

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE CIENCIAS

Departamento de Biología Celular



**ANÁLISIS HISTO-ENZIMÁTICO
EN EL DIGESTIVO DE *A. naccarii*,
Bonaparte (1836): EVOLUCIÓN
DURANTE LA ONTOGENIA**

JOSÉ IGNACIO LLORENTE LÓPEZ

TESIS DOCTORAL

GRANADA, 2006

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: José Ignacio Ilorente López
D.L.: Gr. 604 - 2005
ISBN: 84-338-3789-3

ANÁLISIS HISTO-ENZIMÁTICO EN EL DIGESTIVO DE *A. naccarii*, Bonaparte (1836): EVOLUCIÓN DURANTE LA ONTOGENIA

Memoria para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas presentada por
el licenciado

D. José Ignacio Llorente López

DIRECTORES DEL TRABAJO

Dr. Ramón Carmona Martos
Prof. Titular Dpto. Biología
Celular Universidad de Granada

Dra. M^a del Valle Ostos Garrido
Prof. Titular Dpto. Biología
Celular Universidad de Granada

Dra. Ana Sanz Rus
Prof. Titular Dpto. Biología
Animal Universidad de Granada

ASPIRANTE

Ldo. José Ignacio Llorente López

Dña. M^a del Valle Ostos Garrido y D. Ramón Carmona Martos, Profesores titulares del Departamento de Biología Celular de la Universidad de Granada y Dña. Ana Sanz Rus, Profesora Titular del Departamento de Biología Animal de la Universidad de Granada

CERTIFICAN:

Que el trabajo de investigación que se presenta en esta Memoria, titulado:

“Estudio Histo-Enzimático en el digestivo de *Acipenser naccarii* Bonaparte (1836): Evolución durante la ontogenia”

Ha sido realizado en los Departamentos de Biología Celular y Biología Animal de la Universidad de Granada, bajo nuestra dirección por el Licenciado D. José Ignacio Llorente López, y constituye su Tesis Doctoral.

Con fecha _____ autorizamos su presentación en la Comisión de Doctorado de la Universidad de Granada.

Dr. Ramón Carmona Martos
Prof. Titular Dpto. Biología
Celular Universidad de Granada

Dra. M^a del Valle Ostos Garrido
Prof. Titular Dpto. Biología
Celular Universidad de Granada

Dra. Ana Sanz Rus
Prof. Titular Dpto. Biología
Animal Universidad de Granada

Los estudios histológicos y ultraestructurales que se recogen en la presente memoria se han llevado a cabo en el Departamento de Biología Celular de la Universidad de Granada gracias al apoyo económico del proyecto de investigación titulado "*Desarrollo de sistemas orgánicos implicados en la alimentación, la conducta y distribución interna en el esturión *Acipenser naccarii*. Aplicaciones a su cultivo*" AGL2000-0382-P4-05 del Ministerio de Ciencia y Tecnología.

Los análisis de actividades enzimáticas se realizaron en la Unidad de Fisiología Animal del Departamento de Biología Animal y Ecología de la Universidad de Granada con el soporte económico del proyecto de investigación titulado "*Estudio de diferentes Aspectos Fisiológicos e Histológicos en el esturión *Acipenser naccarii**" AGL2001-2984 del Ministerio de Ciencia y Tecnología.

Los ejemplares de esturión fueron mantenidos a lo largo de todo el estudio en las instalaciones de la Piscifactoría "Sierra Nevada", en Riofrío (Granada).

Asimismo, algunos de los resultados recogidos en esta memoria han sido presentados en:

- IX Congreso Nacional de Acuicultura. Cádiz, 2003.
- X Congreso Nacional de Acuicultura. Gandía (Valencia), 2005.
- 1st International Workshop on Biology, Conservation and Sustainable Development of Sturgeon in Southern Europe. Granada, 2005.

Ahora que veo el fin del camino, me gustaría reconocer la labor de todas las personas que han participado de una forma u otra en esta tesis doctoral.

En primer lugar me gustaría dar las gracias a mis directores, los Doctores María del Valle Ostos Garrido, Ana Sanz Rus y Ramón Carmona Martos, que me dieran la oportunidad de cumplir un sueño. Gracias por vuestra labor y confianza a lo largo de esta Tesis.

Estoy agradecido al Doctor Manuel García Gallego por su dedicación y gran interés en este trabajo, así como por su compañía y amistad durante estos cuatro años. Muchas gracias por resolver gran parte de mis “problemas”.

Doy las gracias a la Doctora Ruth Calvente por su desinteresada colaboración en esta tesis doctoral y su cordial ayuda con las “preguntas” del día a día, pero ante todo por su calidad personal y por la gran amistad que me ha brindado.

He de mencionar al Doctor Alberto Domezain y a Julio Domezain y agradecerles su inestimable labor, desde el departamento de I+D de la Piscifactoría “Sierra Nevada”, en la cría y mantenimiento de los ejemplares *Acipenser naccarii*.

He de agradecer además la labor de las Doctoras M^a del Carmen Hidalgo y Amalia E. Morales en el asesoramiento y puesta en marcha de los estudios de actividades enzimáticas. Gracias por vuestro apoyo durante estos cuatro años.

Me gustaría reconocer al personal del Departamento de Biología Celular de la Universidad de Granada su compañía y amistad a lo largo de todos estos años. A mi compañera de laboratorio Susana Camacho, gracias por todo lo que he aprendido de ti. Gracias por ser tú misma.

También agradezco al personal de la Unidad de Fisiología Animal de la Universidad de Granada, su compañía y colaboración desde el primer momento. Estoy especialmente agradecido a las doctoras Cristina Trenzado y Rosa M^a Martínez, y a las “aspirantes a grado de Doctor” Amalia y Miriam, por la comprensión y cariño que me han brindado.

A los técnicos de C.I.C de la Universidad de Granada, Conchi, Juande, David; gracias por brindarme vuestra experiencia y saber hacer en los estudios ultraestructurales, pero también por vuestro ánimo.

Por supuesto he de mencionar al “Clan Precario”, sin cuyo apoyo logístico y psicológico nada hubiera sido posible. Fernando Rodríguez, tu optimismo y amistad son muy importantes para mí. Gracias por mostrarme el otro camino de la “vida universitaria”. Mohamed Tassi: العالم يستحق أناس مثلك ، لن أنساك أبدا أخي... .

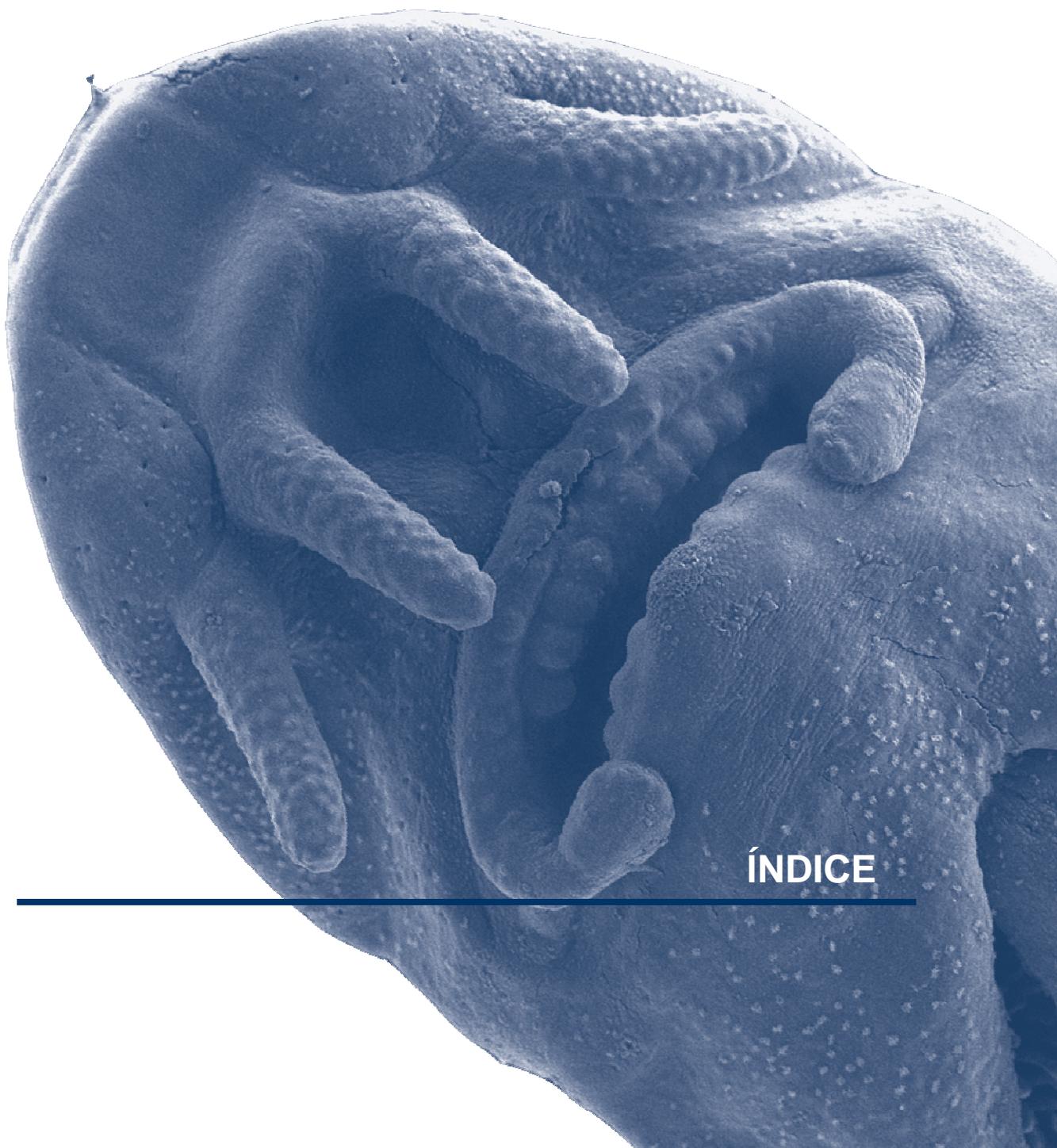
Me acuerdo de los amigos que han conseguido demostrarme de forma empírica, que “las cosas urgentes no siempre son las más importantes”. Juanjo, Manuel, Fernando, Juan, David, Jose, Eduardo y Salvador; muchísimas gracias. Muchas gracias por vuestra sincera amistad y por mostrarme la cara divertida de la vida.

No puedo olvidarme de la otra persona “sufridora” de esta tesis. Laura, gracias por tu paciencia y resignación, por valorar mi trabajo tanto o más que yo y por mostrarme la verdadera cara de la realidad; pero sobre todo, he de agradecerte que pintes una sonrisa en mi cara cada día.

Por último me gustaría mencionar a mi “Indiana Jones” particular y a mis padres, por su ánimo, apoyo, cariño, confianza, consejo,...; en fin, no tengo palabras para expresar lo agradecido que os estoy por lo mucho que me habéis dado. Mil gracias por enseñarme que lo más importante en la vida de una persona es estar rodeado de buena gente.

A mis padres

A Laura



ÍNDICE

I. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO	7
II. INTRODUCCIÓN	13
1. Introducción	15
1.1. Localización taxonómica de los Acipenseriformes	17
1.2. Características de los Acipenseriformes	20
1.3. <i>Acipenser naccarii</i> , Bonaparte 1836	21
2. El tracto digestivo de los peces	24
2.1. Región bucofaríngea	26
2.2. Esófago	31
2.3. Estómago	32
2.4. Ciegos Pilóricos	35
2.5. Intestino Post-pilórico	36
2.6. Glándulas anejas	41
2.6.1. Hígado y Vesícula Biliar	41
2.6.2. Páncreas	42
3. El tracto digestivo de Acipenseriformes	42
3.1. Esófago	43
3.2. Porción gástrica	44
3.3. Intestino	45
3.3.1. Ciegos pilóricos	47
3.3.2. Intestino anterior o pilórico	47
3.3.3. Válvula espiral	48
3.3.4. Recto	49
4. Características digestivas de los peces	49
4.1. La digestión en la boca y el esófago	50
4.2. La digestión en el estómago	51
4.2.1. Secreción de ácido	51
4.2.2. Enzimas proteolíticos	51
4.2.3. Enzimas no proteolíticos	52
4.3. La digestión en el intestino y lo ciegos pilóricos	52

4.3.1. Enzimas de origen pancreático.....	53
4.3.2. Enzimas intestinales	56
4.4. Otros enzimas digestivos	56
5. Características digestivas de los Acipenseriformes	57
6. Absorción de nutrientes en peces	60
6.1. Absorción de carbohidratos	60
6.2. Absorción de aminoácidos y proteínas	61
6.3. Absorción de grasas	63
7. Desarrollo ontogénico del tracto gastrointestinal en peces	66
7.1. Período Lecitotrófico	70
7.2. Período Lecito-Exotrófico	73
7.3. Período Exotrófico.....	75
8. Desarrollo ontogénico del tracto gastrointestinal en Acipenseriformes	76
8.1. Periodo Lecitotrófico	78
8.2. Periodo Lecito-Exotrófico	81
8.3. Periodo Exotrófico	82
III. MATERIAL Y MÉTODOS	85
1. Animales de experimentación	87
2. Diseño experimental	87
3. Microscopía óptica	89
3.1. Fijación	89
3.2. Inclusión	89
3.3. Corte y montado de las piezas	90
3.4. Tinción	91
3.4.1. Hematoxilina y Eosina	92
3.4.2. Reacción del Ácido peryódico de Schiff (PAS)	93
3.4.3. Azul Alcían pH 2,5	94
3.4.4. Azul Alcían pH 1	95
3.4.5. PAS- Azul Alcían pH 2,5	95
4. Microscopía Electrónica	96

4.1. Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)	97
4.2. Microscopía eElectrónica de Barrido de Emisión de Campo (FESEM)	98
5. Análisis Enzimáticos	99
5.1. Preparación de las muestras	99
5.2. Determinación de la actividad proteolítica total	100
5.3. Determinación de la actividad α -amilasa	102
5.4. Determinación del contenido proteico	104
IV. RESULTADOS	107
<u>Estudios Histológicos y Ultraestructurales</u>	109
1. Periodo Lecitotrófico	111
1.1. Eclosión	111
1.2. Fase de Embrión Libre	121
➤ Cavidad orofaríngea	123
➤ Esófago	130
➤ Estómago	132
➤ Intestino anterior y medio	142
➤ Ciegos pilóricos	148
➤ Intestino posterior o Válvula espiral	150
➤ Recto	159
➤ Glándulas anejas	161
1.3. Periodo Lecito-Exotrófico	165
➤ Cavidad orofaríngea	167
➤ Esófago	170
➤ Estómago	170
➤ Intestino anterior, medio y válvula espiral	172
➤ Glándulas anejas	174
1.4. Periodo Exotrófico	177
➤ Cavidad orofaríngea	178
➤ Esófago	179
➤ Estómago	181
➤ Intestino anterior, medio y ciegos pilóricos	188

➤ Intestino posterior o Válvula espiral	196
➤ Recto	204
➤ Glándulas anejas	205
<u>Actividades enzimáticas</u>	213
1. Actividad específica α-amilásica	215
2. Actividad Proteásica	217
V. DISCUSIÓN	222
1. Cavidad Orofaríngea	228
2. Esófago	231
3. Estómago	233
4. Intestino anterior y medio	239
5. Ciegos Pilóricos	245
6. Intestino posterior o Válvula espiral	246
7. Hígado	252
8. Páncreas	253
VI. CONCLUSIONES	257
VI. BIBLIOGRAFÍA	261



I. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

A pesar de que la producción de la pesca extractiva alcanzó sus máximos niveles a finales de los años 90 y que desde entonces fluctúa en torno al mismo nivel (hecho que indica que los caladeros se están explotando cerca de su producción máxima sostenible), la demanda mundial de productos pesqueros se ha duplicado en las últimas décadas, tanto por el incremento de la población como por un aumento en el consumo "*per capita*" de pescado, que ha pasado de 11 Kg. por persona y año en 1970 a casi 16 Kg. en 2000. Es por esto por lo que la Organización Mundial para la Alimentación y la Agricultura de la UNESCO (FAO) considera que, hoy en día, la acuicultura representa la única alternativa para mantener un consumo de pescados y mariscos en el ámbito mundial ya que la mayoría de los caladeros se encuentran sobreexplotados y, algunas especies, al borde de la extinción.

En los últimos años el sector acuícola ha registrado grandes adelantos tecnológicos, cuyo potencial para el crecimiento económico y para incrementar la seguridad alimentaria ha sido reconocido por la FAO en su Declaración y Estrategia de Bangkok, que subraya que debe continuarse con su desarrollo.

El rápido crecimiento que la producción de determinadas especies (como salmón, trucha, tilapia, lubina, dorada, etc.) alcanzó a mediados de los años 90, junto con la saturación del mercado para estas especies, ha desencadenado que actualmente, una de las prioridades más importantes en el desarrollo de la acuicultura sea la diversificación de especies (aumento del catálogo de las mismas susceptibles de ser producidas de forma regular en cantidades apreciables con el fin de aumentar la variedad de la oferta en el mercado), lo que ha provocado que se emprendan de forma generalizada numerosas actuaciones dirigidas a conocer las posibilidades de cultivo de un notablemente elevado número de peces.

Los esturiones son un grupo de especies consideradas como “fósiles vivientes” debido a su antigüedad filogenética y que han desaparecido de numerosos ríos en los que vivían en el pasado (como el Ebro y el Guadalquivir) debido a la sobrepesca, las dificultades que constituyen las presas para las migraciones reproductivas y la contaminación de hábitats. También poseen una gran importancia desde el punto de vista económico, ya que son muy apreciados tanto por la alta calidad nutricional de su carne (debido a la concentración de aminoácidos esenciales y ácidos grasos poliinsaturados) como por el alto precio que sus huevos (el caviar) alcanzan en el mercado (Boglione y col., 1999), hecho que llevó a iniciar la posibilidad de su cultivo a mediados del siglo XX en la antigua URSS.

