



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS



CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y
FISIOLÓGICA DE EMBRIONES Y LARVAS
VITELINAS DEL HUACHINANGO DEL PACÍFICO
Lutjanus peru: IMPLICACIONES EN LA CALIDAD
DE LOS DESOVES

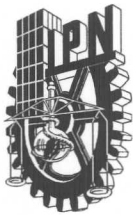
TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS
EN
MANEJO DE RECURSOS MARINOS

PRESENTA

IVETTE MOGUEL HERNÁNDEZ

LA PAZ, B.C.S., JUNIO DE 2010



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARIA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., siendo las 12:00 horas del día 24 del mes de Mayo del 2010 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CICIMAR para examinar la tesis titulada:

**“CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y FISIOLÓGICA DE EMBRIONES Y LARVAS VITELINAS
DEL HUACHINANGO DEL PACÍFICO *Lutjanus peru*: IMPLICACIONES EN LA CALIDAD
DE LOS DESOVES”**

Presentada por el alumno:

MOGUEL

Apellido paterno

HERNÁNDEZ

materno

IVETTE

nombre(s)

Con registro:

A	0	8	0	0	6	8
---	---	---	---	---	---	---

Aspirante de:

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS

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

LA COMISION REVISORA

Director(a) de Tesis

DR. RENATO PEÑA MARTÍNEZ

DRA. SILVIE DUMAS

DR. JESÚS IVÁN MURILLO ÁLVAREZ

MC. MAURICIO CONTRERAS OLGUÍN

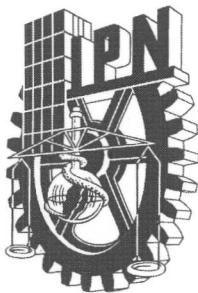
DR. HÉCTOR GERARDO NOLASCO SORIA

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

DR. RAFAEL CERVANTES DUARTE



IPN
CICIMAR
DIRECCION



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., el día 25 del mes Mayo del año 2010, el (la) que suscribe B.M. IVETTE MOGUEL HERNÁNDEZ alumno(a) del Programa de MAESTRÍA EN CIENCIAS EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS con número de registro A080068 adscrito al CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de tesis, bajo la dirección de: DR. RENATO PEÑA MARTÍNEZ y cede los derechos del trabajo titulado:

"CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y FISIOLÓGICA DE EMBRIONES Y LARVAS VITELINAS

DEL HUACHINANGO DEL PACÍFICO *Lutjanus peru*: IMPLICACIONES EN LA CALIDAD DE LOS DESOVES"

al Instituto Politécnico Nacional, para su difusión con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección: relir12@ipn.mx repenam@ipn.mx

Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

B.M. IVETTE MOGUEL HERNÁNDEZ

nombre y firma

RECONOCIMIENTO

El presente trabajo de investigación se desarrollo con financiamiento del proyecto Institucional SIP-IPN: “Caracterización bioquímica del metabolismo energético en embriones y larvas del huachinango del Pacífico *Lutjanus peru* y su relación con la calidad de los desoves” con número de registro: 20080815 y 20090462, y del proyecto SEP-CONACYT: “Caracterización bioquímica y fisiológica del metabolismo energético en embriones y larvas de peces marinos: implicaciones en la calidad de los desoves” con número de registro: 60803.

CONTENIDO

RESUMEN	4
ABSTRACT	5
LISTA DE FIGURAS	6
LISTA DE TABLAS	7
ABREVIATURAS	9
GLOSARIO	10
I. INTRODUCCIÓN	12
I.1. Consumo de reservas energéticas y capacidad digestiva durante el desarrollo embrionario y la fase de larva vitelina	12
I.2. Criterios utilizados para definir la calidad de los desoves	15
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	18
III. ANTECEDENTES	19
IV. JUSTIFICACIÓN	25
V. HIPÓTESIS	26
VI. OBJETIVOS	27
VII. METODOLOGÍA	28
VII.1. Captura y transporte de reproductores	28
VII.2. Manejo de los reproductores e inducción al desove	28
VII.3. Tratamiento del desove	29
VII.4. Tiempos de muestreo y toma de muestra	30
VII.5. Determinaciones morfométricas	32

VII.6. Porcentaje de fertilización, eclosión y supervivencia	33
VII.7. Análisis bioquímicos	34
<i>VII.7.1. Obtención del extracto</i>	34
<i>VII.7.2. Evaluación de la concentración de proteínas</i>	34
<i>VII.7.3. Evaluación de la concentración de metabolitos energéticos</i>	35
<i>VII.7.4. Evaluación de la actividad enzimática metabólica y digestiva</i>	36
VII.8. Análisis estadísticos	39
VIII. RESULTADOS	40
VIII.1. Características generales de los desoves	40
VIII.2. Niveles de actividad enzimática metabólica y concentración de metabolitos	44
VIII.3. Niveles de actividad enzimática digestiva	47
VIII.4. Comparación entre grupos de desoves	49
VIII.5. Parámetros bioquímicos y criterios de calidad de los desoves	51
IX. DISCUSIÓN	57
IX.1. Características generales de los desoves	57
IX.2. Caracterización bioquímica	58
IX.3. Implicaciones de las características morfológicas y bioquímicas en la calidad de los desoves	63
X. CONCLUSIONES	72
XI. RECOMENDACIONES	73
XII. REFERENCIAS	74
XIII. ANEXOS	84

RESUMEN

Se realizó una caracterización bioquímica y fisiológica de los embriones y larvas vitelinas del huachinango del Pacífico *Lutjanus peru* con el objetivo de evaluar sus implicaciones en la calidad de los desoves. Se obtuvieron, mediante inducción hormonal, cinco desoves que fueron sembrados en tanques cónicos. Se obtuvieron valores morfométricos de los huevos y larvas vitelinas, así como porcentajes de fertilización, anormalidad en los blastómeros, eclosión y supervivencia hasta el momento de la primera alimentación en cada uno de los desoves. Se determinó la concentración de proteínas, así como de metabolitos energéticos (glucosa, fructuosa y glucosa-6-fosfato). Se evaluó la actividad de enzimas metabólicas (fosfatasa ácida, fosfatasa alcalina, lactato deshidrogenasa, transaldolasa y glucosa-6-fosfatasa) y digestivas (amilasa, lipasa, tripsina, quimotripsina y catepsina) durante diferentes etapas del desarrollo embrionario y la fase de larva vitelina (huevos fecundados, divisiones mitóticas, blástula, gástrula, eclosión, 24 y 48 horas después de la eclosión). Todos los metabolitos energéticos y las enzimas metabólicas y digestivas presentaron actividad en todos los estadios de desarrollo, con excepción de la quimotripsina y el metabolito glucosa-6-fosfato. La concentración de proteínas y metabolitos energéticos y la actividad de las enzimas metabólicas y digestivas registraron un patrón similar durante el desarrollo embrionario y la fase de larva vitelina en los desoves analizados. No se observaron diferencias significativas entre los grupos de desoves con elevados porcentajes de eclosión y supervivencia, y los principales criterios de calidad y los parámetros bioquímicos. Se proponen modelos de regresión múltiple para explicar las variaciones en los porcentajes de eclosión, anormalidad en los blastómeros y supervivencia.

ABSTRACT

A biochemical and physiological characterization of embryos and yolk sac larvae of the Pacific red snapper *Lutjanus peru* were made with the aim to assess their implications in egg quality. Fertilized eggs of five spawns were obtained by hormonal induction and were maintained in conical tanks. Morphometric measures of eggs and yolk sac larvae and rates of fertilization, abnormal cleavage, post-hatching and survival were taken for each spawning. The concentrations of protein and energy metabolites (glucose, fructose and glucose-6-phosphate) were determined. The activity of metabolic (acid phosphatase, alkaline phosphatase, lactate dehydrogenase, transaldolase and glucose-6-phosphatase) and digestive (amylase, lipase, trypsin, chymotrypsin and cathepsin) enzymes were evaluated during different stages of development (eggs, early cleavage, blastula, gastrula, post-hatching, 24 and 48 hours after hatching). All the energy metabolites and the metabolic and digestive enzymes showed activity in all stages of development, with the exception of chymotrypsin and the metabolite glucose-6-phosphate. The concentration of protein and energy metabolites and the activity of metabolic and digestive enzymes had a similar pattern during the embryonic development and yolk sac larvae in all the analyzed spawning. There were no significant differences between the spawning groups with high percentages of hatching and survival, and the main criteria of quality and biochemical parameters. Multiple regression models to explain variations in the rates of hatching, abnormal cleavage and survival were proposed.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Huevos en divisiones mitóticas tempranas de *Melanogrammus aeglefinus*.
a) huevo con 8 células simétricas, b) huevo con 16 células simétricas, c)
huevo con 8 células asimétricas y d) huevo con 16 células asimétricas.....21
- Figura 2.** Concentración promedio (n = 3) de proteínas y metabolitos energéticos y actividad enzimática metabólica durante el desarrollo embrionario y la fase de larva vitelina del huachinango del Pacífico *Lutjanus peru*.....46
- Figura 3.** Actividad promedio (n = 3) de las enzimas digestivas durante el desarrollo embrionario y la fase de larva vitelina del huachinango del Pacífico *Lutjanus peru*.....48

LISTA DE TABLAS

Tabla I. Etapas de desarrollo del huachinango del Pacífico <i>Lutjanus peru</i> en las que se tomaron muestras para análisis bioquímicos.....	31
Tabla II. Características de los huevos previo a la fertilización en los cinco desoves del huachinango del Pacífico <i>Lutjanus peru</i>	41
Tabla III. Características generales de las hembras y los desoves de huachinango del Pacífico <i>Lutjanus peru</i>	42
Tabla IV. Relación entre las características generales de los desoves del huachinango del Pacífico <i>Lutjanus peru</i>	43
Tabla V. Concentración de proteínas ($\mu\text{g g muestra}^{-1}$) y metabolitos energéticos ($\mu\text{g g muestra}^{-1}$), y niveles de actividad enzimática metabólica (unidades mg proteína^{-1}) durante el desarrollo embrionario y la fase de larva vitelina de <i>Lutjanus peru</i>	45
Tabla VI. Niveles de actividad enzimática digestiva (unidades mg proteína^{-1}) durante el desarrollo embrionario y la fase de larva vitelina del huachinango del Pacífico <i>Lutjanus peru</i>	47
Tabla VII. Niveles de actividad enzimática metabólica (unidades mg proteína^{-1}) y concentración de proteínas ($\mu\text{g g muestra}^{-1}$) y metabolitos energéticos ($\mu\text{g g muestra}^{-1}$) entre los grupos A (desoves 1, 2 y 3), B (desoves 4 y 5) y C (huevos no viables) del huachinango del Pacífico <i>Lutjanus peru</i>	50
Tabla VIII. Niveles de actividad enzimática digestiva (unidades mg proteína^{-1}) entre los grupos A (desoves 1, 2 y 3), B (desoves 4 y 5) y C (huevos no viables) del huachinango del Pacífico <i>Lutjanus peru</i>	51

Tabla IX. Coeficientes de correlación de Pearson entre la actividad enzimática metabólica, la concentración de proteínas y metabolitos energéticos con los criterios de calidad durante las etapas I y IV del desarrollo del huachinango del Pacífico <i>Lutjanus peru</i>	53
---	----

Tabla X. Coeficientes de correlación de Pearson entre la actividad enzimática digestiva y los criterios de calidad durante las etapas I y IV del desarrollo del huachinango del Pacífico <i>Lutjanus peru</i>	54
--	----

Tabla XI. Modelos de regresión lineal simple entre los principales criterios de calidad y los parámetros bioquímicos durante la ontogenia inicial del huachinango del Pacífico <i>Lutjanus peru</i>	54
--	----

Tabla XII. Modelos de regresión múltiple entre los principales criterios de calidad y los parámetros bioquímicos durante las etapas I y IV del desarrollo del huachinango del Pacífico <i>Lutjanus peru</i>	56
--	----

ABREVIATURAS

%F	Porcentaje de fertilización	desv est	Desviación estándar
%E	Porcentaje de eclosión	UV	Ultravioleta
%S	Porcentaje de supervivencia	ups	Unidades prácticas de salinidad
%A	Porcentaje de anormalidades en los blastómeros	rpm	Revoluciones por minuto
DH	Diámetro del huevo	ppm	Partes por mil
AH	Área del huevo	°C	Grados centígrados
VH	Volumen del huevo	min	Minutos
DGA	Diámetro del glóbulo de aceite	h	Horas
AGA	Área del glóbulo de aceite	m	Metros
VGA	Volumen del glóbulo de aceite	cm	Centímetros
LT	Longitud total	mm	Milímetros
HV	Altura del vitelo	µm	Micrómetros
LV	Longitud del vitelo	nm	Nanómetros
HF	Huevos fertilizados	g	Gramos
DM	Divisiones mitóticas tempranas	kg	Kilogramos
B	Blástula	mg	Miligramos
G	Gástrula	µg	Microgramos
E	Eclosión	L	Litros
DE	Después de la eclosión	mL	Mililitros
DDE	Días después de la eclosión	µL	Microlitros
Peso ♀	Peso de las hembras	M	Moles
No. H	Número de huevos	mM	Milimoles
FR	Fecundidad relativa	µM	Micromoles

GLOSARIO

Blastómero: Cada una de las células producidas durante la segmentación del embrión (Balinsky, 1983).

Blastoporo: Abertura del tubo digestivo embrionario formada en la gastrulación (Kardong, 1999).

Blástula: Estadio temprano de un embrión que habitualmente está formado por una esfera hueca de células, antes de que empiece la gastrulación (Alberts *et al.*, 1996).

Calidad del huevo: Potencial del huevo para producir crías (larvas) viables (Kjorsvik *et al.*, 2003).

Eclosión.- Proceso en el cual se rompe el corion o envoltura del huevo y emerge la larva vitelina (Balon, 1984).

Embrión: Fase inicial del desarrollo de un organismo, mientras éste se encuentra contenido dentro de las membranas del huevo o dentro del cuerpo materno (Balinsky, 1983).

Enzima: Proteína que cataliza una reacción química específica (Alberts *et al.*, 1996).

Gástrula: Estadio temprano del desarrollo embrionario en el que los blastómeros, por medio de movimientos morfogenéticos, forman las tres capas embrionarias (ectodermo, mesodermo y endodermo) (Balinsky, 1983).

Glóbulo de aceite: Lisosomas modificados que adquieren forma esférica y que se forman al fusionarse las vesículas de vitelo, muchas especies presenta uno o más glóbulos en, o cerca de, la masa vitelina. Sirve inicialmente como una estructura de flotación o equilibrio y que al consumirse es utilizado como fuente de energía (Kamler, 2008).

Glucógeno: Polisacárido compuesto exclusivamente por unidades de glucosa, utilizado para almacenar energía en las células animales (Alberts *et al.*, 1996). Carbohidrato complejo (polisacárido) que mediante hidrólisis se convierte en glucosa (Curtis & Barnes, 2001).

Glucólisis: Proceso catalizado por enzimas, mediante el cual una molécula de glucosa se convierte anaeróbicamente en dos moléculas de ácido pirúvico (Lehninger *et al.*, 1995; Curtis & Barnes, 2001).

Gluconeogénesis: Biosíntesis de un glúcido a partir de precursores más sencillos no glucídicos tales como oxalacetato o piruvato (Lehninger *et al.*, 1995). Ruta por la que se sintetiza glucosa a partir de sustratos no glucídicos (Enes *et al.*, 2008).

Metabolismo: Suma total de los procesos químicos catalizados por enzimas, que tienen lugar en las células vivas (Lehninger *et al.*, 1995; Alberts *et al.*, 1996).

Metabolito: Intermedio químico en las reacciones del metabolismo catalizadas por enzimas (Lehninger *et al.*, 1995).

Ontogenia: Comprende la serie de cambios morfofisiológicos que ocurren durante el ciclo de vida de los animales, incluyendo a los peces (Balon, 1984).

Organogénesis: Fase del desarrollo embrionario donde se lleva a cabo la formación de los órganos (Balinsky, 1983).

Proteína: Principal constituyente macromolecular de las células. Polímero lineal de aminoácidos unidos entre sí mediante enlaces peptídicos, siguiendo una secuencia determinada (Alberts *et al.*, 1996).

Ruta de las pentosas fosfato: Ruta metabólica estrechamente relacionada con la glucólisis durante la cual se utiliza la glucosa para generar ribosa, que es necesaria para la biosíntesis de nucleótidos y ácidos nucleicos (Lehninger, 1995). Ruta que sirve para interconvertir hexosas y pentosas y que es fuente de equivalentes de reducción y pentosas para procesos biosintéticos (Lehninger *et al.*, 1995).

Sustrato: Compuesto específico sobre el cual actúa una enzima (Curtis & Barnes, 2001).

Vitelo: Sustancia nutritiva del embrión al iniciarse el desarrollo, que se encuentra acumulado en la célula sexual femenina; sus componentes principales son: proteínas, fosfolípidos y en menor grado grasas neutras y carbohidratos (fosfoglicolipoproteína) (Balinsky, 1983).

I. INTRODUCCIÓN

La ontogenia inicial de los peces se caracteriza por presentar procesos termodependientes, drásticos y súbitos, los cuales ocurren en un pequeño intervalo de tiempo, donde se presentan altas tasas de mortalidad (Brooks *et al.*, 1997).

Existen tres periodos principales donde se presenta una elevada tasa de mortalidad. El primero y el segundo ocurren durante la embriogénesis (después de la fertilización y durante la eclosión) y el tercero se encuentra relacionado con la transición de la alimentación endógena a exógena (Kamler, 2005).

La capacidad de los embriones para sobrevivir a estas etapas críticas está dada, en gran medida, por la cantidad, calidad y utilización de reservas energéticas y nutricionales que contengan en el vitelo y el glóbulo de aceite, las cuales son diferentes en cada especie y varían en función de la edad, el peso y la dieta de los reproductores (Heming & Buddington, 1988; Bromage & Roberts, 1995).

A pesar de las diferencias cualitativas y cuantitativas de las reservas nutricionales y energéticas, puede observarse un patrón similar de consumo y utilización de éstas reservas, lo cual sugiere que se trata de un proceso genéticamente programado (Faulk & Holt, 2008; Kamler, 2008).

I.1. Consumo de reservas energéticas y capacidad digestiva durante el desarrollo embrionario y la etapa de larva vitelina

Varios autores han señalado dos escenarios para explicar las limitantes en el desarrollo y supervivencia durante la ontogenia inicial de los peces; ambos escenarios se encuentran íntimamente relacionados y están involucrados en el desarrollo de los embriones y larvas de peces (Savoie *et al.*, 2008). El primero ocurre a nivel de la capacidad de producción de energía y material estructural, mediante la transformación y asimilación de las reservas endógenas durante los primeros días de desarrollo. El segundo se refiere a la capacidad digestiva en el momento de la primera alimentación (Boulekbache, 1981; Lemieux *et al.*, 2003; Savoie *et al.*, 2008).

Las reservas energéticas y nutricionales que necesita el embrión durante su desarrollo son sintetizadas durante la ovogénesis de manera endógena y exógena, y

son acumuladas en el vitelo y en el glóbulo de aceite de los oocitos (Sarasquete *et al.*, 1993). Las fosfoglucolipoproteínas (vitelogenina) son sintetizadas por los hepatocitos y transportadas por el torrente sanguíneo e incorporadas en los oocitos mediante endocitosis, finalmente son hidrolizadas en proteínas vitelinas: lipovitelinas, glucovitelinas y fosfovitas (Heming & Buddington, 1988; Carnevali *et al.*, 2001a; Kamler, 2008). El proceso final de maduración del oocito está caracterizado morfológicamente por la coalición de las vesículas de vitelo y fisiológicamente por la hidratación del oocito (Lahnsteiner, 2006). Además de proporcionar insumos energéticos, el vitelo también cuenta con hormonas y enzimas (Brooks *et al.*, 1997). Por otro lado, el glóbulo de aceite (cuando está presente) se compone, en su mayoría, de triacilglicéridos que son una fuente de energía para las larvas, principalmente durante el proceso de la primera alimentación exógena (Kamler, 2008).

La secuencia en el consumo de reservas nutricionales y energéticas durante la ontogenia inicial de peces comienza con pequeñas moléculas de carbohidratos, seguidas de aminoácidos libres (los cuales forman aproximadamente el 50% del total de aminoácidos en huevos de peces marinos pelágicos) y proteínas. Los lípidos son usados progresivamente en la producción de energía para el nado (Ronnestad & Fyhn, 1993; Sarasquete *et al.*, 1993; Fyhn & Govoni, 1995; Kamler, 2008).

En los huevos de peces, el metabolismo de los carbohidratos es esencial para el desarrollo embrionario (Boulekbache, 1981). La glucosa, además de ser utilizada como fuente de energía, es transformada en otros monosacáridos que son necesarios para la síntesis de ácidos nucleicos y polisacáridos. Por su parte, la fructuosa es precursor en la formación de oligosacáridos los cuales juegan un papel importante durante la organogénesis (Lahnsteiner, 2006). En la síntesis y almacenamiento de estos metabolitos intervienen tres vías metabólicas, la glucolisis, la gluconeogénesis y la vía de las pentosas, los cuales se encuentran catalizados por muchas enzimas, entre las cuales se encuentran: fosfofructoquinasa (EC 2.7.1.56) y piruvatoquinasa (EC 2.7.1.40) en el primero; glucosa-6-fosfatasa (EC 3.1.3.9) (catalizando la reacción de glucosa-6-fosfato a glucosa) y lactato deshidrogenasa (EC 1.1.1.27) (reducción del piruvato en la vía anaeróbica) en el segundo;

transaldolasa (EC 2.2.1.2) (vía no oxidativa de la síntesis de pentosas para la formación de ácidos nucleicos) y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (EC 1.1.1.49) (vía oxidativa) para el último (Lehninger *et al.*, 1995; Lahnsteiner, 2006).

Las proteínas almacenadas en el vitelo son degradadas en aminoácidos libres por las enzimas proteolíticas catepsinas. La procatepsina L está localizada en el sincitio vitelino y es transferida al vitelo donde es activada por la catepsina D localizada en los glóbulos de vitelo. Se han caracterizado otras isoformas de catepsinas (A, B, C); sin embargo, todas tienen la función de hidrolizar las proteínas vitelinas para su utilización como energía y la formación de material estructural de los embriones y larvas (Carnevali *et al.*, 2001a; Kamler, 2008). Entre los aminoácidos esenciales más abundantes en el vitelo están la leucina, lisina, valina e isoleucina; mientras que la alanina y serina son los aminoácidos no esenciales más abundantes (Rønnestad & Fyhn, 1993).

Los lípidos son degradados por enzimas lipasas y se encuentran principalmente en el glóbulo de aceite, el cual está compuesto en su mayoría por lípidos neutros con una alta proporción de ácidos grasos monoinsaturados (MUFA) que son usados preferentemente en el metabolismo energético de la larva. En contraste, los lípidos de las lipoproteínas vitelinas contienen principalmente lípidos polares ricos en ácidos grasos polinsaturados (PUFA), que son utilizados para incorporarlos a los tejidos durante la organogénesis (Lahnsteiner & Patarnello, 2004a; Kamler, 2008).

Aunado a esto, la supervivencia larvaria está dada en gran medida por la capacidad que tengan los organismos para digerir y asimilar los nutrientes al momento de cambiar de una alimentación endógena a una exógena. Esto implica que durante los primeros días de desarrollo existan cambios drásticos en la morfología y fisiología digestiva de las larvas, dando como resultado la síntesis y secreción de enzimas digestivas que les permita hidrolizar los nutrientes presentes en el alimento (Peña, 2000; Lemieux *et al.*, 2003).

Dependiendo del sustrato sobre el que actúan, las enzimas digestivas se dividen en proteasas, lipasas y carbohidrasas. Las proteasas son enzimas capaces de reconocer e hidrolizar esqueletos de péptidos en regiones específicas de una

cadena polipeptídica (Muhlia-Almazán *et al.*, 2008). La principal enzima proteolítica es la pepsina, la cual aparece cuando el sistema digestivo de las larvas se encuentra completamente desarrollado (Peña, 2000; Álvarez-González, 2003). Otras enzimas importantes son la quimotripsina que hidroliza los enlaces peptídicos que contienen grupos carboxilo de los aminoácidos aromáticos; y la tripsina, que cataliza la hidrólisis de aquellos enlaces peptídicos en que el grupo carbonilo es aportado por el residuo de lisina o de arginina, con independencia de la longitud o la secuencia aminoácida de la cadena (Muhlia-Almazán *et al.*, 2008). Por otro lado, las lipasas son enzimas específicas que poseen la función de disociar los enlaces covalentes entre lípidos complejos llevándolos al estado de glicerol y ácidos grasos asimilables por el organismo (Lehninger, 1995). La hidrólisis progresiva de los triglicéridos se produce por una misma lipasa, con baja afinidad por el sustrato, y no por una sucesión de diferentes enzimas como es el caso de la proteólisis (Gurr & Harwood, 1991). Por último, las carbohidrasas (la amilasa es la más conocida) tienen una acción hidrolítica sobre los polisacáridos, transformándolos en cadenas de disacáridos y monosacáridos (Blanco-Cachafeiro, 1995).

