Cahu y Zambonino, 2001; Kolkovsky, 2001; Cara-Torres *et al.*, 2002).

Después de la metamorfosis, el pez ya tiene completa la carga de enzimas para iniciar la alimentación (Kolkovski, 2001). La inhabilidad de las larvas de peces marinos para crecer adecuadamente al ser alimentados con dietas artificiales, ha sido generalmente atribuida a una baja actividad enzimática, lo cual resulta en una pobre capacidad digestiva (Alvarez-González, 2003).

2.3 Actividad enzimática digestiva

Poco después de la apertura de la boca, es posible detectar una amplia gama de enzimas en larvas de peces marinos en estadios tempranos (Zambonino Infante y Cahu, 1994). Ribeiro *et al.*, (1999) reportaron actividades enzimáticas elevadas de amilasa y tripsina, en larvas al momento de abrir la boca; la capacidad enzimática antes de la primera alimentación sugiere que esas actividades no fueron inducidas por el alimento. En el desarrollo temprano de las larvas, la secreción de aminopeptidasa es indicadora de la madurez del páncreas y de intestino respectivamente (Kurokawa y Suzuki, 1996).

La presencia de las principales enzimas digestivas en el momento de la apertura de la boca en larvas de peces, ha sido demostrada no solamente en especies de agua dulce, o salobre como *Acipenser studio* (Gawlica *et al.*, 1995), sino también en especies marinas como *Sparus aurata* (Moyano *et al.*, 1996) o *Solea senegalensis* (Moyano *et al.*, 1999). Parte de la evolución de tales actividades estarán afectadas tanto por la velocidad de desarrollo de los tejidos secretores, como por la naturaleza y disponibilidad del alimento (Carra-Torres *et al.*, 2002).

Con respecto al crecimiento larval, las actividades de las enzimas del borde de cepillo aumentan de manera importante, y la actividad citosólica disminuye aproximadamente en la tercera semana de vida (Cahu y Zambonino, 1994; Ribeiro *et al.*, 1999; Buchet *et al.*, 1997).

La leucina-alanina peptidasa es una enzima citosólica y su actividad es muy alta durante las primeras tres semanas de vida de las larvas y disminuye progresivamente con el crecimiento (Buchet *et al.*, 1997; Ribeiro *et al.*, 1999; Nicholson *et al.*, 1974). El aumento de la aminopeptidasa-N en las membranas de borde de cepillo de las células intestinales es característico de la maduración normal de los enterocitos. El establecimiento de una digestión eficiente en la membrana de borde de cepillo, se presenta en los enterocitos de los adultos (Henning *et al.*, 1994).

La capacidad de digestión proteica en las larvas se ha evaluado a través de la cuantificación de la actividad proteasa total ácida y alcalina; también se ha medido la actividad de las enzimas comúnmente usadas como indicadores tanto de pinocitosis de proteínas (fosfatasa ácida), como de hidrólisis completa a nivel intestinal (leucina aminopeptidasa) o absorción de aminoácidos (fosfatasa alcalina). El crecimiento en los organismos depende del sistema digestivo, donde se llevan a cabo los procesos de absorción y digestión. En el sistema digestivo, la digestión luminal y la digestión de las células del borde de cepillo dan como resultado la actividad enzimática del tracto digestivo. El estado final de la digestión es llevado a cabo por los enterocitos intestinales, que en el proceso de la migración desde la región de las criptas hacia la punta del vello, adquiere funciones diferenciadas incluyendo la expresión de las enzimas de la membrana de borde de cepillo como son disacaridasas, fosfatasa alcalina y transpeptidas (Harpaz y Uni 1999).

2.4 Papel de los probióticos en la acuicultura

Varios probióticos potenciales han sido estudiados por su capacidad de adherencia y persistencia en el tracto digestivo (Gatesoupe, 1999). Algunos trabajos describen su aislamiento, los mecanismos y capacidad de adhesión así como su persistencia en hospederos (crustáceos, peces y moluscos) y en algunos peces de importancia comercial como la trucha y el rodaballo (Andlid *et al.*, 1995 Vázquez-Juárez, 1997).

Existen reportes del uso de levaduras como probióticos, donde se comprobó que éstas se adhieren al tracto digestivo y posteriormente colonizan el intestino de peces, aumentando así su aplicación en la acuicultura (Gatesoupe, 1999). Otros trabajos reportan para larvas de la lubina europea (*Dicentrarchus labrax*), que la cepa CBS 8339 (*D. hansenii*) produce tres poliaminas: putrescina, espermidina y espermina, las cuales ejercen un incremento de la actividad, expresión genética y secreción de enzimas digestivas. Además se conoce que tiene una alta capacidad de adhesión al intestino en la lubina europea y la cabrilla arenosa (Tovar *et al.*, 2004).

Algunos autores mencionan que las poliaminas pueden modificar la secreción enzimática digestiva. Tal es el caso del suministro de espermina sintética en las etapas larvarias de la lubina europea (*Dicentrarchus labrax*), que produce un incremento en la actividad enzimática de las células del borde de cepillo (leucino-aminopeptidasa y fosfatasa alcalina) y una baja de actividad citosólica (leucino-alanina peptidasa). También se observan cambios positivos en la actividad de las enzimas pancreáticas tripsina, quimiotripsina y amilasa,

con respecto a la dieta control libre de poliaminas (Péres *et al.*, 1997). La aparición de un sistema digestivo eficiente como en los adultos de la especie, es logrado cuando las larvas de la lubina europea son alimentadas con una dieta enriquecida con poliaminas (Péres *et al.*, 1998) y por otro lado, con levaduras productoras de poliaminas (Tovar *et al.*, 2002; Tovar *et al.*, 2004).

La administración vía oral de espermina o espermidina induce la maduración morfológica y funcional prematura del intestino delgado, ya que la mucosa del tracto intestinal, especialmente en el intestino delgado, se renuevan rápidamente y tienen un incremento en la demanda de estas moléculas (Katsuhiko *et al.*, 2003). La biosíntesis de las poliaminas está determinada por la enzima 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). También se ha estudiado el efecto de la inclusión de levadura viva (*D. hansenii*) en alimento microparticulado sobre la respuesta inmune en juveniles de la cabrilla sardinera *M. rosácea* (Reyes-Becerril *et al.*, 2008); además de que favorece el crecimiento en la lubina europea (Tovar *et al.*, 2004; Gatesoupe, 2007).

2.5 α -difluorometilornitina (DFMO)

La ODC esta íntimamente involucrada en el metabolismo de las poliaminas. La antienzima fue inicialmente descubierta en los 70's como una proteína inhibidora de la ODC (Fong *et al.*, 1976; Heller *et al.*, 1976 y MacCann, 1977).

El DFMO es uno de los inhibidores más eficientes de la actividad ODC. Al ser descarboxilado por ODC produce un intermediario electrofílico que reacciona con un centro nucleofílico del sitio activo de la enzima para formar un enlace covalente. Esta reacción produce inactivación irreversible de la enzima (Pegg, 1986). Así la deficiencia de poliaminas afecta la síntesis de ADN, ARN y proteínas.

III. JUSTIFICACIÓN

En México, y en especial en la región noroeste, se están haciendo esfuerzos para llevar a cabo la optimización de las tecnologías de cultivo de peces marinos con potencial económico. Sin embargo, se necesitan incrementar los esfuerzos multidisciplinarios para abarcar la gama de problemas en los cuales se centran los cuellos de botella y así, avanzar significativamente en el conocimiento biológico de las especies, la fisiología digestiva, reproducción, nutrición, cría larvaria, etc.

La investigación referente al desarrollo de la fisiología digestiva de las larvas de peces, así como las dietas microparticuladas adicionadas con levaduras constituye un importante paso dentro del desarrollo de nuevas tecnologías para el cultivo, ya que permite conocer el efecto de las poliaminas en función del estado de desarrollo del tubo digestivo de las larvas, entender sus requerimientos alimenticios y su capacidad digestiva; de tal forma que se consiga el mayor aprovechamiento del alimento y con ello disminuir los elevados índices de mortalidad, lo que se verá reflejado en mayores tasas de crecimiento y supervivencia. Finalmente, al ofrecer una dieta artificial, propiciara una reducción en los costos de mantenimiento del alimento vivo.

IV. HIPÓTESIS

Si el desarrollo funcional del sistema digestivo en larvas de la cabrilla arenera es complementado y acelerado por el aporte de poliaminas de la levadura *Debaryomyces hansenii* (cepa 8339), entonces, el aporte de estas poliaminas, se verá significativamente disminuido por la incorporación de levaduras tratados con DFMO, inhibidor de la actividad ornitín descarboxilasa (ODC) y por lo tanto se observaría un retraso en el desarrollo de la larva.

V. OBJETIVOS

Objetivo general

- Conocer el efecto de la incorporación de la cepa CBS 8339 *Debaryomyces hansenii*, de forma silvestre e inhibida en su actividad ornitín-descarboxilasa (ODC) en el desarrollo del sistema digestivo en larvas de la cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*).

Objetivos particulares

- Conocer la cinética de producción de poliaminas de la cepa CBS 8339 (*Debaryomyces hansenii*) durante sus fases de crecimiento.
- Realizar la inhibición irreversible de la síntesis de la enzima ornitín-descarboxilasa (ODC) con α - difluorometil ornitín-descarboxilasa (DFMO).
- Evaluar los efectos de la incorporación en la dieta de levaduras silvestres (ODC +) y carentes de actividad ornitín-descarboxilasa (ODC -) en el crecimiento y supervivencia larval.
- Evaluar cambios en el desarrollo del sistema digestivo de larvas de cabrilla arenera a través de la actividad enzimática digestiva *in vitro* y de la cuantificación de PCR en tiempo real de los niveles de ARN codificantes para tripsina, amilasa, lipasa y aminopeptidasa N.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS.

6.1 Levadura

Para conocer el potencial de producción de poliaminas se utilizó la levadura *D. hansenii* CBS 8339, aislada del intestino de la trucha arcoiris (Andlid *et al.*, 1995).

6.1.2 Medio de cultivo para el crecimiento de la levadura

La reactivación de las levaduras se llevó a cabo en medio líquido YPD (Yeast extract-Peptone-Dextrose, Sherman, 1991), la composición de los ingredientes se muestra en la tabla II.

Tabla II. Composición del medio YPD.

Ingredientes	Proporción
	%
Glucosa	2
Peptona	1
Extracto de levadura	0.5
Agua destilada estéril	96.5

La esterilización del medio de cultivo se llevó a cabo en una autoclave a 120° C, 15 lb de presión durante 20 min. Las levaduras se inocularon por estría

cruzada en medio YPD (Agar 2%) y fueron incubadas a 30° C para observar crecimiento (24-48 horas).

6.1.3 Cinética de crecimiento de las levaduras

Se usaron matraces de 125 mL de capacidad con 25 mL de medio YPD. Cada matraz fue inoculado con 2.5 mL de suspensión celular. Como parámetro de crecimiento se consideró el aumento de densidad óptica medido a 550 nm en un espectrofotómetro Beckman DU[®] 640, cada cuatro horas a partir del tiempo cero (t₀) durante 24 horas. Los matraces se incubaron a 200 rpm y 30° C en una incubadora Shaker Serie 25. También se tomaron alícuotas de tres mL en cada medición, las cuales fueron almacenadas a -60° C, para posteriormente realizar la cuantificación de poliaminas.

La cinética de crecimiento se realizó bajo condiciones normales y en presencia del inhibidor DFMO a una concentración del 2%. Cada tratamiento se realizó por triplicado.

6.2 Cuantificación de poliaminas biogénicas por HPLC

6.2.1 Método de extracción de poliaminas biogénicas

El método de extracción y detección de poliaminas se llevó a cabo de acuerdo a Mallé *et al.*, (1996) con el siguiente procedimiento: se eliminó el medio de cultivo por centrifugación a 10, 000 x g (3000 rpm) a 4° C, durante diez min. El sedimento fue lavado con agua destilada y nuevamente centrifugado. El pellet fue recuperado y resuspendido en 0.8 mL de ácido

perclórico (HClO_4) al 0.2M. Las células se rompieron utilizando un sonicador, a 40 W de potencia, con tres intervalos de 30 seg. en baño de hielo. El homogenizado resultante se centrifugó a 3000 g durante 10 min y 4° C en una centrifuga de gabinete BECKMAN GPR; del sobrenadante resultante se tomaron 100 μL para la detección por cromatografía de alta resolución (HPLC).

6.2.2 Dansilación

A partir de 100 μL del sobrenadante obtenido de la extracción de las poliaminas, se le adicionó 20 μL de diaminopropano (1ng/ 1 μL) como estándar interno, 200 μL de solución saturada de Carbonato de Calcio y 400 μL de Cloruro de Dansilo al 0.027 M, esta mezcla se agitó utilizando un vortex y fue incubada en baño de agua a 60° C durante 20 min. Transcurrido este tiempo se le agregaron 100 μL de L-Prolina al 0.8 M, se agitó con vortex y se almacenó en oscuridad durante 20 min a temperatura ambiente. A continuación se le adicionó 500 mL de Tolueno, se agitó la mezcla y se dejó reposar dos min.

En seguida, con ayuda de una pipeta Pasteur de vidrio, se recuperó la fase orgánica (fase superior), la cual fue evaporada utilizando corriente de nitrógeno gaseoso. Finalmente el producto fue resuspendido en 200 μL de acetonitrilo y se filtró en membranas (ACRODISC) de 0.2 μm . Se utilizaron 30 μL de esta solución para ser inyectada en el cromatógrafo y el resto se almacenó a -20° C (la muestra almacenada se degrada cada día, aún bajo estas condiciones).

6.2.3 Detección de poliaminas por HPLC

La detección de poliaminas biogénicas se llevo a cabo inyectando 30 μ L del homogenizado a un HPLC marca Waters modelo 2695, el cual posee un sistema de bombeo cuaternario, y el detector empleado es un PDA (Detector de arreglo de diodos) modelo 2996 (con filtro de 254 nm).

Se usó una columna SUPELCOSIL (SIGMA-ALDRICH) LC-18-DB, de 15 cm de largo, 5 μ m de diámetro, 4.6 ID y los cromatogramas se registraron y procesaron en el software del HPLC. La elución de las poliaminas se llevó a cabo con un flujo de 1 mL/min con una concentración de agua/acetonitrilo de acuerdo a los tiempos y porcentajes de la tabla III (a una temperatura de 25° C \pm 2° C).

Tabla III. Concentraciones de agua/acetonitrilo utilizados para el HPLC.

Tiempo (min)	% Acetonitrilo	% Agua
0.0	60	40
7.0	70	30
8.0	75	25
10.0	95	5
16.0	95	5
16.01	60	40
22.0	60	40

6.2.4 Cuantificación de poliaminas

Para conocer la cantidad producida de poliaminas en cada muestra, se le adicionó un estándar interno (diaminopropano, 1ng/μl) y se corrió una curva de calibración con los estándares putrescina (Sigma, P-7505), espermidina (Sigma, S-0381), espermina (Sigma, S-2876) y diaminopropano (Sigma, D2, 380-7), las concentraciones utilizadas en cada nivel fueron de 2.5, 5, 10 y 20 ng/μL. La cuantificación se realizó en base al área de los picos de las muestras correlacionadas a los picos de las poliaminas control. Para el calculo de concentración se utilizó la formula de regresión lineal simple. Para conocer el tiempo de retención y espectro de cada poliamina se realizaron inyecciones por separado de cada una de ellas, como se muestra en la Tabla IV.

Tabla IV. Tiempos de retención (TR) y Espectros de las poliaminas.

Poliaminas	TR (min)	Espectros (nm)
Estándar Interno (E.I.)	6.3	250.9, 336.3
Putrescina	6.7	249.7, 336.3
Espermina	12.02	252.1, 337.5
Espermidina	15.04	253.3, 339.7

6.3 Elaboración de las dietas microparticuladas

Fueron formuladas tres dietas microparticuladas diferentes (Tabla V), una control y otras dos adicionadas con levaduras vivas (1.1% de inclusión en

peso seco). La dieta control careció de levaduras mientras que las otras dos se diferenciaron únicamente por contener a la levadura *D. hansenii* silvestre (actividad ODC +) y el otro alimento contenía a la levadura inhibida químicamente (actividad ODC -). El análisis bromatológico de los diferentes alimentos mostró que las tres dietas eran aproximadamente entre sí, isocalóricas, isoproteicas e isolipídicas, tal y como se muestra en la Tabla VI. Su elaboración se llevó a cabo en el Laboratorio de Nutrición Acuícola perteneciente al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR).

6.3.2 Cultivo de Levaduras

Para elaborar el alimento, fue necesario escalar la producción de biomasa y pasar de un cultivo de levaduras *D. hansenii* (8339), de 1 L a un garrafón de 20 L de medio YPD. Se cultivaron a 30° C y 150 rpm durante 24 horas. Las células fueron recuperadas en una centrifuga de flujo continuo Beckman J2-HS, rotor JCF-Z a 5000 rpm a 10° C y con ayuda de una bomba peristáltica Manostat. El medio de cultivo YPD se preparó con la siguiente proporción: Glucosa (1%), extracto de levadura (2%), peptona (2%) y agua destilada estéril (95 %).

6.3.3 Cuenta viable de levaduras en el alimento

Del alimento obtenido, se tomó un gramo y se resuspendió en 10 mL de agua destilada estéril, se prepararon diferentes diluciones y se inocularon por dispersión en medio YPD sólido. Las placas se incubaron a 30° C durante toda

la noche y al día siguiente se realizó el conteo de las unidades formadoras de colonias (UFC) en el alimento.

Tabla V. Formulación usada para la fabricación de las dietas microparticuladas (1.1% de inclusión en peso seco).

INGREDIENTE	ALIMENTO CONTROL (%) BASE HÚMEDA	ALIMENTO CON LEVADURA (%) BASE HÚMEDA
Harina de Sardina	21.56	21.56
Gluten de Trigo	15.0	15.0
Conc. Prot. Sol. Pescado	20.0	20.0
Harina de Calamar	15.0	15.0
Harina Integral de Trigo	14.07	9.70
Levadura Marina	0.0	4.42
(actividad ODC silvestre o inhibida)		
Aceite de Hígado de Bacalao	5.09	5.09
Lectina de Soya	4.87	4.87
Alginato de Sodio	2.0	2.0
L-Lisina HCL	0.50	0.50
L-arginina HCL	0.50	0.50
Premezcla de vitaminas	0.70	0.70
Premezcla de minerales	0.50	0.50
Cloruro de Colina	0.13	0.13
Vit. C	0.08	0.08
BHT	0.002	0.002

Tabla VI. Composición química proximal de las dietas utilizadas para la alimentación de larvas de la cabrilla arenera.

COMPUESTO	CANTIDAD %
Lípidos	15
Proteína	55
Cenizas	6
Fibra cruda	2.9
Extracto libre de Nitrógeno	21
Energía	5053 Kcal/g

6.3.4 Elaboración del alimento microparticulado

Para la elaboración del alimento experimental las harinas y el alginato (ver Tabla 5) fueron pulverizadas utilizando un molino de piedras, posteriormente se tamizaron a través de una malla de 250 μ m. Se mezclaron los ingredientes restantes y se adicionó la levadura, que fue previamente resuspendida en agua destilada y finalmente se le agregó el ácido algínico (SIGMA A-7128) como ligante. Al alimento control no se le adicionó levadura solo el ácido algínico.