En Europa, los primeros intentos de cultivo se produjeron en Francia, con la especie *Acipenser sturio*. Actualmente se dispone de un único y escaso stock en el Centro de Investigación del CEMAGREF en Burdeos con el que se está llevando a cabo un programa de cría en cautividad y recuperación de la especie, que avanza muy lentamente. En cambio, *Acipenser naccarii* ha demostrado sus excelentes posibilidades para el cultivo en agua dulce tanto en Italia como en España, países en los que la especie es autóctona (Garrido-Ramos y col., 2004).

En España durante más de 30 años existió una próspera fábrica de caviar en Coria del Río (Sevilla), pero se cerró debido a la falta de capturas de ejemplares salvajes; desde el año 1992 sólo se han producido capturas esporádicas de esta especie en la Península Ibérica. En la actualidad existe una empresa dedicada al cultivo de la especie *Acipenser naccarii*, la Piscifactoría Sierra Nevada SL., situada en Riofrío (Granada) que posee el mayor stock de esta especie a nivel mundial. Sin embargo y a pesar de los esfuerzos, aún existen aspectos incipientes en la tecnología de cultivo, sobre todo en lo que respecta a la obtención de juveniles.

El principal problema a la hora de establecer el cultivo integral de una especie de pez es el de la alimentación durante las primeras fases de vida, especialmente en aquellas donde el sistema digestivo no es completamente funcional. Además, la tendencia actual en la acuicultura pretende desligar tan pronto como sea posible la alimentación durante las primeras fases de vida de la producción de presas vivas que sirvan de alimento, obteniendo al mismo tiempo una gran tasa de supervivencia de los animales. Por tanto, parece claro que una de las líneas de investigación más importantes en piscicultura sea la de conseguir dietas inertes adecuadas que permitan la alimentación artificial de una determinada especie desde el inicio de su alimentación exógena. Pero para llegar a este punto es indispensable conocer las características estructurales y funcionales del tracto digestivo a lo largo de la vida de la especie mediante la realización de trabajos multidisciplinares que comprendan:

- Estudios fisiológicos: Determinaciones del pH de los distintos segmentos del canal digestivo, evolución de las capacidades digestivas a lo largo del crecimiento, papeles relativos de los enzimas endógenos y exógenos, etc. (Alarcón y col., 1998; Hidalgo y col., 1999; Bairagi y col., 2002).
- Estudios morfológicos: Se incluyen aquí trabajos histológicos e histoquímicos. A la hora de determinar la eficacia en el uso de dietas inertes en las primeras formas de vida de los peces, los estudios más usuales incluyen el examen del aparato sensorial (botones gustativos), del canal alimentario (especialmente los epitelios), el hígado y el páncreas (Bisbal & Bengston, 1995; Calzada y col., 1998; Crespo y col., 2001).

El presente trabajo se centra en el análisis Histo-Enzimático en el digestivo de *Acipenser naccarii* Bonaparte 1836 durante la ontogenia, ya que el estudio de las características morfológicas y funcionales del tracto digestivo a lo largo

del desarrollo ontogénico de esta especie constituye un paso previo y necesario a la hora del establecimiento de las capacidades digestivas durante los primeros fases de vida. Estos resultados asistirán a futuras investigaciones centradas en el esclarecimiento de las estructuras implicadas en la digestión de los embriones a lo largo de su desarrollo, así como los requerimientos nutricionales y los hábitos alimenticios, que a su vez redundarán en una mejora de las técnicas de cultivo capaz de maximizar la producción y rentabilidad. Además, las posibles mejoras en el protocolo de cría y engorde, en un futuro próximo, permitirían además disponer de un stock más o menos constante a la hora de posibles reintroducciones en el medio natural.



II. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

Thurman y Webber (1984) definen los peces como vertebrados acuáticos que poseen aletas con un número variable de elementos esqueléticos llamados radios y que utilizan branquias para obtener oxígeno del agua. Su vida se desarrolla en el medio acuático y tienen una alta capacidad de adaptación a las diferentes condiciones de los diversos hábitats en los que viven, hecho que se ha traducido en un alto éxito evolutivo. De esta forma en la actualidad, el 50% de las especies de vertebrados que existen son peces, frente a un 23% de aves y un 12% de mamíferos (Smith, 1980). De este porcentaje de peces, las dos clases principales son los Condríctios y los Osteíctios.

Los Condríctios, o peces cartilagosos, son vertebrados de aspecto pisciforme, cuyo esqueleto está formado por cartílago, en ocasiones parcialmente calcificado. La boca de estos carnívoros es ínfera con mandíbula hiolística (no unida al cráneo), lo que les permite que la apertura sea máxima. Sus aletas son pares, gruesas, carnosas y no las pueden plegar. Están recubiertos de dentículos dérmicos o escamas placoideas y pueden presentar espiráculos bien desarrollados. Son esencialmente marinos y pueblan los mares desde el Devónico medio (Arnason y *col.*, 2001).

Los Osteíctios se caracterizan por una progresiva osificación de su esqueleto que afecta simultáneamente al cráneo, a las vértebras y a las extremidades. Se diferencian de los Condríctios, además, porque tienen las branquias protegidas por un opérculo óseo. El cuerpo está recubierto por escamas cosmoideas, ganoideas o cicloideas, también de origen dérmico. Se distribuyen en dos subclases: Sarcopterigios y Actinopterigios, que se diferencian en la estructura de sus aletas pares.

La subclase *Sarcopterygii* es extremadamente antigua en su origen, ya que los primeros restos aparecen en estratos pertenecientes al Devónico más bajo (alrededor de 390 millones de años). Sólo dos grupos, los Celacantos y los Dipnoos (peces pulmonados), han llegado a nuestros días (Bruno & Maugeri, 1995).

Los Actinopterygios aparecieron originalmente en el Devónico, pero no florecieron hasta bien entrado el Carbonífero (aproximadamente unos 360 millones de años) (Figura 1). Son el grupo dominante de los peces, constituyendo el 95 % del número total de especies, y están caracterizados por la presencia de una única aleta dorsal y una aleta caudal que primitivamente era completamente heterocerca y que, posteriormente, se hendió profundamente para transformarse en homocerca. Según Benton (2004) podemos realizar dos divisiones dentro de los Actinopterygios: los Acipenseriformes (esturiones y peces espátula) y los Neopterygios. La subclase *Neopterygii* incluye a los Holósteos (Lepisosteiformes y Amiiformes) y a los Teleósteos, donde se encuadran la mayoría de los peces actuales (Figura 2).

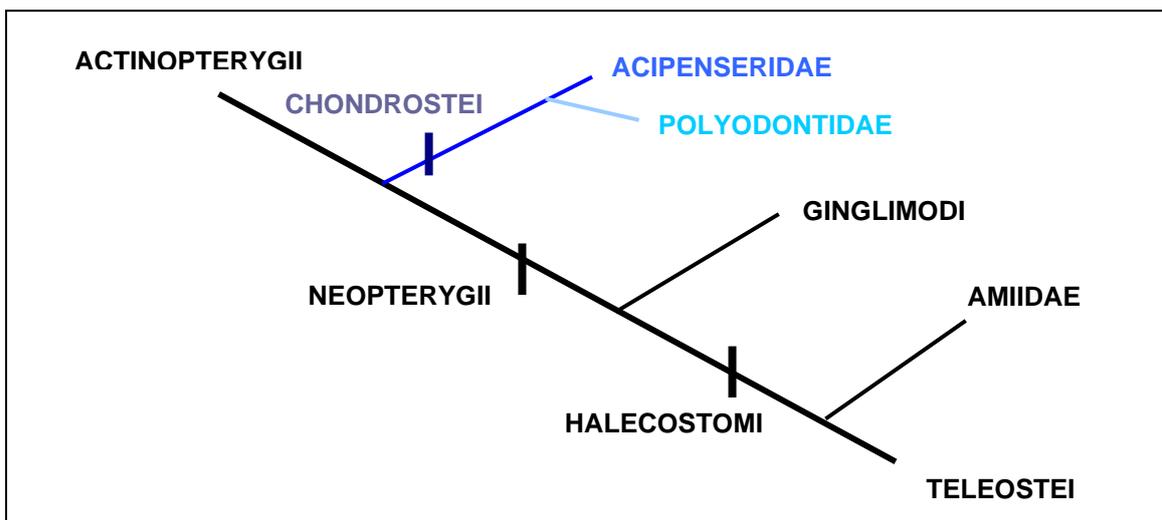


Figura 1: Tendencias evolutivas dentro del grupo de los Actinopterygios

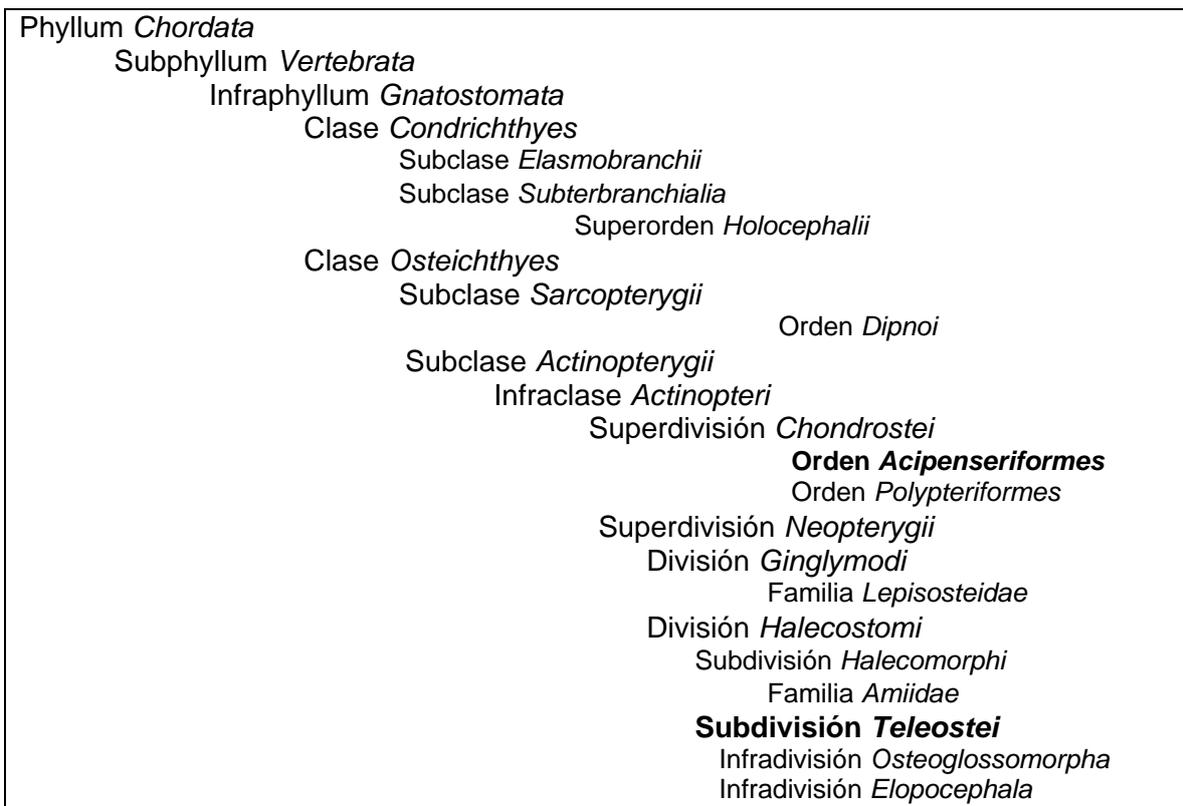


Figura 2: Clasificación de los peces según Benton (2004)

1.1. Localización taxonómica de los Acipenseriformes

Los Acipenseriformes han aparecido en diferentes lugares de la sistemática de peces a lo largo de la historia. Originalmente se emparentaron con los tiburones, idea que se dio por errónea tras diferentes análisis morfológicos y taxonómicos; actualmente se afirma que constituyen uno de los antecesores de los peces óseos actuales. Contrariamente a los Neopterigios, que gradualmente fueron desarrollando escamas menos pesadas y huesos más ligeros, los Acipenséridos perdieron parte de sus pesadas escamas ganoideas (en algunos casos completamente) y eliminaron el proceso de osificación de su esqueleto cartilaginoso. Los individuos más antiguos siguieron manteniendo diferentes centros de osificación endocondral, por lo que podemos suponer que

la osificación del cartílago simplemente fue relegada a un segundo plano, en favor de otros mecanismos adaptativos.

A pesar de lo anterior, hay que decir que los Acipenseriformes, como grupo, se caracterizan por poseer una serie de características ancestrales que sugieren una posición basal dentro de los Osteíctios más recientes. Estos caracteres son:

- Escamas ganoideas pesadas.
- Aleta caudal heterocerca.
- Esqueleto cartilaginoso: Se piensa que este es un carácter secundario en las formas actuales (no homólogo al de los Condríctios), ya que los fósiles del grupo indican la presencia de un esqueleto óseo.
- Presencia de espiráculo.
- Los radios de las aletas son más numerosos que sus soportes basales.

Tras muchos estudios, tanto la posición filogenética como la sistemática del grupo seguían siendo inciertas, hasta que Bemis y col. (1997) propusieron una clasificación basada en caracteres morfológicos, osteológicos y genéticos que define mejor que ninguna de las anteriores la filogenia y sistemática del grupo. Esta clasificación defiende que la familia *Acipenseridae* está formada actualmente por unas 25 especies, de las cuales 19 pertenecen a la subclase *Acipenserinae* y las otras 6 a la Tribu *Scaphirhynchinae* (Birstein & Bemis, 1997), y que con las dos especies actuales de peces espátula (*Polyodon spathula* y *Psephurus gladius*) componen el orden Acipenseriformes, el grupo más numeroso de “peces fósiles vivientes” (Gardiner, 1984) (Figura 3).

Orden Acipenseriformes	Familia Polyodontidae	<i>Psephurus gladius</i>				
		<i>Polyodon spathula</i>				
	Familia Acipenseridae	Subfamilia Husinae		<i>Huso huso</i>		
				<i>Huso dauricus</i>		
		Subfamilia Acipenserinae	Tribu Scaphirhynchini		<i>Scaphirhynchus albus</i>	
					<i>Scaphirhynchus platyrhynchus</i>	
					<i>Scaphirhynchus suttkusi</i>	
			Tribu Acipenserini		<i>Acipenser sturio</i>	
				<i>Acipenser oxyrinchus</i>		
				<i>Acipenser brevirostrum</i>		
	<i>Acipenser fulvescens</i>					
	<i>Acipenser transmontanus</i>					
		<i>Acipenser medirostris</i>				
		<i>Acipenser sinensis</i>				
		<i>Acipenser schrenckii</i>				
		<i>Acipenser mikadoi</i>				
		<i>Acipenser gueldenstaedtii</i>				
		<i>Acipenser stellatus</i>				
		<i>Acipenser ruthenus</i>				
		<i>Acipenser dabryanus</i>				
		<i>Acipenser nudiventris</i>				
		<i>Acipenser baerii</i>				
		<i>Acipenser persicus</i>				
		<i>Acipenser naccarii</i>				

Figura 3: Clasificación de los Acipenseriformes según Bemis, Findeis y Grande (1997).

1.2. Características de los Acipenseriformes

Según Bemis y col. (1997), los esturiones aparecieron en la tierra hace unos 200-250 millones de años y consiguieron un gran éxito evolutivo. En su evolución consiguieron adaptarse a modos de vida muy diferentes, ya que pueden habitar tanto aguas dulces, como salobres o marinas (restringiéndose siempre a la plataforma continental). Se encuentran distribuidos en las regiones semifrías y templadas del hemisferio septentrional, estando también presentes en el Mediterráneo (occidental y centro septentrional), en el Mar Caspio, Mar Negro y en los ríos principales que en ellos desembocan. Esta espaciada distribución denota la importancia que en el pasado tuvo un grupo que actualmente está en vías de desaparición (Billard & Lecointre, 2001).

Su aspecto general es escualiforme, con el hocico más o menos alargado y con cuatro barbillones en la parte inferior. La boca es protráctil (tubiforme), en posición ventral y sin dientes en los estados adultos. La aleta caudal es heterocerca (el lóbulo superior es mucho más largo que el inferior); el cuerpo es macizo y alargado, de sección pentagonal o subcilíndrica, cubierto de piel desnuda y con cinco series longitudinales de escudos óseos:

- Una serie a lo largo del dorso del animal.
- Dos series en los flancos.
- Dos series ventrales.

Todas las especies pasan por una etapa carnívora en su vida. Los embriones libres son zooplantívoros pelágicos (Baranova & Miroshinichenko, 1969) aunque los hábitos alimenticios de juveniles y adultos son más amplios, oscilando desde la filtración (género *Polyodon*) hasta la ictiofagia (*Huso huso*).

Se piensa que la mayoría de los adultos son carnívoros bentónicos oportunistas estando su dieta compuesta por moluscos, crustáceos, embriones de insectos, invertebrados bentónicos y, ocasionalmente de peces (Buddington & Christofferson, 1985). La pubertad suele ocurrir tarde en todas las especies, oscilando entre los 5 y los 30 años, no siendo el ciclo reproductor de carácter anual. Los adultos continúan creciendo durante toda su vida y algunas especies como el Beluga (*Huso huso*) alcanzan los 100 años de edad y algo más de 1000 Kg. de peso. Las poblaciones naturales han sufrido enormes descensos en los últimos años debido principalmente al impacto antropogénico, estando actualmente la mayoría de las especies en peligro y con necesidad de medidas de protección según la UICN (World Conservation Union, 1996). A pesar de la instauración de diferentes medidas de control como la reducción en el número de capturas, la restauración de hábitats o la inclusión de todas las especies en el catálogo CITES (Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Flora and Fauna, 2005), se hace necesaria la elaboración de diferentes estudios multidisciplinarios capaces de aumentar los conocimientos sobre este grupo de peces.