Bajo este marco, el resultado de la utilización eficiente de las reservas nutricionales por parte de las larvas, así como la presencia de enzimas digestivas al momento de la primera alimentación se ve reflejado en elevados porcentajes de eclosión y bajas mortalidades larvarias durante la primera alimentación, lo cual ha sido propuesto como características presentes en los desoves considerados de mayor calidad (Lahnsteiner & Patarnello, 2005).

I.2. Criterios utilizados para definir la calidad de los desoves

La calidad de los desoves ha sido definida como la probabilidad de un óptimo desarrollo embrionario y una mayor capacidad alimenticia durante la primera alimentación (Bromage & Roberts, 1995). Es por esto que el porcentaje de eclosión y el porcentaje de supervivencia a la primera alimentación, han sido utilizados como los principales parámetros que caracterizan a los desoves de mayor calidad (Carnevali *et al.*, 2001b; Rideout *et al.*, 2004; Pickova & Brännäs, 2006; Kamler, 2008).

Durante los últimos años se han empleado diferentes criterios que han sido correlacionados con estos porcentajes y que pudieran emplearse como indicadores de la calidad de los desoves. Entre ellos resaltan diversos criterios cuantitativos y cualitativos, por mencionar algunos: la cantidad de huevos presentes en un desove (Papanikos *et al.*, 2003); la apariencia de la zona pelúcida de los huevos (Brooks *et al.*, 1997); el tamaño y forma del huevo (Jónsson & Svavarsson, 2000); el tamaño, forma y coloración del vitelo y del glóbulo de aceite (Brooks *et al.*, 1997; Lahnsteiner & Patarnello, 2005); el porcentaje de fertilización (Bromage & Roberts, 1995); la flotabilidad positiva de los huevos (Carnevali *et al.*, 2001b); la presencia o ausencia de alveolos corticales después de la fertilización (Rideout *et al.*, 2004); la simetría en los blastómeros durante el estadio de segmentación inicial (Shields *et al.*, 1997; Rideout *et al.*, 2004; Rani, 2005) y la pigmentación ocular (Heming & Buddington, 1988). Así como diferentes medidas morfométricas de las larvas: longitud total, longitud del vitelo, diámetro del glóbulo de aceite, etc. (Heming & Buddington, 1988; Brooks *et al.*, 1997; Kamler, 2008).

Algunos parámetros bioquímicos y fisiológicos, que han sido utilizados con este mismo fin, incluyen la composición y consumo de las reservas energéticas (Lahnsteiner *et al.*, 2001). De esta forma, se han caracterizado la concentración y utilización de aminoácidos libres y proteínas vitelinas (Ronnestad & Fyhn, 1993; Nocillado *et al.*, 2000; Lahnsteiner *et al.*, 2001; Bulut *et al.*, 2004; Lahnsteiner & Patarnello, 2004a, b; Faulk & Holt, 2008) así como de lípidos en el glóbulo de aceite y el vitelo (Nocillado *et al.*, 2000; Lahnsteiner *et al.*, 2001; Bulut *et al.*, 2004; Bulut *et al.*, 2005; Pickova & Brännäs, 2006; Faulk & Holt, 2008).

Adicionalmente, se ha demostrado que ciertos parámetros metabólicos relacionados con la producción y consumo de energía como la actividad de enzimas metabólicas; así como la concentración de metabolitos energéticos, son útiles para distinguir entre huevos viables y no viables durante las primeras etapas del desarrollo embrionario y entre larvas que tienen una mayor probabilidad de desarrollo y capacidad alimenticia en la primera alimentación (Ronnestad *et al.*, 1994; Fyhn & Govoni, 1995; Lahnsteiner *et al.*, 1999; Lahnsteiner *et al.*, 2001; Lahnsteiner & Patarnello, 2003; Lahnsteiner & Patarnello, 2004a, b; Giménez *et al.*, 2006). Así

mismo, se ha caracterizado la actividad de enzimas digestivas para reflejar la capacidad digestiva de las larvas al momento de la primera alimentación (Carnevali *et al.*, 2001a, b; Kolkovski, 2001; Tengjaroenkul *et al.*, 2002; Lemieux *et al.*, 2003; García-Gasca *et al.*, 2006; Sveinsdóttir *et al.*, 2006; Gisbert *et al.*, 2009; Naz, 2009).

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Una de las principales premisas en la acuicultura de peces es la obtención del mayor número de huevos y larvas con buena calidad. Es por esto que en años recientes, el cultivo de larvas de peces marinos ha recibido gran atención, debido a que una producción eficiente de larvas con alta probabilidad de supervivencia al momento de la primera alimentación permite un abasto programado de semilla. Sin embargo, lograr una producción constante de semilla resulta complicado, debido principalmente a que puede presentarse una alta tasa de mortalidad durante los primeros estadios de vida (Fyhn & Govoni, 1995; Kamler, 2005; Alemany *et al.*, 2006). Esto ha sido atribuido, en parte, a la inconsistencia en la calidad de los desoves, provocando que el cultivo de larvas sea considerado como una etapa crítica en la producción ó la investigación.

Bajo este marco, se ha dirigido la investigación hacia la obtención de parámetros confiables que permitan determinar la calidad de los desoves de manera temprana y rápida, siendo los criterios morfológicos los más empleados para éste propósito. Sin embargo, a pesar de que los criterios morfológicos han sido considerados como buenos indicadores de la calidad de los desoves, no proporcionan elementos acerca de los factores que la determinan. Es por esto que se han correlacionado los criterios morfológicos con algunos factores bioquímicos y fisiológicos para poder explicar las variaciones en la calidad de los desoves (Faulk & Holt, 2008).

De esta forma, si se pretende evaluar la calidad de los desoves, debe hacerse primero una caracterización de parámetros que permitan establecer el potencial de desarrollo y éxito alimenticio durante la primera alimentación. En éste trabajo se plantea hacer una caracterización de los desoves del huachinango del Pacífico *Lutjanus peru* tomando como referencia los elementos morfológicos, bioquímicos y fisiológicos que han sido correlacionados con elevados porcentajes de eclosión y supervivencia hasta el momento de la primera alimentación en desoves de peces marinos.

III. ANTECEDENTES

La calidad de los desoves y los criterios para establecerla es un área de investigación muy importante para la acuicultura. La evaluación de la calidad de los desoves de peces se ha caracterizado por la utilización de diferentes criterios, lo cual ha dificultado que se desarrolle un esquema integral de evaluación de calidad que sea aplicable a diferentes especies y condiciones de cultivo. A pesar de que se ha reportado una amplia gama de criterios, todos ellos comparten el hecho de intentar explicar el porcentaje de eclosión y supervivencia a la primera alimentación. De esta forma, se han empleado criterios morfológicos, merísticos, bioquímicos, fisiológicos e incluso conductuales (Brooks *et al.*, 1997; Carnevali *et al.*, 2001b; Lahnsteiner *et al.*, 2001; Bulut *et al.*, 2004; Rideout *et al.*, 2004; Rani, 2005; Giménez *et al.*, 2006; Penney *et al.*, 2006; Pickova & Brännäs, 2006; Faulk & Holt, 2008).

Los criterios morfológicos, como cambios en la proporción de huevos que flotan, el tamaño del huevo, la cantidad de reservas energéticas, la presencia de anomalías de los blastómeros en las primeras divisiones mitóticas, han sido utilizados como indicadores de la calidad del huevo (Faulk & Holt, 2008). Por ejemplo, en *Gadus morhua* y *Oncorhynchus mykiss* existe una correlación positiva entre el tamaño de los huevos y el de las larvas al momento de la eclosión, favoreciendo la supervivencia al momento de la primera alimentación; esto debido a que larvas más grandes tienen una mayor resistencia a la inanición (Kamler, 2008). En contraste, en *Salvelinus fontinalis* no se encontró una correlación positiva entre el tamaño del huevo y la supervivencia durante el desarrollo embrionario hasta la eclosión; sin embargo, se correlacionó positivamente con la supervivencia larvaria durante los primeros 50 días de alimentación exógena (Jónsson & Svavarsson, 2000).

En *Sparus aurata* y *Diplodus puntazzo* se reportó una relación cuadrática entre el porcentaje de supervivencia con el diámetro máximo y mínimo de la gota de aceite (Lahnsteiner & Patarnello, 2005). Esto es debido a que existe interacción entre las partes hidrofóbicas e hidrofílicas de los lípidos por lo que la naturaleza y calidad de estas moléculas afectan la forma del glóbulo de aceite.

La simetría de los blastómeros en las primeras divisiones mitóticas (Figura 1) ha sido reportada como indicador general de la calidad de los huevos de peces marinos. Este criterio morfológico ha sido el más recurrido por la correlación positiva que presenta con los porcentajes de eclosión y la viabilidad de las larvas vitelinas, en especies como *Hippoglossus hippoglossus* (Shields *et al.*, 1997), *Scophthalmus maximus* (Kjorsvik *et al.*, 2003), *Melanogrammus aeglefinus* (Rideout *et al.*, 2004), *Sparus aurata*, *Diplodus puntazzo* (Lahnsteiner & Patarnello, 2005), *Gadus morhua* (Rani, 2005). Específicamente, durante las primeras divisiones mitóticas se han reportado diferentes tipos de anormalidades como: disposición asimétrica de los blastómeros, diferencia en el tamaño de los blastómeros, poca adhesión entre los blastómeros y poca definición en el margen entre los blastómeros; de las cuales, la poca adhesión entre los blastómeros es la anormalidad que presenta menores porcentajes de eclosión y menor viabilidad de los embriones. Sin embargo, como las cuatro anormalidades tienden a coocurrir en un mismo desove, el porcentaje de anormalidad en los blastómeros durante las divisiones tempranas es un buen indicador del porcentaje de eclosión y la viabilidad de las larvas (Rideout *et al.*, 2004). A pesar de que éste criterio es un buen indicador de calidad de los desoves presenta una desventaja, ya que si se toman las muestras en tanques donde los reproductores tienen desoves espontáneos los huevos recolectados estarán en diferentes estadios de desarrollo, lo cual restringe la aplicación de este método (Lahnsteiner & Patarnello, 2005).

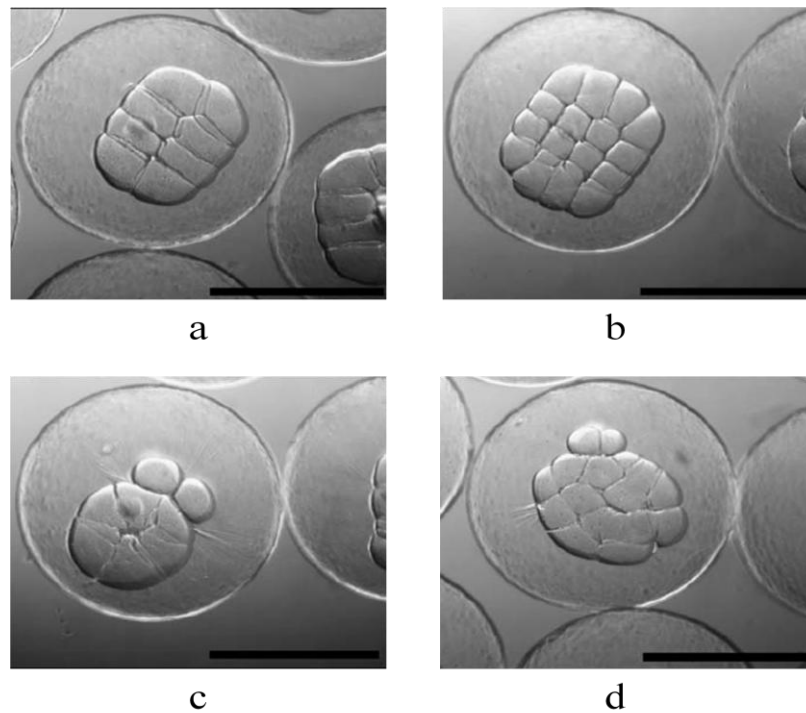


Figura 1. Huevos en divisiones mitóticas tempranas de *Melanogrammus aeglefinus*. a) huevo con 8 células simétricas, b) huevo con 16 células simétricas, c) huevo con 8 células asimétricas y d) huevo con 16 células asimétricas. Barra = 1 mm. Tomado de Rideout *et al.* (2004).

Los parámetros morfológicos que se usan para predecir la calidad de los desoves no explican las razones subyacentes del bajo porcentaje de eclosión. Es por esto que estos criterios se han correlacionado con parámetros bioquímicos (Rideout *et al.*, 2004). La concentración de aminoácidos y proteínas (Ronnestad & Fyhn, 1993; Sarasquete *et al.*, 1993; Fyhn & Govoni, 1995; Faulk & Holt, 2008); así como de lípidos (Ronnestad *et al.*, 1994 y 1998; Mazorra *et al.*, 2003) han sido considerados como indicadores en la calidad de los desoves. Bulut *et al.*, (2005) observaron en *Pagellus erythrinus* una correlación positiva entre la cantidad de lípidos y proteínas en los embriones y los porcentajes de supervivencia larvaria. Lahnsteiner & Patarnello (2003) mencionan que los niveles de aminoácidos libres en huevos no

viabiles son significativamente menores que en huevos viables, lo cual afecta su flotabilidad, así como la síntesis de proteínas y el estado energético de los embriones. Esto es importante, debido a que se ha reportado en especies como *Scophthalmus maximus* y *Microstomus kitt* que el 20 y 30%, respectivamente, de los aminoácidos libres son utilizados en la síntesis proteica y que el 80 y 70%, respectivamente, se emplean en el metabolismo energético de los embriones y larvas vitelinas, siendo un proceso clave en la supervivencia de los organismos (Ronnestad & Fyhn, 1993). En el caso de los lípidos, se ha observado que los ácidos grasos polinsaturados (HUFA) de las series n-3 y n-6 son la clave de la supervivencia y del crecimiento de las larvas en la primera alimentación (Ronnestad & Fyhn, 1993). Mediante estudios bioquímicos se ha encontrado una relación estrecha entre la composición de las reservas alimenticias en los huevos y larvas vitelinas de los teleósteos y la dieta de los reproductores (Sarasquete *et al.*, 1993; Carnevali *et al.*, 1998; Morehead *et al.*, 2001; Kamler, 2005; Faulk & Holt, 2008; Kamler, 2008; Sawanboonchun *et al.*, 2008; Sink & Lochmann, 2008).

Por otro lado, estudios recientes han propuesto que la concentración de metabolitos energéticos y la actividad de enzimas involucradas en el metabolismo de carbohidratos son buenos indicadores del porcentaje de eclosión y de la viabilidad larvaria (Lahnsteiner *et al.*, 1999; Lahnsteiner & Patarnello, 2003; Lahnsteiner & Patarnello, 2004a, b; Giménez *et al.*, 2006).

Las enzimas y concentración de metabolitos como: glucosa-6-fosfatasa, transaldolasa, lactato deshidrogenasa, fosfatasa ácida, fosfatasa alcalina, glucosa, fructuosa, ribosa y glucosa-6-fosfato, tienen correlación con los porcentajes de eclosión y la supervivencia larvaria en especies como *Salmo trutta lacustris* (Lahnsteiner *et al.*, 1999), *Sparus aurata* (Lahnsteiner & Patarnello, 2004a, b), *Puntazzo puntazo* (Lahnsteiner & Patarnello, 2004b) y *Dentex dentex* (Giménez *et al.*, 2006). Sin embargo, se ha observado que la actividad de estas enzimas y la concentración de los metabolitos difieren entre las especies.

Por ejemplo, en *Sparus aurata* se encontró que a pesar de que la glucosa no se correlacionaba directamente con la viabilidad de los huevos, contribuía a incrementar el efecto explicativo en los modelos de regresión múltiple propuestos

para ésta especie. Además, niveles bajos de monosacáridos y glucosa-6-fosfato y una reducida actividad de transaldolasa y glucosa-6-fosfatasa son indicativos de huevos de mala calidad (Lahnsteiner & Patarnello, 2004a). En *Dentex dentex*, la concentración de la glucosa y la ribosa explican las variaciones en los porcentajes de eclosión; la fosfatasa alcalina, la glucosa-6-fosfato y la glucosa están relacionadas con la mortalidad larvaria (Giménez *et al.*, 2006).

La actividad de las enzimas digestivas durante los primeros días de desarrollo ha sido reportada en especies como *Solea senegalensis* (Martínez *et al.*, 1999); *Pleuronectes americanus* (Douglas *et al.*, 2000); *Oreochromis niloticus* (Tengjaroenkul *et al.*, 2002); *Hippoglossus hippoglossus* (Gawlicka *et al.*, 2000; Murray *et al.*, 2006); *Paralichthys californicus* (Gisbert *et al.*, 2004; Zacarias-Soto *et al.*, 2006); *Salminus brasiliensis* (Vega-Orellana *et al.*, 2006); *Melanogrammus aeglefinus* y *Gadus morhua* (Perez-Casanova *et al.*, 2006); *Sphoeroides annulatus* (García-Gasca *et al.*, 2006); *Paralichthys olivaceus* (Bolasina *et al.*, 2006).

Si bien los niveles, tanto de actividad específica como de actividad total, de las diferentes proteasas, carbohidrasas y lipasas varían de manera interespecífica, la presencia de estas enzimas al momento de la primera alimentación ha servido como un indicador de la capacidad digestiva de las larvas al momento de iniciar la alimentación exógena (Douglas *et al.*, 2000; Lemieux *et al.*, 2003; Murray *et al.*, 2006; Shan *et al.*, 2008). Se ha observado que la actividad de las enzimas digestivas en el momento de la eclosión es muy baja, no obstante, los niveles de actividad se incrementan progresivamente con la edad (Peña, 2005).

Se han registrado las actividades enzimáticas digestivas de amilasa, lipasas, tripsina y quimotripsina en embriones y larvas de especies como *Acipenser fulvescens* (Buddington, 1985), *Theragra chalcogramma* (Oozeki & Baley, 1995), *Gadus morhua* (Sveinsdóttir *et al.*, 2006), *Miichthys miiuy* (Shan *et al.*, 2008), y se han registrado variaciones en la actividad enzimática digestiva cuando las larvas cambian de una alimentación endógena a una alimentación exógena, sugiriendo que la actividad de estas enzimas puede estar regulada por el proceso alimenticio (Kolkovski, 2001; Gisbert *et al.*, 2004; Sveinsdóttir *et al.*, 2006; Shan *et al.*, 2008).

Sin embargo, esto no sucede igual para todas las especies, por ejemplo Oozeki & Baley (1995) encontraron que en larvas de *Theragra chalcogramma* las actividades tripsina y lipasa se mantuvieron bajas durante el periodo de transición del alimento endógeno al exógeno, que la actividad amilasa se mantuvo constante, y que al final del periodo larvario estas tres enzimas incrementaron su actividad total. Estos autores sugieren la existencia de dos tipos de lipasa, la primera que muestra un pico de actividad en el día 4 después de la eclosión y se relaciona con la absorción del glóbulo de aceite, y el segundo que se incrementa en el día 14, y se relaciona con la digestión de los lípidos de las presas.

Por otro lado, Buddington (1985), observó en larvas de *Acipenser fulvescens* que durante los primeros 16 días después de la eclosión, el sistema digestivo no estaba diferenciado. Sin embargo, la actividad total de la lipasa y la amilasa fueron altas en el periodo larvario y disminuyeron al desarrollarse completamente el sistema digestivo.

En el caso específico del huachinango del Pacífico *Lutjanus peru*, la mayoría de los estudios abordan aspectos biológico-pesqueros, como edad y crecimiento (Caicedo *et al.*, 2006), alimentación (Saucedo-Lozano, 2000), madurez sexual (Santamaría-Miranda, 1998), distribución y abundancia (Saucedo-Lozano *et al.*, 1998). Sin embargo, en años recientes en la Unidad Piloto de Maricultivos (UPIMA) del CICIMAR-IPN se ha trabajado en el desarrollo de una tecnología de cultivo logrando controlar la reproducción en cautiverio mediante regulación fototérmica e inducción hormonal (Dumas *et al.*, 2004; Pelcastre-Campos, 2006), así como estudios sobre crioconservación de gametos (Pelcastre-Campos, 2006). También se ha evaluado el efecto de la temperatura en el desarrollo embrionario y la eficiencia de la alimentación endógena en las larvas, así como la evaluación del efecto de la intensidad de luz, tipo y densidad de presas en la primera alimentación (Zavala-Leal, 2007). A pesar de éstos avances se han registrado altas tasas de mortalidad durante los primeros días de desarrollo del huachinango del Pacífico.

IV. JUSTIFICACIÓN

Lutjanus peru es considerada como una especie de importancia comercial debido a la calidad de su carne, sabor, precio en el mercado y demanda creciente; por lo que el interés por su cultivo se ha incrementado durante la última década. No obstante, el control en la calidad del desove es un requisito necesario en especies que pretenden ser introducidas con fines de acuicultura y de las cuales las técnicas de reproducción se encuentran aún en desarrollo (Lahnsteiner & Patarnello, 2004b). En el CICIMAR-IPN desde hace 10 años se trabaja en el desarrollo de una tecnología de cultivo del huachinango del Pacífico. Los resultados obtenidos hasta el momento han permitido la generación de protocolos de reproducción e incubación en cautiverio (Dumas *et al.*, 2004; Pelcastre-Campos, 2006; Zavala-Leal, 2007). Sin embargo, una de las principales limitantes en el desarrollo de una estrategia de cultivo del huachinango es la alta variabilidad de la supervivencia durante los primeros estadios embrionarios y durante los primeros días de desarrollo, la cual ha resultado en tasas de mortalidad superiores al 95%. Esto puede atribuirse, entre otros motivos, a la mala calidad de los desoves obtenidos. Por lo anterior es necesario evaluar y caracterizar los desoves del huachinango del Pacífico *Lutjanus peru* utilizando criterios tanto morfológicos, como bioquímicos y fisiológicos que han sido usados de manera exitosa en desoves de otras especies de peces.

Este conocimiento permitirá establecer las bases para implementar una estrategia de evaluación de la calidad de los desoves del huachinango del Pacífico y paralelamente contribuirá al conocimiento requerido para establecer, a largo plazo, una estrategia de cultivo que ayude a aumentar las tasas de supervivencia durante el periodo larvario.

V. HIPÓTESIS

Los principales indicadores utilizados para establecer la calidad de los desoves en peces son el porcentaje de eclosión y el porcentaje de supervivencia al momento de la primera alimentación. Si bien estos criterios han resultado útiles, no proporcionan una explicación de los factores que puedan determinar y en dado caso mejorar dicha calidad. Es por esto que es necesario realizar una caracterización más específica de aquellos elementos que han permitido explicar las diferencias de calidad entre desoves. Lo cual se ha hecho a través de la correlación de parámetros bioquímicos, fisiológicos y morfológicos con el porcentaje de eclosión y supervivencia de las larvas al momento de la primera alimentación. Bajo este marco, en el presente trabajo se planteó la hipótesis de que la evaluación de la concentración de metabolitos energéticos y los niveles de actividad enzimática metabólica involucradas en el metabolismo de los carbohidratos, así como la presencia de anomalías en los blastómeros durante las divisiones mitóticas iniciales, permitirán establecer y explicar las diferencias en la calidad de los desoves del huachinango del Pacífico. Por otra parte, la presencia de actividad enzimática digestiva en el momento de la completa absorción del vitelo evidenciará la capacidad digestiva al inicio de la alimentación exógena de las larvas del huachinango del Pacífico *Lutjanus peru*.

VI. OBJETIVOS

VI. 1. Objetivo general

Caracterizar los aspectos morfológicos, metabólicos y fisiológicos durante el desarrollo embrionario y la fase de larva vitelina del huachinango del Pacífico *Lutjanus peru*, y establecer las implicaciones de dichos parámetros como posibles determinantes de la calidad de los desoves.

VI. 2. Objetivos particulares

Determinar el porcentaje de eclosión y supervivencia hasta el momento de la primera alimentación de las larvas del huachinango del Pacífico.

Estimar el porcentaje de anomalías en los blastómeros durante la etapa de divisiones mitóticas iniciales.

Estimar la concentración de proteínas solubles totales en embriones y larvas vitelinas del huachinango del Pacífico.

Determinar los niveles de actividad de las enzimas metabólicas: transaldolasa, lactato deshidrogenasa, glucosa-6-fosfatasa, fosfatasa ácida y fosfatasa alcalina en embriones y larvas vitelinas del huachinango del Pacífico.

Estimar los niveles de concentración de los metabolitos energéticos: glucosa, glucosa-6-fosfato y fructuosa en embriones y larvas vitelinas del huachinango del Pacífico.

Determinar los niveles de actividad de las enzimas digestivas: lipasa, amilasa, tripsina, quimotripsina y catepsina en embriones y larvas vitelinas del huachinango del Pacífico.