A cada alimento se le agregó un total de 210 mL de agua. A continuación se mezcló en una batidora industrial, se pasó por el extrusor con un cubo de 1/8 cortándose en trozos de 1 cm aproximadamente. El alimento se

colectó en charolas para el secado en horno y fueron mantenidas por aproximadamente 20 horas a 40° C, durante este tiempo el alimento fue removido para homogenizar el secado. Finalmente el alimento fue molido y después tamizado usando una malla con diámetro de 150-250 µm y de 300-425 µm. Las dietas fueron almacenadas en refrigeración a 4° C para su posterior uso.

6.4 Cultivo Larvario

Se realizó una crianza de larvas de *P. maculatofasciatus*, en la Unidad Piloto de Maricultivos (UPIMA) perteneciente al Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas (CICIMAR) del Instituto Politécnico Nacional (IPN). El desove inducido se obtuvo de reproductores mantenidos en cautiverio en un sistema de circulación cerrado, con un fotoperiodo de 13:11 horas (Luz:Oscuridad), una temperatura controlada de 23° C y siguiendo la metodología aportada por Rosales-Velázquez (1997). El sistema de recirculación consistió en 9 tanques de fibra de vidrio (1) con una capacidad de 120 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 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 4). Para probar el buen funcionamiento del sistema, este se llenó con agua de mar durante dos semanas previas a la introducción de las larvas.

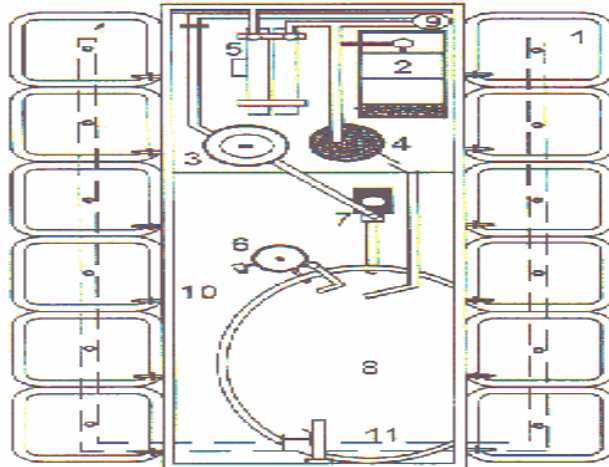


Figura 4. Unidad Piloto Maricultivos CICIMAR IPN. Sistema de cultivo cerrado.

6.4.2 Incubación de Eleuteroembriones

Los huevos se colocaron directamente en los tanques del sistema. Los valores de los parámetros fisicoquímicos fueron tomados con la ayuda de un Multiparámetros marca YSI® modelo MPS 556 (YSI Incorporated, Yellow Springs, Ohio, EUA), con una precisión de 0.01°C , $0.1\text{ mg O}_2/\text{l}$ y 0.01‰ . El valor promedio y la desviación estándar de los parámetros fueron para temperatura de $23 \pm 0.8^{\circ}\text{C}$, salinidad de $35 \pm 0.7\text{‰}$, oxigenación y flujo de agua moderado y constante. Estas condiciones se mantuvieron durante 24 horas hasta que tuvo lugar la eclosión de los embriones.

6.4.3 Siembra de las larvas

Se sembraron 3.2 mL de huevos en cada uno de los tanques, cada mL contenía 1867 huevos, lo que da un total de 5974.4 huevos/tanque, que corresponden a una densidad de 50 larvas/L aproximadamente.

6.4.4 Alimentación de larvas

Las larvas se mantuvieron bajo las condiciones de cultivo sugeridas por Alvarez-González *et al.*, (2001a y b) Durante el cultivo los parámetros físico-químicos fueron medidos a diario, los valores promedio y la desviación estándar fueron para temperatura de $23.46 \pm 0.31^\circ \text{C}$, salinidad 35.79 ± 0.83 ‰, oxígeno disuelto $5.85 \pm 0.75 \text{ mg O}_2/\text{L}$ y amonio total $0.31 \pm 0.13 \text{ mg/NH}_4/\text{L}$.

Durante los primeros 8 días de cultivo, las larvas fueron mantenidas en agua verde adicionando de 300,000 a 600,000 cel/mL de la microalga *Nannochloropsis oculata*, debido a una baja recirculación de agua durante este tiempo (<2 % diario). Las larvas fueron alimentadas con el rotífero *Brachionus plicatilis* desde el primer día, aunque a partir del día 2 es cuando han absorbido el saco vitelino y pigmentado los ojos. El rotífero fue administrado hasta el 16 DDE. El día 1 al 3 DDE se administraron rotíferos sin enriquecer, el día 4 DDE se enriquecieron durante 6 horas antes de ser administrados a las larvas con la emulsión comercial RATIO HUFA® (Salt Creek, Inc., Salt Lake City, UTA, EUA). A partir del día 15 DDE las larvas fueron alimentadas con nauplios de *Artemia sp* sin enriquecer, a partir del 17 al 19 DDE se enriquecieron con la misma emulsión lipídica que se utilizó para los rotíferos, pero con 24 h de enriquecimiento. El día 18 al 25 DDE se alimento con juveniles de *Artemia sp*.

La coalimentación se llevó a cabo con alimento microparticulado y alimento vivo, se realizó a partir del día 20 al día 25 DDE. Se sustituyó 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 del micropartículado y del alimento vivo. La deshabitación alimenticia se logró el día 26 DDE, a partir de este día solo se alimentó con la dieta microparticulada hasta el día 35 DDE que concluyó el experimento. La Tabla VII muestra la secuencia de alimentación.

6.5 Diseño experimental

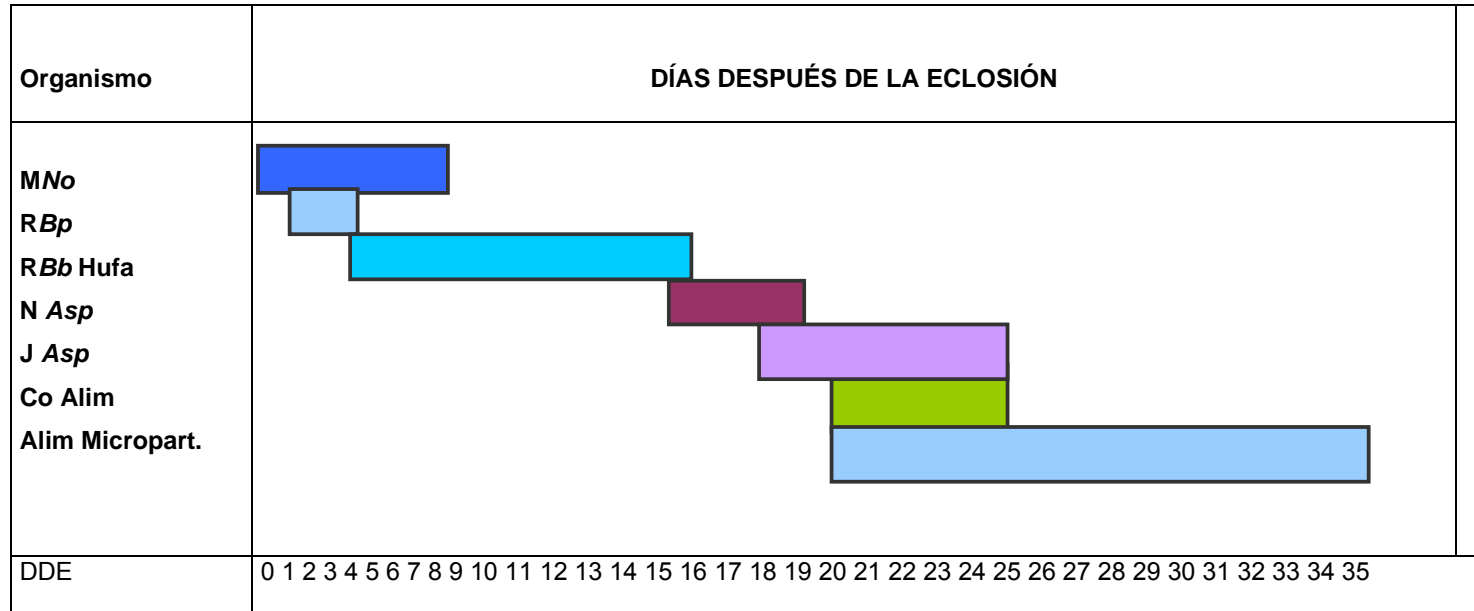
Se usaron 9 tanques para el cultivo larvario, estos fueron divididos en dos grupos experimentales y un control de acuerdo a la dieta administrada. Un grupo fue alimentado con levaduras silvestres (ODC +), otro con levaduras inhibidas en su actividad ODC (ODC -) y el grupo control sin levaduras. Cabe mencionar que cada tratamiento experimental y el control fueron probados por triplicado.

6.6 Limpieza del sistema

Para limpiar el sistema se utilizó una malla de 35 μ m en las salidas de flujo de cada tanque, flujo que se mantuvo cerrado durante los 10 primeros días, mientras que por la noche era moderado y lento; a partir del 14 DDE se cambiaron las mallas por otras de 100 μ m con la finalidad de que el alimento suministrado pudiera ser eliminado del tanque por el tubo de desagüe.

A partir de 15 DDE, con ayuda de un sifón se retiraron diariamente las heces fecales o restos de comida no ingeridos, así como las larvas muertas en cada tanque.

Tabla VII. Secuencia de alimentación suministrada a larvas de la cabrilla arenera.



Abreviaciones: Días después de la eclosión (DDE), micro alga verde *Nannochloropsis oculata* (MNo), Rotífero *Brachionus plicatilis* (RBp), Rotífero *Brachionus plicatilis* enriquecido (RBp Hufa), Nauplios de *Artemia sp.*(N Asp) Juveniles de *Artemia sp.*, (J Asp) Coalimentación (Co Alim), Alimento Microparticulado adicionado con la levadura *Debaryomyces hansenii* (Alim Micropart.).

6.7 Obtención de muestras

Se tomaron muestras con un tubo de vidrio, un sifón y una malla de 100 µm para realizar pruebas de secreción enzimáticas *in vitro* y extracción de ARN total. Se tomaron 250 mg de larvas los días 15, 20, 25, 30 y 35 DDE, por cada uno de los tratamientos. La mitad de las muestras fueron almacenadas en congelación y la otra mitad fue sumergida en RNA^{later}® (Ambion, Inc.) y almacenadas a -70° C hasta su manejo posterior. Con las muestras obtenidas se cuantificó la actividad enzimática digestiva del páncreas (amilasa, lipasa y tripsina) e intestino (aminopeptidasa) utilizando técnicas espectrofotométricas y moleculares, además se tomaron fotografías de las larvas para determinar posteriormente su crecimiento. Para obtener la sonda de cDNA de aminopeptidasa se extrajo ADN de adultos de cabrilla arenera.

6.8 Obtención de sonda de cDNA para aminopeptidasa

La búsqueda de homologías se realizó utilizando el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) en su variación BLASTn (comparación entre secuencias de nucleótidos), disponibles en la base de datos del servidor NCBI BLAST: GenBank.

6.8.2 Cuantificación de la expresión de genes codificantes para las enzimas digestivas, lipasa, amilasa, tripsina y aminopeptidasa.

6.8.3 Extracción de ARN

Las muestras fueron previamente conservadas en RNA Later y almacenadas a -70° C, las extracciones de ARN se hicieron mediante la técnica de TRIZOL, que a continuación se describe.

Homogenización del tejido

Las larvas de 5 a 25 DDE fueron homogenizadas directamente y a las larvas del día 30 y 35 DDE se les diseccionó la región del aparato digestivo. La homogenización de los tejidos se llevo a cabo en un mL de TRIZOL por 50 a 100 mg de tejido. El volumen de la muestra no excedió el 10% del volumen de TRIZOL usado durante la homogenización.

Procedimiento

La muestra homogenizada fue incubada durante cinco minutos a temperatura ambiente para permitir la disociación de los complejos de nucleoproteínas. Se hizo una centrifugación rápida para remover los restos celulares y se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo. Se adicionaron 0.2 mL de cloroformo por un mL de TRIZOL, se agitó vigorosamente durante 15 seg. y se incubo a temperatura ambiente de 2 a 3 min.

Las muestras fueron centrifugadas a 12000 g por 15 min. a 4° C. Se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo. Se tuvo especial cuidado en no tocar la interfase para evitar contaminación. El volumen de la fase acuosa es aproximadamente el 60% del volumen de TRIZOL usado para la homogenización.

A continuación se adicionó un volumen equivalente de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1) pH 4.3 y se agitó vigorosamente durante 15 seg.

Después se tomaron 750 μ L de la muestra a un tubo de 2 mL Heavy Phase Lock Gel el cual fue previamente centrifugado a 12000 g durante 30 seg. a 4° C. Se centrifugaron las muestras a 16000 g por 5 min. a 4° C. Se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo. Para precipitar el ARN se adicionó 0.5 mL de alcohol isopropilico por un mL de TRIZOL usado en la homogenización inicial. En seguida las muestras fueron incubadas a temperatura ambiente por 10 min. Se centrifugaron a 12000 g por 10 min. a 4° C. Se retiró el sobrenadante cuidadosamente para no distribuir el pellet de ARN.

El sedimento de ARN fue lavado adicionándole un mL de etanol al 75% por cada mL de TRIZOL utilizado. Se centrifugaron las muestras a 12000 g por 10 min. a 4° C para remover el etanol, de nuevo cuidando no distribuir el pellet; cuando fue necesario se hizo una centrifugación rápida para remover los residuos de etanol. Los pellets se dejaron secar de 10 a 30 min.

Finalmente el ARN fue disuelto en 20 μ L de agua tratada DEPC. Se tomó la densidad óptica (DO) a 260 nm y 280 nm para determinar la concentración y la pureza de la muestra. El radio de 260/280 debe ser alrededor de 1.6, aplicando la convención que 1 de DO equivale a 40 μ g/mL de ARN. También, cuando fue necesario se realizaron las diluciones pertinentes. El ARN fue almacenado a -70° C.

6.8.4 Tratamiento con DNasa I

Para dejar libre al ARN de ADN se realizó un tratamiento con DNAsas utilizando el kit INVITROGEN DNase I.

Procedimiento

Se colocó en un tubo eppendorf la muestra de ARN en 40 μ L de agua tratada DEPC, a continuación se agregaron 5 μ L de buffer 10 X y 5 μ L de DNasa I. Todo este procedimiento se realizó sobre hielo.

En seguida se incubó durante 15 min. a temperatura ambiente, después se agregaron 5 μ L de EDTA 25 mM y se colocaron las muestras en una placa térmica a 65° C por 10 min.

6.8.5 Síntesis de cDNA

Para realizar la síntesis de cDNA es conveniente tener una concentración de ARN de 1 μ g/ μ L. En este caso se utilizó el kit Script II de INVITROGEN y durante el proceso las muestras siempre fueron mantenidas en hielo.

Procedimiento

Se mezclaron y centrifugaron todos los reactivos antes de ser usados, para la primera reacción, se agregaron los componentes de acuerdo a la tabla VIII.

Tabla VIII. Componentes utilizados para la primera reacción de síntesis de cDNA

Componente	Para cada reacción
RNA I $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	n μL
10 mM dNTP mix	1 μL
Oligo (dT)	1 μL
Agua tratada DEPC	para 10 μL

Las muestras fueron incubadas a 65° C y después en baño de hielo por un min. Se preparo la siguiente la segunda reacción mezclando y adicionando cada componente en el orden indicado en la tabla IX.

Tabla IX. Componentes utilizados para la segunda reacción de síntesis de cDNA

Componente	Para cada reacción
Buffer 10X	2 μL
MgCl ₂ 25 mM	4 μL
DTT 0.1 M	2 μL
RNase OUT	1 μL

Se adicionaron 9 μL de esta mezcla a cada reacción, se mezcló suavemente, se hizo una centrifugación rápida y se incubo a 42° C por dos min.

En seguida se agregó a cada tubo 1 μL (50 unidades) de SuperScrip II RT se mezcló y se incubo a 42° C por 50 min.

Después se incubo a 70° C por 15 min. Al terminar las muestras se colectaron para una centrifugación rápida y se les adicionó 1 μL de RNase H de *E. coli*, esto último se realizó en baño de hielo. Finalmente se incubo por 20 min. a 37° C y se almaceno a -70° C.

6.8.6 Preparación de gel de agarosa al 1%

Se pesaron 0.05 g de agarosa y se disolvieron en 500 mL de buffer TAE 1X en seguida se agregaron 25 μL de bromuro de etidio. Esta mezcla se calentó aproximadamente durante un minuto o hasta que se torno transparente y fue vertida en una cámara de electrofóresis. Cuando el gel polimerizo fue cubierto con buffer TAE 1X de corrimiento. Se tomaron 1.5 μL de cDNA de cada muestra, se les agrego aproximadamente 1.5 μL de azul de metilo, esta mezcla fue homogenizada y depositada en los pozos del gel. Se corrió a 80 voltios durante 40 min.

6.8.7 PCR en tiempo real

El PCR en tiempo real constituye la técnica más precisa conocida para la cuantificación de la expresión génica. Los datos procesados de este método están basados en curvas estándares o en tasas de eficiencia de amplificación. Esta prueba de eficiencia del PCR es preferida para la cuantificación relativa,

mientras que las curvas estándar son comúnmente usadas para cuantificaciones absolutas.

6.8.8 Cuantificación relativa de los ARN codificantes para las enzimas tripsina, lipasa, amilasa y aminopeptidasa.

Se realizó la cuantificación de los transcritos de cada enzima y del fragmento 18s ARN ribosomal, utilizado con gen endógeno (housekeeping gene) o de referencia para los tres grupos experimentales.

Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real (PCRq)

La cuantificación del ARN de todas las muestras se realizó con sondas TaqMan® (Applied Biosystems, Europa) con las diferentes enzimas. La mezcla de reacción para la PCR se preparó según la tabla X.

Tabla X. Componentes utilizados para realizar PCRq

Componente	Para cada reacción
Agua libre de RNasa	8 μ L
TaqMan® Universal PCR Master Mix 2X	10 μ L
Sonda y control de primers	1 μ L
cDNA	1 μ L
Volumen total	20 μ L

Las condiciones de tiempo y temperatura fueron las siguientes:

Temperatura inicial (1X)	95°C	10:00 min
Alineación/extensión (40X)	95°C 15 s, 60°C 01:00 min,	

La cuantificación se obtuvo mediante la relación del ARN de cualquier enzima/A 18s. El 18s es considerado un estándar interno ya que es un gen constitutivo que se está expresando constantemente en la célula por lo que provee un amplio sentido de comparación en la expresión de los genes.

Para la cuantificación de los transcritos de cada muestra, solo se consideraron los valores obtenidos del producto de amplificación que estén dentro de la fase logarítmica de la curva entre los ciclos 10 al 24.