1.3. *Acipenser naccarii*, Bonaparte 1836.

Las características que diferencian a esta especie de los demás esturiones según Domezain (2003) son:

- La boca es transversa, relativamente grande y ligeramente curva en los extremos; la anchura interna máxima de la boca no cabe dos veces entre esta y la punta del hocico.
- El hocico es corto y con el extremo redondeado y su longitud no supera un tercio de la longitud del cuerpo.
- El labio inferior es continuo con una acanaladura en el centro.

- Poseen cinco filas de escudetes:
 - Dorsales: entre 10 y 14 escudetes (los de la zona media son más profundos y generalmente más grandes que los de la parte frontal).
 - Laterales: el número de escudetes varía de 32 a 42 en cada lado.
 - Zona ventral: entre 8 y 11 escudetes a cada lado, sin placas más pequeñas entre las filas dorsales y laterales.
- La aleta dorsal tiene entre 36 y 48 radios mientras que la anal varía de los 24 a los 31.
- La parte posterior del cuerpo es marrón-olivácea, los flancos más claros y la parte ventral blanquecina.

El peso de los ejemplares adultos de *Acipenser naccarii* está normalmente entre los 30 y los 80 Kg. Los machos suelen ser algo más pequeños que las hembras de la misma edad y no presentan un dimorfismo sexual evidente (Domezain, 2003). Es una especie que se reproduce en agua dulce pero que utiliza el mar para su crecimiento y engorde. Se alimenta de invertebrados bentónicos (quironómidos, oligoquetos y tubificidos) aunque también consumen restos de animales, vegetales y semillas (Soriguer y col., 2002). Sus hábitos son poco conocidos, pero se sabe que en sus migraciones reproductoras entraban en el Guadalquivir entre febrero y mayo.

En los últimos años, diferentes estudios (Garrido-Ramos y col., 1997; Hernando y col., 1999; Domezain, 2003) han puesto en duda la idea original de que *A. naccarii* se distribuyera exclusivamente por el Mar Adriático (Tortonese, 1989). Hernando y col., (1999), mediante el análisis de diferentes aspectos morfológicos y genéticos de distintos ejemplares de esturión pertenecientes a varios museos europeos, confirma la existencia de un área histórica de distribución para *A. naccarii* mucho más amplia que va desde el Mar Adriático,

pasando por toda la costa mediterránea europea, hasta llegar casi al límite entre Portugal y Galicia. Si a esta conclusión anterior le unimos el hecho de que diferentes autores citaran al *A. naccarii* en los ríos de la Península Ibérica después de 1869 y de que existen datos de capturas en Niza, podemos asumir que *A. naccarii* fue una especie autóctona de la Península ibérica en el pasado, y que incluso podría haber constituido una especie común en bastantes ríos del sur europeo (Hernando et al., 1999) (Figura 4).

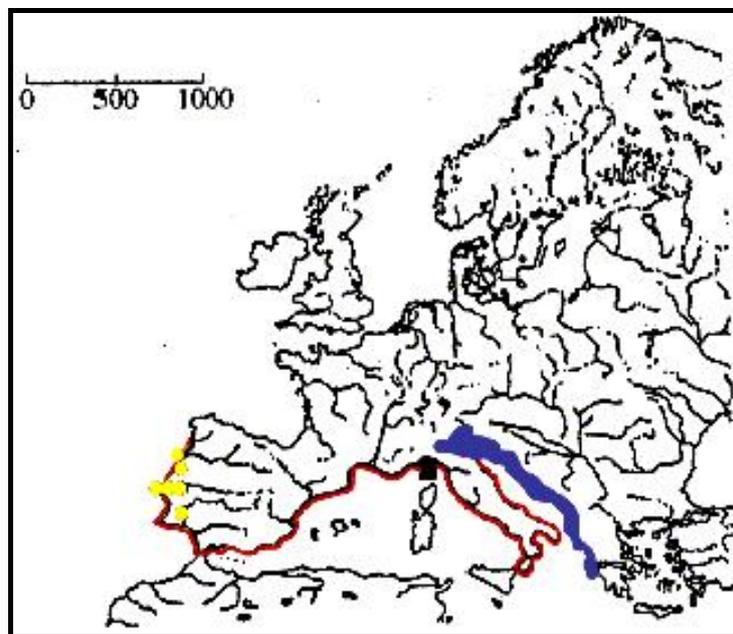


Figura 4: Área de distribución histórica de *A. naccarii*. La línea azul representa la zona propuesta por Tortonese en 1989; la línea roja, la distribución propuesta por Hernando y col., (1999). Los círculos amarillos indican los puntos de captura citados en literatura. Modificado de *Hernando y col. (1999)*

Robles y col. (2004) tras el estudio de diferentes familias de secuencias de ADN satélites de la familia *Acipenseridae* concluyeron de forma inequívoca que el esturión *Acipenser naccarii* es una especie autóctona de la Península Ibérica.

Acipenser naccarii es una especie catalogada como en “serio riesgo de extinción” y está incluida entre la “fauna estrictamente protegida” de la Convención de Berna; así mismo, su comercio internacional aparece restringido desde 1998 (Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Flora and Fauna, CITES II, 2005). En Italia, donde como hemos comentado la especie está aún presente, el dramático declive que se registró en las capturas anuales a finales del siglo XX (de 2000 Kg./año en los años 70 a sólo 50 Kg. en 1993) arroja serias dudas sobre el estado de salud y el número de individuos de las poblaciones naturales (Martínez Álvarez, 2003). Los principales problemas que esta especie encuentra en el medio natural son la pérdida de calidad de los ecosistemas acuáticos, la construcción de embalses y la pesca furtiva (Rossi y col., 1991).

En España, la producción de esta especie para la obtención de caviar fue iniciada por la empresa Piscifactoría Sierra Nevada SL. en el año 1987. En el año 2004 se obtuvieron aproximadamente unos 1500 Kg. de caviar y se prevé duplicar esta cifra para el año 2005 (Domezain, 2003).

2. EL TRACTO DIGESTIVO DE LOS PECES

Es difícil definir un patrón estructural único cuando nos referimos al sistema gastrointestinal de los peces debido a la enorme variabilidad existente en los hábitos de vida (Grasse, 1977). A nivel general, puede describirse el tracto digestivo de los peces como una estructura tubular que comienza en la boca y termina en el ano. Normalmente se divide en una porción cefálica (boca y faringe) y una porción troncal. La porción troncal comienza en el esófago y se divide a su vez en dos segmentos principales:

- Segmento anterior o pre-pilórico. Comienza en el límite posterior de la cámara branquial e incluye el esófago y el estómago. En peces agastros como los Ciprínidos, el intestino anterior se compone de esófago y de parte de la porción intestinal (hasta el lugar de conexión con el conducto biliar) (Smith, 1980).
- Segmento posterior o post-pilórico. En algunos casos puede subdividirse en intestino medio e intestino posterior (Paniagua & Nistal, 1983). La delimitación entre las dos zonas es en la mayoría de los casos incierta o incluso inexistente; en cambio, otras veces el límite entre los dos compartimentos viene marcado por un espesamiento de la capa muscular, la existencia de una válvula o por un súbito aumento del diámetro (Smith, 1980).

En los peces, el tubo digestivo es un conducto hueco de diámetro variable que presenta una organización estructural similar a lo largo de toda su longitud. Desde el punto de vista histológico, la pared del tubo digestivo está formada por 4 capas distintas cuya disposición, desde la luz del conducto hacia fuera, es:

- Mucosa: Consiste en un epitelio de revestimiento y una capa de tejido conjuntivo subyacente denominada lámina propia. En algunas especies de peces, la transición entre la lámina propia de la mucosa y la submucosa no es clara, pues no existe *muscularis mucosae* (Ostos Garrido y col., 1993). El epitelio difiere en las distintas porciones del tubo digestivo ya que se adapta a las funciones específicas de cada segmento; así podemos distinguir un epitelio estratificado en el esófago y otro cilíndrico simple en el estómago y en el intestino.
- Submucosa: Formada por tejido conjuntivo denso no modelado y vasos sanguíneos de gran calibre que envían ramificaciones a la mucosa, la muscular propia y la serosa, así como vasos linfáticos y plexos nerviosos.

En ciertas localizaciones de la submucosa se encuentran glándulas, cuya presencia suele contribuir a identificar el segmento o región específicos del tubo digestivo en los cortes histológicos.

- **Muscular propia:** En la mayor parte del tubo digestivo consiste en dos capas concéntricas relativamente gruesas de músculo liso. Las células de la capa interna adoptan una orientación circular mientras que las de la capa externa se orientan longitudinalmente. Las contracciones de la capa circular interna provocan una constricción en el diámetro del tubo digestivo y favorecen la mezcla de su contenido. Las contracciones de la capa muscular longitudinal externa favorecen el movimiento del bolo alimenticio a lo largo del sistema digestivo.
- **Serosa:** Es una membrana compuesta por mesotelio y una pequeña cantidad de tejido conjuntivo. En la serosa podemos encontrar vasos sanguíneos de gran tamaño, vasos linfáticos y troncos nerviosos. En la faringe, esófago y recto no existe una túnica serosa como tal, sino una túnica adventicia constituida sólo por tejido conjuntivo laxo en el que se pueden encontrar algunos vasos y nervios.

2.1. Región bucofaríngea

Tanto la posición como el tamaño de la boca guardan una estrecha relación con la localización y tamaño del alimento en los peces. En aquellas especies que se alimentan en el centro de la columna de agua en la que viven generalmente suele estar situada en posición medial, paralela al eje longitudinal del cuerpo, mientras que en las especies que toman el alimento en capas inferiores la boca adquiere una posición ínfera (situada en la parte inferior del hocico), como es el caso de algunas especies de la familia *Cobitidae*. En cambio, en aquellos peces depredadores de aguas superficiales o en los filtradores de plancton, la posición de la boca es súpera. El tamaño relativo de la boca parece depender del tamaño del alimento ingerido; así, las

bocas de mayor tamaño corresponden a los peces depredadores carnívoros (Alev, 1963) (Figura 5).

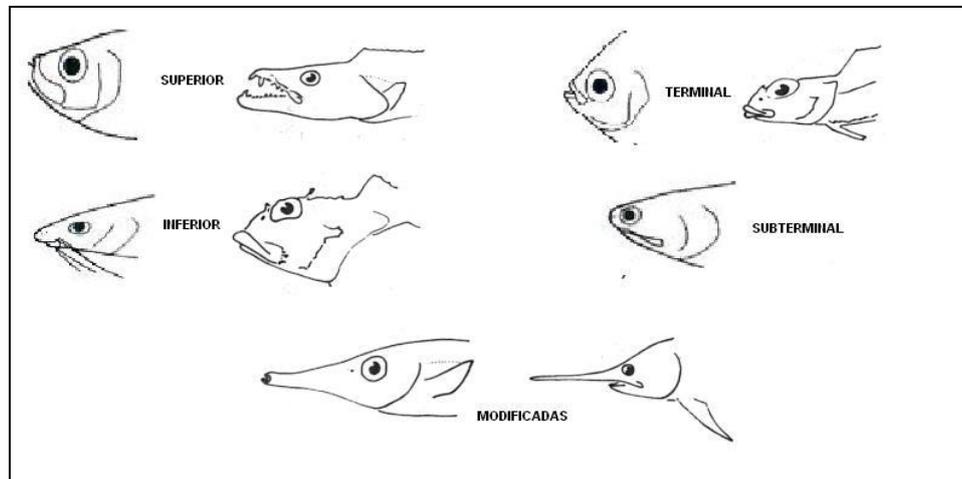


Figura 5: Diferentes estructuras de la boca en peces.

En muchos casos la boca puede sobresalir hacia adelante, de forma que su longitud llega a suponer entre un 5 y un 25 % de la longitud total de la cabeza. Mediante esta especialización del aparato bucal se facilita la captura de presas y la succión del alimento del fondo, permitiendo además un movimiento hidrodinámico cuando la boca se retrae.

El epitelio que tapiza la cavidad bucofaríngea de los peces es de tipo estratificado con botones gustativos, dientes y células mucosas:

- **Botones gustativos:** En peces, al igual que ocurre en otros vertebrados, los botones gustativos son los órganos sensitivos periféricos del sistema gustativo. Se encuentran en el epitelio de la cavidad orofaríngeo-branquial y en muchas especies se extienden por la epidermis de los labios, barbas – en caso de existir - y más raramente por toda la superficie corporal. Cuando

los botones gustativos están maduros tienen forma de pera y contienen células epiteliales especializadas de diferentes tipos: células claras y oscuras que constituyen el epitelio sensorial y células basales que entre otras funciones podrían ser mecanorreceptores (Jakubowsky & Whitear, 1990; Reutter & Will, 1993; Roper, 1993). Se asientan en una pequeña papila constituida por el tejido conjuntivo subyacente.

- Estructuras dentarias: Los peces tienen tres clases de dientes: mandibulares, bucales y faríngeos (Huysseune y col., 2002). Los salmónidos y los depredadores más activos poseen fuertes mandíbulas con dientes puntiagudos en ellas, que les confieren la capacidad de poder morder y capturar a sus presas. Otros peces que se alimentan de invertebrados o que arrancan su alimento de rocas (Género *Plecostomus*) poseen pequeños dientes mandibulares y la superficie labial modificada, de forma que se hacen mucho más ásperos y permiten arrancar el alimento. Algunos peces poseen dientes faríngeos que se sitúan sobre un quinto arco branquial modificado y que, por lo general, se disponen en estructuras que permiten cortar el alimento o su trituración y molienda. Existen también casos de carencia absoluta de dientes, como ocurre en los esturiones en etapas adultas, peces aguja y caballitos de mar.

En los peces, las estructuras dentarias no son auténticos dientes, sino formaciones odontoides originadas por brotes epiteliales que experimentan una intensa cornificación (Carrato & Fernández, 1987). De manera general, los dientes y las escamas de los vertebrados no mamíferos suelen tratarse como una unidad fundamental, el odontodo, cuya estructura es idéntica a la de la escama placodea de Condrictios (Sire & Huysseune, 2003). El odontodo está formado por una capa externa compuesta por un tejido calcificado que a menudo recibe el nombre de esmalte y una capa de dentina que rodea un espacio central denominado cavidad pulpar, cuya base se une al hueso dentario (Moya, 2003). Diferentes autores apuntan a que el origen del esmalte

en los peces sea mesodérmico, por lo que podríamos hablar de vitrodentina o durodentina y no de un verdadero esmalte de origen epidérmico; pero esta cuestión no está totalmente dilucidada, pues la formación de dientes sólo ha sido estudiada por ahora en un número reducido de especies (Sire & Huysseune, 2003).

Kakizawa & Meenakarn (2003) estudiaron la histogénesis de las estructuras dentarias en una especie de pez gato, (*Pangisianodon gigas*) y concluyeron que el desarrollo del diente se inicia con la evaginación del epitelio de la cavidad oral que consigue englobar cierta cantidad del tejido mesenquimático subyacente, formando la lámina dental y un pequeño núcleo de células mesenquimáticas bajo él. Posteriormente se produce un plegamiento del epitelio que adopta un aspecto parecido al de una campana y se forma el órgano del esmalte que rodea a la papila dental, constituida por mesénquima. En este momento, las células más superficiales de la papila dental se transforman en odontoblastos que comienzan a secretar la matriz orgánica de colágeno de la que se obtiene la dentina y que, una vez completamente formada, se mineraliza. Durante estos procesos, el ápice del diente se posiciona en las proximidades del epitelio oral y su base gradualmente se dirige hacia el hueso subyacente. El ápice del diente atraviesa el epitelio bucofaríngeo en el momento en el que la base de la estructura dentaria entra en contacto con el hueso subyacente (Figura 6).

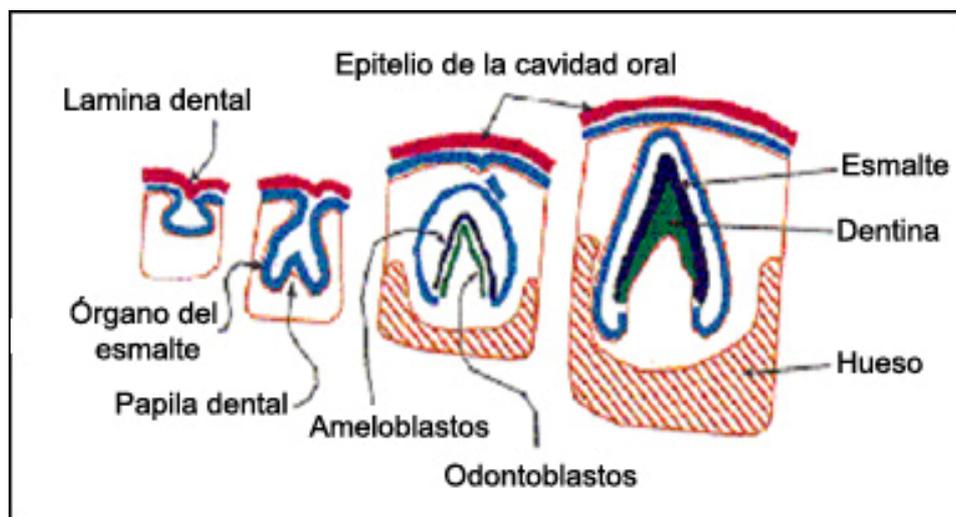


Figura 6: Representación esquemática de los diferentes estadios en el desarrollo de un diente en peces. Adaptado de Sasawa, 1995.

En la mayoría de los peces óseos las estructuras dentales son reemplazadas de forma constante a lo largo de toda su vida. Según Trapani (2001) los dientes funcionales son reabsorbidos y/o eliminados y substituidos por nuevos dientes.