VII. METODOLOGÍA

VII.1. Captura y transporte de reproductores

Las capturas de los reproductores del huachinango del Pacífico se llevaron a cabo en la época natural de reproducción de esta especie, durante los meses de agosto a octubre (Reyna-Trujillo, 1993) en las inmediaciones de la comunidad de La Ribera, municipio de los Cabos, Baja California Sur, México. Las capturas se hicieron utilizando líneas (hilo nylon y anzuelo). Una vez que los organismos se pescaron, se subieron lentamente a la embarcación y se depositaron en viveros de tubos de PVC (70 cm de longitud y 25 cm de diámetro). Los viveros se sumergieron a más de 20 m de profundidad. Al terminar la captura de los reproductores, los viveros se subieron lentamente dando un tiempo de recuperación de 30 min por cada 10 m para la descompresión de los organismos.

Se obtuvieron un total de 5 hembras y 10 machos durante la temporada reproductiva del 2007 y 18 hembras y 2 machos en la temporada del 2008. Los organismos se transportaron a la Unidad Piloto de Maricultivos (UPIMA) del CICIMAR-IPN en un tanque de transporte con capacidad de 1.5 m³ provisto con agua de mar, oxígeno puro (a saturación) y hielo para bajar la temperatura del agua a 25°C. Al llegar al laboratorio, los reproductores se colocaron en tanques de concreto de 11 y 13 m³ con recirculación provistos con bomba centrífuga, filtro de arena y filtro biológico.

VII.2. Manejo de los reproductores e inducción al desove

Aproximadamente 19 h después de su llegada al laboratorio los organismos se anestesiaron en agua de mar con 400 ppm de 2-fenoxietanol (Sigma Chemicals), se pesaron y se marcaron intramuscularmente con una marca digital (BioMark). Se determinó el sexo ejerciendo ligera presión abdominal lo que ocasionó la salida de esperma en el caso de los machos; al no lograr la extracción de esperma, se consideraron hembras, procediendo a verificar su sexo y condición de madurez gonádica mediante una biopsia ovárica, insertando en el oviducto una cánula de plástico de 2 mm de diámetro exterior y 30 cm de longitud. La muestra obtenida se

observó en un microscopio de disección conectado a una cámara digital (Hitachi KP-D50). Se tomaron fotografías y se midió el diámetro de los oocitos con un analizador de imágenes (Image Pro Plus v4.5 Media Cybernetics, MD, USA). Cuando el promedio del diámetro de los oocitos fue $\geq$ a 400 μm , se procedió a la inducción hormonal.

Los desoves fueron inducidos por inyección intramuscular del análogo del factor de liberación de la hormona luteinizante (LHRH-a) (Sigma Co.). A las hembras se les aplicó 25 $\mu\text{g/kg}$ de peso corporal repartida en dos dosis iguales, con un intervalo de 24 h entre cada inyección, mientras que para los machos fue una sola inyección de 25 $\mu\text{g/kg}$ de peso corporal, aplicada al mismo tiempo que la segunda dosis de la hembra (Pelcastre-Campos, 2006).

Posteriormente, estos reproductores se mantuvieron en cautiverio durante un año en tanques de concreto de 11 y 13 m^3 con bomba centrífuga, filtro de arena y filtro biológico, bajo control foto-térmico, de acuerdo a lo reportado por Dumas *et al.* (2004) para lograr su maduración sexual. Además, se realizaron sifoneos y recambios de agua una vez a la semana para mantener la calidad del agua. La alimentación de los organismos consistió en trozos de calamar y sardina, una vez al día a saciedad aparente. Para la inducción al desove de éstos reproductores se siguió el mismo protocolo que para los reproductores silvestres (Pelcastre-Campos, 2006).

VII.3. Tratamiento del desove

Bajo estas condiciones de inducción, se obtuvieron cuatro desoves de reproductores silvestres: dos en la temporada reproductiva de 2007 y dos en la temporada de 2008. En el caso de los reproductores mantenidos en cautiverio, se obtuvo un desove en el 2009. Los gametos se obtuvieron manualmente mediante masaje abdominal, entre las 46 y 52 h después de la primera inyección de las hembras. Se obtuvieron óvulos sobre un recipiente de plástico y se determinó el peso del desove en una balanza digital (Ohaus, Explorer); el esperma se recolectó con una jeringa hipodérmica sin aguja, directamente del poro genital.

La fertilización se hizo artificialmente en un recipiente de plástico, se mezclaron los gametos masculinos y femeninos con un poco de agua de mar y se dejó reposar durante 10 min. Posteriormente, en un frasco de boca ancha se separaron los oocitos fertilizados viables mediante el criterio de flotabilidad, se extrajeron por medio de un sifón los oocitos no viables asentados en el fondo del recipiente. Los oocitos viables fueron colocados en tolvas de incubación cilíndricas de 120 L con agua de mar filtrada e irradiada con luz UV, a una temperatura de 26 °C y salinidad de 35 ups, con flujo continuo de agua y aireación moderada.

La fecundidad (número de huevos por desove) se calculó tomando 5 alícuotas de 1 g de huevos previo a la fertilización de un desove de *L. peru* no utilizado en los análisis del presente trabajo, los cuales se contabilizaron. Posteriormente se extrapoló el promedio de la cantidad de huevos obtenida por el peso de los desoves, con base en la siguiente fórmula:

$$Fecundidad = peso\ del\ desove\ (g) * 3512.5$$

También se obtuvo la fecundidad relativa (FR) utilizando la siguiente fórmula:

$$FR = \frac{Fecundidad}{Peso\ \text{♀}\ (g)}$$

VII.4. Tiempos de muestreo y toma de muestra

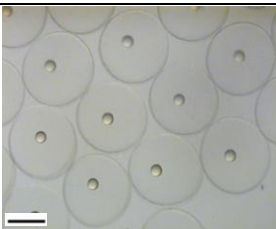
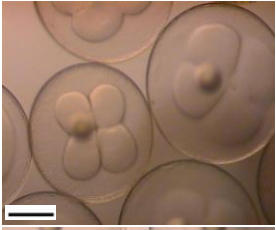
En cada uno de los desoves obtenidos se realizaron muestreos en diferentes etapas del desarrollo embrionario (Tabla I). Se eligieron estas etapas de desarrollo porque son las más representativas durante el desarrollo embrionario y la fase de larva vitelina, y así tener una idea general del metabolismo energético y digestivo de

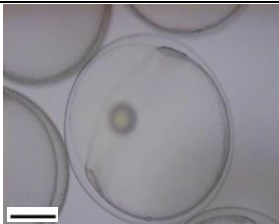
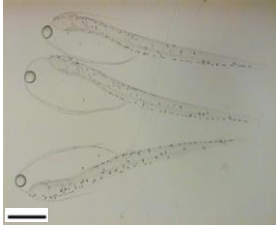
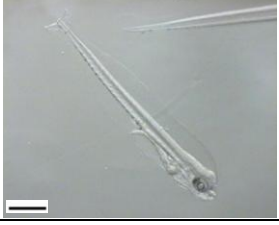
los organismos desde el huevo recién fertilizado hasta la larva que ha absorbido el vitelo y se encuentra preparada para la alimentación exógena.

Los muestreos se realizaron directamente de la tolva de incubación con ayuda de un tamiz de 100 μm . En el caso de los desoves 4 y 5, se obtuvieron también muestras de huevos no viables recolectadas aproximadamente 6 h después de la fertilización, éstas se recolectaron del fondo de la tolva con ayuda de un sifón.

Después de eliminar el exceso de agua se pesaron en una balanza analítica (precisión de 0.001 g) 4 muestras de 0.35 g por etapa de desarrollo. Las muestras se colocaron en tubos Ependorff de 2 mL y se congelaron a -70°C en un ultracongelador (Thermo Scientific Revco).

Tabla I. Etapas de desarrollo del huachinango del Pacífico *Lutjanus peru* en las que se tomaron muestras para análisis bioquímicos. Barra = 0.5 mm.

Etapa	Características	Tiempo pos-fertilización a 26°C	Imagen
I	Huevo recién fertilizado	2 – 5 min	
II	Divisiones mitóticas iniciales (de 4 a 8 células)	1 – 2 h	
III	Blástula	3:30 h	

Etapas	Características	Tiempo pos-fertilización a 26°C	Imagen
IV	Gástrula	9 – 10 h	
V	Pos-Eclosión	20 – 22 h	
VI	Larvas vitelinas (24 h DE)	44 – 46 h	
VII	Larvas con remanentes de vitelo y glóbulo de aceite aptas para alimentarse (48 h DE)	68 – 70 h	

VII.5. Determinaciones morfométricas

Previo a la fertilización, se tomó una muestra aleatoria de 30 huevos y se sacaron fotografías digitales con el analizador de imágenes Image Pro Plus v4.5 (Media Cybernetics, MD, USA). Posteriormente, se midió el área y el diámetro, y se obtuvo el volumen ($V = 4/3\pi r^3$) de los huevos y del glóbulo de aceite. Después de la fertilización se tomó una muestra de aproximadamente 100 huevos al principio del desarrollo embrionario (de 80 a 90 minutos después de la fertilización) y se evaluó el número de divisiones mitóticas anormales (Kjorsvik *et al.*, 2003). En la eclosión se tomó una muestra de 30 larvas; que fueron anestesiadas con fenoxietanol (4%) y fotografiadas con el analizador de imágenes. Se realizaron las siguientes

mediciones: longitud total de la larva (LT); altura (HV), longitud (LV) y volumen ($V=\pi/6*LV*HV$) del vitelo; diámetro (DGA), área (AGA) y volumen ($VGA = 4/3\pi r^3$) del glóbulo de aceite (Blaxter & Hempel, 1963; Ronnestad *et al.*, 1992).

VII.6. Porcentaje de fertilización, eclosión y supervivencia

Una vez que se cerró el blastoporo de los embriones (aproximadamente 10 h pos-fertilización), se tomaron seis muestras aleatorias conteniendo entre 100 y 150 organismos y se colocaron en seis incubadoras de plástico de 1L con agua de mar filtrada y esterilizada con UV, a 26° C y salinidad de 35 ups. Después de la eclosión (DE) (22 h pos-fertilización), los embriones de tres incubadoras se anestesiaron con fenoxietanol al 4%. Posteriormente, con la ayuda de un microscopio de disección (Olympus SZ-CTV), se evaluó el porcentaje de fertilización y de eclosión, haciendo los conteos de los huevos sin embrión, de los huevos no eclosionados y las larvas vitelinas. Los porcentajes de fertilización (%F) y de eclosión (%E) se obtuvo con base en las siguientes fórmulas:

$$\%F = \frac{(HNE + Larvas\ vitelinas)100}{HSE + HNE + Larvas\ vitelinas} \qquad \%E = \frac{(Larvas\ vitelinas)100}{HNE + Larvas\ vitelinas}$$

Donde:

HSE = Huevos sin embrión

HNE = Huevos no eclosionados (huevos con embrión)

Así mismo, 48 h DE (70 h pos-fertilización) se estimó la tasa de supervivencia de las larvas hasta el momento de la primera alimentación (%S) en las otras tres incubadoras, haciendo los conteos de larvas vivas y larvas muertas con base en la siguiente fórmula:

$$\%S = \frac{LV * 100}{LV + LM}$$

Donde:

LV = Larvas vivas

LM = Larvas muertas (coloración opaca y/o retorcidas)

VII.7. Análisis bioquímicos

Los análisis bioquímicos se llevaron a cabo en el laboratorio de Fisiología del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. Previo al análisis de las muestras, las técnicas bioquímicas fueron estandarizadas con base al tamaño y tipo de muestra utilizando una serie de muestras que corresponden a embriones y larvas del pargo lunarejo (*Lutjanus guttatus*), las cuales son similares a las de *Lutjanus peru*. Los análisis bioquímicos de proteínas, enzimas y metabolitos energéticos se hicieron por triplicado para cada etapa de todos los desoves. En todos los casos, el blanco de reacción se preparó siguiendo la misma metodología que para las muestras, sustituyendo el extracto enzimático por agua destilada.

VII.7.1. Obtención del extracto

Para la preparación del extracto se colocó agua destilada en cada tubo Eppendorff. El volumen (mL) de agua destilada se obtuvo multiplicando el peso de la muestra por 4. Posteriormente se maceró la muestra, en baño de hielo, en un homogeneizador de tejidos Pro200 por un lapso de 60 segundos. Los tubos se centrifugaron a 13000 rpm a 5°C durante 10 min. El sobrenadante se transfirió a 14 tubos Eppendorff, uno para cada determinación bioquímica, y se congelaron en un ultracongelador a -70°C hasta el momento de su análisis.

VII.7.2. Evaluación de la concentración de proteínas

La concentración de proteínas se determinó con base en la técnica de análisis de Bradford (1976). En un tubo de ensaye se colocaron 792 µL de agua destilada,

200 μL de la solución de Bradford y 8 μL del extracto problema y se agitó en un vortex. Posteriormente se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 595 nm en un espectrofotómetro UV/visible. La curva de calibración se llevó a cabo a partir de una solución estándar de albúmina bovina (1 mg/mL).

VII.7.3. Evaluación de la concentración de metabolitos energéticos

Se determinó la concentración de los metabolitos D-glucosa, D-fructuosa y glucosa-6-fosfato.

La concentración de D-glucosa se determinó utilizando un kit comercial (Glucosa HK Assay Kit) (Sigma, Co.). Se colocó en un tubo de ensaye 250 μL de la solución Glucose Assay, 650 μL de agua destilada y 100 μL del extracto problema. Se dejó incubar por 1 h a 35°C y se leyó la absorbancia a 340 nm. Para la curva de calibración se utilizaron diferentes cantidades (10 μL –100 μL) de una solución de glucosa con una concentración de 1mg mL⁻¹ en 0.1% de ácido benzóico (incluida en el kit).

La concentración de D-fructuosa se determinó con un kit comercial (Fructose Assay Kit) (Sigma, Co.). En un tubo de ensaye se agregaron 5 μL de solución de fosfoglucoasa isomerasa (PGI), 500 μL de solución Glucose Assay, 1395 μL de agua destilada y 100 μL del extracto problema. Se agitó por inversión y se dejó incubar por 1 h a 35°C, posteriormente se leyó la muestra a una longitud de onda de 340 nm. Al igual que en la determinación de glucosa, se obtuvo una curva de calibración utilizando diferentes cantidades (10 μL –100 μL) de una solución de fructuosa con una concentración de 1mg mL⁻¹ (incluida en el kit).

Para determinar la concentración de glucosa-6-fosfato se siguió la metodología empleada por Bergmeyer (1985), con las siguientes modificaciones. En un tubo de ensaye se colocaron 1 mL de buffer trietanolamina (0.4 M/L, pH de 7.6), 100 μL del extracto problema, 900 μL de agua destilada, 20 μL de una solución NADP y 20 μL de una solución de MgCl₂. Se mezcló y se mantuvo a 25°C, posteriormente se tomaron dos lecturas con intervalos de 3 min a 339 nm. Después se agregó 10 μL de una solución de glucosa-6-deshidrogenasa y se incubó por 5

min. Se hicieron lecturas a 339 nm con intervalos de 3 min hasta asegurar que la absorbancia no incrementara.

VII.7.4. Evaluación de la actividad enzimática metabólica y digestiva

Se determinó la actividad de las enzimas fosfatasa ácida (EC 3.1.3.2.), fosfatasa alcalina (EC 3.1.3.1), glucosa-6-fosfatasa (EC 3.1.3.9.), transaldolasa (E.C. 2.2.1.2.), lactato deshidrogenasa (EC 1.1.1.27), quimotripsina (EC 3.4.21.1), tripsina (EC 3.4.21.4), actividad tipo catepsina, lipasa (EC 3.1.1.3) y amilasa (EC 3.2.1.1).

Para la determinación de la fosfatasa ácida y alcalina se colocó en un tubo de ensaye 500 μ L de buffer, en el caso de la fosfatasa ácida se utilizó citrato-HCl 90 mM a un pH 4.8 y para la fosfatasa alcalina glicina 100 mM con pH 10. Posteriormente se agregaron 500 μ L de una solución de p-nitrofenil fosfato como sustrato, se mezcló por inversión y se equilibró a una temperatura de 37°C. Se agregaron 20 μ L del extracto enzimático y se dejó incubar a la misma temperatura por 20 min. Se colocaron 4000 μ L de solución de hidróxido de sodio para detener la reacción y se mezcló por inversión. Se leyó la absorbancia de la mezcla de reacción a una longitud de onda de 410 nm. Las actividades enzimáticas fosfatasas fueron expresadas en términos de la actividad específica (unidades mg proteína⁻¹), donde una unidad hidroliza 1.0 μ M de p-nitrofenil fosfato por min bajo estas condiciones (Bergmeyer *et al.*, 1974).

La concentración de glucosa-6-fosfatasa se determinó colocando en un tubo de ensaye 2350 μ L de buffer cacodilato-HCl 100 mM a pH 6.5 y 60 μ L de extracto enzimático, se mezcló por inversión y se equilibró a una temperatura de 37°C. Después se agregaron 600 μ L de una solución de glucosa-6-fosfato, se mezcló inmediatamente y se dejó incubar a la misma temperatura por 15 min. Se colocaron 2000 μ L del reactivo de color Taussky-Shorr (Taussky & Shorr, 1953), el cual se preparó en fresco, se mezcló nuevamente por inversión y se dejó incubar a 37°C por 5 min. Posteriormente se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 660 nm. La actividad enzimática fue expresada en términos de la actividad específica (unidades mg proteína⁻¹), donde una unidad libera 1.0 μ M de fósforo inorgánico de la glucosa-6-fosfato por min (Nordlie & Arion, 1966).

La concentración de transaldolasa se obtuvo agregando en un tubo de ensaye 1800 μL de agua destilada, 550 μL de buffer glicilglicina- NaOH 250 mM a un pH 7.7, 50 μL de solución D-eritrosa 4-fosfato, 100 μL de solución D-fructuosa 6-fosfato, 150 μL de solución de β -nicotinamina denina dinucleotida, 150 μL de solución de cloruro de magnesio y 100 μL de solución de glicerofosfato deshidrogenasa. Se mezcló por inversión y se equilibró la reacción a 25°C, posteriormente se agregó 100 μL del extracto enzimático, se volvió a mezclar por inversión y se registró el decremento de la absorbancia a una longitud de onda de 340 nm por 10 min. La actividad enzimática de transaldolasa fue expresada en términos de la actividad específica (unidades mg proteína^{-1}), donde una unidad produce 1.0 μM de D-gliceraldehído 3-fosfato de la D-fructuosa-6-fosfato por min, en la presencia de D-eritrosa-4-fosfato (Bergmeyer *et al.*, 1974).

Para determinar la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa se colocó en un tubo de ensaye 2800 μL de solución de β -nicotinaminadenina dinucleotido y 100 μL de solución de piruvato de sodio. Se mezcló por inversión y se equilibró la temperatura a 37°C. Después se agregó 100 μL del extracto enzimático, se mezcló por inversión y se registró el decremento de la absorbancia a una longitud de onda de 340 nm cada 15 min por 2 h. La actividad enzimática fue expresada en términos de la actividad específica (unidades mg proteína^{-1}), donde una unidad reduce 1.0 μM de piruvato para L-lactato por min (Bergmeyer *et al.*, 1974).

Para analizar la actividad enzimática quimotripsina se colocaron en un tubo de ensaye 930 μL de buffer de 0.1 M tris-HCl con 0.01 M CaCl_2 a un pH 7.8. Posteriormente se agregaron 50 μL de SAAPNA a una concentración de 0.5 mM. Finalmente se añadieron 20 μL del extracto enzimático. Posteriormente se dejó incubar la reacción por 60 min y se leyó en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 410 nm.

En el caso de la actividad enzimática de la tripsina, se preparó el sustrato con 100 nM de BAPNA (Na-benzoil-DL-arginina-P-nitroanilida) en 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) y se aforó a 100 mL usando un buffer 50 mM de tris-HCl y 10 mM de CaCl_2 a un pH 8.2. Posteriormente se colocaron en un tubo de ensaye 1.25 mL del sustrato a 37°C y 20 μL del extracto enzimático. Después de 60 min de

incubación se adicionó 0.25 mL de ácido acético al 30%. La absorbancia se midió a una longitud de onda de 410 nm (Modificado de Erlanger *et al.*, 1961).

La actividad tipo catepsina se evaluó colocando en un tubo de ensaye 1 mL de hemoglobina (0.5%) en tampón 0.1 M ácido fórmico a un pH 3.3. Se añadieron 20 μ L del extracto enzimático y se incubó por un periodo de 60 min. Después se detuvo la reacción con 0.5 mL de ácido tricloroacético al 20% y se dejó reposar la mezcla de reacción por 20 min a 4°C. Posteriormente se centrifugó a 12000 rpm durante 5 min. El sobrenadante se leyó en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 280 nm (Modificado de Anson, 1938).

Para cuantificar la actividad enzimática de la lipasa se colocaron en un tubo de ensaye 100 μ L de tauricolato de sodio 100 mM en 1900 μ L de buffer tris-HCl 50 mM a un pH 7.2 y 10 μ L de extracto enzimático, ésta mezcla se agitó. Se agregaron 20 μ L de β -naftil-caprilato 200 mM como sustrato. Posteriormente se dejó incubar por 60 min a temperatura ambiente. Se agregaron 20 μ L de fast blue BB 100 mM y se volvió a incubar por 5 min. Para detener la reacción se agregaron 200 μ L de ácido tricloroacético 0.72 N y 2.71 mL de etanol:acetato de etilo para clarificar la reacción. La mezcla de reacción se agitó y se leyó en un espectrofotómetro a una absorbancia de 540 nm en cubetas de vidrio (Modificado de Versaw *et al.*, 1989).

Para observar la concentración de la actividad amilasa en un tubo de ensaye con tapa de rosca se colocaron 500 μ L de buffer tris-HCl 50 mM a un pH 7.5 y 20 μ L de extracto enzimático. Se agregaron 500 μ L de almidón soluble al 1% en tris-HCl a temperatura ambiente, se agitó y se dejó incubar a 37°C por 60 min. Posteriormente se adicionaron 200 μ L de carbonato de sodio 2 N y 1.5 mL de reactivo DNS. Se agitaron los tubos y se colocaron en un baño María en ebullición por 15 min. Después se agregaron 7.3 mL de agua destilada y se agitó nuevamente. Finalmente se leyó la absorbancia a 550 nm.

La actividad enzimática digestiva se expresó en términos de la actividad específica (unidades mg proteína⁻¹), donde una unidad es la cantidad de enzima requerida para incrementar 0.01 unidades de absorbancia a determinada longitud de onda por min.

VII.8. Análisis estadísticos

Antes del análisis de los datos se realizaron las pruebas de normalidad de Kolmogorov-Smirnov y homocedasticidad de Bartlett y Cochran. En el caso de las medidas morfométricas de los huevos fecundados, debido a que cumplieron con los supuestos, se procedió a hacer un ANDEVA para comparar el diámetro, el área y el volumen del huevo y el glóbulo de aceite entre los desoves.

Al no cumplir con los supuestos de normalidad y homocedasticidad, se hicieron análisis de Kruskal Wallis del peso de las hembras, el número de huevos por desove, la fecundidad relativa, el porcentaje de fertilización (%F), el porcentaje de anormalidad en los blastómeros (%A), el porcentaje de eclosión (%E) y el porcentaje de sobrevivencia hasta el momento de la primera alimentación (%S). Estos parámetros se compararon entre los desoves 1, 2 y 3 (grupo A) y los desoves 4 y 5 (grupo B); así como las concentraciones de proteínas y metabolitos energéticos y las actividades enzimáticas metabólicas y digestivas entre las etapas del desarrollo, los grupos A y B (en las etapas de I, II, III y IV) y los grupos A, B y C (este último grupo conformado por los huevos no viables obtenidos de los desoves 4 y 5) (en la etapa III del desarrollo). Se hizo un análisis de correlación entre peso de las hembras, el número de huevos por desove, %F, %A, %E, %S, el diámetro del huevo (DH) y el diámetro del glóbulo de aceite (DGA).

Se ajustaron modelos de regresión de las concentraciones de proteínas y metabolitos energéticos y las actividades de las enzimáticas metabólicas y digestivas. Finalmente, se hicieron análisis de correlación y regresión simple y múltiple entre los principales criterios de calidad (%A, %E y %S) y las determinaciones bioquímicas.

VIII. RESULTADOS

VIII.1. Características generales de los desoves

Se obtuvieron cinco desoves individuales de reproductores de huachinango del Pacífico, cuatro de reproductores silvestres y uno de un reproductor mantenido en cautiverio. Los dos primeros desoves de reproductores silvestres corresponden a la temporada del 2007, dos a la temporada del 2008 y el desove de cautiverio a la temporada 2009. Se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los huevos no fertilizados de los cinco desoves en cuanto a el diámetro, el área y el volumen del huevo y el glóbulo de aceite. El desove 2 presentó los huevos de mayor tamaño con un diámetro promedio de 0.81 ± 0.03 mm (media $\pm$ desv est), un área de 0.51 ± 0.03 mm² y un volumen de 0.28 ± 0.04 mm³. Los desoves 1 y 2 tuvieron los valores más altos de diámetro, área y volumen del glóbulo de aceite (Tabla II).