6.9 Cuantificación de enzimas digestivas por métodos espectrofotométricos

Para las determinaciones enzimáticas, el tejido fue pesado en una balanza analítica y resuspendido en solución amortiguadora de fosfatos 50 mM (pH 7.0) en una proporción 1:4 (peso/volumen). El tejido fue macerado por 30 segundos con un homogenizador tipo Polytrón (PRO 250, 5 mm x 150 mm), manteniendo las muestras en hielo y repitiendo el proceso hasta homogenizar toda la muestra. Los extractos fueron centrifugados a 20 000 g, por 15 min. a 4° C. El sobrenadante (extracto enzimático) fue recuperado y almacenado en congelación a -20° C hasta los ensayos enzimáticos.

De los extractos enzimáticos obtenidos se cuantificó la actividad de las enzimas lipasa, amilasa, aminopeptidasa N y tripsina (Tabla 7).

Tabla XI. Enzimas determinadas por métodos espectrofotométricos.

Enzima	Técnica utilizada
Lipasa	Versaw <i>et al.</i> , 1989
Tripsina	Erlanger <i>et al.</i> , 1961
Aminopeptidasa N	Maraux, 1973
Amilasa	Vega- Villasante <i>et al.</i> , 1993

6.9.2 Lipasa (Versaw *et al.*, 1989)

A 100 μL de taurocolato de sodio (100 mM) se agregaron 1.9 mL de Tris-HCl (50 mM pH 7.2) y 20 μL de extracto enzimático y se agitó. La reacción inició con 20 μL de β -naftil-caprilato (200 mM), por 30 minutos de incubación a 37° C, se agregaron 20 μL de fast blue (100 mM) y se incubó por cinco minutos a temperatura ambiente. La reacción se detuvo con 200 μL de TCA (0.72 N), se adicionaron 2.71 mL de etanol acetato de etilo (1:1 v/v) y se agitó con vórtex. La lectura de la muestra se realizó en un espectrofotómetro (JEAN WAY 6505 UV/vis) a 540 nm en cubetas de vidrio. Para cada muestra se preparó un testigo de la reacción, el cual no tenía extracto enzimático, las muestras se procesaron por triplicado. La actividad lipasa se definió como la cantidad de enzima requerida para incrementar 0.01 unidades de absorbancia a 540 nm por min.

6.9.3 Tripsina (Erlanger *et al.*, 1961)

Se preparó una solución de 100 mM de BAPNA ($N\alpha$ -Benzoil-DL-Arginina-P NitroAnilida) en 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO), se aforó a 100 mL usando tampón 50 mM de Tris-HCl y 10 mM $CaCl_2$ a pH 8.2. Para iniciar la reacción se mezcló 1.25 mL de sustrato a 37°C, con 20 μ L del extracto enzimático. Después de un tiempo de incubación lineal, la reacción se detuvo con la adición de 0.25 mL de ácido acético al 30%. A continuación, se midió la absorbancia a 410 nm utilizando un blanco como control. La unidad de actividad se definió de acuerdo con Dimes y colaboradores (1994). Una unidad de actividad es 1 μ mol de p-nitroanilida liberada por minuto usando como coeficiente de extinción molar $8800\text{ cm}^{-1}\text{ M}^{-1}$.

El equipo se calibró usando el buffer 50 mM de Tris-HCl y 10 mM $CaCl_2$ a pH 8.2 sin BAPNA.

6.9.4 Aminopeptidasa N (Maraux, 1973)

Se prepararon las soluciones de DMSO, L-leucina p-nitroanilida y buffer de fosfatos (80 mM, pH 7).

Se colocaron 2.45 mL del buffer de fosfatos (80 mM, pH 7) en una cubeta a la que se adicionó 50 μ L del sustrato (L-leucina p-nitroanilida 0.1M en DMSO) y el homogenizado celular; en este caso la reacción se inicio con 40 μ L del problema. Se midió la cinética a 410 nm y una temperatura de 37° C aprox. Para calibrarse se usó el buffer de fosfatos (80 mM, pH 7) más el sustrato (L-leucina p-nitroanilida 0.1M en DMSO).

Para realizar los cálculos se tomo en cuenta lo siguiente:

El coeficiente de extinción molar del sustrato = $8200 \text{ l.moles}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ a 410 nm.

$$\text{Actividad de la enzima (Unidades/mL)} = \frac{dDO/\text{min}}{0.0082} * \frac{2.5}{1000} * \frac{1000}{x}$$

1 unidad = μmoles de sustrato hidrolizado por min. A 37° C .

La actividad se expresó en unidades por miligramo de proteína (U/mg).

6.9.5 Amilasa (Almidón como sustrato) Vega-Villasante *et al.*, 1993

Se utilizaron tubos de vidrio grandes (150 X 16 mm) con tapón de rosca.

Las muestras se procesaron por triplicado y con un testigo.

Se adicionaron $10 \mu\text{L}$ de la enzima (extracto) a $500 \mu\text{L}$ de Tris-HCl (50 mM, pH 7.5) y $500 \mu\text{L}$ de almidón soluble (1% en Tris-HCl) a temperatura ambiente para iniciar la incubación y se agitó. Se dejó incubar durante 20 min. A temperatura ambiente. A continuación se agregan $200 \mu\text{L}$ de carbonato de sodio (2N) y 1.5 mL de reactivo de DNS, se agitó y tapo el tubo. En este momento se agregó la enzima para el tubo del testigo.

Se colocaron los tubos a baño María durante 15 min., se agregaron 7.3 mL de agua destilada y se agitó. La lectura de la muestra fue a una absorbancia de 550 nm.

6.9.6 Determinación de proteínas solubles por el método de Bradford (Bradford, 1976)

Se cuantificaron también las proteínas solubles totales de acuerdo a Bradford (1976).

Se colocaron en tubos de vidrio limpios (100 X 15 mm) 8 μ L de extracto, se adicionaron 792 μ L de agua destilada y 200 μ L de reactivo de Bradford (Bio Rad). Se agitó suavemente con vortex y se leyó a una absorbancia de 595 nm. Se utilizó como blanco reactivo de Bradford y agua destilada. Para construir la curva estándar fue usada la albúmina sérica bovina.

6.9.7 Crecimiento de las larvas de peces

Para medir el crecimiento de las larvas de la cabrilla arenera se tomaron fotos de organismos de cada tratamiento, con cinco repeticiones cada uno y se utilizó el software Image Pro Plus, proporcionado por el laboratorio de Histología del CIBNOR. El crecimiento se determinó obteniendo la longitud total de las larvas.

6.9.8 Análisis estadísticos

Se realizaron pruebas de homogeneidad y normalidad de los datos. Análisis de Varianza y T-Student para encontrar diferencias entre los tratamientos. Se utilizó una $P \leq 0.05$ como indicativo de significancia estadística. Los análisis se realizaron utilizando el programa de estadística SPSS (Ver. 15.0, LEAD Technologies, Inc., E.U.A.).

VII. RESULTADOS

7.1 Preparación de las dietas

La cosecha total de levadura, obtenida del cultivo en 20 L fue de 179.73 gr. con 75.09 % de humedad. Se prepararon tres kilos de dietas microparticulados, un kilo para cada tratamiento y a éstas se les determinó el porcentaje de humedad que fue en promedio de $7.20 \pm .21$.

7.2 Cinética de crecimiento de la levadura *Debaryomyces hansenii*

La levadura *Debaryomyces hansenii* Cepa 8339 fue crecida hasta entrada su fase exponencial para realizar las mediciones de poliaminas. El crecimiento microbiano fue medido, bajo condiciones normales y en presencia del inhibidor de la enzima ODC (DFMO); fue expresado en unidades de densidad óptica (A 550 nm) (Fig. 5). No se encontraron diferencias significativas de crecimiento entre ambos grupos ($P > 0.05$).

7.3 Producción de poliaminas

La extracción y detección de poliaminas se realizó desde el inicio de la cinética de crecimiento hasta su fase exponencial, cada cuatro horas. Se detectaron las poliaminas putrescina, espermidina y espermina en diferentes proporciones. La mayor cantidad de poliaminas fue detectada durante la fase exponencial (Fig. 6).

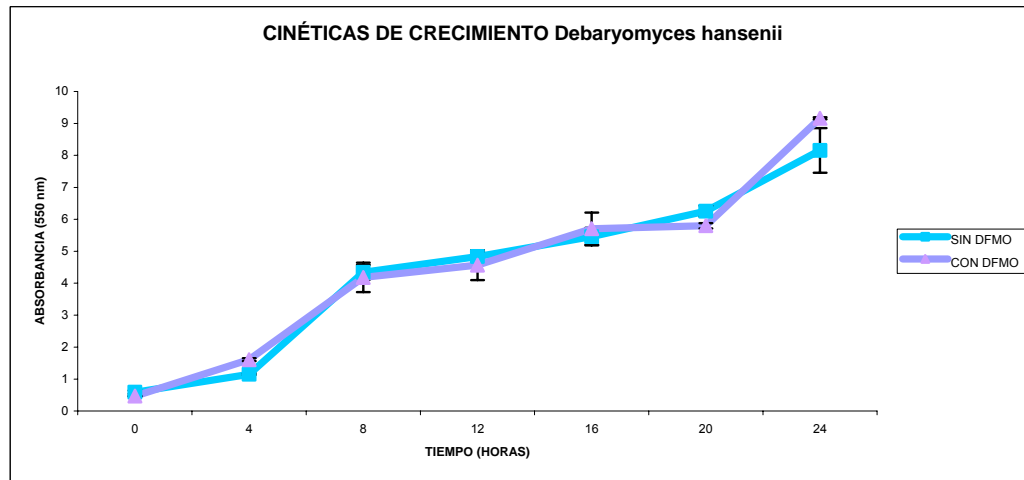


Figura 5. Cinéticas de crecimiento de la levadura *Debaryomyces hansenii* en condiciones normales y en presencia del inhibidor de la enzima ODC (DFMO). Valores promedio y desviación estándar.

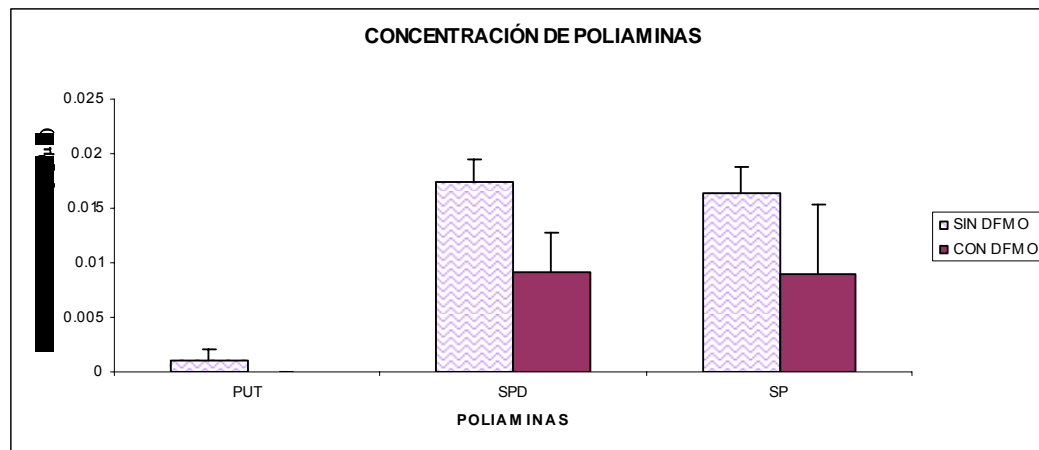


Figura 6. Concentraciones (ng/μL) de las poliaminas durante la fase exponencial de crecimiento de la levadura *Debaryomyces hansenii* en condiciones normales y en presencia de DFMO. No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos ($P > 0.05$).

El análisis de poliaminas en presencia de DFMO (Fig. 7) mostró que la espermidina se encontraba en mayor cantidad con un 50%, seguida de la espermina con el 49.9 % y, en cantidades mínimas a la putrescina con el 0.01%.

En ausencia de DFMO se encontró en mayor concentración a la espermidina con un 49.80% seguida de la espermina con un 47.21% y finalmente a la putrescina con un 2.98% (Fig. 8).

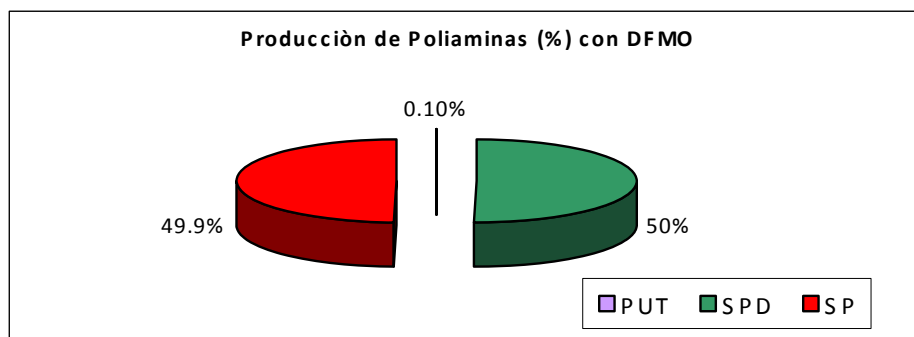


Figura 7. Concentraciones de poliaminas (%) de *Debaryomyces hansenii* en presencia del inhibidor de la enzima ODC (DFMO).

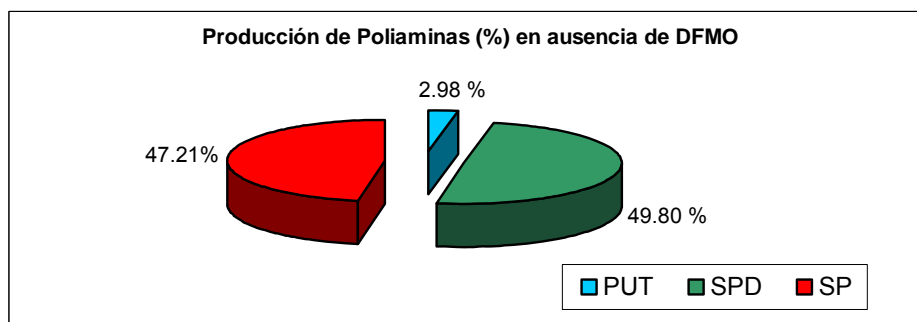


Figura 8. Concentraciones de poliaminas (%) de *Debaryomyces hansenii* en ausencia del inhibidor DFMO.

7.4 Efecto de las dietas con levaduras sobre la supervivencia y el crecimiento de larvas de cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*)

La supervivencia se calculó por el número inicial y final de larvas, expresándose como porcentaje. Se tomó en cuenta la tasa de eclosión que fue del 98.81% y la supervivencia de la eclosión que fue del 96.43%, así como el

número de larvas muestreadas para los ensayos enzimáticos y extracción de ARN. Al día 35 de crecimiento la supervivencia fue del $13.05 \pm 0.54\%$ en las larvas alimentadas con Lev (ODC +), del $11.60 \pm 0.92\%$ con Lev (ODC -) y del $10.34 \pm 1.23\%$ con la dieta control (Fig. 9). El análisis de varianza (ANOVA) mostró diferencias significativas ($P < 0.05$), como se observa en la Figura 10 y la prueba *a posteriori* de Tukey evidencio tres grupos homogéneos.

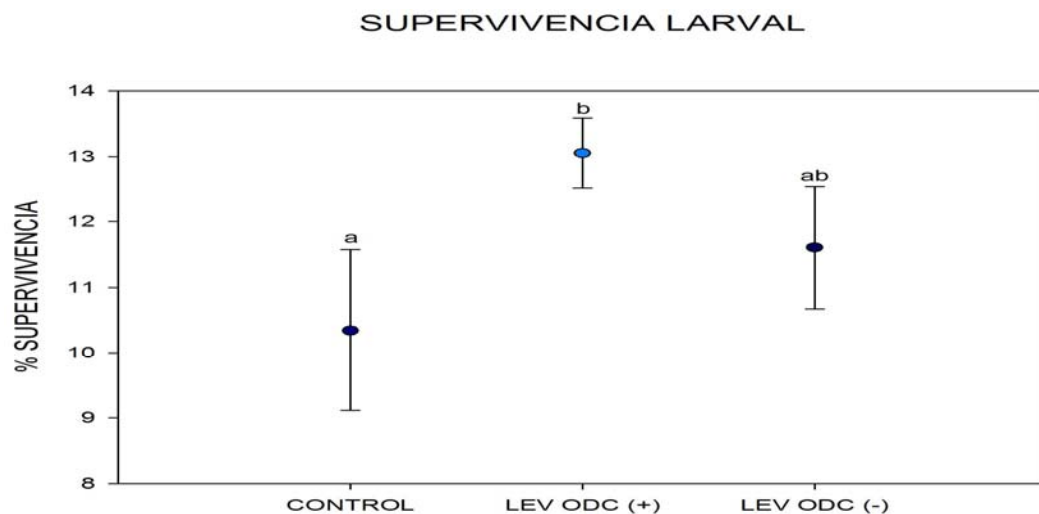


Figura 9. Supervivencia larvaria de la cabrilla arenera (*P. maculatofasciatus*). Se grafican las medias y su desviación estándar, las letras muestran diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los diferentes tratamientos.

En cuanto al crecimiento larval se tomaron microfotografías de las larvas (Fig. 11a y b), se midió la longitud total de las mismas. Se encontró al día 35 DDE que el grupo control fue el que presentó mayor crecimiento y el grupo Lev (ODC -) el menor (Fig.12). El análisis de varianza (ANOVA) mostró diferencias significativas ($P < 0.05$) y la prueba *a posteriori* de Tukey reveló los grupos

homogéneos. El crecimiento de las larvas al día 20 DDE no mostró diferencias significativas ($P>0.05$).

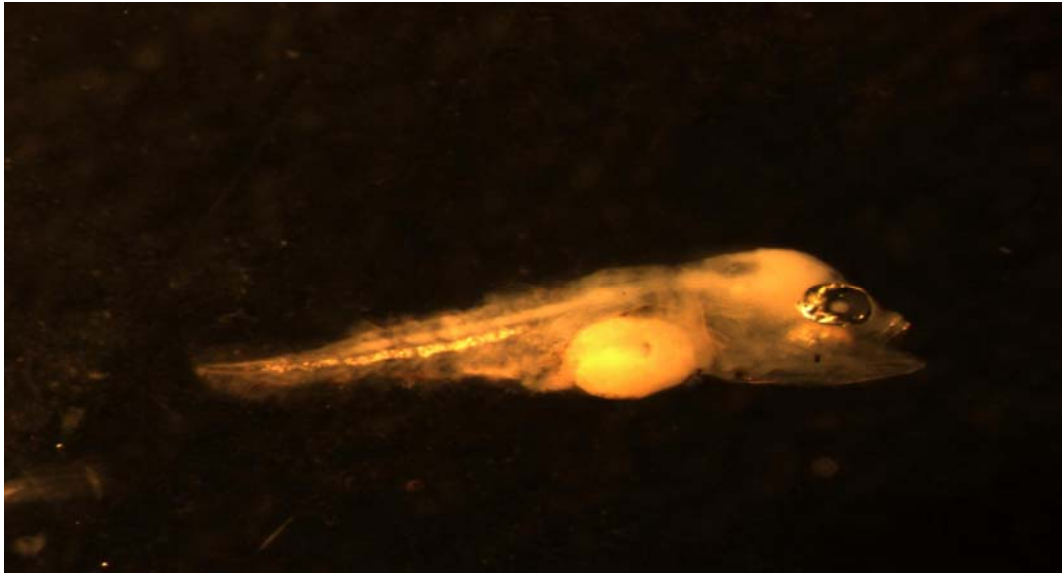


Figura 10. Microfotografías (10x) mostrando larvas de cabrilla arenera de 10 días después de la eclosión.