No se poseen datos sobre la existencia de glándulas salivales en la boca de los peces óseos, pero sí de células mucosas que segregan un mucus responsable de:

- Favorecer la captura de pequeñas partículas alimentarias.
- Proteger frente al daño físico a la hora de la deglución (Reifel & Travill, 1978; Tibbets, 1997; Gisbert y *col.*, 1998)
- Contribuir al mantenimiento del equilibrio osmótico en peces marinos (Domeneghini y *col.*, 1998).

2.2. Esófago

Es una estructura tubular corta y musculosa que se sitúa entre la boca y el estómago. En especies predatoras la mucosa presenta un alto grado de plegamiento, lo que confiere al esófago una gran capacidad de distensión y permite la ingesta de presas de gran tamaño; además, la existencia de un esfínter esofágico bien desarrollado previene la entrada de agua desde el aparato branquial a la hora de la deglución (Fänge & Grove, 1979; Hopher, 1988).

La estructura histológica de su pared permite distinguir una mucosa con numerosos pliegues longitudinales limitados por un epitelio estratificado ciliado con células mucosas (Fishelson y col., 2004). En algunas especies de Condríctios y Condrósteos podemos observar además botones gustativos, cuya estructura y función varían según su posición topográfica y la especie. Diferentes autores señalan la presencia de acúmulos de tejido linfático en la submucosa, que en los Condríctios forma el llamado órgano de Leydig (Bertin, 1958; Fänge, 1968; Smith, 1980). La capa muscular propia tiene un gran grosor y está formada por fibras musculares inervadas por el nervio vago (Fänge & Grove, 1979).

Gisbert y col. (2004) confirman que en *Paralichthys californicus* la mucosa esofágica presenta dos regiones diferentes: una porción anterior revestida por un epitelio estratificado cúbico ciliado con algunas células caliciformes PAS-positivas y una porción posterior con un epitelio cuboidal simple ciliado que no presenta células mucosas. Según Gisbert y col. (1998) esta especialización del epitelio esofágico en peces está relacionada con los procesos de deglución, de forma que la síntesis de mucosustancias en la porción anterior facilitaría el paso del bolo alimenticio hacia la porción posterior, donde los cilios favorecen el tránsito del alimento al estómago. Tibbetts (1997), en un estudio de las

mucosustancias en un Hemirrámido (*A. sclerolepis*), propuso que el principal papel de las mucosustancias secretadas por las células mucosas esofágicas y faríngeas estaba relacionado con la formación de una capa lubricante en las paredes de estos conductos que previniera frente al daño físico producido a la hora de la deglución y que además, facilitara el paso del bolo alimenticio hacia el intestino.

En la porción más caudal del compartimento esofágico algunas especies como *Dorosoma cepedianum* presentan células glandulares con unas características ultraestructurales similares a las de las glándulas gástricas (Schmitz & Baker, 1969).

2.3. Estómago

El estómago es la porción más dilatada del tracto digestivo de los peces y posee una gran capacidad de distensión, lo que permite almacenar grandes cantidades de alimento (Hepher, 1988). Un gran número de peces, entre ellos los Ciprínidos, no tienen estómago ni por tanto, secreciones gástricas asociadas (Albrecht y col., 2001) pasando el alimento directamente al intestino donde comenzarían los procesos digestivos. La agastria suele estar asociada con hábitos micrófagos, por lo que las especies sin estómago suelen poseer estructuras trituradoras (dientes faríngeos) que permiten que el alimento pase de forma mucho más fragmentada al intestino.

El estómago de los peces generalmente es de tipo sigmoideo pudiendo presentar una gran variedad de formas (Grasse, 1977). Su conformación más simple es la fusiforme, donde pueden reconocerse un “cuerpo” y la región pilórica. También podemos encontrar animales que poseen un estómago muscular parecido al de las aves granívoras, cuyo cometido es compensar la

falta de dentición; este es el caso de los Acipenseriformes y la mayoría de los peces herbívoros como los mágiles, silúridos, algunos cíclidos, etc. (Figura 7).

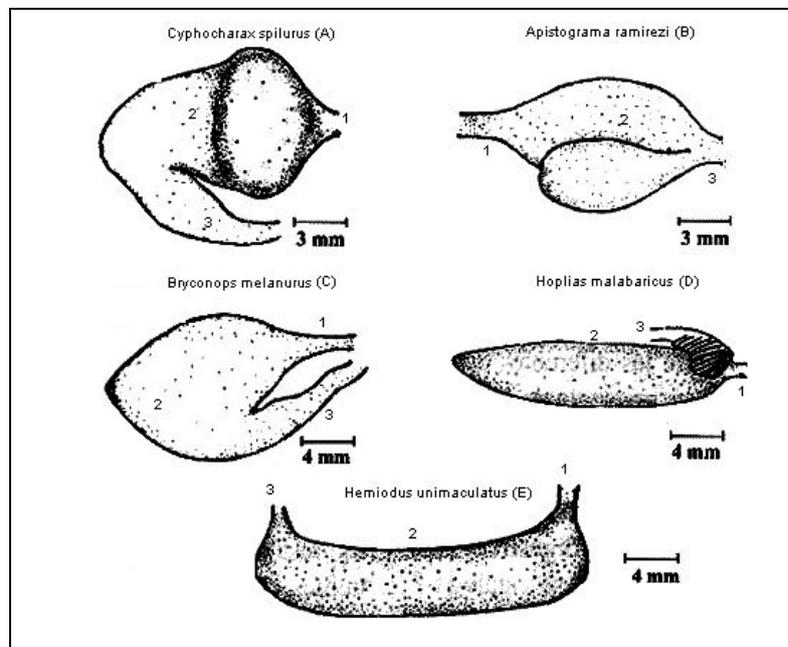


Figura 7: Diferentes estructuras del tracto digestivo en peces. 1. Esófago. 2. Estómago. 3. Intestino. A: Estómago en forma de bolsa asimétrica; B: Estómago bilobulado; C: Estómago en forma de bolsa; D: Estómago alargado; E: Estómago de aspecto ovoide. Modificado de Sánchez y col., 2003.

En la trucha arco-iris, *Oncorhynchus mykiss*, la porción gástrica está formada por dos regiones diferentes: una porción glandular o *corpus* y una porción muscular o píloro. Ambas regiones presentan una mucosa altamente plegada y limitada por un epitelio de tipo cilíndrico, que en la porción glandular forma criptas donde desembocan las glándulas gástricas, que ocupan la casi totalidad del corion.

Es un hecho común en peces que las células epiteliales superficiales unidas entre sí por complejos de unión e interdigitaciones, elaboren mucosustancias

de carácter neutro que, almacenadas en el interior de gránulos de secreción, ocupan su polo apical (Reifel & Travill, 1979; Grau y col., 1992; Ostos-Garrido y col., 1993; Arellano, 1995; Domeneghini y col., 1998; Gisbert y col., 1999; Vieira, 2000). La presencia de estas mucinas ha sido relacionada con la absorción de sustancias fácilmente digeribles como disacáridos y ácidos grasos de cadena corta (Grau y col., 1992). Además también pueden actuar protegiendo al epitelio frente al daño químico o físico durante el proceso de trituración (Gisbert y col., 1992).

Los peces, como los anfibios, sólo poseen un tipo de célula glandular denominadas células oxíntico-pépticas (Ito, 1967) capaz de secretar tanto el pepsinógeno como el ácido clorhídrico (Mattison & Holstein, 1980). En la trucha arco-iris (Ostos Garrido y col., 1993) las células glandulares exocrinas tienen un aspecto piramidal y se caracterizan por la presencia de pequeños pliegues en la superficie apical. En el citoplasma supranuclear puede distinguirse un sistema túbulo-vesicular bien desarrollado, numerosas mitocondrias y gránulos de secreción; el núcleo es esférico y se localiza en posición basal. Las porciones laterales de las membranas celulares de células adyacentes presentan interdigitaciones y complejos de unión. Diferentes autores (Reifel & Travill, 1979; Grau y col., 1992) detectaron la presencia de mucosustancias sulfatadas en las glándulas gástricas de distintas especies de peces y propusieron que esta característica está probablemente relacionada con la dieta. Spicer & Schulte (1992) especulan sobre el hecho de que las sulfomucinas son capaces de formar complejos con la pepsina, dando lugar a una forma más estable de este enzima.

Diferentes estudios inmuno-histoquímicos en el epitelio gástrico de peces han permitido identificar células endocrinas que se encuentran distribuidas entre las células epiteliales superficiales (Noaillac-Depeyre & Gas, 1982; Radaelli y col., 2000; Youson y col., 2001). Estas células presentan una

morfología redonda u ovoide y un núcleo eucromático ovoide, lobulado o indentado. El citoplasma perinuclear de las células endocrinas contiene un número variable de gránulos de secreción que muestran tamaños, texturas y grados de osmiofilia variables (Radaelli y *col.*, 2000). Aunque el significado biológico de estas células sigue siendo incierto y requiere de un mayor número de trabajos, diferentes autores apuntan la posibilidad de que las células endocrinas gástricas en peces estén relacionadas con la secreción de somatostatina (Elbal y *col.*, 1991), sustancia P (Elbal y *col.*, 1988) y bombesina (Homgren y *col.*, 1982).

La conexión estómago-intestino viene marcada por la existencia de un pliegue en forma de embudo y por la conformación anular de la musculatura, que cierra el estómago a modo de esfínter; su función es la de regular el vaciado estomacal e impedir el reflujo del quimo. En los peces sin estómago, el esfínter puede estar ausente o ser reemplazado por una válvula esófago-intestinal formada por un repliegue de las capas mucosa y submucosa (Smith, 1980).

2.4. Ciegos Pilóricos

A diferencia de los vertebrados superiores, muchos peces poseen una serie determinada de tubos ciegos alrededor del esfínter pilórico llamados ciegos pilóricos. El hecho de que su número no sea constante se ha utilizado como carácter diferenciador interespecífico; así, podemos encontrar como su número puede variar desde unos pocos (de 7 a 12 en el múgil) a varios cientos (en el atún). Los peces sin estómago tampoco poseen ciegos pilóricos.

Histológicamente son similares al intestino, ya que están formados por pliegues mucosales limitados por epitelio columnar simple rico en células caliciformes.

Se han sugerido varias funciones para los ciegos:

- Reservorio de alimento.
- Función digestiva que suplementaría la actividad estomacal e intestinal (Buddington y col., 1997).
- Absorción de carbohidratos y grasas (Belandria Romero, 1997).
- Reabsorción de agua e iones (Ahearn y col., 1992).
- Aumento de la superficie intestinal y con ello aumento del tiempo de tránsito para algunos sustratos (Kapoor y col., 1975; Fange & Grove, 1979).

Se ha propuesto que la retroperistalsis actúa como un mecanismo que permite el llenado de los ciegos pilóricos en peces. Ronnestad y col. (2000) afirman que las contracciones retrógradas del intestino dirigen parte del contenido intestinal hacia el esfínter pilórico, de forma que la presión intraluminal del conducto aumenta y permite el llenado de los ciegos pilóricos. También se propone que los movimientos retroperistálticos podrían ayudar en la mezcla del quimo con las secreciones enzimáticas (tales como bilis y enzimas del páncreas exocrino). Otros autores observaron un mecanismo similar en la pintarroja, *Scyliorhinus canicula*, (Andrews & Young, 1993).

2.5. Intestino Post-pilórico

La longitud del intestino con respecto a la longitud total del pez varía entre las diferentes especies y se relaciona con los hábitos alimentarios (Figura 8). Suele ser mayor en los herbívoros que en los carnívoros debido a que en éstos últimos la mayor parte de la digestión se lleva a cabo en el estómago. Dicha relación oscila entre 0,50 para los carnívoros y alrededor de 2,00 para los herbívoros y los omnívoros (Tabla 1).

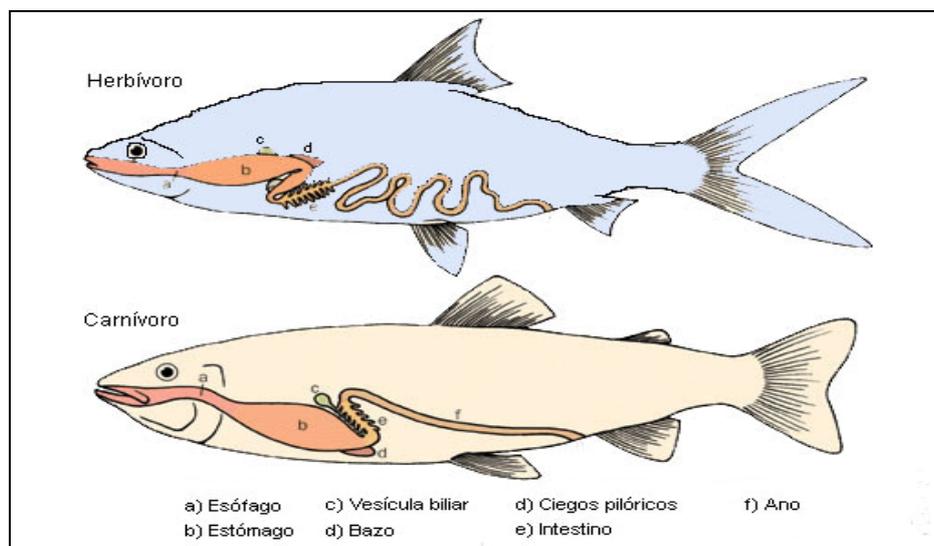


Figura 8: Diferencias estructurales debidas al régimen alimenticio entre especies piscícolas herbívoras y carnívoras. Modificado de Hepher (1988).

ESPECIE	(RLG)
CARNÍVOROS	
<i>Anguilla japonica</i>	0,46
<i>Channa maculatus</i>	0,57
<i>Clarias fuscus</i>	0,68
HERBÍVOROS	
<i>Ctenophryngodon idella</i>	2,16
OMNÍVOROS	
<i>Cyprinus carpio</i>	2,04

Tabla 1: Longitud relativa del intestino (RLG) de diferentes especies de peces con hábitos alimentarios diferentes. Modificada de Hsu & Wu (1979).

Salvando el hecho de que en las especies agastras no existe una diferenciación anatómica clara a lo largo del intestino, distintos autores basándose en criterios morfológicos, anatómicos e histológicos distinguen en el intestino de peces entre la región anterior y la posterior o recto (Halver, 1989;

Morrison & Wright, 1999; Hamlim y col., 2000; Ünal y col., 2001). En la mayor parte de los casos se denomina intestino medio al segmento intestinal que va desde el píloro hasta el intestino terminal (FAO, 1980). La longitud del intestino medio varía, siendo bastante largo en animales herbívoros y corto en los carnívoros. En Condríctios, Acipenseriformes y Holósteos la superficie interna del corto intestino medio se ve incrementada mediante la formación de una válvula espiral, cuya disposición morfológica varía desde la de un tornillo a la de una serie de conos encajados (Grasse, 1977).

En cuanto al intestino terminal o recto, por lo general, su diámetro es menor que el del intestino medio. Gracias a la musculatura de sus paredes se dispone en forma de tubo rígido y su luz se halla limitada por un epitelio cilíndrico con células caliciformes interpuestas. La función de las secreciones mucosas en este conducto no es bien conocida, si bien se ha propuesto la de lubricación de las heces (Reifell & Travil, 1979; Tibbetts, 1997).

La mucosa intestinal en peces presenta cierto grado de plegamiento, estando dichos pliegues limitados por un epitelio columnar simple en donde pueden distinguirse los siguientes tipos celulares:

- Células columnares con borde en cepillo: Presentan unas características ultraestructurales similares a las de las células relacionadas con procesos de absorción en mamíferos (Gauthier & Landis, 1975). Es de resaltar la presencia de vacuolas apicales en su citoplasma que presumiblemente se relacionan con la absorción de lípidos, aminoácidos y proteínas (Caceci, 1984), aunque también podrían intervenir en el intercambio hidromineral (Noaillac-Depeyre & Gas, 1973). Los enterocitos de la porción pilórica están implicados en la absorción de lípidos y aminoácidos, mientras que los de la región media conservan la habilidad de absorber macromoléculas desde los estadios iniciales de desarrollo hasta la fase adulta (Nose, 1989).

- Células caliciformes: Sus características ultraestructurales y funcionales son idénticas a las descritas para las células caliciformes intestinales de mamíferos (Krementz & Chapman, 1975). Diferentes estudios confirman la presencia de varias secreciones de carácter mucoso en el intestino de los peces. Gutiérrez y col. (1986) confirman la presencia de mucosustancias neutras y ácidas (fundamentalmente carboxiladas y, en menor medida, sulfomucinas) en el intestino de *Anguilla anguilla*. Otros estudios realizados en Hemirrámidos (Tibbetts, 1997) proponen para estas mucosustancias una función de protección frente al ataque enzimático y la de lubricación del alimento.
- Células ciliadas: Poseen cortos cilios con un patrón microtubular típico mezclados con microvellosidades (Radaeli y col., 2000). La fuente de energía para los movimientos de los cilios es aportada por abundantes mitocondrias que se localizan en el citoplasma apical. La función de estas células no es bien conocida, pero parece ser que ayudan al transporte de partículas alimenticias y al mantenimiento de una capa de moco constante en las paredes intestinales de los embriones de todas las especies de peces (Gisbert y col., 1998).

En la mucosa intestinal de los peces se ha descrito la existencia de entre 8 y 9 tipos celulares endocrinos diferentes, cuya función no está clara aunque en los últimos años un creciente número de trabajos han conseguido relacionar estas células con la secreción de sustancias tales como colecistoquinina (Elbal y col., 1988), glucagón (Kim y col., 2000) y somatostatina (Elbal y col., 1991).

La túnica muscular se halla constituida por dos estratos de fibras musculares lisas y limitada por una serosa constituida por un mesotelio con abundante tejido conjuntivo y vasos sanguíneos.