La longitud total (LT) de las larvas vitelinas al momento de la eclosión, sólo se midió en los desoves 2 y 3, ya que en los desoves 4 y 5 muy pocos organismos eclosionaron y se presentaron altas tasas de mortalidad (100% y 72%, respectivamente). Las medidas promedio de las larvas vitelinas fueron 2.198 ± 0.24 mm LT; 1.059 ± 0.09 mm de longitud del vitelo; 0.254 ± 0.06 mm de altura del vitelo; 0.038 ± 0.02 mm³ de volumen del vitelo; 0.125 ± 0.01 mm de diámetro del glóbulo de aceite; 0.012 ± 0.002 mm² de área del glóbulo de aceite y 0.001 ± 0.0002 mm³ de volumen del glóbulo de aceite.

Tabla II. Características de los huevos previo a la fertilización en los cinco desoves del huachinango del Pacífico *Lutjanus peru* (promedio $\pm$ desv est) (N = 30). Letras diferentes denotan diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los desoves.

Desove	1	2	3	4	5
DH (mm)	0.75 (0.02) ^d	0.81 (0.03) ^a	0.75 (0.02) ^{cd}	0.77 (0.03) ^{bc}	0.78 (0.03) ^b
AH (mm ²)	0.45 (0.02) ^{cd}	0.51 (0.03) ^a	0.43 (0.02) ^d	0.47 (0.03) ^{bc}	0.47 (0.03) ^b
VH (mm ³)	0.22 (0.02) ^d	0.28 (0.04) ^a	0.22 (0.02) ^{cd}	0.24 (0.03) ^{bc}	0.25 (0.03) ^b
DGA (mm)	0.14 (0.01) ^a	0.13 (0.01) ^b	0.12 (0.01) ^c	0.11 (0.01) ^d	0.12 (0.01) ^c
AGA (mm ²)	0.012 (0.002) ^b	0.014 (0.002) ^a	0.011 (0.001) ^c	0.009 (0.001) ^d	0.011 (0.001) ^c
VGA (mm ³)	0.0014 (0.0003) ^a	0.0011 (0.0002) ^b	0.0009 (0.0001) ^c	0.0008 (0.0001) ^d	0.0009 (0.0002) ^c

DH, diámetro del huevo; AH, área del huevo; VH, volumen del huevo; DGA, diámetro del glóbulo de aceite; AGA, área del glóbulo de aceite; VGA, volumen del glóbulo de aceite.

Con base en los porcentajes de eclosión y supervivencia hasta el momento de la primera alimentación registrados, los cuales son los principales criterios utilizados como indicadores de calidad de los desoves de peces, los cinco desoves se dividieron en dos grupos, el primero (grupo A) conformado por los tres primeros desoves con un porcentaje de eclosión superior al 80% y el segundo (grupo B) formado por los dos restantes, con un porcentaje de eclosión inferior al 55% (Tabla III).

Se observó una alta variabilidad en la fecundidad por desove, la fecundidad relativa varió entre 45.14 y 147.19 huevos gramo de hembra⁻¹. No se encontraron

diferencias significativas ($p > 0.05$) en el peso de las hembras, en la cantidad de huevos producidos, ni en la fecundidad relativa entre los dos grupos de desoves.

Los porcentajes de fertilización, eclosión y supervivencia hasta el momento de la primera alimentación, presentaron valores mayores en los desoves del Grupo A. Sin embargo, debido a la elevada variabilidad registrada y al pequeño número de desoves, solo se detectaron diferencias marginalmente significativas ($p = 0.08$) con respecto a los dos desoves del Grupo B. Los desoves 4 y 5 mostraron los porcentajes de anomalías en los blastómeros más elevados (69% y 90%, respectivamente). En general, se observó una relación inversa entre los porcentajes de fertilización, eclosión y supervivencia hasta el momento de la primera alimentación con respecto al porcentaje de anomalías en los blastómeros (Tabla III).

Tabla III. Características generales de las hembras y los desoves de huachinango del Pacífico *Lutjanus peru*. Letras diferentes denotan diferencias marginalmente significativas ($0.07 \leq p \leq 0.08$) entre los grupos de desoves.

	Grupo A			Grupo B		
Desove	1	2	3	4	5	Estadísticos
Peso ♀	2.88 ^a	3.99 ^a	5.2 ^a	4.2 ^a	6.27 ^a	$p = 0.25$
Fecundidad	130,000 ^a	286,000 ^a	430,31 ^a	618,200 ^a	325,257 ^a	$p = 0.25$
FR	45.14 ^a	71.68 ^a	82.75 ^a	147.19 ^a	51.87 ^a	$p = 0.56$
% F	79 ^a	59 ^a	79 ^a	0.6 ^b	12 ^b	$p = 0.07$
% A	25 ^b	13 ^b	31 ^b	69 ^a	90 ^a	$p = 0.08$
% E	81 ^a	90 ^a	96 ^a	16 ^b	51 ^b	$p = 0.08$
% S	92 ^a	73 ^a	42 ^a	0 ^b	28 ^b	$p = 0.08$

Peso ♀, Peso de las hembras (kg); Fecundidad, fecundidad por desove; FR, fecundidad relativa (No. H g de ♀¹); % F, porcentaje de fertilización; % E, porcentaje de eclosión; % S, porcentaje de supervivencia; % A, porcentaje de anormalidades.

El análisis de correlación entre las características generales de los desoves y los principales criterios de calidad mostró una relación positiva ($p < 0.05$) entre el porcentaje de fertilización y los porcentajes de eclosión ($R = 0.92$) y supervivencia hasta el momento de la primera alimentación ($R = 0.82$). Por su parte, el diámetro del glóbulo de aceite y el porcentaje de supervivencia hasta el momento de la primera alimentación también presentaron una correlación positiva ($R = 0.98$). El diámetro del huevo no presentó correlación con ninguna de las variables (Tabla IV).

Por otro lado, se detectaron correlaciones negativas entre el porcentaje de anormalidades en los blastómeros con el porcentaje de fertilización ($R = -0.86$); el porcentaje de eclosión ($R = -0.78$), y el porcentaje de supervivencia hasta el momento de la primera alimentación ($R = -0.77$). La fecundidad presentó una correlación negativa con el porcentaje de supervivencia hasta el momento de la primera alimentación ($R = -0.91$) (Tabla IV).

Tabla IV. Relación entre las características generales de los desoves del huachinango del Pacífico *Lutjanus peru*. (Coeficiente de correlación de Pearson; $p < 0.05$).

	Peso ♀	Fecundidad	% F	% E	% S	% A	DH	DGA
Peso ♀	1,00							
Fecundidad	0,34	1,00						
% F	-0,44	-0,62	1,00					
% E	-0,16	-0,64	0,92	1,00				
% S	-0,58	-0,91	0,82	0,78	1,00			
% A	0,67	0,45	-0,86	-0,78	-0,77	1,00		
DH	0,12	-0,01	-0,31	-0,03	0,01	-0,05	1,00	
DGA	-0,59	-0,95	0,73	0,68	0,98	-0,66	-0,04	1,00

Peso ♀, peso de la hembra (kg); Fecundidad, fecundidad por desove; % F, porcentaje de fertilización; % E, porcentaje de eclosión; % S, porcentaje de supervivencia hasta el momento de la primera alimentación; % A, porcentaje de anormalidades en las divisiones mitóticas iniciales; DH, diámetro del huevo sin fecundar; DGA, diámetro del glóbulo de aceite.

VIII.2. Niveles de actividad enzimática metabólica y concentración de metabolitos

La descripción de los niveles de actividad enzimática metabólica, la concentración de proteínas y la concentración de metabolitos energéticos durante el desarrollo embrionario y la fase de larva vitelina del huachinango del Pacífico *L. peru*, se realizó únicamente con el promedio de los resultados de los tres primeros desoves, debido a la baja supervivencia registrada en los dos últimos desoves.

Las concentraciones de proteínas, glucosa y fructuosa presentan un patrón similar de fluctuación durante el desarrollo inicial del huachinango. La concentración de los tres compuestos es baja durante el desarrollo embrionario y en el caso de las proteínas y la glucosa, se incrementan significativamente ($p < 0.05$) después de la etapa IV hasta alcanzar niveles máximos después de la eclosión (Tabla V). La concentración de proteínas varió entre los 192.16 ± 33.95 (promedio $\pm$ error est) y 447.45 ± 45.72 $\mu\text{g g de muestra}^{-1}$. La concentración de glucosa fluctuó entre los 184.13 ± 28.38 y 759.03 ± 277.63 $\mu\text{g g de muestra}^{-1}$, mientras que la concentración de fructuosa lo hizo entre los 429.29 ± 55.63 y 1259.83 ± 355.14 $\mu\text{g g de muestra}^{-1}$ (Tabla V). No se detectó la presencia de glucosa-6-fosfato en ninguna de las etapas del desarrollo de los desoves analizados.

Se registró actividad de las cinco enzimas metabólicas en todas las etapas del desarrollo (Tabla V). Se observó una tendencia general hacia el incremento en la actividad enzimática al momento de la eclosión. Se observó una mayor actividad de fosfatasa ácida (intervalo de $2.27 \times 10^{-4} \pm 2.5 \times 10^{-5}$ a $3.65 \times 10^{-4} \pm 2.8 \times 10^{-5}$ unidades mg de proteína $^{-1}$) en comparación con la fosfatasa alcalina (intervalo de $4.50 \times 10^{-6} \pm 2.42 \times 10^{-6}$ a $9.16 \times 10^{-5} \pm 3.14 \times 10^{-5}$ unidades mg de proteína $^{-1}$). La enzima metabólica con la mayor actividad fue la glucosa-6-fosfatasa que fluctuó entre $2.24 \times 10^{-2} \pm 1.18 \times 10^{-2}$ y $6.49 \times 10^{-2} \pm 2.94 \times 10^{-2}$ unidades mg de proteína $^{-1}$ (Tabla V). Las enzimas fosfatasa ácida, lactato deshidrogenasa y glucosa-6-fosfatasa presentaron un patrón de actividad similar caracterizado por un descenso durante el desarrollo embrionario; no obstante, en ninguna de las tres actividades enzimáticas se observaron diferencias significativas entre las etapas de desarrollo. La actividad de la fosfatasa

alcalina y la transaldolasa presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$) durante las diferentes etapas de desarrollo (Tabla V).

Los valores de la concentración de proteínas y metabolitos energéticos, así como los niveles de actividad enzimática metabólica se ajustaron a diferentes modelos de regresión para explicar las fluctuaciones registradas durante las diferentes etapas del desarrollo embrionario y larva vitelina del huachinango.

El mejor ajuste se encontró para las actividades enzimáticas glucosa-6-fosfatasa y transaldolasa ($R^2 = 0.91$ y $R^2 = 0.89$, respectivamente). Por su parte, las actividades enzimáticas fosfatasa ácida y lactato deshidrogenasa presentaron los ajustes más bajos ($R^2 = 0.14$ y $R^2 = 0.59$, respectivamente) (Figura 2).

Tabla V. Concentración de proteínas ($\mu\text{g g muestra}^{-1}$) y metabolitos energéticos ($\mu\text{g g muestra}^{-1}$), y niveles de actividad enzimática metabólica (unidades mg proteína^{-1}) durante el desarrollo embrionario y la fase de larva vitelina de *Lutjanus peru*. Los valores representan el promedio ($\pm$ error est) ($n = 3$). Letras diferentes denotan diferencia significativa ($p < 0.05$) entre las etapas del desarrollo.

	Etapas del desarrollo						
	I	II	III	IV	V	VI	VII
Proteínas	192.16 (33.95) ^b	274.65 (12.51) ^b	277.19 (20.81) ^b	282.39 (32.90) ^b	447.45 (45.72) ^a	383.28 (14.84) ^a	339.82 (10.61) ^a
Glucosa	203.17 (68.42) ^{ab}	192.86 (45.89) ^b	203.17 (23.91) ^b	184.13 (28.38) ^b	759.03 (277.63) ^a	506.80 (153.83) ^a	266.27 (22.90) ^{ab}
Fructuosa	493.27 (143.57) ^a	558.92 (150.31) ^a	446.13 (77.44) ^a	429.29 (55.63) ^a	1205.16 (384.48) ^a	1259.83 (355.14) ^a	515.15 (41.13) ^a
Fosfatasa ácida ($\times 10^{-4}$)	3.04 (0.98) ^a	3.46 (0.71) ^a	3.11 (0.65) ^a	2.71 (0.54) ^a	2.27 (0.25) ^a	3.65 (0.28) ^a	3.11 (0.53) ^a
Fosfatasa alcalina ($\times 10^{-6}$)	9.99 (5.23) ^b	4.50 (2.42) ^b	4.67 (3.15) ^b	4.62 (2.34) ^b	47.98 (12.93) ^a	91.65 (31.41) ^a	59.35 (12.34) ^a
Lactato deshidrogenasa ($\times 10^{-3}$)	4.83 (1.98) ^a	3.49 (0.79) ^a	3.28 (0.88) ^a	0.826 (0.40) ^a	1.15 (0.39) ^a	3.74 (0.09) ^a	2.51 (1.18) ^a
Transaldolasa ($\times 10^{-3}$)	10.4 (1.79) ^a	6.7 (0.37) ^b	5.88 (0.73) ^b	6.13 (0.36) ^b	10.6 (1.03) ^a	9.23 (0.69) ^a	4.72 (2.41) ^{ab}
Glucosa-6- fosfatasa ($\times 10^{-2}$)	5.51 (1.35) ^a	3.58 (1.22) ^a	2.77 (1.06) ^a	2.24 (1.18) ^a	4.01 (2.27) ^a	5.54 (2.96) ^a	6.49 (2.94) ^a

Etapas del desarrollo: I, huevo fecundado; II, divisiones mitóticas iniciales; III, blástula; IV, gástrula; V, pos-eclosión; VI, 24 hrs. después de la eclosión; VII, 48 hrs. después de la eclosión.

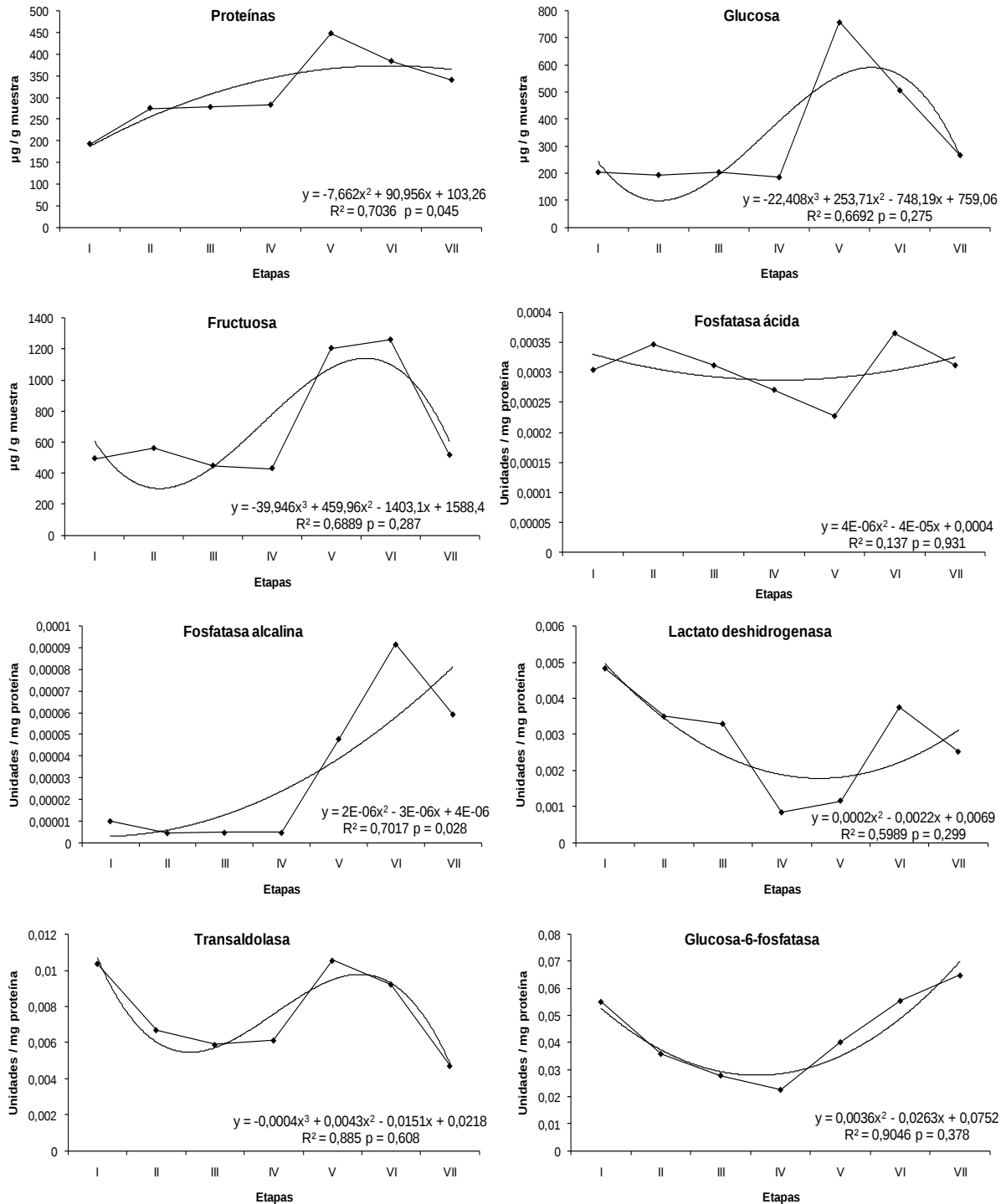


Figura 2. Concentración promedio ($n = 3$) de proteínas y metabolitos energéticos y actividad enzimática metabólica durante el desarrollo embrionario y la fase de larva vitelina del huachinango del Pacífico *Lutjanus peru*. Etapas del desarrollo: I, huevo fecundado; II, divisiones mitóticas iniciales; III, blástula; IV, gástrula; V, pos-eclosión; VI, 24 hrs. después de la eclosión; VII, 48 hrs. después de la eclosión.

VIII.3. Niveles de actividad enzimática digestiva

Todas las enzimas digestivas presentaron actividad durante el desarrollo embrionario y la fase de larva vitelina, con excepción de la quimotripsina (Tabla VI). Las enzimas amilasa y tripsina mostraron un descenso de actividad durante el desarrollo embrionario y un incremento en la fase de larva vitelina (etapas V-VII), éste incremento también fue observado en la actividad enzimática de la lipasa. Por su parte, la actividad tipo catepsina presentó fluctuaciones durante todas las etapas de desarrollo con una tendencia hacia un incremento. Se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) en las actividades enzimáticas (promedio $\pm$ error est) de tripsina y lipasa, registrando un máximo de actividad a las 24 h (1.173 ± 0.27 unidades mg de proteína⁻¹) y 48 h (0.917 ± 0.24 unidades mg de proteína⁻¹) después de la eclosión, respectivamente (Tabla VI). La enzima digestiva que presentó la mayor actividad fue la catepsina que fluctuó entre 1.161 ± 0.29 y 2.022 ± 0.59 unidades mg de proteína⁻¹.

Tabla VI. Niveles de actividad enzimática digestiva (unidades mg proteína⁻¹) durante el desarrollo embrionario y la fase de larva vitelina del huachinango del Pacífico *Lutjanus peru*. Los valores representan el promedio ($\pm$ error est) ($n = 3$). Letras diferentes denotan diferencia significativa ($p < 0.05$) entre las etapas del desarrollo.

	Etapas del desarrollo						
	I	II	III	IV	V	VI	VII
Amilasa	0.206 (0.10) ^a	0.129 (0.03) ^a	0.068 (0.02) ^a	0.09 (0.06) ^a	0.129 (0.01) ^a	0.089 (0.04) ^a	0.098 (0.09) ^a
Lipasa	0.172 (0.14) ^{bcd}	0.160 (0.06) ^{cd}	0.168 (0.05) ^{cd}	0.041 (0.02) ^d	0.329 (0.07) ^{bc}	0.448 (0.09) ^{ab}	0.917 (0.24) ^a
Tripsina	0.424 (0.09) ^b	0.351 (0.09) ^b	0.321 (0.08) ^b	0.249 (0.05) ^b	0.436 (0.09) ^b	1.173 (0.27) ^a	0.806 (0.09) ^a
Catepsina	1.911 (0.21) ^a	1.161 (0.29) ^a	1.581 (0.64) ^a	1.361 (0.41) ^a	1.499 (0.48) ^a	2.022 (0.59) ^a	1.859 (0.65) ^a

Etapas del desarrollo: I, huevo fecundado; II, divisiones mitóticas iniciales; III, blástula; IV, gástrula; V, pos-eclosión; VI, 24 hrs. después de la eclosión; VII, 48 hrs. después de la eclosión.

Los niveles de actividad enzimática digestiva se ajustaron a diferentes modelos de regresión para explicar las variaciones registradas durante las diferentes etapas del desarrollo (Figura 3). La actividad enzimática de la lipasa tuvo el modelo con el mejor ajuste ($R^2 = 0.93$). Por su parte, la actividad enzimática de la catepsina presentó el menor ajustes ($R^2 = 0.48$).

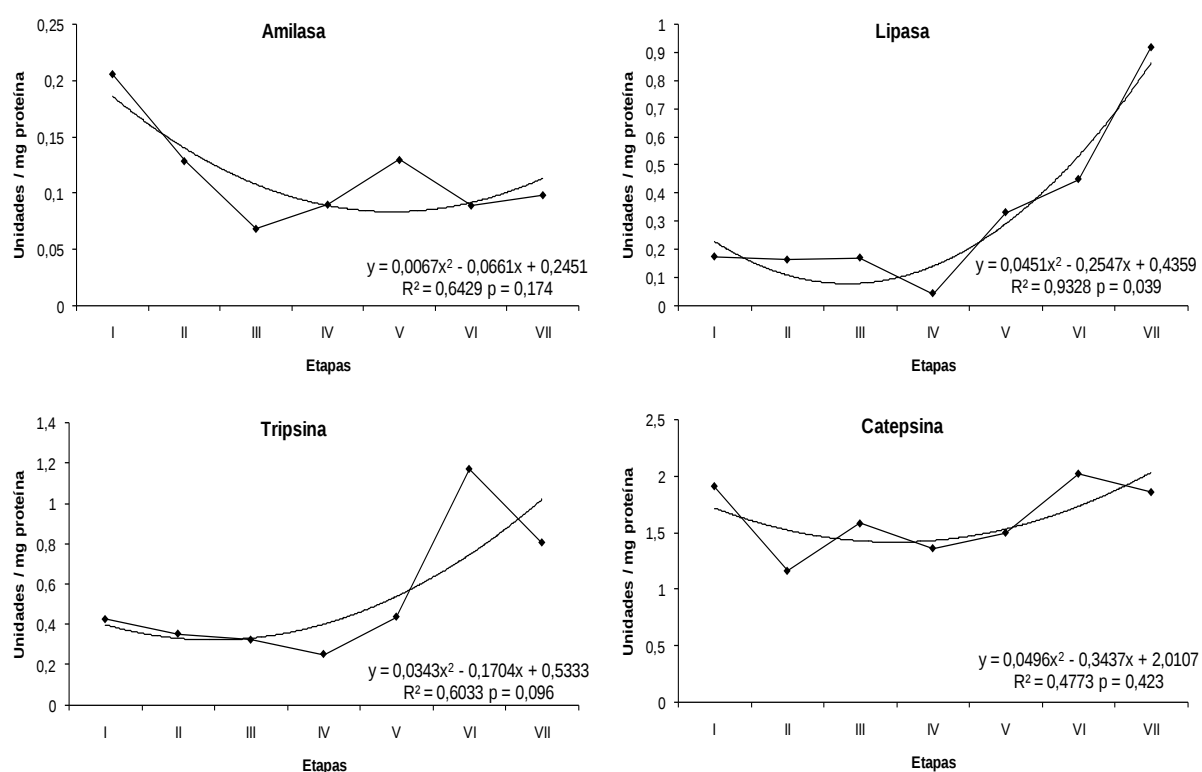


Figura 3. Actividad promedio ($n = 3$) de las enzimas digestivas durante el desarrollo embrionario y la fase de larva vitelina del huachinango del Pacífico *Lutjanus peru*. Etapas del desarrollo: I, huevo fecundado; II, divisiones mitóticas iniciales; III, blástula; IV, gástrula; V, pos-eclosión; VI, 24 hrs. después de la eclosión; VII, 48 hrs. después de la eclosión.