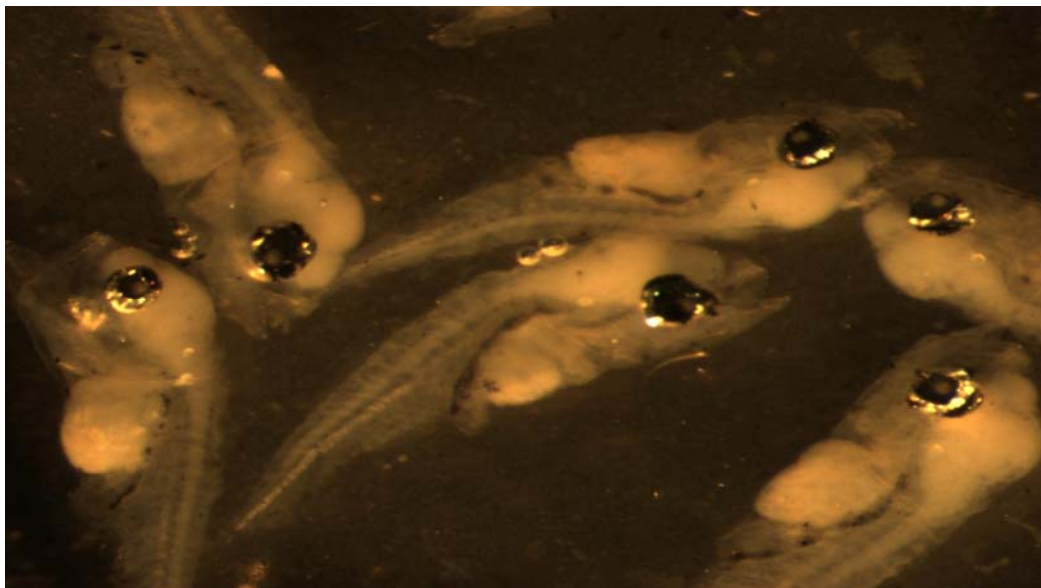


Figura 11. Microfotografías (10x) mostrando larvas de cabrilla arenera de 10 días después de la eclosión.

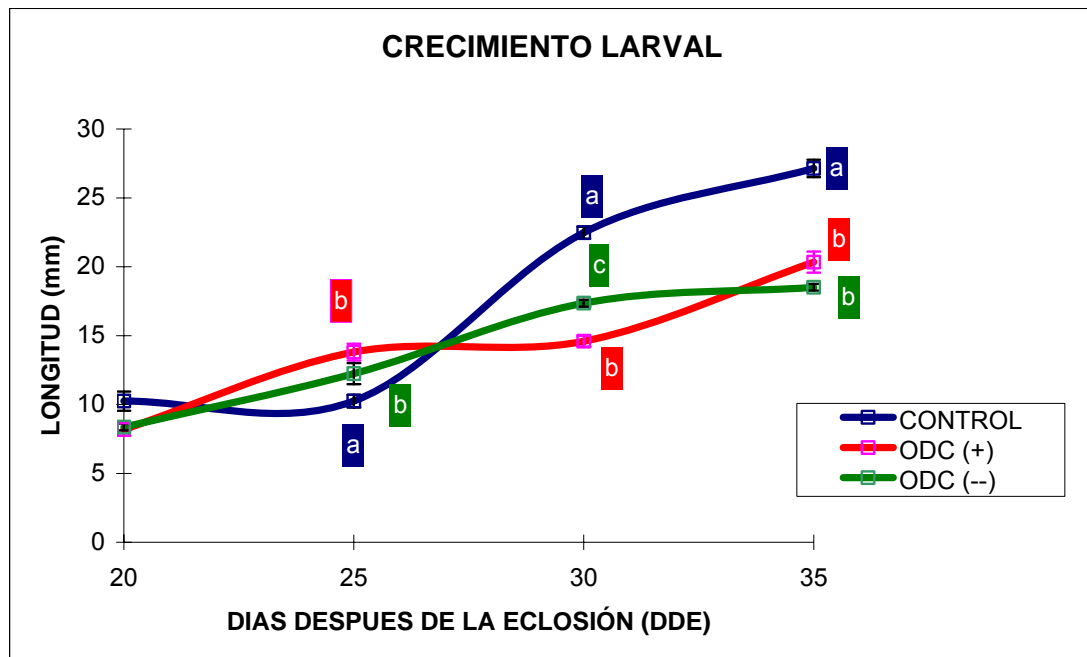


Figura 12. Crecimiento de larvas de la cabrilla arenera alimentada con levadura (1.1 % de inclusión). Se muestran las medias y el error estándar, donde diferentes literales indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

7.4 Efecto de la inclusión en la dieta de *Debaryomyces hansenii* sobre la actividad enzimática digestiva de larvas de la cabrilla arenera

El análisis de varianza (ANOVA) mostró en varios casos que la ingestión de la levadura *D. hansenii* en la dieta (1.1 % de inclusión) puede modificar significativamente ($P < 0.05$) la producción de enzimas digestivas (Figuras 13 - 16).

7.5 Actividad Lipasa

La ingestión de la levadura *D. hansenii* en la dieta modificó significativamente ($P < 0.05$) la actividad de dicha enzima durante los días 25 DDE ($F = 4.265$), 30 DDE ($F = 16.66$) y 35 DDE ($F = 3.917$) DDE y la prueba de

Tukey, arrojo tres grupos homogéneos indicando similitudes estadísticas entre los diferentes tratamientos (Figura 13).

La mayor secreción de lipasa la tuvo el grupo control alcanzando su pico máximo el día 25 DDE y el nivel más alto de ARN (Fig. 20) coincidió con el mismo día. El grupo lev (ODC +) alcanzó su pico máximo de el día 30 DDE (Figura 13) y los niveles mas altos de ARN el día 35 (Figura 20) y finalmente el grupo lev (ODC -) presentó su pico máximo de secreción enzimática el día 25 DDE al igual que el grupo control.

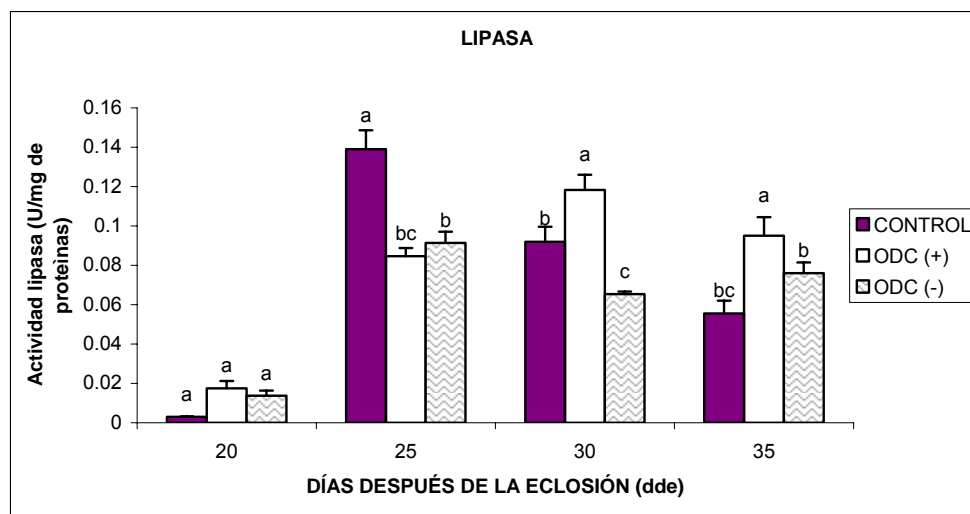


Figura 13. Actividad enzimática lipasa (U/ mg de tejido) *in vitro*, durante los días 20 al 35 DDE. Las letras diferentes marcan diferencias significativas ($P < 0.05$). Se muestran medias y error estándar.

El día 20 DDE comenzó la coalimentación con microparticulados adicionados con levaduras silvestres (ODC +) y bloqueadas (ODC -) concluyendo el día 25, a partir de este momento, todos los grupos mostraron una disminución en dicha actividad.

7.6 Actividad tripsina

Al analizar los datos obtenidos se encontraron diferencias significativas ($P < 0.05$) en los días 20 DDE ($F = 7.895$), 25 DDE ($F = 5.855$) y 30 DDE ($F = 6.560$) y la prueba de Tukey arrojó tres grupos homogéneos indicando similitudes estadísticas entre las diferentes dietas administradas (Fig. 14).

El grupo Lev (ODC +) mostró la mayor actividad enzimática seguida del grupo Lev (ODC -) y finalmente el grupo control con la actividad enzimática mas baja de los tres tratamientos en los días 25, 30 y 35 DDE. Una vez iniciado el tratamiento, los grupos control y Lev (ODC -) alcanzaron su pico de máxima actividad el día 25 DDE mientras que el lev (ODC +) el día 35 DDE.

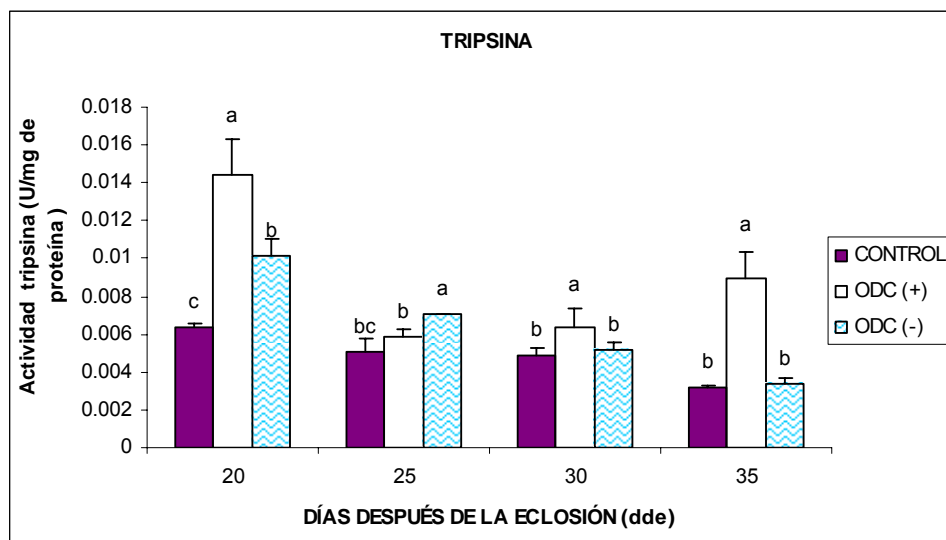


Figura 14. Actividad enzimática tripsina (U/ mg de tejido) *in vitro*, durante los días 20 al 35 DDE. Las letras diferentes marcan diferencias significativas ($P < 0.05$).

7.7 Actividad amilasa

Para esta enzima, se encontraron diferencias significativas ($P < 0.05$) en el día 25 DDE (Fig. 15), donde se observó que el grupo alimentado con levadura silvestre (ODC +) alcanzó la actividad enzimática mas alta en relación a los otros dos tratamientos que estadísticamente fueron iguales. Sin embargo para el día 30 DDE disminuye drásticamente.

El grupo control presentó su actividad mayor el día 20 DDE y el grupo Lev bloqueada (ODC-) el día 35 DDE, ambos muestran un descenso drástico a partir de este momento (Fig. 15).

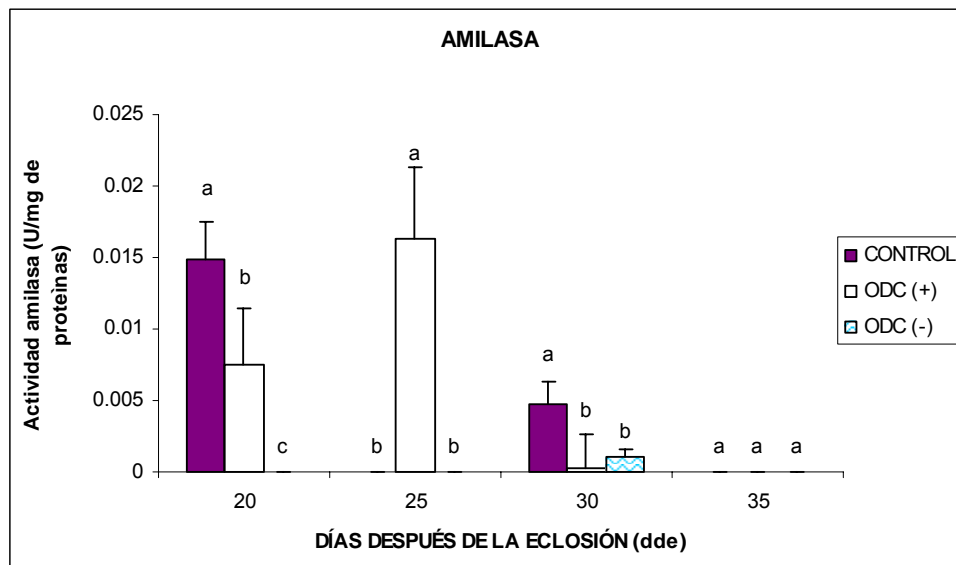


Figura 15. Actividad enzimática amilasa (U/ mg de tejido) *in vitro*, durante los días 20 al 35 DDE. Las letras diferentes marcan diferencias significativas ($P < 0.05$).

7.8 Actividad aminopeptidasa

La actividad de esta enzima del borde de cepillo, se incrementó en las larvas alimentadas con levaduras (Fig. 16). Se observaron diferencias significativas ($P < 0.05$) en los días 20 DDE ($F = 3,675$) y 30 DDE ($F = 5,327$). La prueba de Tukey arrojó tres grupos homogéneos indicando similitudes estadísticas entre las diferentes dietas administradas (Fig. 16).

El grupo alimentado con Lev (ODC +) presentó la mayor actividad de aminopeptidasa durante el tiempo de muestreo, en seguida el grupo control y finalmente el grupo Lev (ODC -). La mayor actividad enzimática se observó el día 30 DDE en el grupo control y en el grupo Lev (ODC +) y el día 35 DDE para el grupo Lev (ODC -).

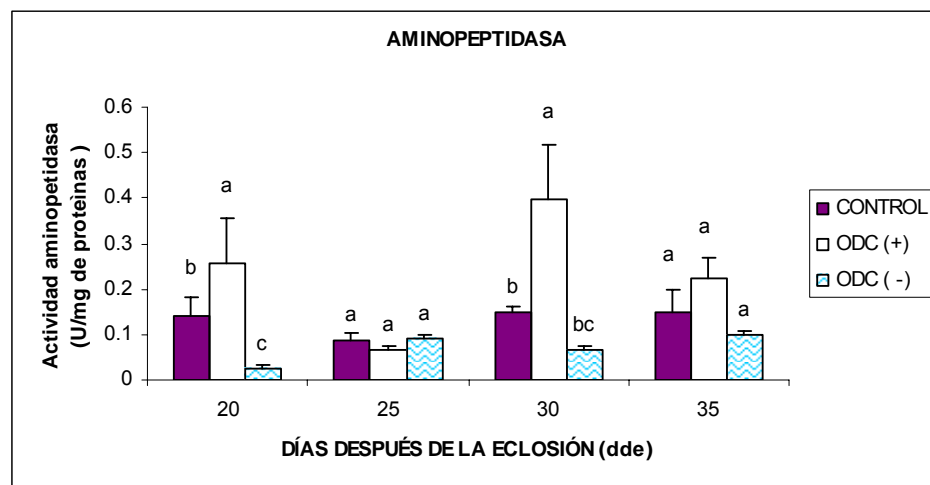


Figura 16. Actividad enzimática de la aminopeptidasa (U/ mg de tejido) *in vitro*, durante los días 20 al 35 DDE. Las letras diferentes marcan diferencias significativas ($P < 0.05$).

7.9 Obtención de la sonda de cDNA para aminopeptidasa

Inicialmente, se hizo el análisis BLASTn buscando el gen de la enzima aminopeptidasa N en peces, encontrándose que solo existía un reporte para esta enzima, proveniente del pez teleósteo *Pleuronectes americanus*. A partir de su secuencia (AF601063.1) se diseñaron varios pares de iniciadores (primers) y al amplificar ADN total proveniente de *P. maculatofasciatus* se obtuvo una banda de aproximadamente 536pb (Fig. 17). La banda de ADN fue purificada para análisis de secuencia, la cual correspondió, en un análisis BLASTn a un fragmento del gen de aminopeptidasa de *Pleuronectes americanus*, en un 81% de identidad. La secuencia de *P. maculatofasciatus* fue sometida al banco de genes (genbank) generando la clave de acceso EF601063.1 (Fig. 18).

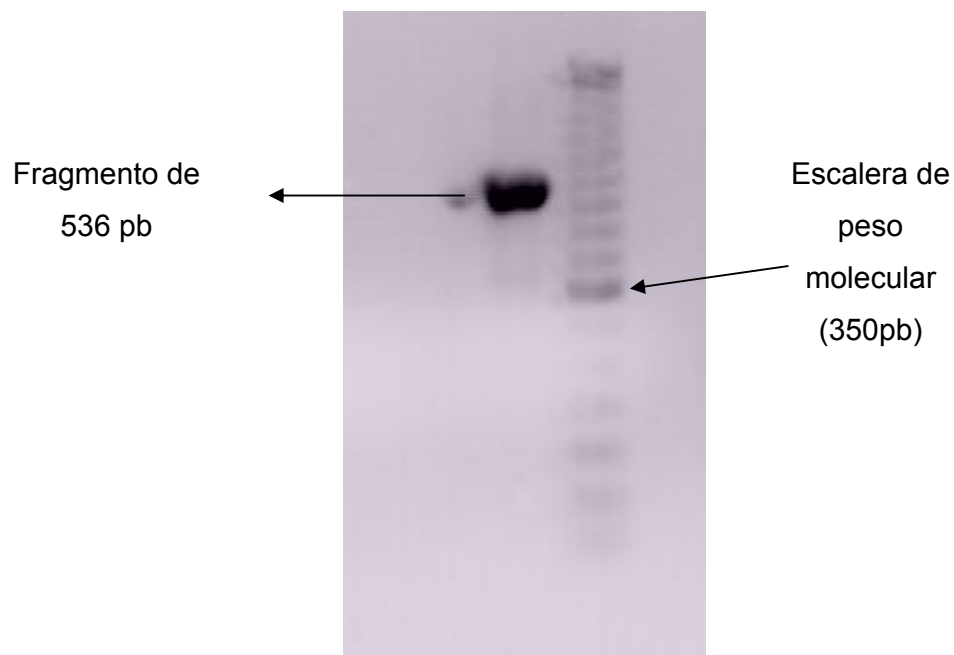


Figura 17. Gel de agarosa que muestra una banda de 536 pb correspondiente a un fragmento del gen de aminopeptidasa N de *Paralabrax maculatofasciatus*.