Los movimientos peristálticos intestinales en los peces se encuentran bajo control tanto nervioso como endocrino y presentan unas características muy similares a las de mamíferos (Olson & Holmgren, 2000). Al igual que en los vertebrados superiores, la presencia de alimento en el estómago de los peces provoca la excitación del nervio vago que genera la contracción de la pared gástrica y el paso del alimento al intestino. Este último hecho induce la síntesis de una molécula tipo secretina que favorece la liberación del jugo pancreático. La colecistoquinina también genera en algunas especies la liberación de enzimas pancreáticos, aunque el papel mejor conocido de esta hormona en peces es la estimulación de la contracción de la vesícula biliar (Adam & Holmgren, 1987).

Diferentes estudios han conseguido poner de manifiesto la presencia de tejido linfóide en la mucosa intestinal en diversas especies de peces relacionado con el tejido linfóide asociado a mucosas (GALT) descrito para vertebrados (Rombout et al., 1985, 1986; Georgopoulou y col., 1986; Hart y col., 1988; Abelli y col., 1997). El GALT no es un órgano linfóide como tal y se encuentra asociado a importantes funciones defensivas. Al igual que en la piel y en las branquias, en la mucosa intestinal se ha demostrado la presencia de leucocitos capaces además de secretar anticuerpos bajo inmunización (Georgopoulou & Vernier, 1986). En un estudio realizado por Davidson y col. (1991) se demuestra las distintas funciones de los leucocitos aislados a partir de este tejido en trucha arco iris; son capaces de producir factor activador de macrófagos (MAF), función asignada a los linfocitos T (Graham & Secombes, 1990).

2.6. Glándulas anejas

2.6.1. Hígado y vesícula biliar

Varía en forma y tamaño en las diferentes especies de peces. En la mayoría de los peces dedicados a cultivo, el hígado es relativamente grande, alargado, de color marrón y con dos lóbulos que se extienden a lo largo del intestino anterior. Histológicamente, el hígado de los peces muestra características similares a las descritas para vertebrados superiores aunque la estructura lobulillar no está bien definida (Cubillos y *col.*, 2001). Los hepatocitos de aspecto poligonal poseen un núcleo de gran tamaño que se localiza en posición central dentro del cual se pueden observar uno o dos nucleolos y un citoplasma con gránulos de glicógeno y un retículo endoplásmico rugoso bien desarrollado (Rocha y *col.*, 1997).

Las células hepáticas se organizan en láminas de una o dos células de espesor que se sitúan entre los sinusoides y forman trabéculas ramificadas. Estas están recorridas por canalículos intercelulares, los canalículos biliares. Los sinusoides son fenestrados y se encuentran irregularmente distribuidos y revestidos por células endoteliales con núcleos prominentes (<http://aquaticpath.umd.edu>).

La vesícula biliar es una estructura de aspecto ovoide o tubular, localizada en posición dorsal al hígado y que en la mayoría de los peces está recubierta por un epitelio columnar simple (Eastman & DeVries, 1997). El conducto biliar, también revestido por epitelio columnar simple, se dirige hacia atrás y conecta con el intestino pilórico cerca de los ciegos pilóricos (Boulhic & Gabaudan, 1992).

2.6.2. Páncreas

El páncreas de los peces es un órgano muy parecido a su homólogo en vertebrados superiores; usualmente no aparece como un órgano localizado sino más bien se presenta en islas difusas de tejido secretor localizadas principalmente en el hígado y alrededor de la vena porta-hepática formando un órgano compuesto llamado hepato-páncreas (Caceci, 1984). En otros casos, las islas de tejido pancreático no sólo se localizan en el hígado sino también en el intestino, el mesenterio intestinal y los ciegos pilóricos e incluso alrededor del bazo y de la vesícula biliar (Youson y *col.*, 1999).

La porción exocrina del páncreas está constituida por células acinares piramidales que forman acinos en torno a una luz central. Estas células poseen un citoplasma oscuro y basófilo con un retículo endoplásmico rugoso bien desarrollado y grandes gránulos de zimógeno que se localizan en la porción apical; el núcleo es basal y tiene un aspecto esférico (Geyer et al., 2000).

3. EL TRACTO DIGESTIVO DE ACIPENSERIFORMES

Durante las últimas décadas diferentes estudios han intentado definir las características histológicas, histoquímicas y ultraestructurales del sistema digestivo en diferentes especies de esturiones (Weisel, 1973, 1979; Buddington & Doroshov, 1985; Radaelli y *col.*, 2000). Todos los estudios señalan similitudes estructurales a lo largo del grupo de los condrósteos (esturiones y peces espátula) y confirman que la estructura histológica de la pared del tubo digestivo en Acipenseriformes es muy similar a la descrita para teleósteos pero con características distintivas, como son:

- La presencia de un epitelio gástrico e intestinal ciliado, tanto durante la fase embrionaria como en la vida adulta. La función de las células ciliadas no es bien conocida pero parece ser que facilitan el transporte de partículas alimenticias y cooperan en el mantenimiento de una capa de moco homogénea a lo largo del tubo digestivo durante el desarrollo embrionario. Según Radaelli y *col.*, (2002) la presencia de estas células en el tracto digestivo de ejemplares adultos de esturión, lejos de ser una característica primitiva, podría constituir una adaptación alimentaria y podrían jugar un importante papel en la mezcla de las distintas secreciones digestivas con el alimento.
- En los esturiones una porción intestinal se pliega sobre sí misma en sentido longitudinal para formar la válvula espiral, lo que constituye una adaptación anatómica del sistema digestivo para aumentar la superficie de absorción.

3.1. Esófago

En los Acipenseriformes es un corto conducto que se extiende desde la cavidad orofaríngea hasta justo antes de la entrada del estómago y, al igual que en otros peces, presenta un epitelio estratificado cúbico con células mucosas y células ciliadas (Buddington & Christofferson, 1985).

Las características ultraestructurales de las células mucosas son muy similares a las observadas en otros vertebrados (Gisbert y *col.*, 1999) y aunque existen discrepancias en cuanto a su significado funcional, se ha propuesto una función de facilitación del transporte del alimento (Buddington & Christofferson, 1985; Gisbert y *col.*, 1998; Gisbert & Doroshov, 2003). En los Acipenseriformes el epitelio esofágico no parece cumplir la función desalinizadora que presentan en los teleósteos (Cataldi y *col.*, 1995; Martínez Álvarez, 2003).

En el esturión blanco, *Acipenser transmontanus*, la característica más distintiva de la mucosa esofágica es la presencia de fibras nerviosas mielinizadas en la transición entre la lámina propia y la submucosa, que presentan un orientación longitudinal y están en estrecha relación con numerosos lóbulos de tejido adiposo altamente irrigado por vasos sanguíneos (Radaelli y col., 2000). Esta asociación entre los lóbulos de tejido adiposo, el sistema vascular y las fibras nerviosas sugieren una alta capacidad de movilización del tejido adiposo esofágico en los esturiones (Hung y col., 1997).

3.2. Porción gástrica

Los Acipenseriformes presentan un estómago adaptado a sus hábitos alimentarios y capaz de suplir la falta de dentición en los estados adultos, que adquiere una estructura cecal típica (Grasse, 1977) y está compuesto por dos regiones distintas que suponen entre el 40 y el 50% de la longitud total del tracto digestivo (Buddington & Doroshov, 1985).

La porción anterior del compartimento gástrico o estómago glandular es una estructura elongada, capaz de distenderse hasta 3-5 veces gracias a la existencia de una serie de pliegues longitudinales en su interior y caracterizada por la presencia de glándulas gástricas. Pueden observarse grandes paquetes de fibras nerviosas, similares a las descritas para el esófago, que se sitúan en la túnica propia-submucosa (Domeneghini y col., 1999).

El estómago pilórico carece de glándulas multicelulares y el músculo liso es el tejido predominante, llegando a suponer hasta el 80% del grosor de las paredes gástricas (Buddington & Diamond, 1985).

La estructura histológica básica de la pared gástrica en Acipenseriformes es similar a la descrita para los peces óseos (Buddington & Christofferson, 1985).

Las observaciones a microscopía electrónica ponen de manifiesto la presencia de un epitelio de revestimiento con células columnares mucosecretoras con microvellosidades, cuyas secreciones mucosas forman una delgada capa superficial a lo largo de todo el epitelio (gel mucoso adherente) y células ciliadas. Los cilios de éstas últimas están entremezclados con cortas microvellosidades y poseen la típica estructura microtubular con prominentes corpúsculos basales.

Las células de las glándulas tubulares exocrinas presentes en la primera porción del compartimento gástrico son piramidales y contienen grandes cantidades de gránulos redondeados fuertemente osmiófilos, así como algunas mitocondrias, una maquinaria biosintética bien desarrollada y un núcleo grande y eucromático (Radaelli *y col.*, 2000).

El epitelio del estómago pilórico no posee cilios y está compuesto por un único tipo celular, cuyo citoplasma adluminal se encuentra lleno de gránulos de secreción (Domeneghini *y col.*, 1999).

La principal función del estómago glandular es la de inicio de la digestión química, mientras que el estómago pilórico compensa la falta de dientes en los estados adultos de los Acipenseriformes, triturando el alimento y permitiendo que éste pase de una forma mucho más fragmentada al intestino (Buddington & Diamond, 1985; Gawlicka *y col.*, 1995; Gisbert *y col.*, 1998).

3.3. Intestino

Presenta una estructura histológica con características muy similares a las descritas para vertebrados, con un epitelio de revestimiento formado por células columnares ciliadas, células no ciliadas con microvellosidades apicales y células caliciformes intercaladas (Detlaff *y col.*, 1993). Las células ciliadas

muestran una característica peculiar, ya que en su superficie podemos observar cilios y copetes de microvellosidades, mientras que las células no ciliadas poseen abundantes microvellosidades largas que forman el borde en cepillo (Radaelli y col., 2000).

El examen ultraestructural de las células productoras de mucosustancias del esófago y el intestino no muestra peculiaridades notables si los comparamos con otros osteíctios o con los vertebrados en general (Specian & Oliver, 1991; Tibbetts, 1997; Gisbert y col., 1999), y únicamente pueden destacarse diferencias en cuanto a la composición en glicoconjugados de las células caliciformes de los esturiones (Domeneghini y col., 1999; Gisbert y col., 1999; Gisbert & Doroshov, 2003) que probablemente sean debidas a diferencias en los hábitos alimentarios y a las características de los hábitats (Scocco y col., 1997; Tibbetts, 1997; Domeneghini y col., 1998).

Al igual que hemos comentado en apartados anteriores (2.3 y 2.5) se ha conseguido demostrar mediante Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) la presencia de diferentes tipos de células endocrinas distribuidas entre las células del epitelio gástrico e intestinal del esturión blanco, *Acipenser transmontanus* (Radaelli y col., 2000). Estas células poseen las mismas características ultraestructurales descritas para los vertebrados y se clasifican en función de los tamaños, texturas y grados de osmiofilia de sus granulaciones.

Diferentes estudios han conseguido poner de manifiesto la presencia de tejido linfoide en la mucosa intestinal de los esturiones. Domeneghini y col. (1999) en un estudio a microscopía óptica, observaron en la lámina propia la presencia de células granulares eosinófila (EGC), caracterizadas por su aspecto redondeado y por presentar un núcleo a menudo bilobulado y excéntrico y un citoplasma azul pálido con gránulos de forma alargada o

esférica. Radaelli y col. (2000) en estudios posteriores con Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) definieron las características ultraestructurales de este tipo celular y los clasificaron como leucocitos granulares intraepiteliales que formarían parte del sistema linfoide asociado a mucosas (GALT) descrito para vertebrados (Georgopoulou & Vernier, 1986).

3.3.1. Ciegos pilóricos

Según Budington & Christofferson (1985) los ciegos pilóricos en los Acipenseriformes constituyen un órgano compacto que adquiere una estructura plana y triangular y que se sitúa entre el estómago y el intestino. Parecen representar la fusión de numerosos ciegos individuales en un único órgano, hecho que es corroborado por la existencia de numerosos canales internos que desembocan en una abertura única que comunica con el intestino. Sus características histológicas son idénticas a la estructura general descrita para el intestino.

En los esturiones los ciegos pilóricos desempeñan las mismas funciones descritas para los teleósteos (Gawlicka y col., 1995).

3.3.2. Intestino anterior o pilórico

Los enterocitos de esta porción del intestino parecen estar implicados en la absorción de lípidos y aminoácidos, ya que las células columnares poseen largas microvellosidades y una gran cantidad de vacuolas así como cuerpos multivesiculares y lisosomas en diversos grados de funcionamiento (Gawlicka y col., 1995). En el citoplasma de los enterocitos es frecuente la presencia de vesículas de contenido lipoproteico que posiblemente sean el equivalente morfológico de los cuerpos lipídicos relacionados con la absorción del componente graso de la dieta descritos en el tracto intestinal de teleósteos

(Radaelli y col., 2000). Estas características ultraestructurales nos llevan a pensar que las células columnares del intestino anterior muestran un máximo de capacidad de absorción lipídica (Buddington & Christofferson, 1985).

Hacia el final de su longitud, el intestino anterior se curva hasta adoptar una forma de “S”, hecho que según Buddington y Christofferson (1985) previene el reflujo del quimo.

3.3.3. Válvula espiral

Representa entre el 60 y el 70% del canal alimentario post-gástrico y constituye una adaptación anatómica al tipo de alimentación (Buddington & Christofferson, 1985). En Acipenseriformes el número de vueltas de la válvula espiral constituye una variación interespecífica y oscila entre las 4-5 para el género *Scaphirhynchus* (Weisel, 1979) y las 6-8 para otros Acipenseridos (Gisbert y col., 1998; Gisbert & Doroshov, 2003). La organización histológica de la pared de esta región intestinal es una continuación de la observada en el intestino anterior, aunque la longitud de los pliegues mucosales es menor en esta zona.

Gisbert y col. (1998) confirman que la característica diferencial de los enterocitos de esta región es la presencia en el citoplasma de un gran número de vacuolas de pequeño tamaño encargadas de captar proteínas mediante pinocitosis. Esta habilidad de absorber macromoléculas proteicas que se conserva a lo largo de toda la vida del animal tiene un sentido nutricional (Buddington, 1991) y, al igual que en el género *Polyodon*, puede estar relacionada con la captación de antígenos (Petrie-Hanson & Peterman, 2005).

3.3.4. Recto

El intestino distal o recto es una estructura corta que llega a suponer entre el 2 y el 3% de la longitud total del tubo digestivo (Budington & Christofferson, 1985) y que se extiende desde el final de la válvula espiral hasta el ano. Según Cataldi y *col.* (2002) en su epitelio estratificado no podemos observar células ciliadas pero sí una gran cantidad de células caliciformes. Las células epiteliales de esta porción intestinal tienen unas microvellosidades de menor tamaño que las de los enterocitos del intestino anterior y la válvula espiral (Radaelli y *col.*, 2000).

4. CARACTERÍSTICAS DIGESTIVAS DE PECES

En los animales, el alimento sufre una serie de tratamientos y transformaciones diversas a todo lo largo del tubo digestivo que lo preparan para su utilización por el organismo, siendo el material no digerido evacuado como heces. Este proceso depende del equipamiento enzimático del pez que puede variar durante la vida de éste y en función de los factores ambientales y del tipo de régimen alimentario; en esencia, a lo largo del proceso, se descomponen las macromoléculas alimentarias en subunidades estructurales básicas (Hepher, 1988).

Los estudios realizados hasta ahora muestran una amplia convergencia entre las actividades digestivas en los peces óseos adultos y las existentes en los vertebrados superiores, lo que sugiere que el equipamiento enzimático es, en gran parte, análogo (Smith, 1980). Como ya se comentó en apartados anteriores, la anatomía del canal digestivo en las distintas especies de peces exhibe diferencias según se trate de la digestión en peces con o sin estómago.

En las especies carentes de estómago (como por ejemplo la carpa) no existe secreción ni de HCl ni de pepsinógeno para la digestión proteica, hecho que sí se da en peces con estómago. En aquellas sólo tiene lugar el desdoblamiento proteico mediante enzimas tríplicas, y la totalidad de la digestión se desarrolla en una zona de ambiente neutro a alcalino (por lo común pH de 6,5) (Tabla 2).

MACRONUTRIENTE	ENZIMA DIGESTIVO	LUGAR DE SÍNTESIS	LUGAR DE ACCIÓN
CARBOHIDRATOS	<i>Carbohidrasas</i>		
	Amilasa	Páncreas	Intestino
	Quitinasa	Estómago/Ciegos pilóricos	Estómago/Intestino
LÍPIDOS	<i>Lipasas/esterasas</i>		
	Lipasa	Páncreas	Intestino
	Esterasa	Páncreas	Intestino
	Fosfolipasa	Páncreas	Intestino
PROTEÍNAS	<i>Proteinasas/Peptidasas</i>		
	Pepsina	Estómago	Estómago
	Tripsina	Intestino	Intestino
	Quimiotripsina	Intestino	Intestino
	Peptidasas	Páncreas/Intestino	Intestino

Tabla 2: Principales enzimas digestivos en el tracto gastrointestinal de peces (FAO, 1980).

4.1. La digestión en la boca y el esófago

Tras muchos estudios sobre la función y composición de las mucosustancias presentes en las células mucosas de la cavidad orofaríngea de los peces se ha conseguido demostrar en algunas especies la presencia de actividad para algunos enzimas digestivos (Smith, 1980). En cambio en el esófago, las células mucosas no presentan actividad enzimática de ningún tipo, pero sí que existen datos sobre la presencia de células glandulares similares a las gástricas en la porción posterior del esófago de algunos peces.

4.2. La digestión en el estómago

4.2.1. Secreción de ácido:

En el estómago de los peces hay usualmente una secreción de ácido clorhídrico que disminuye el pH. En peces, como ya hemos comentado y a diferencia de los mamíferos, las mismas células secretan HCl y enzimas digestivos.