VIII.4. Comparación entre grupos de desoves

No se registraron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre los grupos A (desoves 1, 2 y 3, con %E superior al 80%) y B (desoves 4 y 5, con %E promedio inferior a 55%) en ninguna de las actividades enzimáticas metabólicas ni en la concentración de metabolitos en ninguna de las etapas del desarrollo (Tabla VII). Sin embargo, la concentración de proteínas, glucosa y fructuosa; así como la actividad enzimática de transaldolasa, lactato deshidrogenasa y glucosa-6-fosfatasa presentaron diferencias marginalmente significativas ($p = 0.07 - 0.08$). Las concentraciones de proteínas, glucosa, fructuosa y la actividad enzimática de lactato deshidrogenasa fueron más altas en el grupo B en comparación con el grupo A; en contraste, las actividades enzimáticas transaldolasa y glucosa-6-fosfatasa fueron más elevadas para el grupo A (Tabla VII).

También se realizaron comparaciones entre los desoves del grupo A, el grupo B y los huevos no viables obtenidos en la etapa III de los desoves 4 y 5 (grupo C) durante la etapa III. No se detectaron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre los tres grupos para ninguna de las actividades enzimáticas metabólicas ni en la concentración de metabolitos (Tabla VII). La concentración de proteínas fue menor en el grupo A en comparación con los grupos B y C. La actividad enzimática de transaldolasa fue mayor en el grupo C que en los otros grupos; por el contrario, la actividad enzimática glucosa-6-fosfatasa fue mayor en los grupos A y B.

En la comparación de los dos grupos de desoves (A y B) con la actividad de las enzimas digestivas (Tabla VIII), no se observaron diferencias significativas ($p > 0.05$) para ninguno de los parámetros en ninguna de las etapas, sin embargo las actividades amilasa (etapa II), lipasa (etapa IV) y tripsina (etapa IV) presentaron valores de p marginalmente significativos ($p = 0.08$). Las actividades de tripsina y amilasa fueron mayores en el grupo A. La actividad de lipasa fue mayor en el grupo B. No se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$) en la actividad enzimática digestiva entre los dos grupos de desoves (grupo A y B) y los huevos no viables obtenidos de los desoves 4 y 5 en la etapa III (grupo C) (Tabla VIII).

Tabla VII. Niveles de actividad enzimática metabólica (unidades mg proteína⁻¹) y concentración de proteínas (µg g muestra⁻¹) y metabolitos energéticos (µg g muestra⁻¹) entre los grupos A (desoves 1, 2 y 3), B (desoves 4 y 5) y C (huevos no viables) del huachinango del Pacífico *Lutjanus peru*. Los valores representan el promedio (± error est). No se observaron diferencias significativas (p > 0.05) entre los grupos para cada etapa del desarrollo.

Etapas del desarrollo	I		II		III			IV	
Grupo	A	B	A	B	A	B	C	A	B
Proteínas	192.16 (33.9)	370.98 (8.4)	274.65 (12.5)	340.28 (7.4)	277.19 (20.8)	339.04 (16.6)	319.14 (11.1)	282.39 (32.9)	321.14 (21.7)
Fosfatasa ácida (x10 ⁻⁴)	3.04 (0.9)	4.44 (0.8)	3.46 (0.7)	3.81 (1.9)	3.11 (0.6)	4.03 (1.7)	2.41 (0.6)	2.71 (0.5)	2.99 (2.0)
Fosfatasa alcalina (x10 ⁻⁶)	9.99 (5.2)	8.89 (1.3)	4.5 (2.4)	7.73 (0.1)	4.67 (3.1)	8.76 (3.2)	8.89 (1.8)	4.62 (2.3)	5.49 (2.1)
Lactato deshidrogenasa (x10 ⁻³)	4.83 (1.9)	5.16 (0.7)	3.49 (0.7)	5.92 (1.4)	3.28 (0.8)	5.92 (0.9)	1.59 (0.5)	0.83 (0.4)	4.05 (0.3)
Transaldolasa (x10 ⁻³)	10.4 (1.7)	5.26 (0.1)	6.7 (0.3)	5.72 (0.2)	5.88 (0.7)	6.44 (0.5)	13.9 (0.2)	6.13 (0.3)	5.9 (1.1)
Glucosa-6-fosfatasa (x10 ⁻²)	5.51 (1.3)	1.36 (0.8)	3.58 (1.2)	1.32 (0.03)	2.77 (1.1)	1.62 (0.3)	0.25 (0.2)	2.24 (1.1)	1.35 (0.5)
Glucosa	203.17 (68.4)	960.12 (412.5)	192.86 (45.8)	871.43 (288.1)	203.17 (23.9)	749.41 (226.7)	261.9 (116.6)	184.13 (28.3)	542.26 (136.3)
Fructuosa	493.27 (143.5)	1575.76 (414.1)	558.92 (150.3)	1391.41 (376.2)	446.13 (77.4)	1179.29 (169.1)	638.89 (260.1)	429.29 (55.6)	1055.56 (131.3)

Tabla VIII. Niveles de actividad enzimática digestiva (unidades mg proteína⁻¹) entre los grupos A (desoves 1, 2 y 3), B (desoves 4 y 5) y C (huevos no viables) del huachinango del Pacífico *Lutjanus peru*. Los valores representan el promedio ($\pm$ error est). No se detectaron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre los grupos para cada etapa del desarrollo.

Etapas del desarrollo	I		II		III			IV	
	A	B	A	B	A	B	C	A	B
Amilasa	0.206 (0.10)	0.089 (0.03)	0.129 (0.03)	0.034 (0.02)	0.068 (0.01)	0.062 (0.003)	0.077 (0.02)	0.09 (0.06)	0.071 (0.05)
Lipasa	0.172 (0.14)	0.245 (0.07)	0.160 (0.06)	0.336 (0.07)	0.168 (0.05)	0.31 (0.13)	0.175 (0.10)	0.041 (0.02)	0.122 (0.01)
Tripsina	0.424 (0.09)	0.643 (0.32)	0.351 (0.09)	0.309 (0.14)	0.321 (0.07)	0.386 (0.08)	0.127 (0.06)	0.249 (0.04)	0.063 (0.01)
Catepsina	1.911 (0.21)	1.651 (0.26)	1.161 (0.28)	1.409 (0.02)	1.581 (0.64)	1.409 (0.02)	1.005 (0.44)	1.361 (0.41)	1.128 (0.23)

VIII.5. Parámetros bioquímicos y criterios de calidad de los desoves

Se detectaron correlaciones tanto positivas como negativas entre diferentes actividades enzimáticas y concentraciones de proteínas y metabolitos con los porcentajes de eclosión, de anomalías en la etapa de divisiones mitóticas iniciales y de supervivencia hasta el momento de la primera alimentación obtenidos de los cinco desoves (Tabla IX). La actividad enzimática glucosa-6-fosfatasa fue el único parámetro bioquímico que tuvo una elevada correlación con los 3 criterios de calidad.

La actividad enzimática de transaldolasa y glucosa-6-fosfatasa durante la etapa I presentaron una correlación positiva con el porcentaje de eclosión ($r = 0.80$ y

$r = 0.78$, respectivamente). Por su parte, la concentración de proteínas en la etapa I se correlacionaron negativamente con el porcentaje de eclosión ($r = -0.87$).

Las concentraciones de glucosa, fructuosa y proteínas durante la etapa I presentaron correlaciones positivas con el porcentaje de anormalidades durante las divisiones mitóticas iniciales ($r = 0.89, 0.89$ y 0.68 , respectivamente), mientras que la actividad de la glucosa-6-fosfatasa presentó una correlación negativa con este criterio de calidad ($r = -0.82$).

La actividad de glucosa-6-fosfatasa en las etapas I y IV presentó una correlación positiva con el porcentaje de supervivencia hasta el momento de la primera alimentación ($r = 0.85$ y 0.77 , respectivamente). Por su parte, la actividad de lactato deshidrogenasa en la etapa IV presentó una correlación negativa con el porcentaje de supervivencia hasta el momento de la primera alimentación ($r = -0.82$).

Por otro lado, en los análisis de regresión simple se observó que la concentración de proteínas en la etapa I explicó más del 70% de la variabilidad en el porcentaje de eclosión ($r^2 = 0.75$; $p = 0.05$). Por su parte, la concentración de glucosa, fructuosa y la actividad de la enzima glucosa-6-fosfatasa explicaron la variabilidad del porcentaje de anormalidades en las divisiones mitóticas iniciales en más del 65% ($r^2 = 0.77, 0.79$ y 0.67 , respectivamente; $p < 0.05$). La actividad de la enzima glucosa-6-fosfatasa en la etapa I explicó más del 70% de la variabilidad del porcentaje de supervivencia hasta el momento de la primera alimentación ($r^2 = 0.72$; $p = 0.06$) (Anexo 1).

Tabla IX. Coeficientes de correlación de Pearson entre la actividad enzimática metabólica, la concentración de proteínas y metabolitos energéticos con los criterios de calidad durante las etapas I y IV del desarrollo del huachinango del Pacífico *Lutjanus peru*.

Etapas del desarrollo	I	I	I	IV
Criterios de calidad	% Anormalidades	% Eclosión	% Supervivencia	
Proteínas	0.82	-0.87*	-0.58	-0.45
Glucosa	0.89*	-0.55	-0.44	-0.55
Fructuosa	0.89*	-0.67	-0.48	-0.62
Fosfatasa ácida	0.23	-0.61	-0.40	-0.14
Fosfatasa alcalina	-0.15	0.26	-0.16	-0.54
Lactato deshidrogenasa	0.16	0.17	-0.47	-0.82
Transaldolasa	-0.68	0.80	0.35	0.10
Glucosa-6-fosfatasa	-0.82	0.78	0.85	0.77

Etapas del desarrollo: I, huevo fecundado; IV, gástrula.

* $p \leq 0.05$

En los análisis de regresión y correlación entre la actividad enzimática digestiva y los principales criterios de calidad no se encontraron correlaciones significativas, con excepción de la actividad enzimática de tripsina en la etapa IV y el porcentaje de supervivencia hasta el momento de la primera alimentación ($r = 0.88$ $p < 0.05$) (Tabla X y Anexo 2).

Los modelos de regresión lineal simple para los parámetros bioquímicos cuyo nivel de significancia fue $p \leq 0.05$, están expresados en la tabla XI.

Tabla X. Coeficientes de correlación de Pearson entre la actividad enzimática digestiva y los criterios de calidad durante las etapas I y IV del desarrollo del huachinango del Pacífico *Lutjanus peru*.

Etapas del desarrollo	I	I	I	IV
Criterios de calidad	% Anormalidades	% Eclosión	% Supervivencia	
Amilasa	-0.29	0.39	0.16	0.36
Lipasa	0.15	-0.43	0.14	-0.55
Tripsina	0.14	-0.72	-0.43	0.88*
Catepsina	-0.18	0.49	0.65	0.26

Etapas del desarrollo: I, huevo fecundado; IV, gástrula.

* $p \leq 0.05$

Tabla XI. Modelos de regresión lineal simple entre los principales criterios de calidad y los parámetros bioquímicos durante la ontogenia inicial del huachinango del Pacífico *Lutjanus peru*.

Etapas		Bioquímico	Modelo	r ²	p
% A	I	Glucosa	y = 17.5966 + 0.0553x	0.77	0.05
		Fructuosa	y = 6.5791 + 0.0421x	0.79	0.04
		Glucosa-6-fosfatasa	y = 81.3124 – 928.1738x	0.67	0.05
% E	I	Proteínas	y = 138.005 -13.5016x	0.75	0.05
% S	IV	Tripsina	y = -0.6418 + 272.0071x	0.78	0.04

Criterios de calidad: %E, porcentajes de eclosión; %A, anormalidades en las divisiones mitóticas iniciales; %S, supervivencia hasta el momento de la primera alimentación. Etapas del desarrollo: I, huevo fecundado; IV, gástrula.

Con base en los resultados obtenidos en los análisis de correlación y regresión lineal simple, se eligieron los parámetros bioquímicos cuyo coeficiente de correlación y/o coeficiente de regresión fueron mayores a 0.5. Con estos parámetros bioquímicos como variables independientes y cada uno de los porcentajes (anomalías en las divisiones mitóticas iniciales, eclosión y supervivencia) como variable dependiente, se ajustaron modelos de regresión múltiple. Se obtuvieron un total de 35 modelos para el porcentaje de eclosión, 70 para el porcentaje de anormalidades en las divisiones mitóticas tempranas y 37 para el porcentaje de supervivencia hasta el momento de la primera alimentación. Sin embargo, no todos los modelos múltiples presentaron niveles de significancia inferiores a 0.05. De esta forma, se eligieron solamente aquellos modelos cuyo nivel de significancia fue < 0.05 y cuyos coeficientes de regresión fueron mayores a 0.90.

Para el porcentaje de eclosión se obtuvieron dos modelos, en ambos se incluye la concentración de proteínas y la actividad enzimática de glucosa-6-fosfatasa en la etapa I. Ambos modelos presentaron niveles de ajuste del 99 %, pero niveles de significancia diferentes (Tabla XII). Dos modelos más se obtuvieron para explicar el porcentaje de anormalidades en las divisiones mitóticas iniciales. Ambos incluyen la actividad de la glucosa-6-fosfatasa con glucosa y fructuosa en la etapa I. En ninguno de los cuatro modelos obtenidos para estos dos parámetros de calidad intervino alguna actividad enzimática digestiva y se observó la presencia de la actividad enzimática glucosa-6-fosfatasa en los cuatro modelos. Para explicar el porcentaje de supervivencia hasta el momento de la primera alimentación se obtuvieron cinco modelos, en los cuales destacan las actividades enzimáticas de fosfatasa ácida y tripsina en la etapa IV (Tabla XII).

Tabla XII. Modelos de regresión múltiple entre los principales criterios de calidad y los parámetros bioquímicos durante las etapas I y IV del desarrollo del huachinango del Pacífico *Lutjanus peru*.

Variable dependiente	Variables independientes	Ecuación	R ²	P
%A	G G6	$y=0.634x_1-0.534x_2+48.568$	0.98	<0.005
%A	F G6	$y=0.638x_1-0.508x_2+39.631$	0.96	<0.015
%E	P G G6	$y=-1.13x_1+0.6x_2+0.45x_3+119.85$	0.99	<0.024
%E	P F G6	$y=-1.397x_1+0.836x_2+0.449x_3+124.089$	0.99	<0.007
%S	T F	$y=0.842x_1-0.462x_2+27$	0.98	<0.005
%S	FA G6 T	$y=-0.549x_1-0.142x_2+0.919x_3+34$	0.99	<0.021
%S	FA LD T	$y=-0.428x_1-0.11x_2+0.766x_3+34$	0.99	<0.040
%S	F L T	$y=-0.496x_1-0.117x_2+0.755x_3+39$	0.99	<0.022
%S	G6 LD L	$y=0.649x_1-0.442x_2-0.249x_3+49.41$	0.99	<0.001

Criterios de calidad: %E, porcentaje de eclosión en la etapa I; %A, porcentaje de anomalías en las divisiones mitóticas iniciales en la etapa I; %S, porcentaje de supervivencia hasta el momento de la primera alimentación en la etapa IV. Variables independientes: P, proteínas; G, glucosa; G6, glucosa-6-fosfatasa; F, fructuosa; T, tripsina; FA, fosfatasa alcalina; LD, lactato deshidrogenasa; L, lipasa.

IX. DISCUSIÓN

IX.1. Características generales de los desoves

Los desoves del huachinango del Pacífico *Lutjanus peru* presentan características similares a las reportadas en otras especies de peces marinos con huevos pelágicos de un diámetro inferior a un milímetro y con un solo glóbulo de aceite (Blaxter & Hempel, 1963; Alemany *et al.*, 1996; Brooks *et al.*, 1997; Jónsson & Svavarsson, 2000; Kamler, 2008). Generalmente se reconoce que hembras de mayor tamaño son más fecundas en comparación con hembras más pequeñas de la misma especie (Heinimaa & Heinimaa, 2004; Kamler, 2005). Sin embargo, en el presente estudio se observa una correlación muy pobre entre el peso de las hembras y la fecundidad, lo que no permite establecer alguna relación que soporte esta hipótesis; este resultado concuerda de manera general con lo obtenido por Pelcastre-Campos (2006) también para desoves inducidos hormonalmente en el huachinango del Pacífico. En el presente trabajo el intervalo de fecundidad (130,000 - 618,200) es superior al reportado por Pelcastre-Campos (2006) (21,000 – 370,000) y Dumas *et al.* (2004) (5,000 – 35,000) también en *Lutjanus peru*. La gran variabilidad en la fecundidad puede explicarse por el estrés de captura y traslado de los reproductores, así como por la estrategia reproductiva de *L. peru*, el cual es un desovador parcial, por lo que en la gónada coexisten oocitos en diferentes estadios de desarrollo, los cuales van madurando a lo largo de la temporada reproductiva (Lucano-Ramírez *et al.*, 2001). De igual forma, la fecundidad puede cambiar de una temporada reproductiva a otra, ya que también depende de las reservas energéticas de los reproductores, la disponibilidad de alimento y de factores ambientales (Brooks *et al.*, 1997).

En varias especies de peces se ha observado una relación positiva entre el tamaño de las hembras desovantes y el tamaño del huevo (Lahnsteiner *et al.* 1999; Kamler, 2005). No obstante, en los desoves de *L. peru* no se detectó una correlación positiva entre el peso de las hembras y el tamaño del huevo. Heinimaa & Heinimaa (2004) reportaron en *Salmo salar* una débil relación entre el tamaño de las hembras y

el tamaño del huevo ($R^2 = 0.049$, $p = 0.146$). La importancia del tamaño del huevo recae en el sentido de que huevos de mayor tamaño producen larvas vitelinas más grandes, con mayor cantidad de reservas alimenticias y con una mayor probabilidad de supervivencia durante los primeros días de vida (Brooks *et al.*, 1997; Heinimaa & Heinimaa, 2004).

A pesar de que no hay relación entre el tamaño de la hembra y el tamaño del huevo, en los desoves de *L. peru*, se detectó cierta variabilidad del tamaño del huevo entre los desoves. Tal variación puede estar asociada a alguna o varias de las siguientes características: condición fisiológica de la hembra, a la magnitud del desove, al avance en la temporada de puesta, al origen de la población, la latitud, la temperatura, la disponibilidad de alimento y la salinidad (Kamler, 2005). Más aún, en especies con desoves parciales, el diámetro del huevo difiere dentro de la misma temporada reproductiva y depende de las reservas energéticas de la hembra y el número de desoves que ha tenido a lo largo de la temporada (Brooks *et al.*, 1997; Kamler, 2005). Lo cual, no es posible determinar al momento de la captura de los reproductores de *L. peru*.

IX.2. Caracterización bioquímica

En *L. peru* se observa una elevada actividad enzimática metabólica en los huevos fertilizados, la cual desciende paulatinamente hasta el momento previo de la eclosión. La presencia de actividad enzimática metabólica ha sido reportada en especies como *Serranus cabrilla* (Lahnsteiner, 2006), *Mullus barbatus* (Lahnsteiner, 2006), *Sparus aurata* (Lahnsteiner & Patarnello 2003, 2004a) y *Diplodus puntazzo* (Lahnsteiner & Patarnello 2004b). Carnevali *et al.* (2001b) mencionan que durante el inicio del desarrollo embrionario, la transcripción ARNm se encuentra regulada por proteínas asociadas al ARNm materno, y no es hasta la etapa de blástula tardía (etapa cercana a la gastrulación) que la transcripción del ARN embrionario comienza, lo cual puede explicar el patrón de actividad enzimática en *L. peru*.

Estudios recientes han reportado que los carbohidratos son la principal fuente de energía durante la embriogénesis temprana (Ronnestad & Fyhn, 1993; Sveinsdóttir *et al.*, 2006; Kamler, 2008; Gisbert *et al.*, 2009), lo que sugiere la presencia de rutas metabólicas dirigidas a su aprovechamiento, particularmente la glucólisis, gluconeogénesis y la ruta de las pentosas. Los resultados del presente estudio permitieron confirmar la capacidad de los embriones y larvas vitelinas de *L. peru* de llevar a cabo estas tres rutas metabólicas, indicado por la actividad enzimática glucosa-6-fosfatasa, la cual cataliza la defosforilación de la glucosa-6-fosfato a glucosa en el último paso de la gluconeogénesis (Enes *et al.*, 2008); por la actividad enzimática transaldolasa, que participa en la vía de las pentosas interviniendo en la conversión de las pentosas a hexosas para su degradación subsiguiente por la glucólisis y el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (Lehninger, 1995) y por la actividad enzimática lactato deshidrogenasa, que interviene en la última etapa de la glucólisis reduciendo el piruvato a lactato (Enes *et al.*, 2008). En este sentido, la glucólisis ha sido propuesta como la vía más importante como fuente de energía en los huevos de peces durante las primeras etapas de desarrollo (Boulekbache, 1981; Lahnsteiner *et al.*, 2001; Lahnsteiner & Patarnello, 2003). El patrón de actividad de la enzima lactato deshidrogenasa presente durante el desarrollo embrionario de *L. peru*, ha sido reportado en huevos de *Salmo irideus* (Boulekbache, 1981). Mediante estudios histoquímicos se observó que las células con mayor cantidad de lactato deshidrogenasa se encuentran distribuidas en el escudo embrionario y en la periferia del blastodisco y el periblasto. Estas células están relacionadas con los movimientos embrionarios (Boulekbache, 1981).

Durante el desarrollo embrionario de *L. peru*, las concentraciones de glucosa y fructuosa mostraron un incremento desde la etapa de gástrula hasta la eclosión. Lahnsteiner & Patarnello (2003) y Lahnsteiner (2006) reportaron un patrón similar en embriones de *Sparus aurata*. En conjunto, estos resultados sugieren que existe una síntesis de carbohidratos durante la embriogénesis y los organismos no dependen exclusivamente del reservorio de carbohidratos generados durante la ovogénesis. La producción de carbohidratos durante este periodo de desarrollo es de suma importancia, ya que la glucosa además de ser utilizada directamente en la glucólisis,

puede transformarse en pentosa (ribosa) en la vía de las pentosas fosfato y ser utilizada como recurso energético. También es la precursora en la formación de otros monosacáridos necesarios para la síntesis de ácidos nucleicos (los cuales se incrementan durante la embriogénesis) y polisacáridos (Lehninger *et al.*, 1995; Lahnsteiner & Patarnello, 2003; Lahnsteiner, 2006). Por su parte, la fructuosa también es utilizada como recurso energético o servir como componente de polisacáridos (Lehninger *et al.*, 1995). En los oocitos de los peces teleósteos la fructuosa es un componente de las glucoproteínas de los corpúsculos corticales y de las cadenas de oligosacáridos que juegan un papel importante durante la organogénesis en el desarrollo embrionario (Lahnsteiner, 2006).

A pesar de la presencia y producción de glucosa y del incremento en la actividad enzimática glucosa-6-fosfatasa, no se encontró glucosa-6-fosfato en ninguna de las etapas para ninguno de los desoves de *Lutjanus peru*, lo cual contrasta con lo reportado en embriones de *Dentex dentex* (Giménez *et al.*, 2006), *Serranus cabrilla*, *Mullus barbatus* y *Sparus aurata* (Lahnsteiner, 2006) donde se ha observado la presencia de glucosa-6-fosfato durante la ontogenia inicial, lo cual sugiere que el método utilizado en el presente trabajo no fue lo suficientemente sensible para detectar la presencia de éste metabolito.

Al momento de la eclosión, las larvas vitelinas de *L. peru* presentan un descenso en la concentración de proteínas, glucosa y fructuosa, así como en las actividades enzimáticas de lactato deshidrogenasa y transaldolasa, además de un incremento en las actividades enzimáticas de catepsina y de lipasa. Ronnestad & Fyhn (1993) y Kamler (2008) mencionan que a partir de la eclosión la principal fuente de energía para el desarrollo proviene de aminoácidos libres, proteínas y lípidos, lo cual concuerda con el incremento en la actividad enzimática de catepsina y lipasa observado en *L. peru*. Más aún, en *Cyprinus carpio* y *Gadus morhua* se ha observado un decremento en el coeficiente de respiración y en la concentración de lactato en el momento de la eclosión (Kamler, 2008), lo cual indica que hay una disminución en la producción de energía basada en carbohidratos (Balinsky, 1983).