También se realizó un análisis de BLAST-X para comparar la secuencia deducida de aminoácidos contra las proteínas reportadas en la base de datos Swissprot, dio como resultado que el marco de lectura (frame+1) (Fig. 19) presentaba una identidad del 64% con la aminopeptidasa N de cerdo (GB:P15145), sin embargo, a nivel de secuencia de aminoácidos no existen reportes con aminopeptidasas de peces.

7.9.2 Cuantificación relativa de los niveles de ARN codificantes para las enzimas digestivas tripsina, amilasa, lipasa y aminopeptidasa de la cabrilla arenera.

Es importante mencionar que la técnica PCRq solo se realizó para el grupo control y el grupo levadura bloqueada (ODC -) debido al deterioro de las muestras al ser transportadas. Cada tratamiento se cuantificó por triplicado y cada réplica tuvo cinco repeticiones en la placa de 96 pozos.

El análisis de varianza (ANOVA) mostró diferencias significativas ($P<0.05$), los niveles de ARN de amilasa fueron menores en los organismos alimentados con levadura en comparación al grupo control (Fig. 20).

En cuanto a la tripsina se observó que las larvas alimentadas con Lev (ODC -) tuvieron un incremento significativo ($P<0.05$) en comparación con el grupo control (Fig. 21).

Para la lipasa se observaron diferencias significativas ($P<0.05$) y se observó en las larvas alimentadas con Lev (ODC -) niveles menores de ARN en comparación con el grupo control durante los días 25, 30 y 35 DDE (Fig. 22).

```

1  ttcccctgct atgatgagcc agctatgaaa gctgtttttt acatcacact gatccatgac
61  catggaactg ttgccctatc caatggcaag caaagagact caatcaacac caaactgat
121 ggccacagtg tgcttaagac aacttttgaa ccaactgaga aaatgtccac ctacctgttg
181 gcattcattg tcagtgactt tgacttcatc aataatacca ttgatggagt tttgattcgc
241 atctttgcca gaaagcctgc tattgctgct ggacaaggac agtatgcct caacaaaact
301 ggacccatcc ttaagttctt tgagaagtat tataattcca gtacccctct gcccaagtct
361 gatccgatag ctctaccaga ctttaatgct ggagccatgg agaattgggg tcttatcaca
421 tacagagaga cagcactgct ctacgatgaa gaattctctt ctaactccaa caagcagagg
481 atcgctacca tcatcgctca tgaactggct catatgtggt ttggcaacct cgttac

```

Figura 18. Secuencia de nucleótidos correspondientes a aminopeptidasa N de *Paralabrax maculatofasciatus*.

```

sp/P15145/AMPN CERDO(Aminopeptidasa M) (gp130) (CD13 antigen)Longitud=963
  GEN ID: 397520 ANPEP | alanil (membrana) aminopeptidasa (aminopeptidasa N,
aminopeptidasa M, microsomal aminopeptidasa, CD13, p150)

Identidad = 116/179 (64%), Positivas = 134/179 (74%), Gaps = 1/179 (0%)
Frame = +1

Query  1      FPCYDEPAMKAVFYITLIHDHGTVALSNGKQRDSINTNTDGHSVLKTTFEPTKEMSTYLL  180
          FPC+DEPAMKA F ITLIH +  ALSN  + S      + +  T FE T  MSTYLL
Sbjct  216  FPCFDEPAMKATFNITLIHPNNLTALSNMPPKGSSTPLAEDPNWSVTEFETTPVMSTYLL  275

Query  181  AFIVSDFDFINNTI-DGVLIRIFARKPAIAAGQGQYALNKTGPILKFFEKYYNSSYPLPK  357
          A+IVS+F  +N T  +GVLIRI+AR  AIA G G YALN TGPIL FF  +YN+SYPLPK
Sbjct  276  AYIVSEFQSVNETAQNGVLIRIWARPNAIAEGHGMIALNVTGPILNFFANHYNTSYPLPK  335

Query  358  SDPIALPDFNAGAMENWGLITYRETALLYDEEFSSSNSNKQRIATIIAHELAHMWFNGLV  534
          SD IALPDFNAGAMENWGL+TYRE ALL+D + SS SNK+R+ T+IAHELAH WFNGLV
Sbjct  336  SDQIALPDFNAGAMENWGLVTTYRENALLFDPQSSSISNKERVVTVIAHELAHQWFGNGLV  394

```

Figura 19. Análisis BLAST-X donde se muestra la secuencia deducida de aminoácidos del fragmento de 526pb y se compara con la aminopeptidasa N de cerdo.

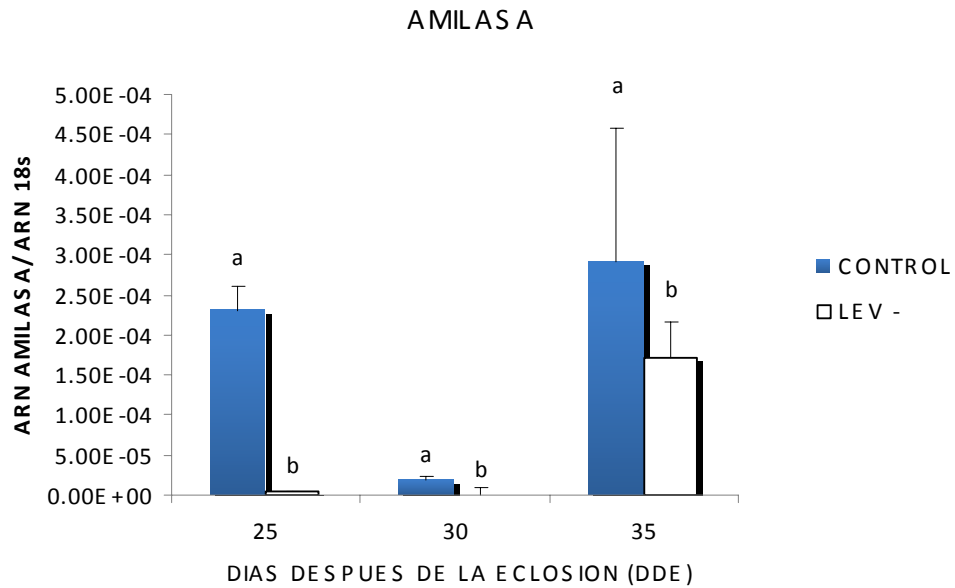


Figura 20. Cuantificación relativa de ARN codificantes para amilasa. Se muestran medias y desviación estándar. Las letras indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

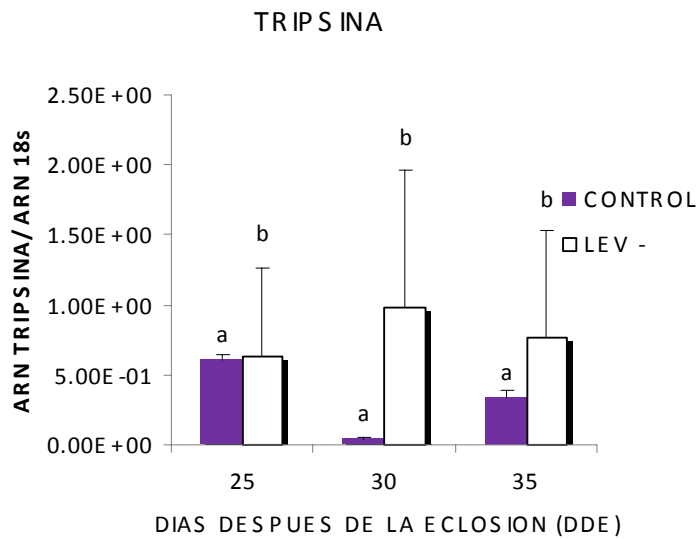


Figura 21. Cuantificación relativa de ARN codificantes para tripsina. Se muestran medias y desviación estándar. Las letras indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

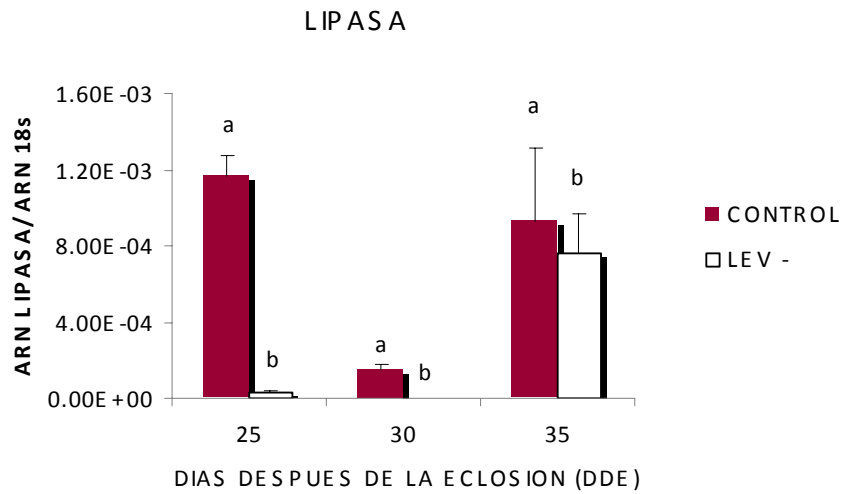


Figura 22. Cuantificación relativa de ARN codificantes para lipasa. Se muestran medias y desviación estándar. Las letras indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

La cuantificación relativa de los ARN para aminopeptidasa reveló diferencias significativas ($P < 0.05$) el día 35 DDE, las larvas alimentadas con Lev (ODC -) muestran niveles más altos de ARN en comparación al grupo control, tal como se muestra en la Fig. 23.

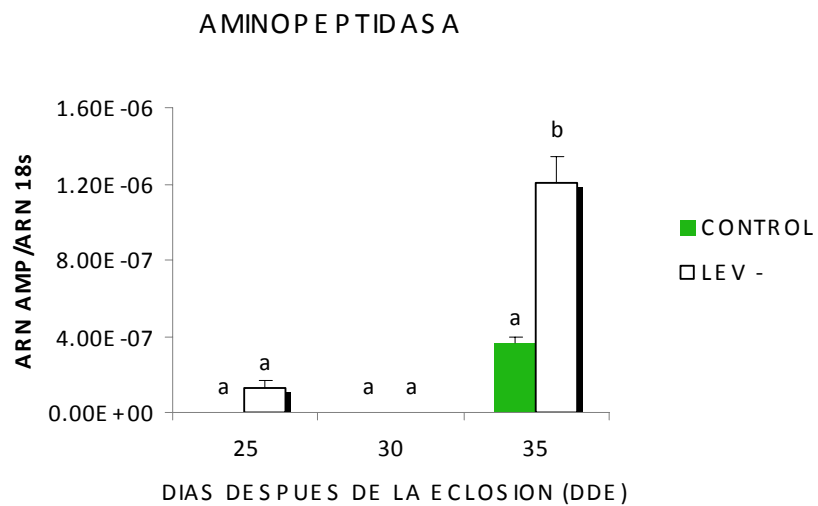


Figura 23. Cuantificación relativa de ARN codificantes para aminopeptidasa. Se muestran medias y desviación estándar. Las letras indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

VIII. DISCUSIÓN

La cinética de crecimiento de la levadura *D. hansenii* mostró una curva típica microbiana, tipo sigmoideal (Fig. 5) semejante a la reportada por Tovar *et al.* (2002).

No se encontraron diferencias en el crecimiento de la levadura, en condiciones normales o en presencia del inhibidor de la enzima ODC (DFMO), lo que no concuerda con los estudios realizados por Pfaller (1987) donde reporta que las poliaminas juegan un importante papel en el crecimiento y desarrollo celular, además de que el DFMO es un potente inhibidor del crecimiento en células de alta proliferación incluyendo microorganismos eucarióticos.

8.1 Detección y cuantificación de poliaminas en la levadura

En cuanto a las técnicas de cuantificación y detección de las poliaminas producidas por *D. hansenii*, el método de HPLC empleado fue sensible, confiable y reproducible ya que identificó las diferentes poliaminas producidas por la levadura.

La producción de poliaminas fue detectada en la fase de crecimiento y su mayor concentración se registró en esta la fase exponencial (20 h). Aunque varias levaduras sintetizan y secretan diferentes poliaminas (Buts *et al.*, 1994), *D. hansenii* fue seleccionada por su persistencia y adherencia al tracto digestivo así como su capacidad de secretar las poliaminas putrescina,

espermidina y espermina (Tovar *et al.*, 2002) en relación a otros reportes donde trabajaron con *S. boulardii* que no secreta espermina ni espermidina (Buts *et al.*, 1994) o *S. cerevisiae* que puede producir las mismas poliaminas (Tabor y Tabor, 1985) pero con una capacidad de síntesis menor (Tovar *et al.*, 2002).

La presencia del inhibidor de la enzima ODC (DFMO) no afectó significativamente la producción de poliaminas de la levadura (Fig. 6), lo cual pudo ser ocasionado por un inadecuado rompimiento de la pared celular de la levadura y liberación de las poliaminas al realizar el método, dado que los datos obtenidos no concuerdan con Luk, *et al.*, (1980) quienes reportan que el DFMO produce el 65% de inhibición irreversible de la ODC y por lo tanto disminuye la síntesis de poliaminas en levaduras. Sin embargo, otros autores como Kallio y McCann (1981), no observan una disminución en el contenido de las poliaminas durante la fase exponencial en *E. coli*, debido a un incremento en la actividad arginina-descarboxilasa, otra vía alterna de la síntesis de poliaminas, la cual se desconoce exista para *D. hansenii*.

La cuantificación de poliaminas, en presencia o ausencia de DFMO (Figuras 7 y 8) mostró que la putrescina se encontraba en menor proporción, lo cual podría ser benéfico ya que su acumulación puede afectar el crecimiento celular (Igarashi y Kashiwagi, 1999).

8.2 Efecto de las dietas con levaduras sobre la supervivencia y el crecimiento de larvas de cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*)

De acuerdo con los resultados obtenidos en este trabajo, podemos decir que la hipótesis planteada fue aceptada ya que se observó un efecto positivo en el desarrollo y maduración del tracto digestivo de las larvas de la cabrilla arenera, inducido por la administración de la levadura *D. hansenii* CBS 8339 en la dieta microparticulada. Esta maduración se infiere por el incremento de la actividad enzimática digestiva y el aumento de la supervivencia.

Con respecto a la supervivencia larvaria, sabemos que *P. maculatofasciatus* es una especie con un razonable potencial de cultivo a lo largo de las costas del Pacífico de México, el cual, se ha realizado con éxito hasta la etapa adulta (Avilés-Quevedo *et al.*, 1995), sin embargo presenta una alta mortalidad larval (Avilés-Quevedo *et al.*, 1995; Alvarez-González *et al.*, 2001a). Nuestros resultados muestran un aumento significativo en la supervivencia (Figuras 9 y 10) en los grupos alimentados con levaduras, en relación al grupo control. Lo cual, podría estar influenciado por el aporte de las poliaminas secretadas por la levadura; esto se apoya en los estudios realizados por Pfaller (1987) quien demuestra que las poliaminas son importantes para el crecimiento de eucariotes y Tovar *et al.*, (2004) quien reporta que la administración de *D. hansenii* aumenta la supervivencia de larvas de peces.

En general las poliaminas juegan un importante papel en la proliferación, rápido crecimiento y regeneración de tejidos, mientras que su síntesis endógena parece insuficiente en animales sanos (Peulen *et al.*, 2002). Por lo

tanto es posible que la producción de poliaminas por las levaduras pueda tener un efecto positivo sobre el crecimiento y metabolismo del pez (Gatesoupe, 2007), aunque esto requiere de más investigaciones dado que tal efecto no pudo ser observado en este trabajo.

Los altos porcentajes de mortalidad reportados durante el cultivo larvario de peces marinos han sido relacionados con una inadecuada nutrición larval (Sorgeloos *et al.*, 1991) además de que el tracto digestivo no está completamente desarrollado (Govoni *et al.*, 1986).

Lara *et al.*, 2003, reporta que en Tilapias (*Oreochromis niloticus*) alimentadas con levaduras *Saccharomyces cerevisiae* se mantiene su porcentaje de supervivencia y digestibilidad al incrementar la densidad poblacional del cultivo en comparación a las alimentadas con una dieta control.

Cabe mencionar, que el porcentaje de supervivencia reportado en este trabajo fue de 13.05% (Fig. 9), lo que mejora los resultados obtenidos por Alvarez-González *et al.*, (2001a) donde con una densidad de 50 larvas/L obtiene el 11.1 ± 4 % de supervivencia a los 30 DDE, para la misma especie, utilizando el mismo sistema de cultivo y condiciones ambientales.

El crecimiento también fue significativamente diferente en los tres grupos alimentados con las distintas dietas, siendo menor en los grupos alimentados con la levadura con respecto al grupo control, alimentado con presas vivas y

alimento microparticulado. En este sentido, se sabe que la lubina europea, es la única especie en la que no se requiera ya del alimento vivo para las primeras fases de su cultivo (Cahu y Zambonino, 2001), sin embargo varios grupos de trabajo han contribuido con numerosas aportaciones para llegar a estos resultados, lo que viene a reforzar las investigaciones encaminadas a proponer alternativas para el uso de dietas microparticuladas en las primeras fases de desarrollo de larvas de peces marinos.

Durante el cultivo larvario, se observó que la alta densidad de peces en los tanques generó aparentemente una competencia por el alimento, provocando un incremento en la segregación de tallas y canibalismo. Estas observaciones coinciden con las de Hetch (1993) en cultivos con un alto porcentaje de supervivencia, por lo que sugerimos que estos factores influyeron indirectamente en el crecimiento de las larvas.

Métailler y Huelvan, (1993); Oliva-Teles y Gonçalves, (2001) mencionan que la incorporación de grandes cantidades de levaduras (mas del 50% de los componentes de la dieta) se han utilizado en peces para sustituir la harina de pescado, sin embargo, no se observaron efectos significativos sobre el crecimiento.

Por otro lado, en este trabajo pudo observarse que los peces aceptaban sin problema aparente el alimento microparticulado (este dato no fue medido) por lo que la elaboración de dietas microparticuladas debe realizarse

cuidadosamente para evitar la alteración de la consistencia física del microparticulado además de controlar la viabilidad celular en cada paso de su elaboración Tovar *et al.*, (2002).

Tovar *et al.*, (2002) comparó los efectos de la inclusión en la dieta, de dos especies de levaduras en larvas de la lubina europea, encontrando que con *D. hansenii* a una concentración de 10^4 UFC g^{-1} , aumenta el peso corporal y mejora la supervivencia posiblemente debido a que acelera la maduración del tracto digestivo. Nuevamente, Tovar *et al.*, (2004) describe que el efecto mejora al utilizar la levadura a una concentración de 10^6 UFC g^{-1} (1.1%) tal y como fue usada en este trabajo, ya que al utilizar mayores porcentajes de inclusión (5.7%) no se observan mejoras en los rendimientos, como ganancia de peso o maduración digestiva (Tovar *et al.*, 2004).

Es importante mencionar que durante los estadios tempranos del desarrollo, se cree que es posible la manipulación del sistema digestivo larval por medio de la adición de probióticos en el agua o en el alimento vivo (Niall *et al.*, 2005) y recientemente a través de alimentos inertes microparticulados (Reyes *et al.*, 2008; Linares, 2007 y Tovar *et al.*, 2004). El problema de la asimilación de las dietas artificiales, en las larvas de peces marinos se piensa que está en función de una falta o insuficiencia de la actividad enzimática al momento de la primera alimentación (Lauff y Hofer, 1984, Munilla-Moran *et al.*, 1990; Boulhic y Gabaundan, 1992).