La secreción de HCl aumenta considerablemente tras la comida, aunque puede haber cierta secreción incluso en peces con estómagos vacíos o peces en ayunas.

En los peces agastros no existe secreción ácida, por lo que el pH del tracto digestivo es neutro o ligeramente básico. En estos peces el pH del intestino está probablemente asociado con la secreción biliar, que es neutra o ligeramente básica.

4.2.2. Enzimas proteolíticos:

En numerosas especies se ha detectado una importante actividad proteolítica en el estómago que adquiere su óptimo a pH ácido (Creac'h, 1963). Las diferentes células glandulares del estómago secretan proteasas y ácido clorhídrico (Ostos Garrido *y col.* 1993; Zambonino Infante & Cahu, 2001; Albrecht *y col.*, 2001; Díaz *y col.*, 2003). Hopher (1988) describe la presencia de una especie de pepsina con una mayor actividad proteolítica y afinidad que su equivalente en mamíferos. El pH óptimo de actuación de este enzima varía entre las especies; por ejemplo, se sitúa entre 3 y 4 para las especies de peces gato del género *Ictalurus*, para la trucha arco-iris es de 3,5 y alrededor de 2 para algunos peces planos marinos.

4.2.3. Enzimas no proteolíticos:

También existen datos de la presencia de carbohidrasas en el tracto gástrico de los peces, aunque con niveles más altos en peces omnívoros y herbívoros que en carnívoros (Urea Ramos, 1996).

Vegas-Vélez (1972) señala la presencia de una α -amilasa en extractos estomacales de un cierto número de teleósteos marinos. Además se han detectado actividades esterásicas en trucha arco iris (Smith, 1980).

Algunos peces presentan actividades quitinolíticas en su estómago; a saber, salmónidos (Lindsay, 1985), el bacalao (Danulat & Kausch, 1984), la raya (Fange y col., 1978), etc. El pH óptimo para la actividad quitinásica se sitúa entre 4,5 y 5,1. A pH más ácido, entre 2 y 3, la actividad es aún relativamente elevada. Su presencia puede tener una cierta importancia en peces que se alimentan preferentemente de crustáceos e insectos. La función primaria del enzima podría consistir en la ruptura del exoesqueleto de la presa para facilitar el ataque enzimático a los tejidos internos y prevenir, además, el posible bloqueo del tracto digestivo por pedazos de caparazón (Hidalgo & Alliot, 1986).

4.3. La digestión en el intestino y los ciegos pilóricos

La digestión en el intestino tiene lugar gracias a la acción de distintos productos secretados bien por la pared intestinal o bien por glándulas anejas (páncreas e hígado). El páncreas vierte al intestino diversos enzimas digestivos: proteasas, carbohidrasas y lipasas. La bilis procedente del hígado aporta principalmente las sales biliares, compuestos tensioactivos capaces de emulsionar los lípidos y que por lo tanto, facilitan la acción de la lipasa en la digestión de las grasas.

Tanto en los peces con estómago como en los agastros, el pH del fluido intestinal es aproximadamente neutro o alcalino (Hidalgo & Alliot, 1986). Generalmente el pH se aproxima a la neutralidad en la parte anterior del intestino y se hace algo básico en la parte posterior. Es probable que, al igual que en mamíferos, el jugo pancreático contenga bicarbonatos que neutralicen las secreciones ácidas gástricas.

Como hemos comentado en el punto anterior, en la digestión intestinal del alimento en peces intervienen enzimas de orígenes diversos; por esto se hace necesario un análisis separado de cada una de ellas:

4.3.1. Enzimas de origen pancreático:

La presencia en la mayoría de los peces óseos de un páncreas difuso hace difícil el estudio de sus secreciones, pero podemos distinguir tres tipos de actividades enzimáticas:

A. Proteasas:

- Tripsina: Es una endopeptidasa que cataliza la hidrólisis de las uniones peptídicas en las que el grupo carbonilo pertenece a la lisina o arginina. Su pH óptimo es siempre ligeramente básico aunque varía entre las diferentes especies, desde 7,5 en *Mugil cephalus* (Guizani y col., 1991) hasta 9 en *Engraulis encrasicolus* (Martínez y col., 1988). Hopher (1988) muestra que la actividad trípica en peces carnívoros es cuatro veces más alta que la de la quimiotripsina, sucediendo lo contrario en omnívoros y herbívoros.
- Quimiotripsina: Se forma como consecuencia de la acción de la tripsina sobre el quimiotripsinógeno. Cataliza la hidrólisis de los enlaces peptídicos en los que estén implicados aminoácidos aromáticos como la tirosina, el triptófano y la fenilalanina. Su pH óptimo varía entre las especies, por

ejemplo es de 7,8 para un pez omnívoro (*Clarias gariepinus*) y oscila entre 7,5 y 9 en la anguila japonesa (*Anguilla japonica*).

- Elastasa: No se encuentra en todas las especies, y es un enzima especialmente activo frente a los enlaces peptídicos de la elastina (Yoshinaka y col., 1982).
- Carboxipeptidasas: Son exopeptidasas que catalizan la hidrólisis del enlace peptídico C-terminal. La Carboxipeptidasa-A hidroliza casi todos los tipos de enlaces peptídicos con grupo carboxílico terminal, mientras que la B separa sólo los restos de arginina o de lisina C-terminales.

B. Carbohidrasas:

A pesar de que siempre se ha considerado a los peces como animales poco aptos para la digestión de polisacáridos, la mayoría de las especies estudiadas poseen un aparato enzimático para la hidrólisis y absorción de carbohidratos (simples o complejos). Por otra parte, la digestión y la absorción de carbohidratos parecen llevarse a cabo mediante las mismas rutas metabólicas en los peces herbívoros, omnívoros y carnívoros. La digestión de los polisacáridos se inicia por la acción de las endoglucosidasas, mientras que tanto los disacáridos como los oligosacáridos son hidrolizados en sus monosacáridos constituyentes mediante varios enzimas de la membrana del borde en cepillo de los enterocitos. El proceso de digestión continúa en el interior de los enterocitos, donde existen enzimas con actividad disacaridasa (Krogdahl, y col., 2005).

- α - Amilasa: Tras diferentes experimentos (Hidalgo y col., 1999; Alarcón y col., 2001) se ha puesto de manifiesto la presencia de una actividad hidrolítica frente al almidón en extractos pancreáticos y en extractos procedentes de los ciegos pilóricos de peces. Esta actividad se debe a la actividad α -amilásica, cuyas características difieren entre las especies en

cuanto al pH óptimo de actuación y su estabilidad térmica. La α - Amilasa hidroliza los enlaces glucosídicos α (1-4) de las moléculas de almidón y moléculas similares, para producir oligosacáridos. Fernández y *col.*, (2001), en un estudio en seis especies de Espáridos mediterráneos, han demostrado que el pH óptimo de actuación de la amilasa se sitúa entre 4 y 9, pero todas muestran más de un pico de actividad y algunas presentan dos isoformas del enzima. Aunque se ha demostrado la presencia de este enzima en diferentes porciones del sistema digestivo de peces, las mayores actividades se miden en el páncreas exocrino (Yardley & Wild, 1991).

- Quitinasa: Su actividad puede demostrarse en el sistema digestivo de muchos peces, concretamente en el quimo presente a lo largo del canal gastrointestinal y en homogenados intestinales, dándose las mayores concentraciones en el estómago y los ciegos pilóricos (Krogdahl y *col.*, 2005). Fänge, Lundblad, Lind y Slettengren (1979) demostraron la síntesis de quitinasa en el páncreas del holocéfalo agastro *Chimaera monstrosa*.

C. Lipasas:

La hidrólisis enzimática de los triglicéridos ha sido relativamente poco estudiada en peces, probablemente debido tanto a las iniciales dificultades encontradas en la puesta a punto del protocolo de aislamiento del enzima responsable, como al hecho de que en la mayoría de estos animales las células pancreáticas exocrinas no se encuentran reunidas en un órgano compacto, sino diseminadas en el tejido adiposo intercecal o en el llamado hepato-páncreas (Caceci, 1984).

Tengjaroenkul y *col.* (2000) confirman que la actividad de este enzima, que suele concentrarse en la primera región del intestino, es menor en peces herbívoros que en omnívoros y carnívoros.

4.3.2. Enzimas intestinales:

Como ya hemos comentado, una gran parte de las actividades enzimáticas descubiertas en el fluido intestinal de peces son de procedencia pancreática. Las células de borde en cepillo del epitelio intestinal parecen producir enzimas tales como aminopeptidasas, di y tripeptidasas, nucleosidasas, polinucleotidasas, lipasas y otras esterasas (Fraise y col., 1981). Así mismo se han hecho patentes actividades del tipo de la amilasa, maltasa, isomaltasa, trealasa y sacarasa en el intestino de los peces (Kapoor y col., 1975). Algunos enzimas intestinales son de origen intracelular y están presentes en la luz del tubo intestinal por descamación del epitelio; otros pueden ser extracelulares pero estar anclados a las membranas de los enterocitos.

4.4. Otros enzimas digestivas

La presencia de fosfatasas en el aparato digestivo de peces ha sido puesta de manifiesto por numerosos autores (Goel & Sastry, 1973; González de Canales & Sarasquete, 1987; Díaz y col., 1997; Ribeiro y col., 1999; Martínez y col., 1999; Gawlicka y col., 2000; Kim y col., 2001).

La fosfatasa alcalina y las mucosustancias neutras producidas por las células caliciformes ocupan los mismos lugares en áreas de absorción activas como el intestino (Weinreb & Bilstad, 1955). Según Moog y Wenger (1952) las mucosustancias neutras observadas en la superficie externa de los enterocitos en *Anguilla anguilla*, *Mugil saliens* y *Sparus aurata* (Gutiérrez y col., 1986; Elbal & Agulleiro, 1986) se combinan con la fosfatasa alcalina y juntas participan en la digestión en el estómago e intestino anterior (Ham & Leeson, 1965), así como en la lubricación del material fecal en el intestino posterior (Gisbert y col., 1998).

Díaz y col. (1997) en un estudio en tres especies de peces (*Dicentrarchus labrax*, *Sparus aurata* y *Stizostedion lucioperca*) proponen que la fosfatasa ácida interviene en el metabolismo lipídico.

5. CARACTERÍSTICAS DIGESTIVAS DE ACIPENSERIFORMES

A pesar de la escasez de estudios referentes a las capacidades digestivas de Acipenseriformes, diferentes trabajos preliminares han puesto de manifiesto el enorme parecido con los peces teleósteos. Partiendo de la base de las semejanzas estructurales y anatómicas del canal alimentario a lo largo del grupo de los Acipenséridos, pueden inferirse una serie de caracteres comunes a la mayoría de las especies de esturiones.

En los Acipenseriformes el proceso de digestión química se inicia en el estómago glandular como consecuencia de los bajos valores de pH en el compartimento gástrico (entre 3 y 4) y la interacción del alimento con la pepsina (Buddington, 1985; Buddington & Doroshov, 1985). En la porción gástrica del esturión blanco, *Acipenser transmontanus*, se ha conseguido demostrar la presencia de enzimas no proteolíticos, como la lipasa y la amilasa, que normalmente suelen estar asociados a la porción intestinal, pero ni su origen ni sus actividades digestivas bajo un ambiente ácido son conocidos (Buddington & Christofferson, 1985; Gawlicka y col., 1995). Estudios posteriores confirmaron además que las concentraciones de lipasa en el compartimento gástrico del esturión blanco son menores que aquellas medidas en el intestino anterior y válvula espiral, donde presentan valores similares (Buddington & Doroshov, 1986).

El canal alimentario post-gástrico es la región más importante del tracto gastrointestinal, tanto a nivel digestivo como para la absorción de nutrientes, en

particular la válvula espiral (Buddington, 1983). El pH del tracto intestinal es alcalino (7,9 en el intestino y 8,27 en la válvula espiral según Buddington & Doroshov, 1985) y la diversidad de enzimas digestivos aumenta. Los enzimas que predominan a estos niveles son los que sitúan sus actividades óptimas a pH básico, esto es:

- Tripsina
- Quimiotripsina
- Carboxipeptidasa A
- Carboxipeptidasa B

Las actividades de Carboxipeptidasa B y de tripsina son similares y más altas que las de Carboxipeptidasa A y quimiotripsina que también son similares, por lo que puede sugerirse una especie de colaboración entre endo y exoproteasas a lo largo del canal digestivo post-pilórico de esturiones, de forma similar a lo descrito para vertebrados superiores (Buddington & Doroshov, 1986) (Tabla 3).

Buddington & Diamond (1987) señalan la presencia de enzimas disacaridasas y dipeptidasas en la membrana del borde en cepillo de las células del epitelio de los ciegos pilóricos, por lo que sugieren una cierta capacidad hidrolítica para esta porción intestinal.

El predominio de las proteasas sobre las carbohidrasas en las secreciones del tracto digestivo del esturión sugiere una adaptación a regímenes alimenticios con altos niveles proteicos y bajos de carbohidratos (Gawlicka y *col.*, 1995).

	ESTÓMAGO	INTESTINO	VÁLVULA ESPIRAL
pH	4,62 U/mg P	7,92 U/mg P	8,27 U/mg P
PROTEASAS			
Pepsina	25,9 U/mg P	Trazas	5,8 U/mg P
Tripsina	7,0 U/mg P	274,7 U/mg P	279,8 U/mg P
Quimiotripsina	0,12 U/mg P	1,23 U/mg P	1,78 U/mg P
Elastasa	0,06 U/mg P	2,96 U/mg P	4,60 U/mg P
Carboxipeptidasa A	0 U/mg P	0,25 U/mg P	0,29 U/mg P
Carboxipeptidasa B	0 U/mg P	0,99 U/mg P	0,76 U/mg P
LEU-aminopeptidasa	0 U/mg P	4,95 U/mg P	15,83 U/mg P
Amilasa	0,20 U/mg P	0,01 U/mg P	0,17 U/mg P
Lipasa	0,53 U/mg P	0,67 U/mg P	0,69 U/mg P
Fosfatasa alcalina	0 U/mg P	0,06 U/mg P	0,11 U/mg P

U/mg P.=: Unidades por mg de Proteína

Tabla 3: Complemento enzimático del esturión blanco, *Acipenser transmontanus* (Buddington & Doroshov, 1986)

El intestino del esturión blanco (*A. transmontanus*) es el compartimento digestivo que presenta las tasas más altas de absorción de hidratos de carbono y aminoácidos (Buddington & Doroshov, 1986), hecho que coincide con el aumento de superficie por unidad de longitud proporcionada por los pliegues de la válvula espiral (Gawlicka y col., 1995; Gisbert y col., 1998). De forma similar al resto de los peces, en el intestino de los Acipenseriformes es posible demostrar la presencia de otras actividades enzimáticas, como la de la elastasa, aunque a muy bajos niveles (Buddington & Christofferson, 1985).

También se ha detectado la presencia de fosfatasa alcalina en el canal digestivo post-gástrico de los esturiones (Buddington & Doroshov, 1986;

Gawlicka y col., 1995). Este enzima puede estar asociado con el borde en cepillo de los enterocitos o localizarse intracelularmente y parece estar relacionada con los procesos de absorción de nutrientes (Gisbert y col., 1999). Las tasas de absorción de nutrientes en intestino y la válvula espiral se corresponden con la distribución de la fosfatasa alcalina (Buddington & Diamond, 1985).

6. ABSORCIÓN DE NUTRIENTES EN PECES

Los mecanismos de absorción de nutrientes han sido bien caracterizados en varias especies de peces, especialmente en los peces omnívoros y los herbívoros (Ferraris & Ahearn, 1984; Collie & Ferraris, 1995). Existen ciertos datos para la anguila europea, *Anguilla anguilla* (Storelli y col., 1989), lubina, *Dicentrarchus labrax* (Balocco y col., 1993) y algunos salmónidos como la trucha de arco-iris, *Oncorhynchus mykiss* (Buddington y col., 1987; Buddington & Diamond, 1987) y *Oncorhynchus kisutch* (Collie, 1985).

6.1. Absorción de carbohidratos

En términos generales podemos afirmar que la absorción intestinal de azúcares en peces herbívoros y omnívoros es mucho más alta que en carnívoros. Además, mientras que tanto los animales omnívoros como los herbívoros son capaces de regular el transporte intestinal de azúcar en función del nivel de carbohidratos de la dieta, los carnívoros carecen aparentemente de esta capacidad (Collie & Ferraris, 1995).

La absorción de glucosa en las células epiteliales intestinales de peces tiene lugar a nivel del borde en cepillo mediante un sistema de simporte dependiente

de Na⁺ parecido al de los mamíferos (Boge, 1982; Krogdahl y col., 2005) (Tabla 4).

ESPECIE	TIPO DE ALIMENTACIÓN	SEGMENTO INTESTINAL	TRANSPORTE	ESTEQUIOMETRÍA
Tilapia	HERBIVORO	IA	Asociado al Na ⁺	1Na ⁺ /1gluc
		IA		
		IP		
		IP		
Anguila	CARNIVORO	IA	Asociado al Na ⁺	1Na ⁺ /1gluc
		IA		2Na ⁺ /1gluc
Pez roca	CARNIVORO	CP	Asociado al Na ⁺	1Na ⁺ /1gluc
		IA		2Na ⁺ /1gluc

IA = Intestino anterior; IP = Intestino posterior; CP = Ciegos pilóricos

Tabla 4: Sistemas de transporte y parámetros estequiométricos para la D-glucosa en el intestino de tres especies de peces. Modificado de Ahearn & Storelli (1994).