En *L. peru* el incremento en la actividad enzimática de la catepsina (enzima relacionada con la degradación de las proteínas vitelinas) estuvo acompañado por

una disminución en la concentración de proteínas, lo cual sugiere que a lo largo del desarrollo se forman nuevos aminoácidos libres, los cuales además de ser la mayor fuente de energía durante las primeras etapas del desarrollo, son esenciales para la multiplicación celular y para la formación de tejidos y órganos. También son importantes en el control osmótico y en la flotabilidad de los embriones, (Rønnestad & Fyhn, 1993; Kamler, 2008). En especies como *Sparus aurata* (Carnevali *et al.*, 1999; Carnevali *et al.*, 2001b), *Perca fluviatilis* (Kestemont *et al.*, 1999), *Dicentrarchus labrax* (Carnevali *et al.*, 2001a) y *Oncorhynchus mykiss* (Kwon *et al.*, 2001) se han detectado diferentes tipos de catepsinas (A, B, C, D, E y L) involucradas en distintas etapas del desarrollo de los organismos; sin embargo, la tasa de actividad y los tipos de enzimas que actúan en cada etapa del desarrollo dependen de la especie. Así se ha observado actividad enzimática catepsina tanto en huevos no fertilizados como fertilizados; durante el desarrollo embrionario; al momento de la eclosión y en larvas con saco vitelino (Carnevali *et al.*, 1999; Kestemont *et al.*, 1999; Carnevali *et al.*, 2001a, b; Kwon *et al.*, 2001).

En *L. peru* se observó una mayor actividad enzimática fosfatasa ácida en comparación con la fosfatasa alcalina, esto también se presenta en larvas vitelinas de *Paralabrax maculatofasciatus* hasta 3 días después de la eclosión (Alvarez-González, 2003). Las fosfatasas ácida y alcalina se encuentran involucradas en la absorción y transporte de nutrientes como glucosa, proteínas, lípidos, calcio y fósforo inorgánico (Alberts *et al.*, 1996; Tengjaroenkul *et al.*, 2002). La actividad enzimática de fosfatasa alcalina presentó un incremento durante la organogénesis (después de la gastrulación) y hasta las 24 hrs. después de la eclosión. Este patrón de actividad enzimática se observó en *Sparus aurata* (Naz, 2009) y *Dentex dentex* (Gisbert *et al.*, 2009). Naz (2009) menciona que la fosfatasa alcalina es estimulada por las fosfoproteínas y fosfolípidos presentes en el vitelo, los cuales tienen una mayor tasa de degradación durante la alimentación endógena.

La presencia de enzimas digestivas al momento de la eclosión y antes del comienzo de la alimentación exógena se han reportado en larvas de *Perca fluviatilis* (Cuvier-Péres & Kestemont, 2002), *Paralichthys californicus* (Alvarez-González *et al.*, 2006), *Anarhichas minor* (Savoie *et al.*, 2008), *Dentex dentex* (Gisbert *et al.*, 2009) y

Sparus aurata (Naz, 2009). Sin embargo, se ha observado que esta actividad es baja y se incrementa con el desarrollo.

En el presente trabajo se observa que la actividad enzimática de lipasa permanece prácticamente constante durante el desarrollo embrionario y presenta un incremento continuo desde la organogénesis hasta las 48 hrs. después de la eclosión, se puede suponer que la elevada actividad enzimática lipasa en la alimentación endógena de *L. peru* es debida a la acción de ésta enzima sobre los triacilglicéridos presentes en el glóbulo de aceite. Este incremento se ha observado en *Dentex dentex* (Gisbert *et al.*, 2009) y *Paralabrax maculatofasciatus* (Alvarez-González, 2003) y ha sido sugerida la posible presencia de dos tipos de lipasas, las primeras que se activan durante el desarrollo embrionario y larvario, las cuales apoyan la absorción del vitelo y el glóbulo de aceite y las segundas que son secretadas directamente por el páncreas una vez que ha sido absorbido el vitelo, y que hidrolizan las grasas provenientes del alimento exógeno (Alvarez-González, 2003).

La actividad enzimática de amilasa en *L. peru* se incrementó desde la etapa de blástula hasta la eclosión. Al igual que lo reportado por Naz (2009) en *Sparus aurata*, la actividad de ésta enzima después de la eclosión tuvo un decremento. Este patrón de actividad está relacionado con la hidrólisis del glucógeno, almacenado en el vitelo, para la producción de glucosa. Ha sido sugerido que las variaciones en la actividad enzimática amilasa durante esta etapa del desarrollo pueden estar dadas por una programación genética antes de la alimentación exógena (Naz, 2009).

La actividad enzimática de tripsina se presentó desde los huevos fecundados en *L. peru* y permaneció constante durante el desarrollo embrionario, posteriormente se observa un incremento a partir de la eclosión con un pico máximo a las 24 h DE. Este patrón ha sido reportado en *Perca fluviatilis* (Cuvier-Péres & Kestemont, 2002), *Gadus morhua* (Sveinsdóttir *et al.*, 2006), *Anarhichas minor* (Savoie *et al.*, 2008) y *Sparus aurata* (Naz, 2009). La actividad de tripsina observada en los embriones durante las etapas del desarrollo temprano indica que se encuentra codificada genéticamente (Cuvier-Péres & Kestemont, 2002) y ha sido sugerido que se

encuentra involucrada en la activación de otras proteasas, como las catepsinas (Carnevali *et al.*, 2001a; Sveinsdóttir *et al.*, 2006).

Por su parte, la actividad de quimotripsina no se registró en ninguno de los desoves de *L. peru*, lo que pudo deberse a que el método utilizado no fue lo suficientemente sensible, ya que reportes anteriores en especies como *Perca fluviatilis* (Cuvier-Péres & Kestemont, 2002), *Gadus morhua* (Sveinsdóttir *et al.*, 2006) y *Dentex dentex* (Gisbert *et al.*, 2009) señalan que la actividad de esta enzima es muy baja al momento de la eclosión y que continúa decreciendo entre 6 y 9 días después de la eclosión. Más aún, la quimotripsina es una enzima que es activada por la actividad de la tripsina (Lehninger, 1995; Lehninger *et al.*, 1995; Sveinsdóttir *et al.*, 2006), de esta forma, el decremento observado en la actividad de tripsina al final de la alimentación endógena pudo provocar la no activación y no detección de quimotripsina, es decir, la falta del estímulo externo asociado a la alimentación pudo haber sido el responsable de que no se activara éste proceso (Sveinsdóttir *et al.*, 2006; Gisbert *et al.*, 2009).

IX.3. Implicaciones de las características morfológicas y bioquímicas en la calidad de los desoves

Los dos principales criterios que permiten definir a un desove como de buena calidad son elevados porcentajes de eclosión y de supervivencia de las larvas. En la mayoría de los casos, es difícil mantener una consistencia en la calidad (Kjorsvik *et al.*, 2003; Lahnsteiner & Patarnello, 2004a, b; Giménez *et al.*, 2006), ya que es común que existan variaciones debidas a factores como la sobremaduración, el estado endócrino de las hembras durante la maduración de los oocitos, factores genéticos, la edad de las hembras, la dieta de los reproductores, el momento del desove durante o fuera de la temporada de puesta, las propiedades intrínsecas del huevo, el tratamiento de inducción y crianza; así como factores ambientales (Brooks *et al.*, 1997; Kjorsvik *et al.*, 2003; Kamler, 2005).

Recientemente, los porcentajes de eclosión y supervivencia han sido correlacionados con diversas características morfológicas y parámetros bioquímicos durante diferentes etapas del desarrollo inicial en peces (Jónsson & Svavarsson, 2000; Lahnsteiner *et al.*, 2001; Duncan *et al.*, 2003; Kjorsvik *et al.*, 2003; Lahnsteiner & Patarnello, 2003; Rani, 2005; Giménez *et al.*, 2006; Lahnsteiner, 2006; Bourque & Phelps, 2007; Faulk & Holt, 2008; Bobe & Labbé, 2010) en un intento ya sea por evaluar, predecir y/o mejorar la calidad de los desoves; a pesar de esto, los resultados varían de manera intra e interespecíficamente.

En el presente estudio no se encontró una correlación entre el tamaño del huevo y la supervivencia hasta el momento de la primera alimentación. El mismo resultado se ha reportado en *Salvelinus alpinus* (Jónsson & Svavarsson, 2000). Sin embargo, se observa una correlación positiva entre el diámetro del glóbulo de aceite y los porcentajes de fertilización ($r = 0.73$), eclosión ($r = 0.68$) y supervivencia hasta el momento de la primera alimentación ($r = 0.98$), la misma relación fue descrita en *Sparus aurata* y *Diplodus puntazzo* (Lahnsteiner & Patarnello, 2005).

En el presente trabajo se encontraron correlaciones positivas entre los porcentajes de fertilización, eclosión y supervivencia en *L. peru*, caso contrario a lo reportado en *Dentex dentex*, donde el porcentaje de eclosión no está relacionado con el porcentaje de mortalidad a la primera alimentación (Giménez *et al.*, 2006). Sin embargo, estos autores sugieren que el porcentaje de eclosión no debe ser considerado como el único indicador de calidad de los desoves y debe ser reforzado con el porcentaje de supervivencia larvaria, ya que esto indicaría la calidad de las reservas endógenas contenidas en el saco vitelino y la supervivencia potencial intrínseca de la larva. También se ha propuesto la proporción de huevos flotantes como un indicador de calidad (Brooks *et al.*, 1997). Sin embargo, en el caso de *L. peru*, la proporción de huevos viables, mediante el método de flotabilidad, fue aproximadamente del 100% para todos los desoves; aún así, en los desoves 4 y 5 se presentó una alta tasa de mortalidad durante la etapa de gástrula, con una supervivencia promedio de 14%, lo cual reduce la utilidad de ese parámetro como una característica de buena calidad de los desoves; un resultado similar fue reportado por Faulk & Holt (2008) en *Rachycentron canadum*.

Las anomalías de los blastómeros en la etapa de divisiones mitóticas iniciales ha sido uno de los criterios morfológicos más utilizados, por la correlación observada con los porcentajes de eclosión y la viabilidad de las larvas vitelinas (Shields *et al.*, 1997; Kjorsvik *et al.*, 2003). Lo cual concuerda con lo encontrado en *L. peru*, ya que el porcentaje de anomalías en los blastómeros durante la etapa de divisiones mitóticas iniciales está correlacionado negativamente con los porcentajes de fertilización, eclosión y supervivencia hasta el momento de la primera alimentación. Por otra parte, Giménez *et al.* (2006) observaron en *Dentex dentex* una correlación muy baja entre la tasa de anomalías y el porcentaje de eclosión y la supervivencia hasta el momento de la primera alimentación. Estos autores mencionan que cuando las anomalías morfológicas de los blastómeros son bajas o los huevos hayan sido evaluados en etapas tardías de desarrollo, la mortalidad de los embriones puede estar enmascarada por otros factores.

Se han observado diferentes tipos de anomalías de los blastómeros durante la segmentación en *Hippoglossus hippoglossus* (Shields *et al.*, 1997), *Melanogrammus aeglefinus* (Rideout *et al.*, 2004) y *Gadus morhua* (Rani, 2005) como: disposición asimétrica, diferencia en el tamaño, poca adhesión, poca definición en el margen celular y presencia de vacuolas. De las cuales, la poca adhesión entre los blastómeros es la anomalía que presenta menores porcentajes de eclosión y menor viabilidad de los embriones, indicando que ésta anomalía interfiere severamente en la embriogénesis (Rideout *et al.*, 2004; Rani, 2005). Por otra parte, Shields *et al.* (1997) y Rideout *et al.* (2004) concluyen que la asimetría en los blastómeros no reduce la viabilidad a pesar de ser la anomalía más común; sin embargo, este tipo de anomalía se encuentra fuertemente correlacionada con las otras anomalías (algunas de las cuales pueden reducir la viabilidad embrionaria) proponiendo que la observación de asimetrías en los blastómeros puede ser suficiente indicador de una mala calidad en el desove. No obstante, Vallin & Nissling (1998) proponen que el criterio de anomalías debe ser utilizado con prudencia y no como un indicador directo de la viabilidad larvaria. Lo anterior debido a que en *Gadus morhua* observaron que huevos con anomalías en las etapas de

división temprana, blástula y gástrula podían desarrollarse normalmente en larvas viables.

La composición bioquímica de los huevos depende de diversos factores, incluyendo diferencias genéticas intraespecíficas, la dieta o la edad de los reproductores y el periodo de desove (Faulk & Holt, 2008). Aunado a esto, en individuos con un origen silvestre, la composición del huevo y su calidad probablemente se encuentran influenciadas por factores ambientales externos, mientras que en los organismos en cautiverio estas características se encuentran más afectadas por la respuesta individual de los peces al tratamiento hormonal o por su tolerancia al estrés durante la manipulación (Lahnsteiner *et al.*, 2001).

Independientemente, cada etapa del desarrollo embrionario está caracterizada por distintos niveles de metabolitos y de actividad enzimática. Por lo tanto, solo aquellos parámetros bioquímicos cuyos niveles permanezcan relativamente estables durante el desarrollo embrionario pueden ser utilizados como potenciales indicadores de la calidad del desove (Lahnsteiner & Patarnello; 2004b). En *Sparus aurata*, por ejemplo, parámetros con estas características son las actividades enzimáticas de glucosa-6-fosfatasa, transaldolasa, fosfatasa ácida y el metabolito glucosa-6-fosfato (Lahnsteiner & Patarnello, 2003; Lahnsteiner & Patarnello, 2004a). En el presente trabajo, los parámetros bioquímicos detectados permanecen relativamente constantes o presentan pequeñas variaciones sin diferencias significativas entre las etapas del desarrollo embrionario de *L. peru*. Sin embargo, esto no implica que todos los parámetros analizados puedan ser utilizados como indicadores de la calidad del desove en esta especie.

Se observaron diferencias marginalmente significativas entre el grupo A (desoves 1, 2 y 3 con %E mayores de 80%) y el grupo B (desoves 4 y 5 con %E menores de 55%), con respecto a la concentración de proteínas, glucosa y fructuosa, y las actividades enzimáticas lactato deshidrogenasa, transaldolasa, glucosa-6-fosfatasa, lipasa, tripsina y amilasa, esto sugiere que al incrementarse el número de muestras se podría observar una diferencia significativa ($p < 0.05$).

El grupo B de desoves de *L. peru* presentó menores niveles de actividad de transaldolasa y glucosa-6-fosfatasa que el grupo A. En *Sparus aurata*, reducidas

actividades enzimáticas transaldolasa (enzima reguladora de la vía de las pentosas) y glucosa-6-fosfatasa (enzima clave en la gluconeogénesis) son indicativos de huevos de mala calidad (Lahnsteiner & Patarnello, 2004a).

En el presente trabajo se observa una alta concentración de glucosa y fructuosa y una baja actividad enzimática de la glucosa-6-fosfatasa en el grupo B. En *Dentex dentex* se reporta que huevos de mala calidad contenían altas concentraciones de cetosa (dentro de las cuales la fructuosa es de las más importantes en el tejido animal), glucosa-6-fosfato y glucosa (Giménez *et al.*, 2006). Lo anterior puede indicar un daño o una baja actividad en la glucólisis y gluconeogénesis dando como consecuencia una acumulación de estos metabolitos. Lahnsteiner & Patarnello (2004a) y Giménez *et al.* (2006) mencionan que los carbohidratos son sintetizados durante el desarrollo embrionario para usarlos en las etapas finales para producción de energía y en funciones mecánicas y de osmoregulación, esto sugiere que los embriones provenientes de los huevos de mala calidad no estén utilizando carbohidratos para la producción de energía y otros sustratos, como lípidos, sean utilizados en su lugar. La elevada actividad enzimática de lipasa en el grupo B, en comparación con el grupo A sugiere que probablemente los lípidos, sean utilizados en lugar de los carbohidratos.

La comparación entre los grupos A, B y C (huevos no viables obtenidos de los desoves 4 y 5) no detectó diferencias significativas entre ellos, esto debido probablemente al bajo número de muestras ($n = 7$).

La necesidad de una estimación precisa de la calidad de los desoves es primordial para aclarar si las altas tasas de mortalidad durante las primeras etapas de vida, son debido a la calidad del huevo o a la viabilidad inicial de la larva. Lo que permitirá, en determinado momento, justificar el utilizar o descartar un desove para llevar a cabo su cultivo. Es por esto, que algunos estudios han tratado de explicar las variaciones en la calidad del desove ajustando modelos de regresión entre la actividad enzimática y concentración de metabolitos con los criterios de calidad.

En el presente estudio no se observó una correlación entre metabolitos y el porcentaje de eclosión, contrario a esto Giménez *et al.* (2006) basados en el cálculo del coeficiente de correlación de los modelos de regresión simple encontraron que la

actividad enzimática piruvato cinasa y la concentración de glucosa, ribosa y monosacáridos están relacionados con el porcentaje de eclosión en *Dentex dentex*. Sin embargo, en *L. peru* se observó que el porcentaje de eclosión está correlacionado con la concentración de proteínas y las actividades enzimáticas transaldolasa y glucosa-6-fosfatasa. Estas dos enzimas son esenciales en el metabolismo de los carbohidratos. Lahnsteiner & Patarnello (2003) y Lahnsteiner (2006) mencionan que los huevos ovulados tienen la capacidad para llevar a cabo los procesos de gluconeogénesis y la vía de los fosfatos de pentosa, además resaltan la importancia de un buen funcionamiento de éstas rutas metabólicas con respecto a un desarrollo embrionario exitoso.

En *L. peru* se encontró una relación entre el porcentaje de anormalidades y la concentración de proteínas, glucosa y fructuosa, y la actividad enzimática glucosa-6-fosfatasa. Las correlaciones positivas de los metabolitos y negativa de la actividad enzimática con respecto a éste parámetro, podrían dar un indicio de una falla en el metabolismo de los carbohidratos, observada por una saturación de metabolitos y una baja actividad glucosa-6-fosfatasa. Sin embargo, Giménez *et al.* (2006) mencionan que el porcentaje de anormalidades es un criterio poco utilizado debido al método de toma de muestra, ya que en el caso de desoves espontáneos dentro del tanque de mantenimiento no es posible evaluar este parámetro durante las etapas tempranas del desarrollo embrionario.

En *L. peru*, al igual que en *Sparus aurata* (Lahnsteiner & Patarnello, 2004a), el porcentaje de supervivencia hasta el momento de la primera alimentación estuvo correlacionado con la actividad enzimática glucosa-6-fosfatasa, además éste criterio de calidad también se correlacionó con las actividades lactato deshidrogenasa y tripsina.

La actividad enzimática glucosa-6-fosfatasa se encuentra correlacionada con los criterios de calidad analizados, dando un indicativo de la importancia de los procesos de gluconeogénesis y glucólisis (Enes *et al.*, 2008), durante el desarrollo embrionario y en la larva vitelina en *L. peru*.

Ajustando modelos de regresión simple, los porcentajes de eclosión y anormalidades en *L. peru*, se relacionaron con la concentración de proteínas ($R^2 =$

0.75) para el primer parámetro, y la concentración de glucosa ($R^2 = 0.77$) y fructuosa ($R^2 = 0.79$) en el segundo. El único parámetro bioquímico relacionado con la supervivencia hasta el momento de la primera alimentación fue la actividad enzimática tripsina ($R^2 = 0.78$). En *Sparus aurata* (Lahnsteiner & Patarnello, 2004a), *Puntazzo puntazzo* (Lahnsteiner & Patarnello, 2004b) y *Dentex dentex* (Giménez *et al.*, 2006) se han observado coeficientes de regresión simple bajos, con diferentes parámetros bioquímicos, con respecto a la supervivencia pos-eclosión ($R^2 < 0.450$, $R^2 < 0.445$ y $R^2 < 0.5$, respectivamente). A pesar de que los niveles de significancia obtenidos en *L. peru* son mayores a los reportados para las tres especies antes mencionadas, estos resultados sugieren que la calidad de los desoves en *L. peru* no se puede explicar con una sola variable independiente.

Siguiendo lo propuesto por Lahnsteiner & Patarnello (2004a), en el presente trabajo se obtuvieron modelos de regresión múltiple, observándose un incremento considerable en el coeficiente de regresión para explicar las variaciones de los porcentaje de eclosión ($R^2 = 0.99$), anormalidades en los blastómeros ($R^2 \geq 0.96$) y supervivencia hasta el momento de la primera alimentación ($R^2 \geq 0.98$).

En comparación con los modelos obtenidos para *L. peru*, los coeficientes de regresión múltiple entre la supervivencia pos-eclosión y los parámetros bioquímicos en *Sparus aurata* (Lahnsteiner & Patarnello, 2004a), *Puntazzo puntazzo* (Lahnsteiner & Patarnello, 2004b) y *Dentex dentex* (Giménez *et al.*, 2006) fueron menores ($R^2 = 0.741$, $R^2 \leq 0.535$ y $R^2 \leq 0.948$, respectivamente). Sin embargo, estos autores mencionan que estos modelos pueden predecir la calidad del desove con un nivel de significancia elevado.

Para explicar la variabilidad de los indicadores de calidad en los desoves de *L. peru* se proponen dos modelos para el porcentaje de eclosión y dos para el porcentaje de anormalidades en los blastómeros. Para ambos casos se recomienda el modelo donde interviene la glucosa, esto debido a que éste metabolito interviene directamente en el metabolismo de los carbohidratos, el cual es utilizado en mayor medida para la obtención de energía durante el inicio del desarrollo embrionario (Ronnestad & Fyhn, 1993; Sveinsdóttir *et al.*, 2006; Kamler, 2008; Gisbert *et al.*, 2009). Además es precursora en la formación de monosacáridos necesarios para la

producción de ácidos nucleicos (Lahnsteiner, 2006). Sin embargo, los dos modelos obtenidos para el porcentaje de eclosión presentan correlaciones altas entre las concentraciones de proteínas y glucosa ($r = 0.84$) para el primero, y proteínas y fructuosa ($r = 0.92$) para el segundo. Por lo que se sugiere que ambos modelos se deben utilizar con cuidado al momento de explicar la variabilidad del porcentaje de eclosión.

A pesar de que la glucosa-6-fosfatasa no se encuentra correlacionada con los porcentajes de eclosión y las anormalidades en los blastómeros en las regresiones simples, contribuye a incrementar el coeficiente de regresión múltiple. Lahnsteiner & Patarnello (2004a) mencionan que lo anterior también resalta otra vez la importancia del metabolismo de los carbohidratos durante el desarrollo de huevos y larvas de peces.

La variación en el porcentaje de supervivencia hasta el momento de la primera alimentación en el huachinango del Pacífico se puede explicar por medio de cinco modelos de regresión múltiple, donde, aparte de la actividad enzimática metabólica interviene la actividad enzimática digestiva. Cabe destacar, que de los cinco modelos propuestos para éste indicador de calidad, en cuatro de ellos participan las actividades enzimáticas fosfatasa alcalina y tripsina. La fosfatasa alcalina es una enzima lítica involucrada en el catabolismo de los fosfolípidos y en la defosforilación de la fosfovítina del vitelo. Se ha observado en organismos como *Dentex dentex* (Giménez *et al.*, 2006) que altos niveles de actividad de ésta enzima están correlacionados con la mortalidad larvaria, lo cual puede indicar que el vitelo fue consumido rápidamente en las etapas del desarrollo temprano, dando como consecuencia larvas con pocas reservas en el saco vitelino antes de la alimentación exógena. Lo anterior puede ser explicado en los modelos de regresión múltiple, debido a que la fosfatasa alcalina presenta valores negativos con relación al porcentaje de supervivencia. En cuanto a la tripsina, ésta es una proteasa que cataliza la hidrólisis de aquellos enlaces peptídicos en que el grupo carbonilo es aportado por el residuo de lisina o de arginina (Lehninger, 1995). Esta enzima tiene la capacidad de activar a otras proteasas y se encuentra directamente relacionada con el proceso de primera alimentación y por ende con la supervivencia larvaria.

Entre los cinco modelos de regresión múltiple para explicar la supervivencia hasta el momento de la primera alimentación en *L. peru*, se recomienda que se utilice la combinación de las variables independientes tripsina y fosfatasa alcalina ($R^2 = 0.98$ $p < 0.005$), esto debido a que la correlación entre las variables no es significativa ($r = -0.09$) y es el modelo de regresión múltiple que menos variables tiene. Con base en esto, Lahnsteiner & Patarnello (2004a) mencionan que son preferibles los modelos que usan un número bajo de variables, ya que reducen el esfuerzo del análisis.

X. CONCLUSIONES

- Existe una relación inversa entre los porcentajes de fertilización, eclosión y supervivencia hasta el momento de la primera alimentación con respecto al porcentaje de anomalías en los blastómeros, lo que hace a éste parámetro un buen criterio morfológico para evaluar la calidad de los desoves de *L. peru*.
- La elevada correlación de la actividad enzimática de la glucosa-6-fosfatasa con los porcentajes de eclosión, anormalidades y supervivencia, sugiere que esta enzima está involucrada en la calidad de los desoves.
- La glucosa-6-fosfatasa es una enzima clave en los modelos de regresión múltiple para explicar las variaciones en los porcentajes de anormalidades de los blastómeros y eclosión.
- Las actividades enzimáticas fosfatasa ácida y tripsina intervienen en la variación del porcentaje de supervivencia hasta el momento de la primera alimentación.
- Ninguna de las enzimas digestivas interviene en la explicación de la variación de los porcentajes de eclosión y anormalidades de los blastómeros.
- La presencia de actividad enzimática digestiva durante el desarrollo de las larvas vitelinas del huachinango del Pacífico sugiere que la alta tasa de mortalidad al momento de iniciar la alimentación exógena de esta especie no se encuentra relacionada con la capacidad digestiva.
- Los huevos fecundados de *L. peru* tienen la capacidad enzimática para llevar a cabo los procesos de glucólisis, gluconeogénesis y la ruta de las pentosas fosfato, recalcando la importancia del metabolismo de los carbohidratos durante el desarrollo embrionario.