Existen factores importantes a controlar para tener éxito en el uso de dietas formuladas para lograr la deshabitación alimentaria temprana (Baskerville-Bridges and Kling, 2000):

- 1) Palatabilidad: puede ocurrir una baja ingestión debido a este factor o la baja permanencia del alimento en el agua.
- 2) Digestibilidad de la dieta, puede deberse a una insuficiencia enzimática.
- 3) Composición nutricional, pobre formulación de la dieta

8.3 Efecto de la inclusión en la dieta de *Debaryomyces hanseni* sobre la actividad enzimática digestiva de larvas de la cabrilla arenera

Las larvas de la cabrilla arenera requieren de dos días después de la eclosión para alcanzar la diferenciación morfológica mínima necesaria e iniciar la obtención y absorción de alimento exógeno, aún teniendo reservas vitelinas. Por lo tanto en esta etapa ocurren cambios significativos en la estructura del tubo digestivo, que darán las bases para el pleno funcionamiento de la fisiología digestiva de las larvas (Tanaka, 1971; 1973; Grizzle y Curd, 1978; Stroband y Dabrowski, 1979; Peña *et al.*, 2002).

Las larvas de peces marinos experimentan los mayores cambios morfológicos y celulares durante el primer mes de vida. De tal manera que durante la ontogenia del tracto gastrointestinal, se combinan aspectos del desarrollo larval y cambios funcionales, que están coordinados y

genéticamente programados (Cahu y Zambonino, 2001). Durante los primeros estadios, las larvas de peces marinos exhiben particulares características digestivas

No obstante, en muchas especies, las enzimas digestivas están presentes al inicio de la alimentación exógena (Cousin *et al.*, 1987; Izquierdo, 2000; Hoehne- Reitan *et al.*, 2001a y b) y diversos estudios han encontrado niveles significativos de enzimas pancreáticas e intestinales, así como la capacidad de absorción de nutrientes en larvas de peces (Pedersen *et al.*, 1987; Loewe y Eckmann, 1988; Segner *et al.*, 1994; Kjorsvik *et al.*, 1991).

En cuanto a nuestros resultados, las larvas alimentadas con levaduras silvestres, mostraron diferencias significativas en los altos niveles de secreción de las enzimas lipasa y tripsina con respecto al grupo control. Para la amilasa, el grupo control presentó la mayor secreción. Finalmente, la aminopeptidasa incrementó su actividad en las larvas alimentadas con *D. hanseni* silvestre.

Lo anterior sugiere que la maduración del tracto digestivo y la consecuente mejora de la supervivencia en el grupo alimentado con *D. hanseni* podrían atribuirse a la secreción de las poliaminas de las levaduras, como se ha observado en previos reportes. Carmona-Contreras (2008) (*com pers*) estudió el efecto de la concentración de las poliaminas putrescina, espermidina y espermina, sobre la expresión de la hormona colecistokinina (CCK) en cultivos celulares primarios del intestino del huachinango *Lutjanus*

peru. Este autor observa que los niveles de ARNm codificante para CCK, se incrementan significativamente al incubar las células con 0.1% de las tres poliaminas, con respecto al control, libre de éstas. La CCK es una hormona peptídica que regula la secreción de las enzimas del páncreas y la bilis entre otras funciones digestivas. Por otro lado, se observó el efecto positivo de la espermina sintética sobre la maduración digestiva de la lubina europea (Péres *et al.*, 1997).

Nuestros resultados concuerdan con Tovar *et al.*, (2004), quien trabajó con la lubina europea y menciona que la cantidad de poliaminas producidas por la levadura *D. hansenii* son las responsables del rápido crecimiento, acompañado de una acelerada maduración pancreática e intestinal, por lo que pueden utilizarse para estimular la maduración precoz de las funciones digestivas.

También se sabe que la maduración del tracto digestivo de ratas se acelera por la liberación endoluminal de espermina y espermidina (Buts *et al.*, 1994).

Otros investigadores, reportan que la alimentación temprana con levaduras, especialmente *D. hansenii* y *S. cerevisiae* aporta beneficios al hospedero, tales como la colonización temprana del tracto digestivo; lo que tiene efectos sobre el desarrollo del sistema digestivo en larvas y en peces adultos, estimulan el metabolismo y el crecimiento (Gatesoupe, 2007).

Waché *et al.*, (2006) observan que la maduración temprana del sistema digestivo en larvas de la trucha Arcoiris, se acelera cuando se incorpora a la dieta la levadura *D. hansenii*.

En el caso particular de las larvas de la cabrilla arenera, es importante hacer notar, que al momento de la primera alimentación, el tubo digestivo ya contaba con estructuras morfológicas que permiten el desarrollo de un mecanismo de digestión y absorción del alimento. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que el estado de desarrollo morfológico de las estructuras digestivas, no siempre conlleva una capacidad fisiológica bien desarrollada (Peña *et al.*, 2003). Con el objeto de conocer los beneficios de las poliaminas sobre el desarrollo larval y la maduración del tubo digestivo durante la coalimentación, en este trabajo se evaluaron cambios en el desarrollo del sistema digestivo a través de la actividad enzimática digestiva y la cuantificación de ARN codificantes para amilasa, tripsina, lipasa y aminopeptidasa.

La maduración del tracto digestivo esta referida a la capacidad digestiva del animal, es decir, al incremento o disminución de la actividad de enzimas intestinales y pancreáticas, y su correspondiente variabilidad en la expresión de los genes asociados a estas enzimas. La capacidad digestiva conduce al aumento de la supervivencia larvaria y del crecimiento de los peces alimentados con probióticos.

8.3. 2 LIPASA

Los resultados obtenidos de la actividad enzimática pueden sugerir que las poliaminas pueden modificar el patrón de secreción de la lipasa en los grupos alimentados con levadura, en comparación al control (Figuras 13 y 22); esto concuerda con los trabajos de Tovar *et al.*, (2004) quien observó que *D. hansenii* induce la actividad específica de la lipasa y la expresión de su gen para el día 36 DDE en la lubina europea. Otra manera en que las poliaminas podrían estar implicadas en el incremento de la actividad de la lipasa, es que éstas estimulan la expresión de la CCK, la cual es responsable de la liberación de la bilis, emulsionando los lípidos para un mejor funcionamiento de la lipasa.

A los cuatro días, después de iniciada la alimentación exógena con alimento vivo, en las larvas de *P. maculatofasciatus* existe evidencia de la acumulación de lípidos en el intestino anterior (Peña *et al.*, 2002), lo cual está de acuerdo con lo encontrado en larvas de otras especies (Iwai y Tanaka, 1968a y b; Tanaka, 1973; Kapoor *et al.*, 1975; Watanabe y Sawada, 1985; Govoni *et al.*, 1986; Loewe y Eckmann, 1988; Kjorsvik *et al.*, 1991; Verreth *et al.*, 1992; Sarasquete *et al.*, 1995; Calzada *et al.*, 1998; Segner y Rösch, 1998; Porter y Theilacker, 1999), juveniles y adultos (Stroband, 1977; Fänge y Grove, 1979; Stroband y Dabrowski, 1979; Stroband y Kroon, 1981; Stroband y van Der Veen, 1981).

Las enzimas lipolíticas del páncreas, lipasa y fosfolipasa 2 se incrementan durante el desarrollo de las larvas de peces marinos (Izquierdo *et*

al., 2000). Tal respuesta enzimática ha sido observada en el día 38 DDE en la lubina europea y día 24 DDE en larvas de la corvina roja (Zambonino y Cahu, 1999; Buchet *et al.*, 2000). Los niveles de expresión de lipasa y fosfolipasa 2 sugieren que existe una capacidad máxima de la síntesis de las enzimas lipolíticas en larvas de lubina europea sin importar la estimulación por lípidos en la dieta (Zambonino y Cahu, 2001).

En nuestro estudio se observó para el grupo control, un decremento progresivo de la actividad de esta enzima a partir del pico máximo de secreción y para los otros dos grupos, con levadura, una oscilación de la actividad de lipasa a partir sus picos máximos (Fig. 13).

Morais *et al.*, (2007) menciona que la actividad lipasa puede ser estimulada a través de una dieta rica en lípidos pero solo hasta alcanzar una meseta, después este estímulo no aumenta la secreción enzimática por lo que se sugiere que está genéticamente programada, por lo menos durante los estados tempranos del desarrollo.

Otros autores sugieren que la colecistokinina (CCK) puede estar involucrada en la mediación de esta enzima (Singer, 1987; Brannon, 1990; Spannagel *et al.*, 1996). Nuestros resultados de actividad lipasa coinciden con los obtenidos por Alvarez-González (2003) quien también observa un aumento progresivo de la actividad a partir del día 20 de cultivo en larvas alimentadas solamente con presas vivas. Sin embargo, con nuestros resultados de

expresión (Fig. 22), observamos que los niveles de ARN para las larvas alimentadas con presas vivas son más altos que los de aquellas alimentadas con levadura; por lo que sugerimos que para este último grupo experimental, existe una regulación de la expresión a nivel postranscripcional, ya que los niveles de actividad no correlacionan con aquellos de expresión. Sin embargo, se sugiere realizar más estudios para corroborar estas observaciones.

8.3.3 TRIPSINA

A partir del día 20 DDE se evaluó la actividad de tripsina, observándose un incremento de la actividad para el grupo de lev (ODC +) y un decremento para el grupo control y lev inhibida (ODC -), para el día 35 DDE. Álvarez-González (2003) observa que la actividad de tripsina tiene un ligero incremento después del día 20 hasta el día 30 DDE, sin embargo, sus resultados son expresados en mU/larva, lo que se tendría que verificar si corresponde a las U/mg de proteína soluble realizada en este trabajo.

La mayor actividad de tripsina se detecto en el grupo levadura (ODC +) alcanzando su pico máximo el día 20 DDE y los mayores niveles de ARN fueron detectados para el día 30 DDE (Figuras 14 y 21). En este caso, la secreción de la esta enzima se vio favorecida al avanzar la edad de la larva con respecto al control. Eso concuerda con Pérez *et al.*, (1998), que mencionan que la regulación de los genes que codifican la amilasa y tripsina es independiente,

que sus genes se expresan bajo la influencia de la edad y la composición de la dieta.

En nuestro estudio, la composición química proximal de las dietas fue similar, con la presencia de levaduras silvestres y levaduras con la actividad ODC inhibida como única variante; por lo que sugerimos que la presencia de estos microbios, pueden regular el patrón de secreción y expresión de esta enzima.

Nuestros resultados se apoyan en lo reportado por Lhoste *et al.*, (1996) quienes observaron que la presencia de la microflora (bacterias) en ratas, y la composición de su dieta pueden modificar la actividad de sus enzimas pancreáticas, además de promover la mejor digestión y absorción de los nutrientes (específicamente los de naturaleza proteica).

Así mismo Tovar *et al.*, (2004) publicó que en larvas de la lubina europea alimentadas con levaduras (*D. hansenii* CBS 8339) incorporadas en la dieta, mostraron un incremento en la actividad y concentraciones de ARN tripsina y lipasa por lo tanto es posible que estos microorganismos contribuyan a aumentar la habilidad de digestión y asimilación de nutrientes, además de que la degradación de estos probióticos pueden liberar componentes que pueden ser benéficos para el hospedero (McDonald *et al.*, 1986) aunque la importancia de sus enzimas digestivas aun no queda completamente clara (McDonald *et al.*, 1986; Pollak y Montgomery, 1994).

Sin embargo, otros autores afirman que la modulación de la actividad tripsina no ocurre rápidamente al proporcionar dietas con niveles de proteínas en larvas de la lubina europea y que este proceso regulador no puede ser funcional en larvas jóvenes (Péres *et al.*, 1996).

Variaciones en la actividad tripsina han sido estudiadas en relación a los niveles de alimento dado en otras especies (Pedersen *et al.*, 1990) pero una clara relación entre la actividad tripsina y el alimento proporcionado solo ocurre después de la quinta semana de vida. Aunque los mecanismos que controlan la adaptación de la actividad tripsina a la cantidad de proteína en la dieta no fueron eficientes en larvas jóvenes, se ha observado que la calidad de la proteína dietética moduló la transcripción de ARNm de tripsina y en algunos casos la actividad tripsina desde el día 29 (Péres *et al.*, 1998).

8.3.4 AMILASA

Se encontraron diferencias significativas el día 25 DDE entre el grupo alimentado con levaduras silvestres con respecto al control y al grupo Lev (ODC -) (Fig.15). La mayor secreción de amilasa la tuvo el grupo lev (ODC +) alcanzando su pico máximo el día 25 DDE pero cae drásticamente para el día 30 DDE y se mantiene casi imperceptible hasta el final del experimento el día 35 DDE. Esto es similar a lo reportado por Tovar *et al.*, (2002) donde mencionan que *D. hansenii* estimula la actividad amilasa en larvas de la lubina europea encontrándose su mayor efecto el día 27 DDE en comparación al

grupo control atribuyendo que la maduración de las funciones secretoras del páncreas fue antes.

En cuanto a los niveles de ARN también se encontraron diferencias significativas. El grupo alimentado con levadura (ODC -) tuvo niveles casi imperceptibles (Fig. 20) mientras que el grupo control presentó los niveles más altos de ARN durante todo el experimento, coincidiendo para el patrón de la actividad enzimática. Los niveles mas altos de ARNm, se observan en la dieta control para el día 35 DDE, a pesar que en actividad enzimática, los niveles son casi imperceptibles para ambos grupos experimentales.

Dado estos resultados, podemos sugerir que las poliaminas tuvieron un efecto positivo sobre la maduración del tracto digestivo puesto que, cuando la actividad y niveles de ARN de amilasa permanecen altos, en los organismos persiste un sistema digestivo poco desarrollado (Cahu y Zambonino-Infante, 1994; Zambonino *et al.*, 1996). También Tovar *et al.*, (2004) sugieren que el descenso de los niveles de la secreción enzimática y los de ARN es un patrón característico de maduración precoz del sistema digestivo de larvas de peces y que además esta genéticamente programado.

Se conoce que la actividad amilasa es muy alta en la larva joven y decrece marcadamente durante el desarrollo de la misma (Zambonino y Cahu, 1994b; Ribeiro *et al.*, 1999; Buchet *et al.*, 2000; Péres *et al.*, 1996) lo cual también coincide con nuestros datos.

Recientemente, Alvarez-González *et al.* (2001b) reportó actividad amilasa en la cabrilla arenera desde el día 1 DDE, encontrando un incremento constante hasta el día 35 DDE, sin embargo, es reportada como mU/larva. La actividad amilasa también ha sido reportada en otras especies (Tanaka *et al.*, 1972; Rösch y Segner, 1990).

Péres *et al.*, (1998) demostró que altos niveles de ARN codificante para amilasa, son encontrados en larvas jóvenes de la lubina europea que en las más viejas, esto sugiere que existe un decremento coordinado entre la actividad específica de los niveles de ARN de amilasa que es transcripcionalmente regulado durante el desarrollo larval. En el lenguado, Douglas *et al.*, (2000) también muestra que los picos de transcripción de amilasa son aproximadamente el día 20 y esto decrece durante la metamorfosis.

Por otra parte este decremento en la amilasa es observado independientemente de una dieta concentrada en glúcidos (Péres *et al.*, 1996) lo cual sugiere que el decremento de la actividad amilasa durante el desarrollo larval está genéticamente programado. Este cambio particular en la amilasa puede reflejar diferentes requerimientos nutricionales en los diferentes estados de vida (Krogdahl y Sundby, 1999) y también de las especies con hábitos alimenticios diferentes.

Nuestros resultados también mostraron que el decremento de los niveles de ARN no coinciden con la disminución de la actividad enzimática; lo cual no

concuerta con varios autores quienes mencionan que el decremento de la actividad amilasa esta coordinado con el decremento de ARN codificante en la lubina europea (Péres *et al.*, 1998).

Este proceso coordinado sugiere que la disminución en la expresión de la amilasa es transcripcionalmente regulado durante el desarrollo larval. También se ha demostrado que una dieta con almidón puede modular el declive de la actividad amilasa específica. Este declive fue muy lento en las larvas de la lubina europea alimentadas con una dieta que contenía 25% de glúcidos que en larvas alimentadas con solo el 5% de glúcidos. La adaptación de la amilasa a los niveles de almidón ha sido extensivamente descrita en mamíferos (Sheele, 1993) y peces (Kawai e Ikeda, 1973a y b). En el caso de larvas de la lubina europea esto puede precisar que la modulación de la actividad amilasa por una dieta con almidón es eficiente para el día 18 DDE y podría ser el resultado de una regulación post- transcripcional de la síntesis de amilasa (Péres *et al.*, 1998) para la corvina roja reportan lo mismo (Buchet *et al.*, 2000).

8.3.5 AMINOPEPTIDASA

El análisis estadístico mostró diferencias significativas el día 30 DDE. Se observó que la mayor secreción de aminopeptidasa la tuvo el grupo lev (ODC +), alcanzando su pico máximo el día 30 y el grupo levadura (ODC -) presentó los niveles más elevados de ARN el día 35 DDE (Figuras 16 y 23).

El grupo control presentó su máxima actividad enzimática también el día 30 DDE, pero su secreción fue significativamente menor, en comparación al grupo levadura (ODC +).

Lo obtenido demuestra que el patrón enzimático puede cambiar al proporcionar levaduras a las larvas de peces de la cabrilla arenosa, induciendo la secreción de aminopeptidasa y con ello ayudando a la capacidad digestiva, estimulada por una maduración de las células del borde de cepillo. El experimento finalizó al día 35 pero este día no mostró diferencias entre los tratamientos.

Lo anterior concuerda con Buts *et al.*, (1986, 1999) quienes publican que las levaduras incrementan la actividad de las enzimas de la membrana del borde de cepillo. También con Tovar *et al.*, (2004) quienes demuestran que para el día 27 DDE en larvas de la lubina europea, existe un aumento en la actividad en las enzimas del borde de cepillo estimulado por la administración de *D. hansenii* al 1.1 %, sugiriendo que la levadura estimula a la maduración del tracto digestivo y que para el día 36 DDE el proceso ha terminado.

Waché *et al.*, 2006 también encuentra que las larvas de la trucha Arcoiris alimentadas con diferentes levaduras aumentan la actividad de las enzimas de borde de cepillo.

Otros nutrientes como las poliaminas también actúan sobre la diferenciación de los enterocitos. Péres *et al.*, (1998) ha demostrado que las larvas de la lubina europea alimentados con una dieta que contiene el 0.33% de espermina adquieren un perfil enzimático temprano característico de enterocitos maduros en comparación a larvas alimentadas sin espermina.

La maduración temprana del sistema digestivo y la administración de poliaminas están asociadas a la obtención de mayores tasas de supervivencia en peces (Péres, 1997). Estos últimos autores, obtuvieron un aumento del 33% de supervivencia en larvas de la lubina europea alimentadas con dietas compuestas y 0.33% de espermina (Sigma S3256). Con lo que se demuestra, al igual que en mamíferos, que las poliaminas son un factor importante en la maduración de los enterocitos (Greco *et al.*, 2000).