6.2. Absorción de aminoácidos y proteínas

El proceso de absorción de aminoácidos en peces ocurre a nivel de la membrana del borde en cepillo de los enterocitos y se lleva a cabo por transporte pasivo, aunque en algunos casos se ha demostrado la existencia de un proceso activo (Tabla 5). Storelli y col. (1989), en un estudio sobre el intestino de la anguila, detectaron 4 sistemas Na⁺-dependientes para el transporte de aminoácidos:

- Un sistema exclusivo para los aminoácidos catiónicos lisina y arginina;
- otro para los aminoácidos aniónicos, ácido aspártico y ácido glutámico;

- un tercer sistema para prolina y aminoácidos N-metilados;
- y un cuarto sistema que acepta un amplio rango de aminoácidos neutros como alanina, cisteína, glicina y serina.

AMINOÁCIDO	DEPENDENCIA DEL Na ⁺	K _t (nM)	J _{Max} (nmol/mg Prot/min)
ALANINA	SI	1,29+0,14	
ALANINA	NO	0,59+0,06	3,61+0,17
GLICINA	SI	7,33+0,41	1,49+0,49
GLICINA	NO	1,41+0,37	17,69+0,21
GLUTAMINA	SI	0,79+0,12	1,77+0,09
LISINA	SI	0,16+0,01	2,61+0,31
LISINA	NO	0,24+0,02	5,00+0,20
FENILALANINA	SI		3,00+0,03
PROLINA	SI	0,23+0,04	7,96+0,87

Tabla 5: Sistemas de transporte y parámetros cinéticos de algunos aminoácidos en intestino anterior de anguila. K_t = Constante de saturación media; J_{Max} = Velocidad de flujo interno máximo. Modificado de Velandia Romero (1997).

Los péptidos son captados por un transportador acoplado a protones (Thamotharan y *col.*, 1996; Maffia y *col.*, 1997). Existe además otro sistema de transportadores en la membrana basolateral de los enterocitos que conducen los nutrientes desde el interior de la célula al espacio intercelular (Collie & Ferraris, 1995).

Otro aspecto interesante referente a la absorción de los compuestos nitrogenados de la dieta es la absorción de proteínas macromoleculares que no ha sufrido digestión previa y que pasan al torrente sanguíneo tras un proceso de hidrólisis intracelular (Nose, 1989). En determinadas regiones del tracto digestivo de la mayoría de los peces existen células epiteliales especializadas en la absorción de nutrientes que poseen la capacidad de absorber proteínas

intactas no hidrolizadas y biológicamente activas. Estas células se localizan en las regiones más posteriores del intestino y poseen invaginaciones de la membrana apical y una enorme acumulación de vesículas y vacuolas en el citoplasma apical (Nose, 1989). Las proteínas ingresan en la célula por pinocitosis y una vez dentro del citoplasma serán degradadas en los lisosomas secundarios (Nose, 1989).

Aunque la mayoría de proteínas absorbidas son destinadas a digestión intracelular, una proporción de ellas logra escapar a esta degradación y entrar en contacto con células linfoides de la mucosa intestinal (Dorin y col., 1993).

6.3. Absorción de grasas

En esencia, los mecanismos de absorción lipídica son bastante semejantes en peces y mamíferos, centrándose las diferencias en el ritmo del proceso y la eficacia de la maquinaria enzimática implicada en la síntesis de lipoproteínas (Díaz y col., 2002).

Los principales componentes lipídicos en las dietas naturales y artificiales de los salmónidos son generalmente triacilglicéridos con cantidades más pequeñas de fosfolípidos y de ésteres de colesterol (Henderson & Tocher, 1987). En mamíferos, la bilis junto con el efecto mecánico mezclador del peristaltismo, reduce la grasa ingerida a una fina emulsión de triglicéridos, los cuales se hidrolizan parcialmente por la lipasa pancreática en el lumen intestinal dando ácidos grasos libres y monoglicéridos. Estos productos se combinan con las sales biliares para formar diminutas micelas de unos 2 nm de diámetro. Cuando estas micelas entran en contacto con las células absorbentes del intestino, los ácidos grasos y los monoglicéridos difunden a través de la membrana apical (Olsen & Ringø, 1997). Las membranas del retículo endoplásmico liso localizado en el citoplasma apical contienen los

enzimas necesarios para la resíntesis de los triglicéridos. Desde aquí, los triglicéridos en forma de pequeñas gotitas lipídicas son transportados al complejo de Golgi que los convierte en quilomicrones. Estos últimos son transportados hasta las membranas basolaterales de los enterocitos, salen al espacio intercelular, atraviesan la lámina basal del epitelio y acaban en el interior de los capilares linfáticos de la lámina propia de las vellosidades intestinales (Tso & Fujimoto, 1991; Thomson y *col.*, 1993) (Figura 9).

En peces óseos, además de las formas lipídicas típicas observadas en mamíferos (quilomicrones y VLDL) puede observarse de forma común otro tipo de cuerpo lipídico en los enterocitos, denominado “gotas lipídicas libres”. Éstas no parecen ser intermediarios en la síntesis de lipoproteínas, sino que más bien son consideradas formas de almacenamiento temporal de lípidos en los casos donde el índice de la absorción excede la síntesis de lipoproteínas (Iwai, 1969; Bergot & Fléchon, 1970; Noaillac-Depeyre & Gas, 1974; Stroband & Dabrowski, 1979; Watanabe & Sawada, 1985). Aunque tales acumulaciones raramente se han considerado patológicas, las grandes acumulaciones pueden, sin embargo, dañar la integridad del enterocito y el transporte de nutrientes (Díaz y *col.*, 2002).

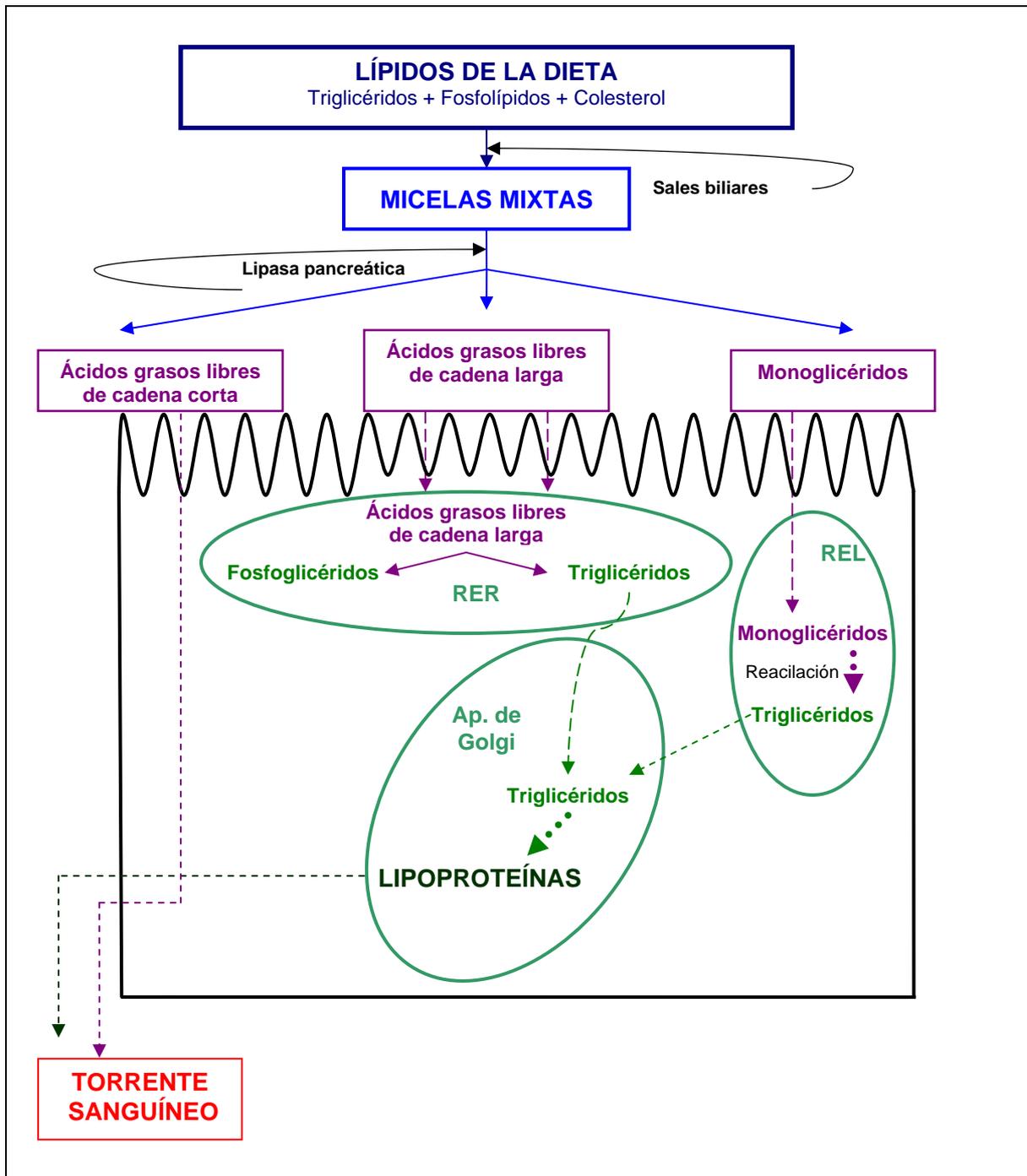


Figura 9: Representación esquemática de los principales eventos que ocurren en las células epiteliales intestinales durante la absorción del componente lipídico de la dieta. REL = Retículo Endoplásmico Liso; RER = Retículo Endoplásmico Rugoso. Modificado de Sire y col. (1981).

7. DESARROLLO ONTOGÉNICO DEL TRACTO GASTROINTESTINAL EN PECES

En términos generales, los peces se reproducen mediante la emisión de huevos, aunque existen casos de verdadero viviparismo y ovoviviparismo. La forma típica de reproducción en los peces óseos consiste en que la hembra pone los huevos directamente en la columna de agua, donde son fecundados por los machos y transportados por las corrientes, desarrollándose libremente sin relación alguna con la madre que se desentiende enseguida de la puesta (David & Evans, 1993).

En los peces pueden definirse dos tipos principales de huevos que se diferencian en función de la cantidad de vitelo que poseen. Las Lampreas y los Dipnoos producen huevos mesolecíticos que siguen un patrón de segmentación holoblástico, lo que conlleva la formación de una blástula esférica, pequeña y excéntrica. El resto de los peces óseos se reproducen mediante huevos telolecíticos que se segmentan según el patrón meroblástico, por lo que se genera una blástula discoidal y plana que se posiciona entre el epiblasto y el hipoblasto (Braat y *col.*, 1999).

Los diferentes estadios por los que atraviesa un pez a lo largo de su desarrollo han recibido una gran cantidad de denominaciones, lo que ha generado una enorme controversia. Siguiendo los trabajos de Balon (1975 y 1999) podemos distinguir entre dos tipos de especies:

- Especies con desarrollo indirecto que pasan por un periodo de metamorfosis, como son la anguila y el lenguado.
- Especies con desarrollo directo y que no sufren metamorfosis, como es el caso de los esturiones.

En este último grupo de especies puede distinguirse una serie de momentos clave en su desarrollo, como son:

1. Periodo de embrión: se inicia con la fertilización del huevo y concluye en el momento de la eclosión.
2. Periodo de embrión libre: comienza con la eclosión y concluye con la primera toma de alimento externo.
3. Periodo juvenil: al inicio de este periodo se establece la alimentación exógena y se expulsa el tapón de melanina. Concluye en el momento de la maduración sexual.
4. Periodo adulto.

La duración del periodo embrionario es muy variable dependiendo principalmente de la especie de la que se trate, de la cantidad de reservas de vitelo presentes en el embrión y de la temperatura de mantenimiento (Elbal y col., 2000) (Tabla 6).

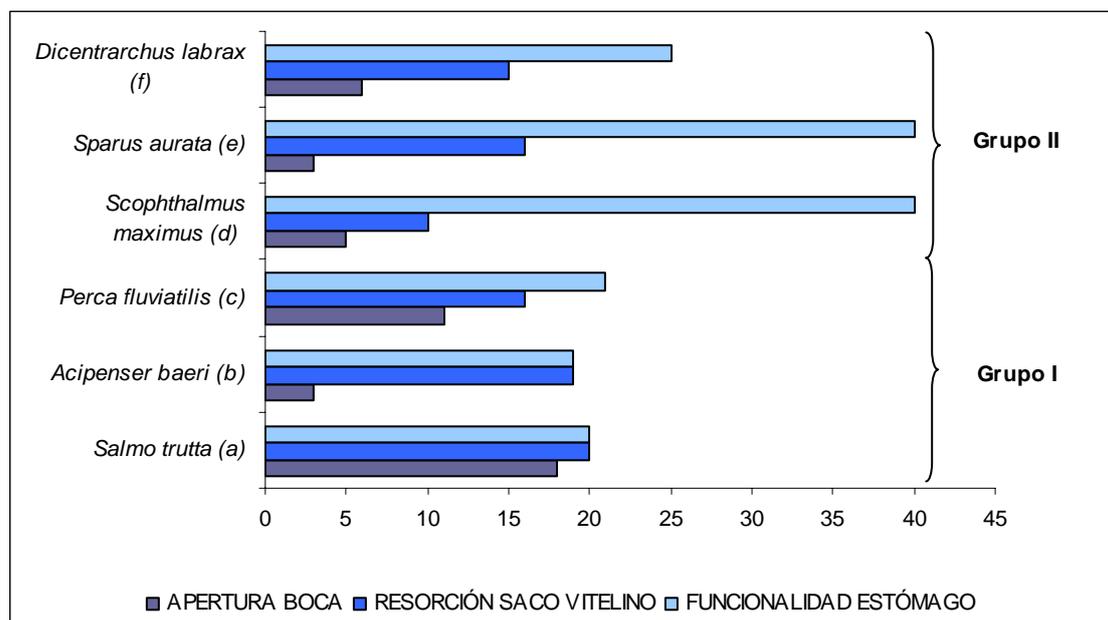
	Ø HUEVO (mm)	TALLA EMBRIONES ECLOSIÓN (mm)	DURACIÓN DEL PERIODO EMBRIONARIO	
			Desde la Fecundación hasta la Eclosión	Desde la Eclosión hasta el inicio de la alimentación exógena
SALMÓN	5,0-6,0	15-25	90 días (a 10°C) ⁽¹⁾	≈3 semanas (a 10°C)
TRUCHA	4,0-5,0	13-15	40 días (a 10°C) ⁽²⁾	≈3 semanas (a 10°C)
DORADA	0,9-1,1	3,5-4,0	3 días (a 19°C) ⁽³⁾	3 días (a 19°C)
LUBINA	1,2-1,4	7,0-8,0	2 días (a 19°C) ⁽⁴⁾	3 días (a 19°C)

⁽¹⁾: Henry y col.; 1998; ⁽²⁾: Martínez y col.; 2003; ⁽³⁾: Kamaci y col.; 2005; ⁽⁴⁾: García Hernández y col.; 2001.

Tabla 6: Principales características de los huevos y embriones libres de varias especies de peces. Modificado de García-Alcázar (2000).

A efectos prácticos, Dabrowski (1982) estableció tres categorías de peces considerando los principales eventos que tienen lugar durante la evolución y desarrollo de su sistema digestivo:

- En un primer grupo consideró a los salmónidos y algunos cíclidos. Éstos se caracterizan por la emisión de un número relativamente reducido de huevos de gran tamaño con un gran volumen de reservas nutritivas que permiten un período de incubación más dilatado en el tiempo. Un desarrollo de este tipo determina que al inicio de la alimentación exógena los animales posean ya un estómago bien desarrollado y además funcional (Gráfica 1).
- Se engloban dentro del segundo grupo a la mayoría de los peces marinos que emiten un número considerable de huevos de pequeño tamaño, con una reducida reserva vitelina y períodos de incubación muy cortos. Tras la eclosión aparece un embrión muy pequeño, poco desarrollado y con escasas reservas nutritivas internas (Gráfica 1). Por consiguiente, la alimentación exógena se inicia muy pronto, incluso antes de que se produzca el total desarrollo de los sistemas sensoriales y digestivos implicados en la localización, captura y utilización del alimento (Lauff & Hoffer, 1984).
- En el tercer grupo, se incluyen los peces que permanecen sin estómago a lo largo de toda su vida, como son los Ciprínidos, siendo lo más común durante su desarrollo embrionario el notable incremento de la longitud del intestino.



DPF: Días post-fecundación

Grupo I: Especies con periodos de incubación largos; Grupo II: Especies con periodos de incubación cortos

Gráfica 1: Comparación entre los principales eventos que tienen lugar en el sistema digestivo durante el desarrollo embrionario de varias especies de peces. (a: Elbal, 2000; b: Gisbert y col., 1998; c: Cuvier-Péres & Kestemont, 2001; d: Sarasquete y col., 1998; e: Calzada y col., 1998; f: García Hernández y col., 2001)

En las últimas décadas se ha producido un incremento en el interés sobre el desarrollo ontogénico de los peces y en particular sobre el del tracto digestivo (Loeve & Eckmann, 1988; Buddington, 1991; Boulhic & Gabaudan, 1992; Sarasquete y col., 1995; Bisbal & Bengston, 1995; Calzada y col., 1998; Ribeiro y col., 1999; Boglione y col., 1999; Gallagher y col., 2000; Crespo y col., 2001).

Al igual que entre los adultos, existen notables diferencias entre la anatomía del tracto digestivo de embriones de las distintas especies de peces óseos; sin embargo, de manera general, podemos caracterizar diferentes fases en el

desarrollo del tracto digestivo embrionario en relación con el tipo de alimentación que tiene el embrión en cada momento (Tabla 7).

FASE DE DESARROLLO	PERIODO DE ALIMENTACIÓN
EMBRIÓN	Lecitotrófico o de Alimentación endógena
EMBRIÓN LIBRE	
JUVENIL	Lecito-Exotrófico o de Alimentación mixta
ADULTA	Periodo Exotrófico o de Alimentación exclusivamente exógena
SENESCENTE	

Tabla 7: Fases del desarrollo del tracto digestivo en relación con el tipo de alimentación. Modificado de Elbal (2000).