XI. RECOMENDACIONES

Los resultados obtenidos en el presente trabajo permiten hacer las siguientes sugerencias para futuros estudios relacionados con la caracterización bioquímica y fisiológica del metabolismo energético y sus implicaciones con la calidad de los desoves del huachinango del Pacífico *Lutjanus peru*.

- Observar el tipo de anomalías de los blastómeros en los desoves con base en los criterios propuestos por Shields *et al.* (1997), Rideout *et al.* (2004) y Rani (2005), e identificar el tipo de anomalía que presenta una mayor correlación con la mortalidad larvaria.
- Evaluar la forma del glóbulo de aceite como un parámetro potencial en la determinación de la calidad de los desoves con base en lo propuesto por Lahnsteiner & Patarnello (2005), por la elevada correlación que se observa entre el diámetro de ésta estructura y el porcentaje de supervivencia hasta el momento de la primera alimentación.
- Evaluar la concentración de glucosa-6-fosfato y la actividad enzimática quimotripsina mediante otro método bioquímico para eliminar la incertidumbre de la sensibilidad del método utilizado en el presente trabajo.
- Continuar la caracterización de la actividad enzimática digestiva de las larvas hasta el punto de no retorno.
- Incrementar el número de muestras (desoves) para observar si existen diferencias significativas entre los desoves con bajos porcentajes de eclosión y supervivencia hasta el momento de la primera alimentación y los parámetros bioquímicos.
- Caracterizar los desoves con base al contenido de material energético (proteínas, aminoácidos libres y ácidos grasos) y su efecto en la calidad de los desoves; así como su relación con la alimentación de los reproductores.

XII. REFERENCIAS

- Alberts, B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts & J. D. Watson. 1996. Biología molecular de la célula. Omega. Barcelona, España. 1387 pp.
- Alemaný, F., I. Álvarez, A. García, D. Cortés, T. Ramírez, J. Quintanilla, F. Álvarez & J. M. Rodríguez. 2006. Postflexion larvae and juvenile daily growth patterns of the Alboran Sea sardine (*Sardina pilchardus* Walb.): influence of wind. Sci. Mar. 93-104.
- Alvarez-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 de Doctorado. CICIMAR-IPN. México. 179 pp.
- Alvarez-González, C. A., M. Cervantes-Trujano, D. Tovar-Ramírez, D. E. Conklin, H. Nolasco, E. Gisbert & R. Piedrahita. 2006. Development of digestive enzymes in California halibut *Paralichthys californicus* larvae. Fish Physiol. Biochem. 31: 83-93.
- Anson, M.L. 1938. The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin. J. Gen. Physiol. 22: 79-89.
- Balinsky, B. I. 1983. Introducción a la embriología. Omega. Barcelona, España. 727 pp.
- Balon, E.K. 1984. Reflections on some decisive events in the early life of fishes. Trans. Am. Fish. Soc. 113 : 178-185.
- Bergmeyer, H. U. 1985. Method of enzymatic analysis. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim. Germany. 629 pp.
- Bergmeyer, H. U., Gawehn, K. & Grassel, M. 1974. In Method of enzymatic analysis. (Bergmeyer, H. U. ed.). Academic Press, Inc., New York. I, 630 pp.
- Blanco-Cachafeiro, M. C. 1995. La trucha cría industrial. Mundi-Prensa Libros. 503 pp. Consulta en línea (26/10/09 a las 4:55 pm) <http://books.google.com.mx>
- Blaxter, J. H. S. & G. Hempel. 1963. The influence of egg size on herring larvae (*Clupea harengus* L.). Journal du Conseil. Conseil International pour l'Exploration de la Mer. 28 : 211-240.

- Bobe, J. & C. Labbé. 2010. Egg and sperm quality in fish. General and Comparative Endocrinology. 165 : 535-548.
- Bolasina, S., A. Pérez & Y. Yamashita. 2006. Digestive enzymes activity during ontogenetic development and effect of starvation in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. Aquaculture. 252 : 503-515.
- Boulekbache, H. 1981. Energy metabolism in fish development. Amer. Zool. 21 : 377-389.
- Bourque, B. D. & R. P. Phelps. 2007. Induced spawning and egg quality evaluation of red snapper, *Lutjanus campechanus*. Journal of the world aquaculture society. 38,2 : 208-217.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. An. Biochem. 72: 248-254.
- Bromage, N. & R. J. Roberts. 1995. Broodstock management and seed quality – General considerations. 1-25 pp. In: N. Bromage, R. J. Roberts (eds.). Broodstock Management and Egg Larval Quality. Blackwell Science. Great Britain.
- Brooks, S., C. R. Tyler & J. P. Sumpter. 1997. Egg quality in fish: what makes a good eggs? Reviews in Fish Biology and Fisheries. 7: 387-416.
- Buddington, R. 1985. Digestive secretion of lake sturgeon, *Acipenser fulvencens*, during early development. Journal of Fish Biology. 26: 715-723.
- Bulut, M., O. Özden, S. Saka & M. K. Firat. 2004. Biochemical composition of fertilized dentex (*Dentex dentex*) eggs. Pakistan Journal of Biological Sciences. 7(7): 1096-1098.
- Bulut, M., I. Celik & S. Bilen. 2005. Biochemical composition of fertilized striped bream *Pagellus erythrinus* (Linnaeus, 1758) eggs. Pakistan Journal of Biological Sciences. 8(10):1342-1345.
- Caicedo, J. A., E. A. Rubio, L. A. Zapata & A. Giraldo. 2006. Estimación del crecimiento de *Lutjanus peru* (Pisces: Lutjanidae) basado en capturas artesanales experimentales realizadas en el Parque Nacional Natural

- Gorgonia y su área de influencia, Océano Pacífico colombiano. Invest. Mar., Valparaíso. 34(2): 163-168.
- Carnevali, O., R. Carletta, A. Cambi, A. Vita & N. Bromage. 1999. Yolk formation and degradation during oocyte maturation in seabream *Sparus aurata*: involvement of two lysosomal proteinases. Biology of reproduction. 60: 140-146.
- Carnevali, O., G. Mosconi, A. Cambi, S. Ridolfi, S. Zanuy & A. M. Polzonetti-Magni. 2001a. Changes of lysosomal enzyme activities in sea bass (*Decentrarchus labrax*) eggs and developing embryos. Aquaculture. 202: 249-256.
- Carnevali, O., G. Mosconi, M. Cardinali, I. Meiri & A. Polzonetti-Magni. 2001b. Molecular components related to egg viability in the Gilthead sea bream, *Sparus aurata*. Molecular reproduction and development. 58: 330-335.
- Carnevali, O., G. Mosconi, F. Centonze, J. M. Navas, S. Zunay, M. Carrillo & N. R. Bromage. 1998. Influence of dietary lipid composition on yolk protein components in sea bass, *Dicentrarchus labrax*. Scientia Marina. 62(4): 311-318.
- Curtis, H. & N. S. Barnes. 2001. Biología. Editorial Médica Panamericana. Madrid, España. 1496 pp.
- Cuvier-Péres, A. & P. Kestemont. 2002. Development of some digestive enzymes in Eurasian perch larvae *Perca fluviatilis*. Fish Physiology and Biochemistry. 24: 279-285.
- Douglas, S. E., S. Mandla & J. W. Gallant. 2000. Molecular analysis of the amylase gene and its expression during development in the winter flounder, *Pleuronectes americanus*. Aquaculture. 190: 247-260.
- Dumas, S., M. O. Rosales-Velázquez, M. Contreras-Olguín, D. Hernández-Ceballos & N. Silverberg. 2004. Gonadal maturation in captivity and hormonal-induced spawning of the Pacific red snapper *Lutjanus peru*. Aquaculture. 234: 615-623.
- Duncan, N. J., N. Garcia-Aguilar, G. Rodríguez-M. de O., M. Bernadet, C. Martinez-Chavez, C. Komar, P. Estañol & A. Garcia-Gasca. 2003. Reproductive biology of captive bullseye puffer (*Sphoeroides annulatus*), LHRHa induced spawning and egg quality. Fish Physiology and Biochemistry. 28: 505-506.

- Enes, P., S. Panserat, S. Kaushik & A. Oliva-Teles. 2008. Nutritional regulation of hepatic glucose metabolism in fish. Fish Physiol Biochem. DOI 10.1007.
- Erlanger, B., N. Kokowsky & W. Cohen. 1961. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. Arch. Biochem. Biophys. 95: 271-278.
- Faulk, C. K. & G. J. Holt. 2008. Biochemical composition and quality of captive-spawned cobia *Rachycentron canadum* eggs. Aquaculture. 279:70–76
- Fyhn, H. J. & J. J. Govoni. 1995. Endogenous nutrient mobilization during egg and larval development in two marine fishes – Atlantic menhaden and spot. ICES mar. Sci. Symp. 201: 64-69.
- García-Gasca, A., M. A. Galaviz, J. N. Gutiérrez & A. García-Ortega. 2006. Development of the digestive tract, trypsin activity and gene expression in eggs and larvae of the bullseye puffer fish *Sphoeroides annulatus*. Aquaculture. 251: 366-376.
- Gawlicka, A., B. Parent, M. H. Horn, N. Ross, I. Opstad & O. J. Torrissen. 2000. Activity of digestive enzymes in yolk-sac larvae of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*): indication of readiness for first feeding. Aquaculture. 184: 303-314.
- Giménez, G., A. Estévez, F. Lahnsteiner, B. Zecevic, J. G. Bell, R. J. Henderson, J. A. Piñera & J. A. Sanchez-Prado. 2006. Egg quality criteria in common dentex (*Dentex dentex*). Aquaculture. 260:232-243.
- Gisbert, E., G. Giménez, I. Fernández, Y. Kotzamanis & A. Estévez. 2009. Development of digestive enzymes in common dentex *Dentex dentex* during early ontogeny. Aquaculture. 287: 381-387.
- Gisbert, E., R. H. Piedrahita & D. E. Conklin. 2004. Ontogenetic development of the digestive system in California halibut (*Paralichthys californicus*) with notes on feeding practices. Aquaculture. 232: 455-470.
- Gurr, M. I. & J. L. Harwood. 1991. Lipid Biochemistry an introduction. Chapman and Hall. London. 406 pp.
- Heinimaa, S. & P. Heinimaa. 2004. Effect of the female size on egg quality and fecundity of the wild Atlantic salmon in the sub-arctic River Teno. Boreal environment research. 9: 55-62.

- Heming, T. A. & R. K. Buddington. 1988. Yolk absorption in embryonic and larval fishes. 407-446. En: Hoar, W. S & D. J. Randall (Eds.). Fish Physiology, vol. XI A. Academic Press Inc., London.
- Jónsson, B. & E. Svavarsson. 2000. Connection between egg size and early mortality in arctic charr, *Salvelinus alpinus*. Aquaculture. 187: 315-317.
- Kamler, E. 2005. Parent-egg-progeny relationships in teleost fishes: an energetic perspective. Reviews in Fish Biology and Fisheries. 15: 399-421.
- Kamler, E. 2008. Resource allocation in yolk-feeding fish. Rev Fish Biol Fisheries. 18:143–200.
- Kardong, K. V. 1999. Vertebrados, anatomía comparada, función, evolución. McGraw-Hill, Interamericana. Madrid, España. 732 pp.
- Kestemont, P., J. Cooremans, A. Abi-Ayad & C. Mélard. 1999. Cathepsin L in eggs and larvae of perch *Perca fluviatilis*: variations with developmental stage and spawning period. Fish Physiology and Biochemistry. 21: 59-64.
- Kjorsvik, E., K. Hoehne-Reitan & K. I. Reitan. 2003. Egg and larval quality criteria as predictive measures for juvenile production in turbot (*Scophthalmus maximus* L.). Aquaculture. 227: 9-20.
- Kolkovski, S. 2001. Digestive enzymes in fish larvae and juveniles – implications and applications to formulated diets. Aquaculture. 200: 181-201.
- Kwon, J. Y., F. Prat, C. Randall & C. R. Tyler. 2001. Molecular characterization of putative yolk processing enzymes and their expression during oogenesis and embryogenesis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Biology of reproduction. 65: 1701-1709.
- Lahnsteiner, F. 2006. Carbohydrate metabolism of vitellogenic follicles and eggs of *Serranus cabrilla* (Serranidae) and *Mullus barbatus* (Mullidae) and of embryos of *Sparus aurata* (Sparidae). Fish Physiol Biochem. 32: 131-139.
- Lahnsteiner, F. & P. Patarnello. 2003. Investigations on the metabolism of viable and nonviable gilthead sea bream (*Sparus aurata*) eggs. Aquaculture. 223: 159-174.

- Lahnsteiner, F. & P. Patarnello. 2004a. Egg quality determination in the gilthead seabream, *Sparus aurata*, with biochemical parameters. Aquaculture. 237: 443-459.
- Lahnsteiner, F. & P. Patarnello. 2004b. Biochemical egg quality determination in the gilthead seabream, *Sparus aurata*: reproducibility of the method and its application for sharpsnout seabream, *Puntazzo puntazzo*. Aquaculture. 237: 433-442.
- Lahnsteiner, F. & P. Patarnello. 2005. The shape of the lipid vesicle is a potential marker of egg quality determination in the seabream, *Sparus aurata*, and in the sharpsnout seabream, *Diplodus puntazzo*. Aquaculture. 246: 423-435.
- Lahnsteiner, F., B. Urbanyi, A. Horvath & T. Weismann. 2001. Bio-markers for egg quality determination in cyprinid fish. Aquaculture. 195: 331-352.
- Lahnsteiner, F., T. Weismann & R. A. Patzner. 1999. Physiological and biochemical parameters for egg quality determination in lake trout, *Salmo trutta lacustris*. Fish Physiology and Biochemistry. 20: 375-388.
- Lemieux, H., N. R. Le François & P. U. Blier. 2003. The early ontogeny of digestive and metabolic enzyme activities in two commercial strains of Arctic Charr (*Salvelinus alpinus* L.). Journal of Experimental Zoology. 299a:151-160.
- Lehninger, A. L., D. L. Nelson & M. M. Cox. 1995. Principios de Bioquímica. Ediciones Omega. Barcelona. 1013 pp.
- Lehninger, A. L. 1995. Bioquímica. Ediciones Omega. Barcelona. 1117 pp.
- Lucano-Ramírez, G., M. Villagrán-Santa Cruz, S. Ruiz-Ramírez & T. López-Murillo. 2001. Histology of the oocytes of *Lutjanus peru* (Nichols and Murphy, 1922) (Pisces: Lutjanidae). Ciencias Marinas. 27(3): 335-349.
- Martínez, I., F. J. Moyano, C. Fernández-Díaz & M. Yúfera. 1999. Digestive enzyme activity during larval development of the Senegal sole (*Solea senegalensis*). Fish Physiology and Biochemistry. 21: 317-323.
- Mazorra, C., M. Bruce, J. G. Bell, A. Davie, E. Alorend, N. Jordan, J. Rees, N. Papanikos, M. Porter & N. Bromage. 2003. Dietary lipid enhancement of broodstock reproductive performance and egg and larval quality in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). Aquaculture. 227: 21-33.

- Morehead, D. T., P. R. Hart, G. A. Dunstan, M. Brown & N. W. Pankhurst. 2001. Differences in egg quality between wild striped trumpeter (*Latris lineata*) and captive striped trumpeter that were fed different diets. Aquaculture. 192: 39-53.
- Muhlía-Almazán, A., A. Sánchez-Paz & F. L. García-Carreño. 2008. Invertebrate trypsins: a review. J. Comp. Physiol. B. 178:655-672.
- Murray, H. M., J. W. Gallant, S. C. Johnson & S. E. Douglas. 2006. Cloning and expression analysis of three digestive enzymes from Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) during early development: Predicting gastrointestinal functionality. Aquaculture. 252: 394-408.
- Naz, M. 2009. Ontogeny of biochemical phases of fertilized eggs and yolk sac larvae of Gilthead Seabream (*Sparus aurata* L.). Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. 9: 77-83.
- Nocillado, J. N., V. D. Peñaflorida & I. G. Borlongan. 2000. Measure of egg quality in induced spawns of the Asian sea bass, *Lates calcarife* Bloch. Fish Physiology and Biochemistry. 22: 1-9.
- Nordlie, R. C. & W. J. Arion. 1966. Methods in Enzymology. 9, 619 - 625.
- Oozeki, Y. & M. Baley. 1995. Ontogenetic development of digestive enzyme activities in larval walleye Pollock, *Theragra chalcogramma*. Mar. Biol. 122: 177-186.
- Papanikos, N., R. P. Phelps, K. Williams, A. Ferry & D. Maus. 2003. Egg and larval quality of natural and induced spawns of red snapper, *Lutjanus campechanus*. Fish Physiology and Biochemistry. 28: 487-488.
- Pelcastre-Campos, V. T. 2006. Inducción a la ovulación y espermiogénesis en el huachinango del Pacífico *Lutjanus peru* (Nichols y Murphy, 1992) y almacenamiento de su semen. Tesis de Maestría. CICIMAR-IPN. 96 pp.
- Penney, R. W., P. L. Lush, J. Wade, J. A. Brown, C. C. Parrish & M. P. M. Burton. 2006. Comparative utility of egg blastomere morphology and lipid biochemistry for prediction of hatching success in Atlantic cod, *Gadus morhua* L. Aquaculture Research. 37: 272-283.
- Peña, 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.

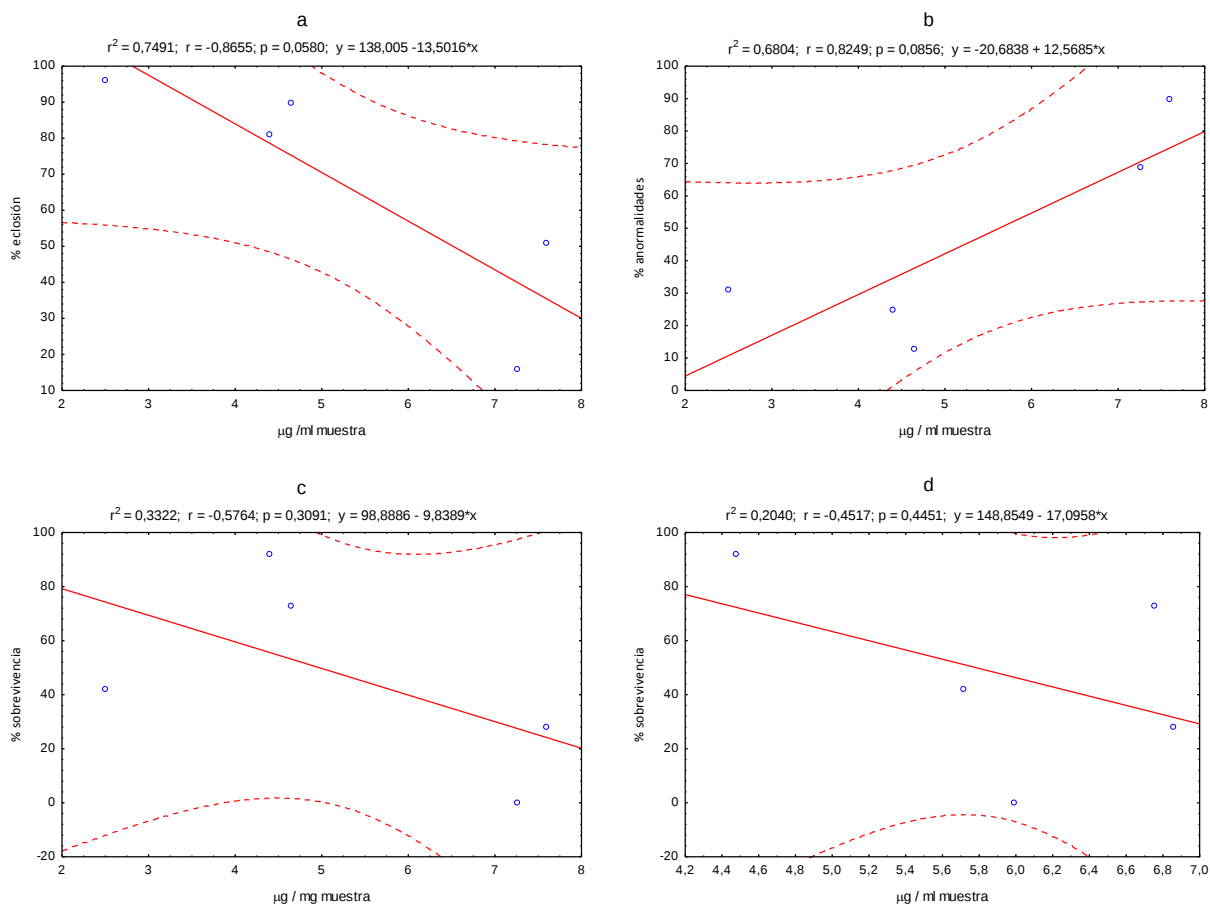
- Peña, R. 2005. Estudio de la función digestiva en larvas de la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus*: aspectos alimenticios y sus aplicaciones prácticas. Tesis de Doctorado. CICIMAR.IPN. México. 141 pp.
- Perez-Casanova, J. C., H. M. Murray, J. W. Gallant, N. W. Ross, S. E. Douglas & S. C. Johnson. 2006. Development of the digestive capacity in larvae of haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) and Atlantic cod (*Gadus morhua*). Aquaculture. 251: 377-401.
- Pickova, J. & E. Brännäs. 2006. Egg quality in Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). Arch. Tierz., Dummerstorf. 49: 86-89.
- Rani, M. S. 2005. Prediction of larval viability based on egg quality parameters and early cleavage patterns in the experiments of triploidy induction in Atlantic cod, *Gadus morhua* L. Tesis de Maestría. University of Tromso, Norway. 51 pp.
- Reyna-Trujillo, M. 1993. Desarrollo gonádico y época de desove del huachinango (*Lutjanus peru*) Nichols y Murphy, 1922 (Pisces: Lutjanidae) en Bahía de La Paz, Baja California Sur, México. Tesis de Licenciatura. Universidad de Guadalajara, México. 69 pp.
- Rideout, R. M., E. A. Trippel & M. K. Litvak. 2004. Predicting haddock embryo viability based on early cleavage patterns. Aquaculture. 230: 215-228.
- Ronnestad, I., R. N. Finn, E. P. Groot & H. J. Fyhn. 1992. Utilization of free amino acids related to energy metabolism of developing eggs and larvae of lemon sole *Microstomus kitt* reared in laboratory. Marine Ecology Progress Series. 88: 195-205.
- Ronnestad, I. & H. J. Fyhn. 1993. Metabolic aspects of free amino acids in developing marine fish eggs and larvae. Reviews in Fisheries Science. 1(3): 239-259.
- Ronnestad, I., W. M. Koven, A. Tandler, M. Harel & H. J. Fyhn. 1994. Energy metabolism during development of eggs and larvae of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). Marine Biology. 120: 187-196.
- Ronnestad, I., W. M. Koven, A. Tandler, M. Harel & H. J. Fyhn. 1998. Utilisation of yolk fuels in developing eggs and larvae of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). Aquaculture. 162: 157-170.