La actividad de las enzimas citosólicas progresivamente disminuyen con el crecimiento de la larva cuando la actividad de las enzimas del borde de cepillo incrementan abruptamente, aproximadamente a la tercera semana DDE en la lubina europea (Cahu y Zambonino, 1994) lenguado (Ribeiro *et al.*, 1999) o corvina roja (Buchet *et al.*, 1997).

La disminución de la actividad de la enzima leucina- alanina- aminopeptidasa en el citosol con la edad, coincide con un aumento agudo de la fosfatasa alcalina y aminopeptidasa N en las membranas del borde de cepillo; estas son características de la maduración normal de los enterocitos en el

desarrollo de las larvas de peces y también en otras especies incluyendo mamíferos. El establecimiento de una eficiente digestión en la membrana del borde de cepillo representa el modo adulto de digestión de los enterocitos (Henning, 1987). Sin embargo en nuestro trabajo solo se midió la actividad aminopeptidasa.

Por todo lo anterior mencionado, podemos sugerir que la administración de levaduras secretoras de poliaminas, producen efectos positivos sobre la actividad enzimática digestiva de las larvas de la cabrilla arenera. Aunque no se conocen completamente los mecanismos moleculares que pueden intervenir o inducir en la maduración precoz del sistema digestivo a través de las poliaminas, aunque ya se sabe que participan en diferentes etapas de la expresión de los genes de proliferación y diferenciación celular (Dufour *et al.*, 1988; Buts *et al.*, 1994; Bardócz *et al.*, 1995a y b).

Esto también concuerda con varios autores como Buts *et al* (1993) donde reportan que las poliaminas inician el control de la expresión en los niveles transcripcionales y post-transcripcionales. Dofur *et al.*, (1988) menciona también que las poliaminas actúan como un factor de modulación del reloj biológico interno.

Nuestros resultados sugieren que la dieta adicionada con levaduras productoras de poliaminas, puede jugar un papel importante induciendo cambios del tracto gastrointestinal, influyendo en la maduración pancreática e

intestinal modificando los niveles de secreción de varias enzimas. Y aunque aun no es completamente claro, si puede o no actuar sobre el tiempo de decline o aumento que es genéticamente programado, nosotros encontramos que las poliaminas estimulan el proceso de transcripción de la tripsina y aminopeptidasa, y retardando a la amilasa. Por lo tanto podemos sugerir que las levaduras usadas como probióticos en las dietas formuladas, pueden contribuir al aporte de moléculas que ayudaran a la maduración del tracto digestivo y permitirá una mayor supervivencia larval, lo anterior se apoya en Tovar *et al.*, (2002) reportan que las poliaminas pueden actuar la maduración pancreática estimulando el proceso de transcripción de la tripsina y lipasa, y retardando el de la amilasa en larvas de lubina europea.

IX. CONCLUSIONES

- La levadura *Debaryomyces hansenii* produce la mayor síntesis de poliaminas putrescina, espermidina y espermina durante su fase exponencial.
- La presencia de DFMO (2mM) inhibidor de la enzima ODC, no altero el crecimiento ni la producción de poliaminas de la levadura *Debaryomyces hansenii*.
- El uso de dietas microparticuladas adicionadas con la levadura *Debaryomyces hansenii* aumenta la supervivencia larvaria de la cabrilla arenera.
- Gracias al diseño de la sonda de la enzima digestiva aminopeptidasa, se pudieron cuantificar los niveles de ARN codificantes de este mismo gen.
- El aporte de poliaminas secretadas por la levadura *Debaryomyces hansenii* (CB 8339), tiene un efecto positivo sobre las larvas de la cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*) que se ve reflejado en la modificación de la secreción enzimática de lipasa, amilasa, tripsina y aminopeptidasa, lo cual promueve la madurez digestiva del pez.

- La incorporación de la levadura *Debaryomyces hansenii* a la dieta se ve reflejado en el aumento de los niveles de expresión de tripsina, amilasa y aminopeptidasa.
- Conocer la actividad y los niveles de expresión de los genes de las enzimas digestivas nos permite entender la forma como operan los procesos de maduración del sistema digestivo en larvas de *Paralabrax maculatofasciatus*.

X. Prospección a futura investigación

- Estudiar la mejor forma de administración de probióticos en la dieta (p.e. microencapsulados, microagregados, etc.) durante las etapas larvarias con la finalidad de lograr una deshabitación alimentaria temprana y así para aprovechar mejor el alimento.
- Optimizar métodos de coalimentación de las dietas micropartículas y presas, con el objetivo de disminuir al mínimo la utilización de los alimentos vivos durante la crianza de las larvas.

- Producción de cepas de levaduras mutantes o deficientes de ODC (ornitín descarboxilasa) para conocer con seguridad el papel de las poliaminas, como control negativo de experimentos futuros.
- Conocer el efecto de la sobreexpresión de la ODC y la producción de poliaminas en la cepa CBS 8339 en el desarrollo de las larvas de peces a través de técnicas moleculares.

XI. LITERATURA CITADA

- Allen, G.R., y D.R. Robertson. 1994. Fishes of the tropical eastern Pacific. Univ. Hawaii Press. Honolulu, Hawaii. 322 pp.
- Alvarez-González, C.A. 1999. Optimización del proceso de producción de cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* (Percoidei: Serranidae) en sistemas de circulación cerrada. Tesis de Maestría, CICIMAR-IPN. 108 pp.
- Álvarez-González, C.A. 2003. Actividad enzimática digestiva y evaluación de dietas para el destete de larvas de la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* (Percoidei: Serranidae). Tesis doctoral. CICIMAR-IPN. 164 pp.
- Álvarez-González, C.A., J.L. Ortiz-Galindo, S. Dumas, S.F. Martínez-Díaz, D.E. Hernández-Ceballos, T. Grayeb del Alamo, M. Moreno-Legorreta, R. Peña-Martínez y R. Civera-Cerecedo. 2001a. Effect of stocking density on the growth and survival sand bass *Paralabrax maculatofasciatus* larvae in a closed recirculating system. J. World Aquacult. Soc. 32:130-137.
- Álvarez-González, C.A., R. Civera-Cerecedo J.L. Ortiz-Galindo, S. Dumas, M. Moreno-Legorreta y T. Grayeb-Del Alamo. 2001b. Effect of dietary protein level on growth and body composition of juvenile spotted sand bass, *Paralabrax maculatofasciatus*, fed practical diets. Aquaculture. 194:151–159.
- Andlid T, Juárez RV, Gustafsson L. 1995. Yeast colonizing the intestine of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) and turbot (*Scophthalmus maximus*). Microb. Ecol. 30:321-334.
- Avilés-Quevedo, A. y M. Iizawa. 1993. Manual para construcción, instalación y operación de jaulas flotantes para el cultivo de peces marinos. CRIP. México. 29 pp.
- Avilés-Quevedo, A., U. McGregor-Pardo, R. Rodríguez-Ramos, O. Morales-Castro, M.A. Huerta-Bello y M. Iizawa. 1995. Biología y cultivo de la

cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* (Steindachner,1868).
SEPESCA. México.

- Bachère, E. 2003. Anti-infectious immune effectors in marine invertebrates: potencial tools for disease control in larviculture. *Aquaculture*. 227:427-438.
- Balcázar, J.L. 2003. Evaluation of probiótico bacterial strains in *Litopenaeus vannamei*. Final Report, National Center for Marine and Aquaculture Reserch. Guayaquil, Ecuador.
- Balcázar, J.L., I. de Blas, I. Ruiz-Zarzuola, D. Vendrell y J.L. Muzquiz. 2004. Probiotics: a tool for the future of fish and shellfish health management. *J. Aquacult. Trop.* 19:239-242.
- Balcázar, J.L., I. de Blas, I. Ruiz-Zarzuola, D. Vendrell y J.L. Muzquiz. 2006. The role of probiótico in aquaculture. *Veterinary Microbiology*. 114:173-186.
- Bardócz, S., G. Grant, D.S. Brown, A. Ralph, A. Pusztai. 1993. Polyamines in food implications for growth and health. *J Nutr Biochem*. 4:66-71.
- Bardócz, S.1993. The role of dietary polyamines. *European Journal of Clinical Nutrition*, 47:683-690.
- Bardócz, S. 1995b. Polyamines in food and their consequences for food quality and human health. *Trends in food science and technology*. 6:341-346.
- Bardócz, S., T.J. Duguid, D.S. Brown, G. Grant, A. Pusztai, A. White y A. Ralph. 1995a. The importance of dietary polyamines in cell regeneration and growth. *British Journal of Nutrition*. 73:819-828.
- Barnabé, G. 1994. *Aquaculture: Biology and Ecology of Cultured of Species*. Ellis Horwood. 403 pp.
- Baskerville-Bridges, B. y L.J. Kling. 2000. Early weaning of Atlantic cod *Gadus morhua* larvae onto a microparticulate diet. *Aquaculture*. 189:109-117.

- Boulhic, M., y J. Gabaudan. 1992. Histological study of the organogenesis of the digestive system and swim bladder of the Dover sole, *Solea solea* (Linnaeus, 1758). *Aquaculture*. 102:373-396.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *An. Biochem.* 72:248-254.
- Brannon, P. M.1990. Adaptation of the exocrine páncreas to diet. *Annu. Rev. Nutr.* 10:85-105.
- Buchet, V., J. L. Zambonino y C. Cahu. 1997. Effect of lipid level in a compound diet on the development of red drum (*Sciaenops ocellatus*) larvae. *Aquaculture* 184: 339-347.
- Buchet, V., J.L. Zambonino-Infante y C.L. Cahu. 2000. Effect of lipid level in a compound diet on the development of red drum (*Sciaenops ocellatus*) larvae. *Aquaculture*. 184:339-347.
- Buts, J., P. Bernasconi, M. Van Craynest, P. Maldague y R. De Meyer. 1986. Response of human and rat small intestinal mucosa to oral administration of *Saccharomyces boulardii*. *Pediatr. Res.* 20:192-196.
- Buts, J.P., Keyser, N. y L. Raedemaeker. 1994. *Saccharomyces boulardii* enhances rat intestinal enzyme expression by endoluminal release of polyamines. *Pediatric Research*. 36(4):522-527.
- Buts, J., N. De Keyser, S. Marandi y D. Sokal. 1999. *Saccharomyces boulardii* upgrades cellular adaptation after proximal enterectomy in rats. *Gut* 45:89-96.
- Cahu, C. y J.L. Zambonino-Infante. 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. y J.L. Zambonino-Infante. 2001. Substitution of live food by formulated diets in marine fish larvae. *Aquaculture*. 200:161-180.

- Calzada, A., Medina, A., González de Canales, M.L., 1998. Fine structure of the intestine development in cultured sea bream larvae. *J. Fish Biol.* 53, 340– 365.
- Cara-Torres, F.J. Moyano, C. Fernández-Díaz y M. Yúfera. 2002. Actividad de enzimas digestivas durante el desarrollo larvario del Sargo (*Diplodus sargus*) CIVA 2002 (<http://www.civa2002.org>), 110-121.
- Casero, R.A., P. Celano, S.J. Ervin, N.B. Applegren, L. West y A.E. Pegg. 1991. Isolation and characterization of a clone that codes for human spermidine/spermine N¹-acetyltransferase. *J. Biol. Chem.* 266:810-814.
- Casero, R.A. y A.E. Pegg. 1993. Spermidine/spermine N¹-acetyltransferase – the turning point in polyamine metabolism. *FASEB. J.* 7:653-661.
- Cousin, J.C.B., F. Baudin-Laurencin y J. Gabaudan. 1987. Ontogeny of enzymatic activities in fed and fasting turbot, *Scophthalmus maximus L.* *J. Fish Biol.* 30:15-33.
- Dimes, L.E. y N.F. Haard. 1994. Estimation of protein digestibility: I. Development of an invitro method for estimating protein digestibility in salmonids. *Comp. Biochem. Physiol.* 108A:349-362.
- Direkbusarakom, S., M. Yoshimizu Y. Ezura, L. Ruangpan y Y. Danayadol. 1998. *Vibrio spp.* The dominant flora in shrimp hatchery against some fish pathogenic viruses. *J. Mar. Biotechnol.* 6:266-267.
- Douglas, S.E., S. Mandla y J.W. Gallart. 2000. Molecular analysis of the amylase gene and its expression during the development in the winter flounder, *Pleuronectes americanus*. *Aquaculture.* 190:247-260.
- Dufour, C., G. Dandrifosse, P. Forget, F. Vermesse, N. Romain, N. y P. Lepont. 1988. Spermine and spermidine induce intestinal maturation in the rat. *Gastroenterology.* 95:112-116.
- Erlanger, B., N. Kokowsky y W. Cohen. 1961. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Arch. Biochem. Biophys.* 95:271-278.

- Fange, R. y D. Grove. 1979. Digestion. *En: Hoar, W.S., D.J. Randall y J.R. Brett (Eds.). Fish Physiology. Vol. 8, Academic Press. NY. Pp. 161-260.*
- Fong, W.F., J.S. Heller y E.S. Canellakis. 1976. The appearance of an ornithine decarboxylase inhibitory protein upon the addition of putrescine to cell cultures. *Biochim. Biophys. Acta 428:456-465.*
- Fontaine, (Ed.). *Nutrition des Poissons. C.N..R.S. Paris. Pp. 355-374.*
- Fuller, R. 1992. History and development of probiotics. *En: Fuller, R. (Ed.), Probiotics. The scientific basis. Chapman and Hall, London. 1-8 pp.*
- Garriques, D. y G. Arevalo. 1995. An evaluation of the production and use of a live bacterial isolate to manipulate the microbial flora in the commercial production of *Penaeus vannamei* post-larvae in Ecuador. *En: Browly, C.L. y J.S. Hopkins (Eds.). Swimming through troubled water. Proceeding of the special session on shrimp farming, aquaculture'95. Baton Rouge, World Aquaculture Society. pp 53-59.*
- Gatesoupe, F. J. 2007. Live yeasts in the gut: Natural occurrence, dietary introduction, and their effects on fish health and development. *Aquaculture. 267(1-4):20-30.*
- Gatesoupe, F.J. 1999. The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture. 180:147-165.*
- Gawlicka, A., S.J. Teh, S.S.O Hung, D.E. Hinton, J. de la Noüe. 1995. Histological and histochemical changes in the digestive tract of the white sturgeon larvae during ontogeny. *Fish Physiol. Biochem. 14:357-371.*
- Girones, R., J.T Jofre y A. Bosch. 1989. Isolation of marine bacteria with antiviral properties. *Can. J. Microbiol. 35:1015-1021.*
- Gómez-Gil, B., A. Roque, J.F. Turnbull. 2000. The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms. *Aquaculture. 191:259-270.*
- Göth T.S., A. Nagasaki, K. Terada, M. Takaguchi y M. Mori. 1996. Molecular cloning of cDNA for nonhepatic mitochondrial arginase (arginase II) and

- comparision of its induction with nitric oxide synthase in a murine macrophage-like cell line. *FEB. Lett.* 395:119-122.
- Govoni, J.J., G.W. Boehlert y Y.L. Watanabe. 1986. The physiology of digestion in fish larvae. *Environ. Biol. Fishes.* 16:59-77.
- Greco, S., I. Hugueny, P. George, P. Perrine, P. Louisot. *Biol. M.C.* 2000. Influence of spermine on intestinal maturation of the glycoprotein glycosylation process in neonatal rats. *Biochem. J.* 345:69-75.
- Gullian, M. y J. Rodriguez. 2002. Immunostimulant qualities of probiotic bacteria. *Global Aquacult. Advocate.* 5:52-54.
- Heller J.S., W.F. Fong y E.S. Canellakis. 1976. Induction of a protein inhibitor to ornithine decarboxylase by the end products of its reaction. *Prroc. Natl. Acad. Sci. USA* 73:1858-1862.
- Henning, S.J. 1987. Functional development of the gastrointestinal tract. *Physiology of the gastrointestinal tract.* 2nd edition. Raven Press, New York. Pp 285- 300.
- Henning, S.J., D.C. Rubin y R.J. Shulman. 1994. Ontogeny of the intestinal mucosa. *En: Johnson, L.R. (Ed.). Physiology of the Gastrointestinal Tract, 3a. Edición,* Raven Press, New York. Pp. 571-610.
- Hecht, T. y G. Peinar. 1993. A review of cannibalism and its implications in fish larviculture. *Journal of the World Aquaculture Society* 24:246-261.
- Hoehne-Reitan, K., E. Kjorsvik y K.I. Reitan, 2001a. Bile salt-dependent lipase in larval turbot, as influenced by density and lipid content of fed prey. *J. Fish Biol.* 58:746–754.
- Hoehne-Reitan, K., E. Kjorsvik, y D.R. Gjellesvik, 2001b. Development of bile saltdependent lipase in larval turbot. *J. Fish Biol.* 58:737-745.
- Höltä, E. 1977. Oxidation of spermidine and spermine in rat liver: purification and properties of polyamine oxidase. *Biochemistry.* 16:91-100.
- Igarashi, K. y K. Kashiwagi. 1999. Polyamine transport in bacteria and yeast. *Biochem. J.* 344:633-642.

- Irianto, A. y B. Austin. 2002. Use of probiotics to control furunculosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *J. Fish Dis.* 25:333-342.
- Iwai, T, R. y M. Tanaka. 1968a. The comparative study of the digestive tract of teteost larvae - III. Epithelial cells in the posterior gut of halfbeak larvae. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 34:44-48.
- Iwai, T.R. y M. Tanaka. 1968b. The comparative study of the digestive tract of teteost larvae - IV. Absorption of fat by the gut of halfbeak larvae. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 34:871-875.
- Izquierdo, M.S., J. Socorro, L. Arantzamendi y C.M. Hernández-Cruz. 2000. Recent advances in lipid nutrition in fish larvae. *Fish Physiol. Biochem.* 22:97-107.
- Juhäni, J., L. Alhonen, Petilä y A. Keinänen. 2004. Genetic approaches to the cellular functions of polyamines in mammals. *Eur. J. Biochem.* 271:877-894.
- Kamei, Y., M. Yoshimizu, Y. Ezura y T. Kimura. 1988. Screening of bacteria with antiviral activity from fresh water salmonid hatcheries. *Microbiol. Immunol.* 32:67-73.
- Kapoor, B.G., H. Smit y I.A. Verighina. 1975. The alimentary canal and digestion in teleosts. *En: F.S. Rusell y M. Yonge (Eds.). Advances in Marine Biology. Vol. 13, Academic Press. London. Pp. 109-211.*
- Kallio, A. y J. McCann. 1981. Ornithine decarboxilase. *Biochem. J.* 218:641-644.
- Kawai, S. y S. Ikeda. 1973a. Studies on digestive enzymes of fishes III. Development of the digestive enzymes of rainbow trout after hatching and the effect of dietary change on the activities of digestive enzymes in the juvenile stage. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 39:819-823.
- Kawai, S., y S. Ikeda. 1973b, Studies on digestive enzymes of fishes – IV. Development of the digestive enzymes of carp and read sea bream after hatching. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 39:877-881.