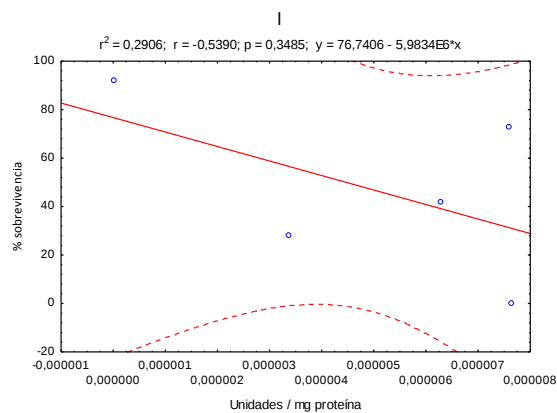
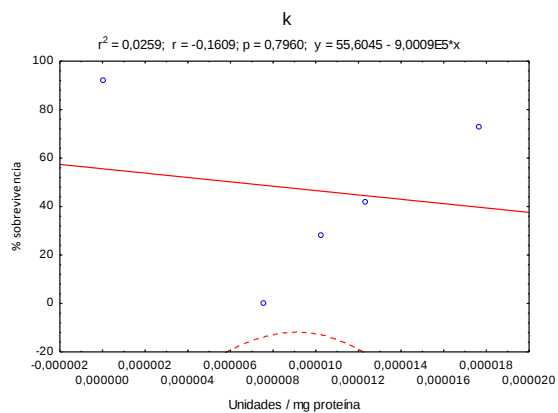
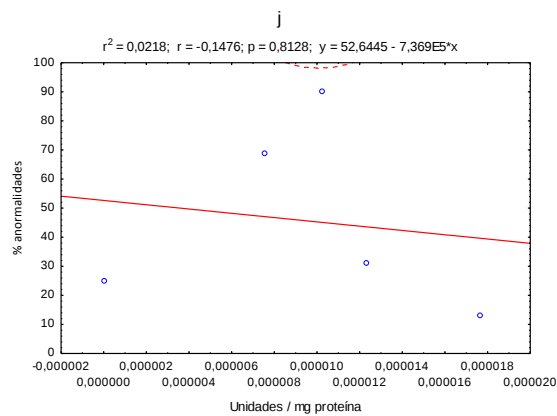
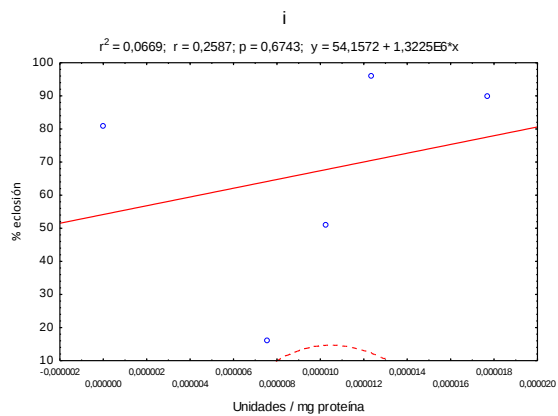
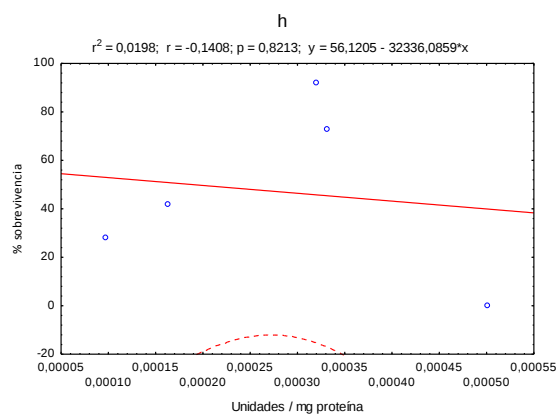
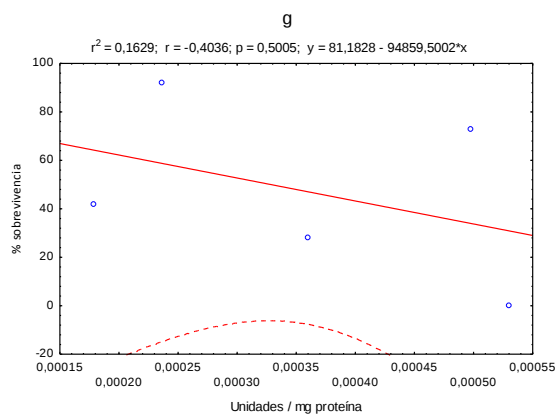
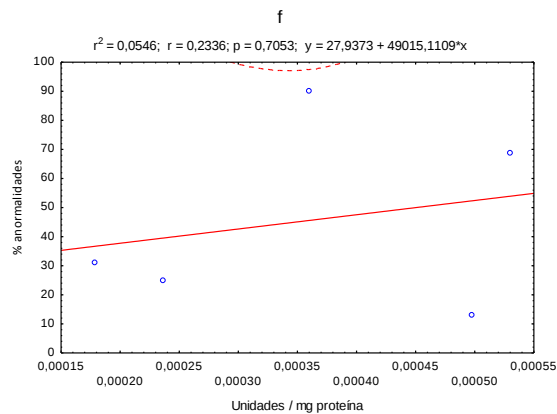
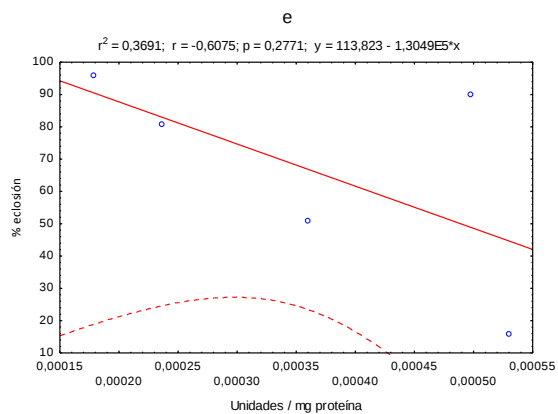
- Santamaría-Miranda, A. 1998. Hábitos alimenticios y ciclo reproductivo del huachinango *Lutjanus peru*, (Nichols & Murphy, 1922) Pisces:Lutjanidae en Guerrero, México. Tesis de Maestría. CICIMAR, México.
- Sarasquete, M. C., A. Polo, E. Pascual & M. Yúfera. 1993. Histochemistry of proteins, lipids and carbohydrates in the yolk of oocytes, eggs and larvae of seabream (*Sparus aurata*). In: B. T. Walther & H. J. Fyhn (ed). Physiological and biochemical aspects of fish development. Norway. University of Bergen. 309-314.
- Saucedo-Lozano, M. 2000. Alimentación natural de juveniles de *Lutjanus peru* (Nichols & Murphy, 1922) y *Lutjanus guttatus* (Steindacher, 1869) (Lutjanidae:Perciformes) en la costa de Jalisco y Colima, México. Tesis de Maestría. ICMYL Unidad Mazatlán. México.
- Saucedo-Lozano, M., E. Godínez-Domínguez, R. García de Quevedo-Macháin & G. González-Sansón. 1998. Distribución y densidad de juveniles de *Lutjanus peru* (Nichols & Murphy, 1922) (Pisces: Lutjanidae) en la costa de Jalisco y Colima, México. Ciencias Marinas. 24(4): 409-423.
- Savoie, A., N. R. Le Francois, C. Cahu & P. U. Blier. 2008. Metabolic and digestive enzyme activity profiles of newly hatched spotted wolffish (*Anarhichas minor* Olafsen): effect of temperature. Aquaculture Reserch. 39(4): 382-389.
- Sawanboonchun, J., W. J. Roy, D. A. Robertson & J. G. Bell. 2008. The impact of dietary supplementation with astaxanthin on egg quality in Atlantic cod broodstock (*Gadus morhua*, L.). Aquaculture. 283: 97-101.
- Shan, X. J., W. Huang, L. Cao, Z. Z. Xiao & S. Z. Dou. 2008. Ontogenetic development of digestive enzymes and effect of starvation in miiuy croaker *Miichthys miiuy* larvae. Fish Physiol Biochem. Springer. DOI 10.1007/s10695-008-9263-9.
- Shields, R. J., N. P. Brown & N. R. Bromage. 1997. Blastomere morphology as a predictive measure of fish egg viability. Aquaculture.155: 1-12.
- Sink, T. D. & R. T. Lochmann. 2008. Effects of dietary lipid source and concentration on channel catfish (*Ictalurus punctatus*) egg biochemical composition, egg and fry production, and egg and fry quality. Aquaculture. 283: 68-76.

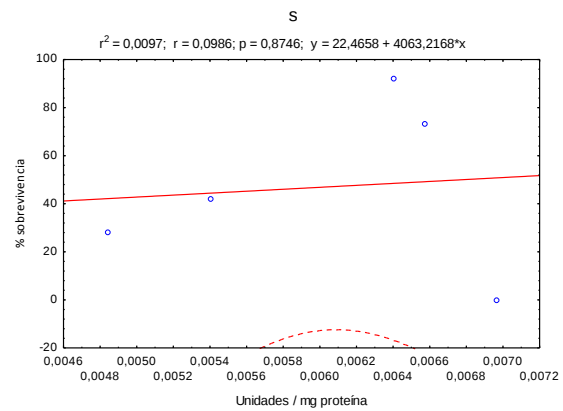
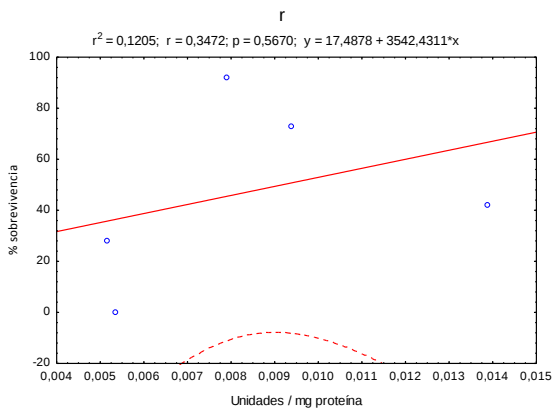
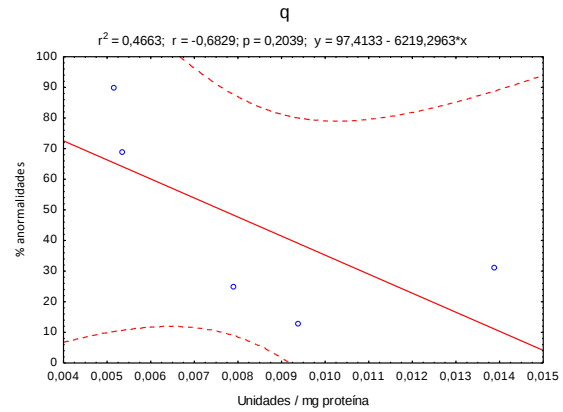
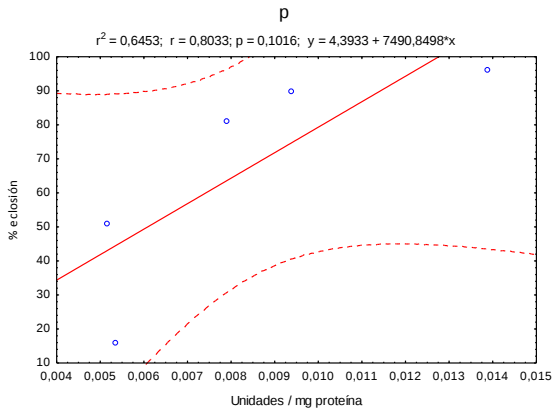
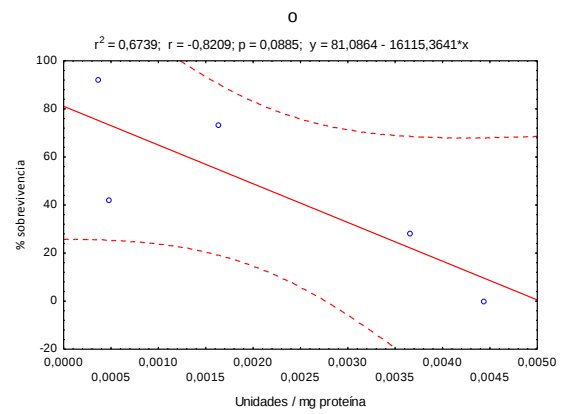
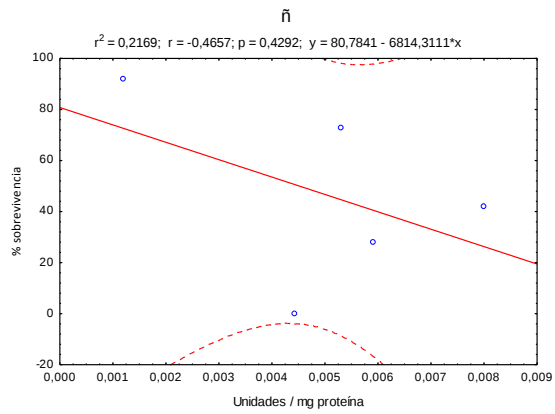
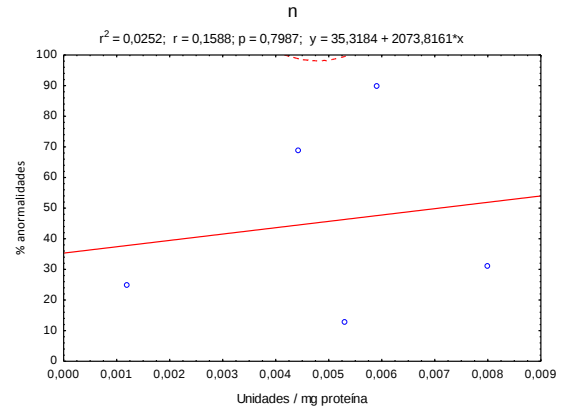
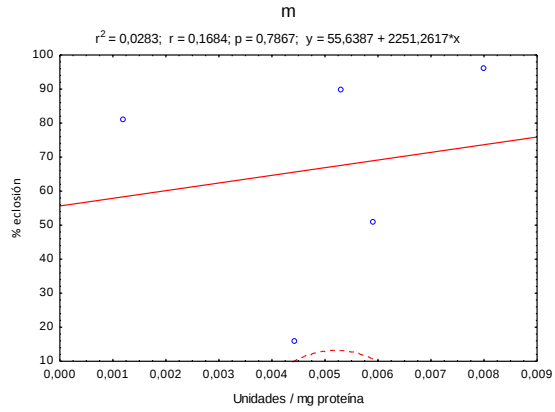
- Sveinsdóttir, H., H. Thorarensen & A. Gudmundsdóttir. 2006. Involvement of trypsin and chymotrypsin activities in Atlantic cod (*Gadus morhua*) embryogenesis. Aquaculture. 260: 307-314.
- Taussky, H. H. & E. Shorr. 1953. A microcolorimetric method for the determination of inorganic phosphorus. J. Biol. Chem. 202: 575-685.
- Tengjaroenkul, B., B. J. Smith, S. A. Smith & U. Chatreewongsin. 2002. Ontogenic development of the intestinal enzymes of cultured Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L. Aquaculture. 211: 241-251.
- Vallin, L. & A. Nissling. 1998. Cell morphology as an indicator of viability of cod eggs- results from an experimental study. Fisheries Reserch. 38(3): 247-255.
- Vega-Orellana, O. M., D. M. Fracalossi & J. K. Sugai. 2006. Dourado (*Salminus brasiliensis*) larviculture: Weaning and ontogenetic development of digestive proteinases. Aquaculture. 252: 484-493.
- Versaw, W., S.L. Cuppett, D.D. Winters & L.E. Williams. 1989. An improved colorimetric assay for bacterial lipase in nonfat dry milk. J. Food Sci. 54: 232-254.
- Zavala-Leal, I. 2007. Efecto de la temperatura, intensidad de luz, tipo y densidad de presa en la eficiencia alimenticia durante la ontogenia inicial del huachinango del Pacífico (*Lutjanus peru*). Tesis de Maestría. CICIMAR-IPN. 66 pp.
- Zacarias-Soto, M., J. B. Muguet & J. P. Lazo. 2006. Proteolytic activity in California halibut larvae (*Paralichthys californicus*). Journal of the World Aquaculture Society. 37(2): 175-185.

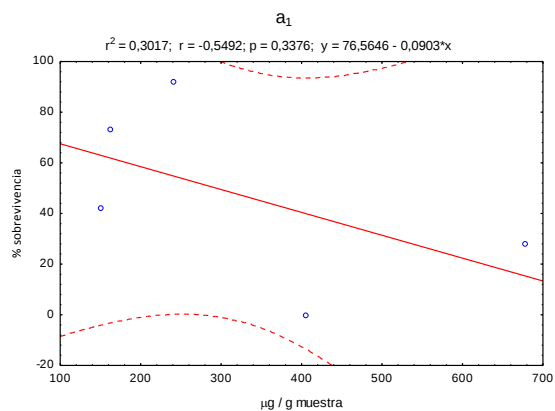
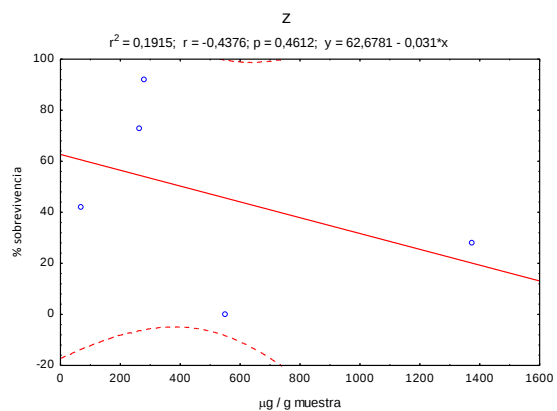
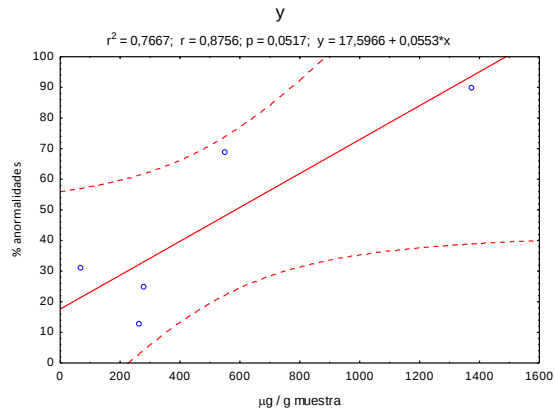
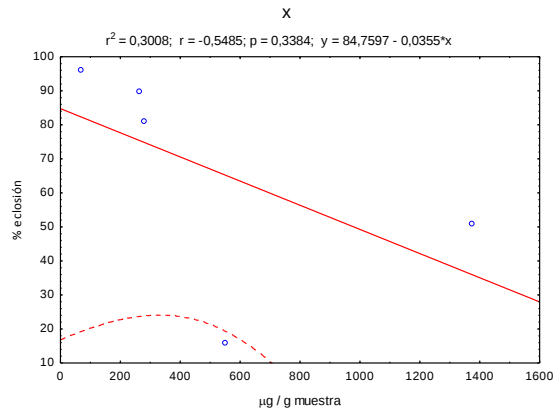
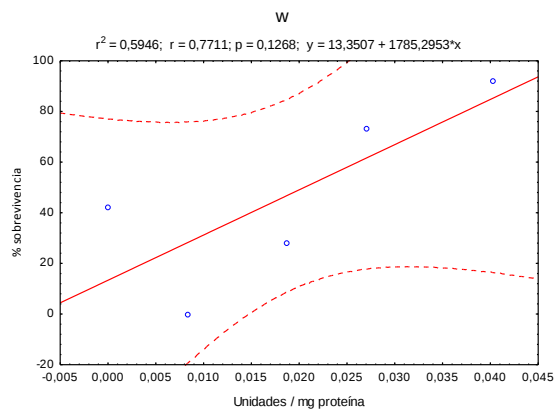
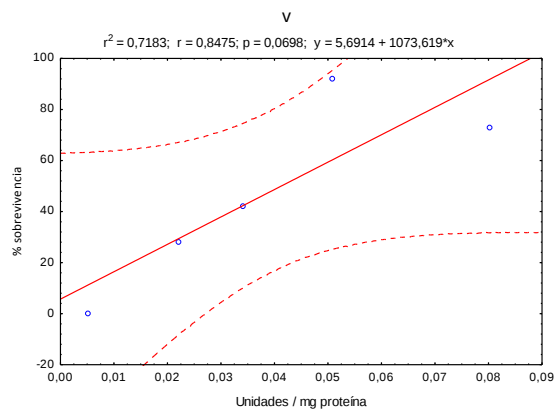
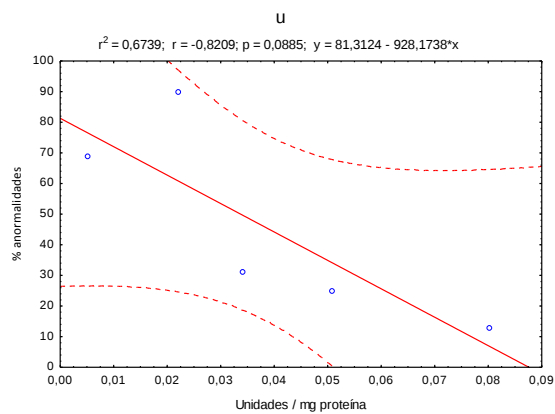
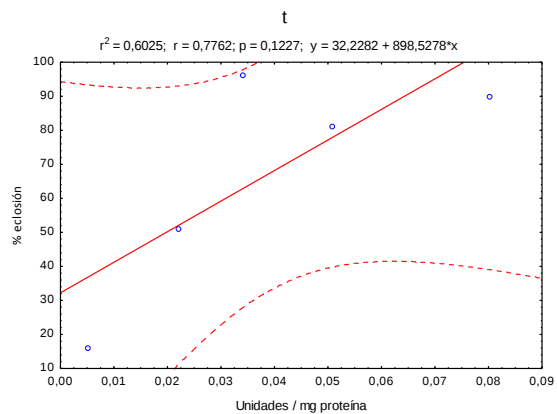
XIII. ANEXOS

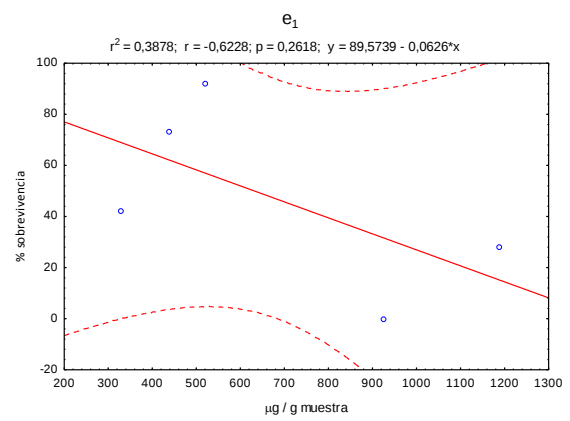
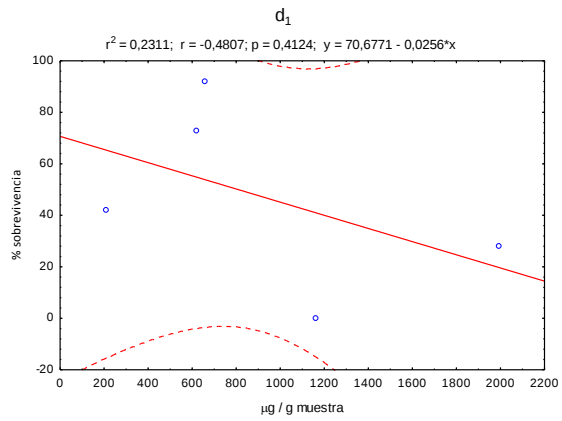
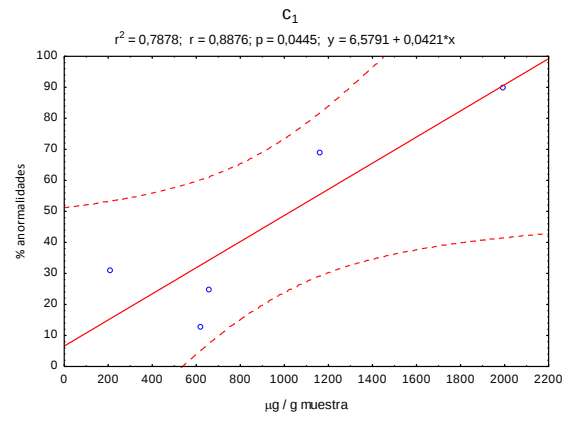
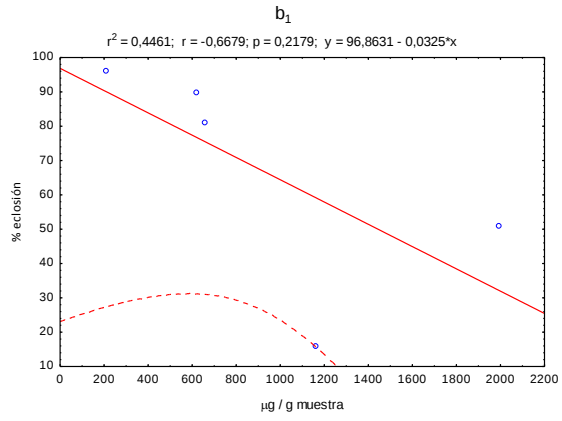
Anexo 1. Análisis de regresión y correlación entre los principales criterios de calidad y la concentración de proteínas y metabolitos energéticos y la actividad enzimática metabólica en las etapas I y IV (*) durante el desarrollo embrionario del huachinango del Pacífico *Lutjanus peru*. Parámetros bioquímicos: Proteínas (a, b, c, d*); fosfatasa ácida (e, f, g, h*); fosfatasa alcalina (i, j, k, l*); lactato deshidrogenasa (m, n, ñ, o*); transaldolasa (p, q, r, s*); glucosa-6-fosfatasa (t, u, v, w*); glucosa (x, y, z, a₁*) y fructuosa (b₁, c₁, d₁, e₁*).











Anexo 2. Análisis de regresión y correlación entre los principales criterios de calidad y la actividad enzimática digestiva en las etapas I y IV (*) durante el desarrollo embrionario del huachinango del Pacífico *Lutjanus peru*. Parámetros bioquímicos: amilasa (a, b, c, d*); lipasa (e, f, g, h*); tripsina (i, j, k, l*) y catepsina (m, n, ñ, o*).