- Kjørsvik, E., T. Van der Meeren, H. Kryvi, J. Arnfinnson y P.G. Kvenseth. 1991. Early development of the digestive tract of cod larvae, *Gadus morhua* L., during startfeeding and starvation. J. Fish. Biol. 38:1-15.
- Kolkovski, S., 2001. Digestive enzymes in fish larvae and juveniles-implications and applications to formulated diets. Aquaculture 200:181-201.
- Krogdahl, A. y A. Sundby. 1999. Characteristics of pancreatic function in fish. En: Pierzynowski, S.G., Zabielski, R. (Eds.), Biology of the Pancreas in Growing Animals. Elsevier Science, Amsterdam. 437-458 pp.
- Kurokawa, T. y T. Suzuki. 1996. Formation of a diffuse pancreas and the development of digestive enzymes synthesis in larvae of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. Aquaculture 141:267-276.
- Lara-Flores, M., M. A. Olvera, B. Guzmán y W. Madrid. 2003. Use of the bacteria *Streptococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus*, and the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as growth promoters in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Aquaculture. 216:193-201.
- Lauff, M. y R. Hofer. 1984. Proteolytic enzymes in fish development and the importance of dietary enzymes. Aquaculture. 37:335-346.
- Lhoste, E. F., I. Catala, M. Fiszlewicz, A.M Gueugneau, F. Popot,, P. Vaissade, T. Corring, y O. Szylit. 1996. Influence of caecal microflora and of two protein levels on the adaptation of the exocrine pancreas: comparative study in germ-free and conventional rats. British Journal of Nutrition. 75:433-444.
- Lluch-Cota D. 1995. Aspectos reproductivos de la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* (Pices:Serranidae) en Bahía Magdalena-Almejas, B.C.S. México. Tesis de maestría. CICIMAR-IPN. México. 171 pp.
- Loewe, H., Eckmann, R., 1988. The ontogeny of the alimentary tract of coregonid larvae: normal development. J. Fish Biol. 33, 841–850.
- Luk, G., C. Civin, R. Weissman, y S. Balyn. 1980. Science. 216: 75-77.

- Mallé, P., M. Vallé y S. Bouquelet. 1996. Assay of biogenic amines involved in fish decomposition. *Journal of AOAC*. 79(1):43-49.
- Maraux, S., D. Louvard y J. Baratti. 1973. The aminopeptidase from hog-intestinal brush border. *Biochim. Biophys. Acta*. 321:282-295.
- Maraux, S., D. Louvard y J. Baratti. 1973. The aminopeptidases from hog-intestinal brush border. *Biochem. Biophys. Acta*, 321:282-295.
- Matus-Nivón, E., R. Ramírez-Sevilla, R. Martínez- Pecero y J.L. Ortiz-Galindo. 1990. Potencial acuacultural de ocho especies de peces marinos del Pacífico mexicano, con base en su biología temprana. *En: G. de la Lanza-Espino y J.L. Arredondo-Figueroa (eds.) La Acuicultura en México: de los conceptos a la producción*. UNAM. México. 68-74 pp.
- McCann P.P., Tardif C. y Mamont P.S. 1977. Regulation of ornithine decarboxylase by ODC-antizyme in HTC cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 75:948-954.
- McDonald, N. L., J. R. Stara y Austin B. 1986. Bacterial microflora in the gastrointestinal tract of Dover sole (*Solea solea* L.), with emphasis on the possible role of bacteria in the nutrition of the host. *FEMS Microbial Lett* 39:107-111.
- Metailler, R. y C. Huelvan. 1991. Utilisation de levures dans l'alimentation du juvénile de bar (*Dicentrarchus labrax*). In Kaushik S. J. y Luquet, P. (Eds.). *Fish Nutrition in Practice Les Colloques*, vol. 61. INRA, Paris, pp 945-948.
- Morais, S., L. Conceicao, I. Ronnestad, W. koven, C. Cahu, J.L. Zambonino, M. Dinis. 2007. Dietary neutral lipid level and source in marine fish larvae: Effects on digestive physiology and food intake. *Aquaculture* 268 : 106-122.
- Moriarty, D. 1997. The role of microorganisms in aquaculture ponds. *Aquaculture* 151:333-349.

- Moyano, F.J., M. Diaz, F.J. Alarcon y M.C. Sarasquete. 1996. Characterization of digestive enzyme activity during larval development of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Fish Physiol. Biochem.* 15:121-130.
- Moyano-López, F.J., I. Martínez-Díaz, M. Díaz-López y F.J. Alarcón-López, 1999. Inhibition of digestive proteases by vegetable meals in three fish species; seabream (*Sparus aurata*), tilapia (*Oreochromis niloticus*) and African sole (*Solea senegalensis*). *Comp. Biochem. Physiol.* 122B:327-332.
- Mulder, R. W., R. Havenaar y J.H. Huis in 't Veld. 1997. Intervencion strategies: the use of probiotics and competitive exclusion microfloras against contamination whit pathogens in pigs and poultry. *En: Fuller, R. (Ed.), Probiotics 2: Applications and practical aspects.* Chapman and Hall, London. 187-207 pp.
- Munilla-Morán, R., J.R. Stark y A. Barbour. 1990. The role of exogenous enzymes in digestion in culture of turbot larvae (*Scophthalmus maximus L.*). *Aquaculture.* 88:337-350.
- Nicholson, J.A. y Y.S. Kim. 1974. A one-step L-amino acid oxidase assay for intestinal peptide hydrolase activity. *Anal. Biochem.* 63:110-117.
- Niiranen K., M. Pietilä, T.J. Pirtillä, A. Järvinen, M. Hälmekito, V.P. Korhonen, T.A. Keinänen, L. Alhonen y J. Juhäni. 2002. Targeted disruption of Spermidine/spermine N¹-acetyltransferase gene in mouse embryonic stem cell. Effects on polyamine homeostasis and sensitivity to polyamine analogues. *J. Biol. Chem.* 277:25323-25328.
- Oliva-Teles, A. y P. Gonçalvez. 2001. Partial replacement of fishmeal by brewers yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) in diets for sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. *Aquaculture.* 202:269-278.
- Pedersen, D., I. Ugelstad y K. Hjelmeland. 1990. Effects of transitory, low food supply on the early life of larval herring (*Cuplea harengus*) on mortality, growth and digestive capacity. *Mar. Biol.* 107:61-66.
- Pedersen, B.H., E.M. Nilssen y K. Hjelmeland, 1987. Variation in the content of trypsin and trypsinogen in larval herring *Clupea harengus* digesting copepod nauplii. *Mar. Biol.* 94, 171–181.

- Pfaller, A., T. Gerarden y J. Riley. 1987. Growth inhibition of pathogenic yeast isolates by alpha-Difluoromethylornithine: An inhibition of ornithine decarboxilase. *Mycophatologia* 98:3-8.
- Pegg, A.E. 1986. Recent advances in the biochemistry of polyamines in eukaryotes. *Biochem. J.* 234:249-262.
- Peña-Martínez, R. 2000. Histología e histoquímica del desarrollo ontogenético del tubo digestivo de larvas de la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus*. Tesis de maestría. CICIMAR-IPN. México. 112 pp.
- Peña-Martínez, R., S. Dumas, M. Villalejo-Fuerte, y J.L. Ortiz-Galindo. 2003. Ontogenetic development of the digestive tract in reared spotted sand bass *Paralabrax maculatofasciatus* larvae. *Aquaculture*. 219:633-644.
- Peña-Martínez, R. 2005. Cambios en la alimentación y desarrollo ontogenético del tubo digestivo de larvas de la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus*. Tesis de doctorado. CICIMAR-IPN. México.
- Péres A., C.L. Cahu, J.L. Zambonino-Infante. 1997. Dietary spermine supplementation induces intestinal maturation in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Fish Physiol Biochem.* 16:479-485.
- Péres, A., C.L. Cahu, J.L. Zambonino-Infante, M.M. Legall y P. Quazuguel. 1996. Amylase and trypsin responses to intake of dietary carbohydrate and protein depend on the developmental stage in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Fish Physiol. Biochem.* 15:237-242.
- Péres, A., J.L. Zambonino-Infante y C.L. Cahu. 1998. Dietary regulation of activities and mRNA levels of trypsin and amylase in sea bass *Dicentrarchus labrax* larvae. *Fish Physiol. Biochem.* 19:145-152.
- Peulen, O., P. Deloyer y G. Dandrifosse. 2002. Maturation of intestinal digestive and immune systems by food polyamines. In: Zabielski, R., Gregory, P. C. Westrom, B. (Eds.), *Biology of the intestine in growing animals*. Vol. 1. Elsevier, Ámsterdam. 145-167 pp.
- Pollak, P. E. y W. L. Montgomery, 1994. Giant bacterium (*Epulopiscium fishelsoni*) influences digestive enzyme activity of a herbivorous

- surgeonfish (*Acanthurus nigrofuscus*). *Comp Biochem Physiol A* 108: 657-662.
- Prieur, G., J.L. Nicolas, A. Plusquellec y M. Vigneulle. 1990 Interactions between bivalves molluscs and bacteria in the marine environment. *Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev.* 28:227-352.
- Regional de Investigaciones Pesqueras-La Paz. México. 35 pp.
- Rengpipat, S., S. Rukpratanporn, S. Piyatiratitivorakul y P. Menasaveta. 2000. Immunity enhancement in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by a probiont bacterium (Bacillus S11). *Aquaculture*. 191:271-288.
- Reyes-Becerril, M., D. Tovar-Ramírez, F. Ascencio-Valle, R. Civera-Cerecedo, V. Gracia-López, y V. Barbosa-Solomieu. 2008a. Effects of dietary supplementation with live yeast *Debaryomyces hansenii* on immune and antioxidant system in juvenile leopard grouper *Mycteroperca rosacea* exposed to stress. *Aquaculture*. 280(1-4):39-44.
- Ribeiro, L., J.L. Zambonino-Infante, C. Cahu. y M.T. Dinis. 1999. Development of digestive enzymes in larvae of *Solea senegalensis* (Kaup 1858). *Aquaculture*. 170: 465-473.
- Rinkinen, M., K. Jalava, E. Westermarck, S. Salminen, A.C. Ouwehand. 2003. Interaction between probiotic lactic acid bacteria and canine enteric pathogens: a risk factor intestinal *Enterococcus faecium* colonization? *Vet. Microbiol.* 92:111-119.
- Rosales-Velázquez, M.O. 1997. Efecto de la alimentación sobre los desoves de la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* (Teleostei: Serranidae) mantenida en cautiverio. Tesis de Maestría, CICIMAR-IPN. 62 pp.
- Sakata, T. 1990. Microflora in the digestive tract of fish and shell-fish. *En: Lesel, R. (Ed.), Microbiology in Poecilotheims*. Elsevier, Amsterdam. Pp. 171-176.
- Sarasquete, M.C., Polo, A., Yufera, M., 1995. Histology and histochemistry of the development of the digestive system of larval gilthead seabream, *Sparus aurata* L. *Aquaculture* 130, 79–92.

- Scholz, U., G. García-Díaz, D. Ricque, L.E. Cruz-Suarez, F. Vargas-Albores y J. Latchford. 1999. Enhancement of vibriosis resistance in juvenile *Panaeus vannamei* by supplementation of diets with different yeast products. *Aquaculture*. 176:271-283.
- Seely, J. E. y Pegg A. E. 1983a. *J. Biol. Chem.* 258:2496-2500.
- Segner, H., R. Rosch, H. Schmidht y K.J. Von Poeppinghausen. 1998. Digestive enzymes in larval *Coregonus lavaretus* L. *J. Fish Biol.* 35, 249-263.
- Segner, H., V. Storch, M. Reinecke, W. Kloas y W. Hanke. 1994. The development of functional digestive and metabolic organs in turbot, *Scophthalmus maximus*. *Mar. Biol.* 119:471-486.
- Sheele, G. A.1993. Regulation on pancreatic gen expression in response to hormones and nutritional subtrates. In: Go, V. L., Gardner, J. D., Brooks, F. P., Lebenthal, E. (Eds.), *The páncreas: Biology, Pathobiology and Disease*, 2nd edition Raven Press, New York, pp. 103-120.
- Sherman, F., 1991. Getting started with yeast. *En: Guthrie, Ch. y G.R. Fink* (Eds). *Methods in Enzymology*, 194, Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology, Acad. Press, NY. Pp. 3-21.
- Singer, M.V. 1987. Pancreatic secretory response to intestinal stimulants: a review. *Scand. J. Gastroent.* 22 (suppl 139). 1-13.
- Sorgeloos, P., Lavens, P., Leger, Ph., Tackaert, W., 1991. State of the art in larviculture of fish and shellfish. In: Lavens, P., Sorgeloos, P., Jaspers, E., Ollevier, F. (Eds.), *Larvi'91 Fish and Crustacean Larviculture Symposium*, vol. 15. European Aquaculture Society, Gent, Belgium, pp. 3 – 5.
- Sorgeloos, P., P. Dhert y P. Candreva. 2001. Use of the brine shrimp, *Artemia spp.*, in marine fish larviculture. *Aquaculture*. 200:147-159.

- Spannagel, A. W., I. Nakano, T. Tawil, W. Y. Chey, R. A. Liddle y G. M. Green. 1996. Adaptation to fat markedly increases pancreatic secretory response to intraduodenal fat in rats. *Am. J. Physiol. : Gasterontest. Liver Physiol.* 33:G128-G135.
- Stroband, H.W.J., Kroon, A.G., 1977. The development of the stomach in *Clarias lazera* and the intestinal absorption of protein macromolecules. *Cell Tissue Res.* 215, 397–415.
- Stroband, H.W.J., Dabrowski, K.R. 1979. Morphological and physiological aspects of the digestive system and feeding in fresh-water fish larvae. *En: M. Fontaine (ed.). La nutrition des poissons. CNERNA. Paris. Pp.* 355-376.
- Stroband, H.W.J. y H. van der Veen. 1981. Localization of protein absorption during transport of food in the intestine of grasscarp, *Ctenopharygodon idella*. *J. Exp. Zool.* 218:149- 156.
- Tabor, C.W. y H. Tabor. 1985. Polyamines in microorganisms. *Microbiological Reviews.* 49(1):81-99.
- Tabor, C.W. y Tabor H. 1984a. Polyamines. *Annu.Rev. Biochem.* 53:749-790.
- Tabor, C.W. y Tabor H. 1984b. *Adv. Enzimol. Relat. Areas Mol. Biol.* 56:251-282.
- Tanaka, M. 1971. Studies on the structure and function of the digestive system in teleost larvae - III. Development of the digestive system during post larval stage. *Jpn. J. Ichthyol.* 18:164-174.
- Tanaka, M. 1973. Studies on the structure and function of the digestive system of teleost larvae. Ph. D. Thesis. Kyoto University. Japan. 136 pp.
- Tanaka, M., S. Kawai y S. Yamamoto. 1972. On the development of the system and changes in activities of digestive enzymes during larval and juvenil stage in ayu. *Bull. Jap. Soc. Scient. Fish.* 38:1143-1152.

- Thomas, T. y T. J. Thomas. 2001. Polyamines in cell growth and cell death: molecular mechanisms and therapeutic applications. *Cell. Mol. Life Sci.* 58, 244–258.
- Tovar-Ramírez, D., J.L. Zambonino- Infante, F.J. Gatesoupe, C. Cahu, S.H. Nolasco y J.R. Vázquez. 2004. Polyamine producing yeast as potential probiotics for the spotted juveniles sand bass *Paralabrax maculofasciatus*. *Aquaculture*. 204:113-123.
- Tovar-Ramírez, D., J.L. Zambonino-Infante, C. Cahu, F.J. Gatesoupe, R. Vázquez-Juárez y R. Lésel. 2002. Effect of live yeast incorporation in compound diet on digestive enzyme activity in sea bass larvae. *Aquaculture*. 204(1-2):113-123.
- Tovar-Ramírez, D. 2002. Comparación de los efectos de la flora digestiva en peces marinos de aguas templadas y tropicales. Tesis de Doctorado. CIBNOR. La Paz, B.C.S. México.
- Tovar-Ramírez, D., J.L. Zambonino, C. Cahu, F.J. Gatesoupe y R. Vázquez-Juárez. 2004. Influence of dietary live yeast on European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larval development. *Aquaculture*. 234(1-4):415-427.
- Vázquez-Juárez, R., T. Andlid, L. Gustafsson. 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.
- Versaw, W., S.L. Cuppett, D.D. Winters y L.E. Williams. 1989. An improved colorimetric assay for bacterial lipase in nonfat dry milk. *J. Food Sci.* 54, 232-254.
- Verschuere, L., G. Rombaut, P. Sorgeloos, W. Verstraete. 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64:655-671.
- Vine, N., D. Winston, y K. Horst. 2005. Probiotics in marine larviculture. *FEMS Microbiol Rev* 30:404-427.
- Vine, N.G., W.D. Leukes, y H. Kaiser. 2004a. In vitro growth characteristics of five candidate aquaculture probiotics and two fish pathogens grown in fish intestinal mucus. *FEMS Microbiol. Lett.* 231:145-152.

- Vine, N.G., W.D. Leukes, H. Kaiser, S. Daya, J. Baxter y T. Hetch. 2004b. Competition for attachment of aquaculture candidate probiotic and pathogenic bacteria and fish intestinal mucus. *J. Fish Dis.* 27:319-326.
- Vujcic S., M. Halmekitö, P. Diegelman, G. Gan, D.L. Kramer, J. Jäne y C.W. Porter. 2000. Effects of conditional overexpression of Spermidine/spermine N¹-acetyltransferase of polyamine pool dynamics, cell growth, and sensitivity to polyamine analogs. *J. Biol. Chem.* 275:38319-38328.
- Waché Y., F. Gatesoupe, J. Zambonino, V. Gayet L. Quentelc. 2006. Cross effects of the strain of dietary *Saccharomyces cerevisiae* and rearing conditions on the onset of intestinal microbiota and digestive enzymes in rainbow trout, *Onchorhynchus mykiss*, fry. *Aquaculture.* 258(1-4):470-478.
- Wallace H.M., A.V. Fraser y A. Huges. 2003. A perspective a polyamine metabolism. *Biochem. J.* 376:1-14.
- Watanabe, T. y N. Sawada. 1985. Larval development of digestive organs and intestinal absorptive functions in the freshwater goby *Chaenogobius annularis*. *Bull. Tohoku Reg. Fish. Res. Lab.* 37:1-10.
- Zambonino-Infante, J.L. y C.L. Cahu. 1994b. Influence of diet on pepsin and some pancreatic enzymes in seabass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Comp. Biochem. Physiol.* 109A(2):209-212.
- Zambonino-Infante, J.L. y C.L. Cahu. 1999. High dietary lipid levels enhance digestive tract maturation and improve *Dicentrarchus labrax* larval development. *J. Nutr.* 129: 1195-1200.
- Zambonino-Infante, J.L. y C.L. Cahu. 2001. Ontogeny of the gastrointestinal tract of marine fish larvae. *Comp. Biochem. Physiol.* 130C:477-487.
- Zambonino-Infante, J.L., C.L. Cahu, A. Péres, P. Quatzuguel y M.M. Le gall. 1996. Sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae fed different *Artemia* ratios: growth, pancreas enzymatic response and development of digestive functions. *Aquaculture.* 139:129-138.