7.1. Período Lecitotrófico

Se inicia con la fertilización del huevo y concluye en el momento de la primera alimentación exógena, por lo que durante este periodo el animal se nutre exclusivamente de sus reservas nutritivas internas (vitelo).

En el momento de la eclosión, los embriones poseen un gran saco vitelino que ocupa casi la mitad del cuerpo y se dispone en posición ventral. Algunas especies presentan un tracto digestivo indiferenciado, mientras que en otras está representado por un tubo recto que ocupa los dos tercios corporales y que está recubierto por un epitelio plano simple cuyas células presentan un aspecto indiferenciado, observándose en algunas ocasiones células ciliadas (Elbal,

2000). A menudo, como ocurre en la dorada, lubina o el rodaballo, no se ha producido la apertura de la boca ni el ano, no existen pliegues intestinales y no aparece tejido conjuntivo ni muscular asociado al tubo digestivo (García Hernández y *col.*, 2001).

Hacia el final de este periodo se produce la apertura del ano y una diferenciación zonal del tracto digestivo que conlleva la aparición de un esófago, un primordio gástrico y un intestino.

El esófago está constituido por un corto conducto tapizado por un epitelio estratificado cúbico, cuyas células presentan un contorno irregular. En su citoplasma pueden observarse además de mitocondrias de matriz clara y crestas irregulares, una gran cantidad de ribosomas libres, cisternas de RER, un complejo de Golgi localizado en posición supranuclear y algunos tonofilamentos (Elbal y *col.*, 2004).

En las especies que desarrollan estómago, el primordio gástrico está tapizado inicialmente por un epitelio cúbico simple con microvellosidades apicales, presentando las porciones laterales de la membrana celular una gran cantidad de interdigitaciones con espacios intercelulares dilatados (García Hernández y *col.*, 2001).

El intestino está tapizado por un epitelio cilíndrico simple cuyas células poseen un borde en cepillo bien desarrollado y un núcleo central donde es evidente un gran nucleolo. En el citoplasma es de destacar la presencia de ribosomas libres y grandes mitocondrias pleomórficas que se asocian a estructuras lamelares en la región basal (García Hernández y *col.*, 2001). Pueden observarse también largas cisternas del RER, lisosomas de tamaño variable y pequeñas vesículas endocíticas en las zonas apicales. También aquí

es frecuente la presencia de grandes espacios intercelulares entre los enterocitos.

Generalmente, en los embriones de peces el hígado se desarrolla pronto ya que está implicado en la resorción de la vesícula vitelina. Fishelson & Becker (2001) confirman que en la carpa, durante el inicio del periodo lecitotrófico, los hepatocitos, aunque inmaduros, se encuentran presentes como células de aspecto ovalado y contorno irregular que poseen una pequeña cantidad de citoplasma rodeando al núcleo de aspecto irregular. Dicho citoplasma es granuloso, con pocas mitocondrias, retículo endoplásmico rugoso y desmosomas en las porciones laterales que conectan las células vecinas. Hacia el final del periodo de alimentación endógena los hepatocitos adoptan características ultraestructurales y funcionales similares a las de ejemplares adultos.

Debido a su destacado papel en la síntesis y secreción de un gran número de enzimas digestivos, el páncreas exocrino en los peces se diferencia durante los primeros días de vida (Zambonino Infante & Cahu, 2001). En la carpa, *Cyprinus carpio*, Fishelson & Becker (2001) confirman que alrededor del día 3 después de la eclosión puede localizarse cierta cantidad de tejido pancreático en posición dorsal al intestino. En este momento las células pancreáticas tienen un aspecto similar al de los hepatocitos inmaduros aunque poseen un menor tamaño. Durante el periodo lecitotrófico el tejido pancreático adquiere su estructura acinar típica, con células que poseen gran cantidad de retículo endoplásmico rugoso en el polo basal y gránulos de zimógeno en posición apical (Bisbal & Bengston, 1995; Gisbert y col., 1998).

7.2. Período Lecito-Exotrófico

La introducción del alimento exógeno marca el inicio de este período, durante el cual los animales presentan un tipo de alimentación mixta, pues ingieren tanto alimento exógeno como los restos de vitelo que aún poseen. Para que los peces inicien la alimentación exógena se requiere un corto periodo de adaptación que oscila entre 1 y 4 días según la especie, incluso aunque la boca sea funcional (Zambonino Infante & Cahu, 2001). Se ha definido el “punto de no retorno” como el momento en el cual los embriones libres que no han ingerido alimento exógeno pierden la capacidad de alimentarse y la flotabilidad, muriendo en un corto espacio de tiempo.

La aparición de las glándulas gástricas constituye uno de los principales eventos en la diferenciación del estómago en peces y según Kolkowski (2001) indica el momento en el que los animales abandonan el periodo embrionario y poseen un sistema digestivo funcional capaz de digerir y absorber el alimento exógeno. Sin embargo, la presencia de glándulas no determina la funcionalidad completa del estómago (Douglas y col., 1999), ya que la pepsina es secretada en forma de pepsinógeno, que gracias al ambiente ácido existente en el estómago se transformará en la forma activa del enzima, por lo que en ausencia de una secreción capaz de disminuir el pH gástrico el enzima no será funcional. Redundando en lo anterior, Dabrowski (1982) propuso que la duración del periodo de alimentación mixta en las especies que presentan un desarrollo gástrico precoz, como los salmónidos y otras especies de agua dulce, es menor que en las especies con un desarrollo gástrico tardío (la mayoría de las especies marinas). En *Perca fluviatilis*, las actividades proteolíticas en medio ácido asociadas a la presencia de glándulas gástricas aparecen a partir del día 29 después de la eclosión (Cuvier Peres & Kestemont, 2002), mientras que en la lubina este proceso se da mucho más tarde en el tiempo, alrededor de los 50-60 días después de la eclosión (Elbal y col., 2004).

Las células glandulares inmaduras se caracterizan por la presencia en su citoplasma apical de una gran cantidad de vesículas claras y ribosomas libres. Con el crecimiento del animal estas células desarrollarán una importante red tubulo-vesicular apical, aparecerán gránulos de zimógeno y se incrementará el número de crestas y la densidad de la matriz de las mitocondrias (Calzada y *col.*, 1998). Paralelamente a la formación de las glándulas gástrica se produce una diferenciación de las células epiteliales del estómago apareciendo en su citoplasma supranuclear gránulos de contenido mucoso (Yúfera y *col.*, 2004).

Durante esta fase tiene lugar un aumento en la longitud intestinal que produce un aumento de la superficie de absorción. Además, los enterocitos adquieren características semejantes a células absorbentes maduras; desaparecen los grandes espacios grandes intercelulares y acaban por diferenciarse tanto el complejo de Golgi como el retículo endoplásmico, situándose éste último en la porción basal de los enterocitos. Estas estructuras están relacionadas con el transporte de nutrientes (Gallagher y *col.*, 2001). Durante esta fase es frecuente encontrar en los enterocitos de algunas especies de peces tres tipos de inclusiones lipídicas. El primer tipo está integrado por una serie de partículas lipídicas con tamaño variable que se localizan preferentemente en la zona basal de las células epiteliales intestinales. El segundo grupo lo conforman las pequeñas partículas lipídicas situadas tanto en vesículas del complejo de Golgi como en los espacios intercelulares basolaterales (Díaz y *col.*, 2002). Estas partículas lipídicas son similares a las proteínas de muy baja densidad (VLDL) sintetizadas a partir de las reservas lipídicas del vitelo durante el proceso de reabsorción del saco vitelino y que se almacenan en el intestino (Sire & Vernier, 1979; Calzada y *col.*, 1998; García-Hernández y *col.*, 2001).

En el momento de la primera alimentación exógena, las concentraciones de enzimas intestinales y pancreáticos son generalmente bajas e incluso en

algunas especies es imposible detectar la actividad de la tripsina, aminopeptidasa o fosfatasa alcalina (Segner y *col.*, 1987). No obstante en otras como la dorada, los enzimas anteriores son patentes a los 3-4 días post-eclosión. Ribeiro y *col.* (1999) propusieron un patrón característico de crecimiento de actividades enzimáticas digestivas para embriones de *Solea senegalensis* durante el desarrollo. A lo largo de los primeros diez días post-eclosión se produce un aumento generalizado de la mayoría de los enzimas digestivos, seguido por un descenso; desde el día 21 al 27 día post-eclosión, se observa un gran aumento de la actividad de la fosfatasa alcalina, lo que indica el desarrollo del borde en cepillo de los enterocitos. Este último hecho está sincronizado con el descenso en las concentraciones de enzimas citosólicos.

Algunos autores han sugerido que los embriones de peces utilizan enzimas propios de las presas de las que se alimentan, proceso mediante el cual se facilita la digestión del alimento en fases en las que el canal alimentario no se encuentra aún completamente diferenciado (Jancarik, 1964; Kolkowsky y *col.*, 1993).

7.3. Período Exotrófico

El período de alimentación exclusivamente exógena tiene su inicio cuando el vitelo está completamente reabsorbido y se prolongará durante el resto de la vida del animal. Concluye el proceso de diferenciación intestinal con la aparición de pliegues mucosales y la proliferación de células caliciformes. Durante el transcurso de la vida del animal las grandes gotas lipídicas libres de los enterocitos del intestino anterior desaparecerán, movilizándose las grasas en forma de quilomicrones (Díaz y *col.*, 1999).

Como comentamos en el apartado anterior, al inicio del periodo exotrófico el estómago posee unas características histológicas, ultraestructurales y funcionales muy similares a las de ejemplares adultos.

Uno de los rasgos más significativos, común a todas las especies estudiadas, es la aparición de vacuolas y vesículas supranucleares relacionadas con la toma de proteínas por pinocitosis en los enterocitos del intestino posterior (Nose, 1989). En estas células destaca el gran desarrollo del retículo endoplásmico y el aparato de Golgi, así como la presencia de una gran cantidad de lisosomas, características ultraestructurales que reflejan la capacidad de los enterocitos de dicha región intestinal para incorporar proteínas mediante procesos de pinocitosis y realizar una digestión intracelular (Smith, 1980). En algunas especies, las vacuolas y vesículas supranucleares desaparecen gradualmente cuando las glándulas gástricas se hacen funcionales; sin embargo, en otras especies estas vacuolas persisten durante toda la vida adulta (Deplano y col., 1991).

8. DESARROLLO ONTOGÉNICO DEL TRACTO GASTROINTESTINAL EN ACIPENSERIFORMES

Los huevos de esturión se desarrollan según el patrón holoblástico de crecimiento y el saco vitelino intraembrionario participa directamente en la formación del canal alimentario (Gisbert y col., 1998). El desarrollo del sistema digestivo ha sido estudiado en *Acipenser gueldnestaedi* (Dettlaf y col., 1993), *Acipenser transmontanus* (Gawlicka y col., 1995), *Acipenser baerii* (Gisbert y col., 1998, 1999) y en *Acipenser medirostris* (Gisbert & Doroshov, 2003).

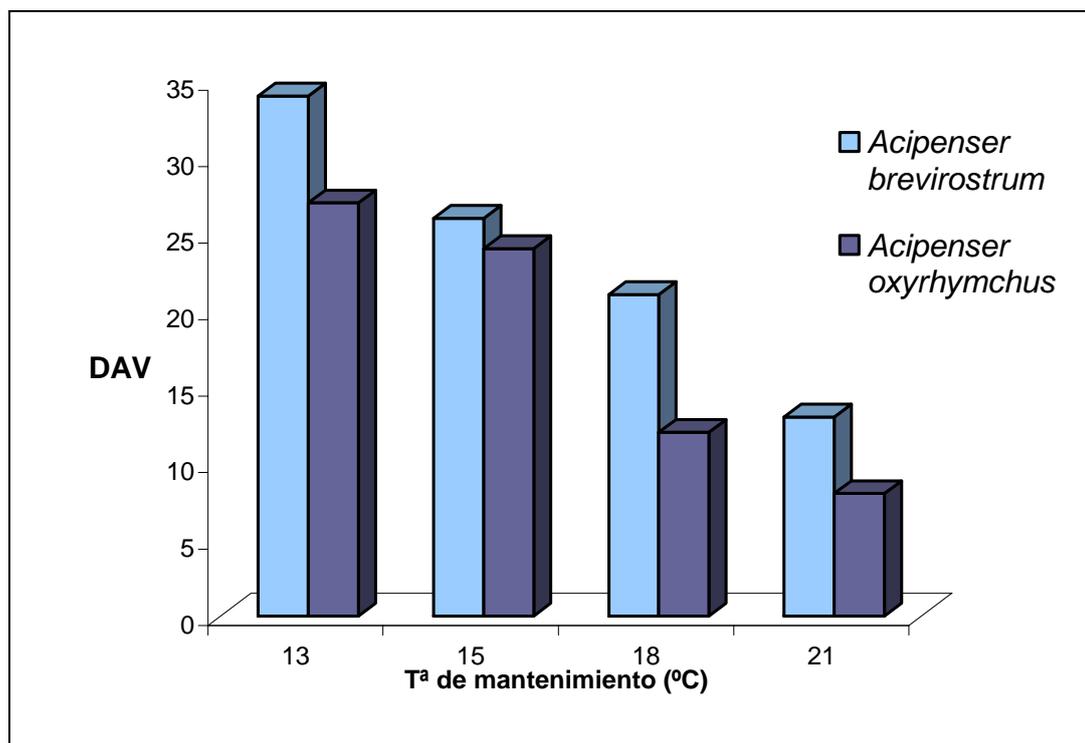
Diferentes autores han defendido la similitud de los patrones de desarrollo a lo largo del grupo de los Acipenseriformes (Buddington & Christofferson, 1985;

Gawlicka y col., 1995; Gisbert y col., 1998) por lo que pueden establecerse unas directrices capaces de resumir, al menos de forma general, el desarrollo de los embriones de esturión. Buddington en diferentes trabajos (Buddington & Christofferson, 1985; Buddington & Doroshov, 1986) propone tres periodos principales en el desarrollo de los esturiones:

- Embrionario. Desde la fertilización hasta la eclosión.
- De alimentación endógena. Desde la eclosión hasta el inicio de la alimentación exógena.
- De alimentación exógena.

La duración de cada uno de los anteriores periodos varía, al igual que en otros peces, en función de la temperatura de mantenimiento y de la especie. Hardy & Litvak (2004) demostraron en dos especies de esturión (*Acipenser brevirostrum* y *Acipenser oxyrinchus*) que tanto la tasa de utilización de vitelo como el tiempo total para su completa reabsorción están inversamente relacionados con la temperatura de mantenimiento en las diferentes especies (Gráfica 2).

Recientemente, Gisbert y Ruban (2004) han propuesto la existencia de un periodo de alimentación mixta en los embriones de esturión siberiano (*Acipenser baeri*).



DAV = Días para la reabsorción del saco vitelino

Gráfica 2: Diferencias temporales en el desarrollo embrionario entre diferentes especies de esturión. Modificado de Hardy & Litvak (2004)

8.1. Período Lecitotrófico

Como ya hemos comentado, este periodo se inicia con la fertilización del huevo y concluye en el momento de la primera alimentación exógena, por lo que durante esta fase el animal se nutre exclusivamente de sus reservas nutritivas internas (vitelo).

En el momento de la eclosión el tracto digestivo no está comunicado con el exterior (la boca y el ano aún no se han abierto). En este momento en el tracto digestivo de *Acipenser baerii* y *Acipenser medirostris* se pueden distinguir dos segmentos (Gisbert y col., 1999; Gisbert & Doroshov, 2003):

- Una región anterior rellena de vitelo y recubierta por células endodérmicas, que evolucionarán para formar las porciones gástrica y las partes anterior y media del intestino.
- Un rudimento intestinal que consiste en un intestino posterior relativamente diferenciado, que formará la válvula espiral. En este compartimento es posible distinguir un recubrimiento interno formado por células cilíndricas en diferenciación.

En el momento de la eclosión es posible detectar las actividades de diferentes enzimas en el tracto digestivo de los embriones de esturión, así en embriones de esturión siberiano (*Acipenser baeri*) Gisbert y col. (1999) mediante técnicas histoquímicas demostraron la presencia de baja actividad para la fosfatasa (ácida y alcalina) y la esterasa no específica en la matriz del saco vitelino, mientras que las actividades para estos mismos enzimas eran altas en el tejido endodérmico que rodea a la masa vitelina.

Durante los dos primeros días tras la eclosión se produce una diferenciación zonal del intestino, siendo patente la válvula espiral en todas las especies estudiadas (Gawlicka y col., 1995; Gisbert y col., 1998; Boglione y col., 1999; Gisbert & Doroshov, 2003). Las diferencias de orden temporal observadas entre las diferentes especies de esturión también se ponen de manifiesto en el momento de la apertura de la boca, que oscila entre los 1-2 días para *A. naccarii* y *A. medirostris*, y los 3-4 días en *A. baeri* (Gisbert y col., 1998).

Entre los 3 y los 7 días post-eclosión se produce la apertura del ano y se establece continuidad entre las distintas partes del tracto gastrointestinal, al mismo tiempo que se produce una diferenciación del canal alimentario, siendo este proceso común para la mayoría de las especies estudiadas. En *Acipenser naccarii* (Boglione y col., 1998), *Acipenser baeri* (Gisbert y col., 1998; Gisbert &

Williot, 2002) y *Acipenser medirostris* (Gisbert & Doroshov, 2003) comienza a aparecer una especie de surco oblicuo al canal digestivo que lo separará en una región anterior (que dará lugar al estómago) y otra posterior que se diferenciará en el intestino anterior; este proceso también sufre cambios temporales interespecíficos. Así mismo, en el intestino tiene lugar un proceso de especialización que conduce a una zonación de la parte posterior del tracto digestivo en:

- Intestino anterior
- Válvula espiral
- Recto.

Hacia el final del periodo de alimentación endógena en los embriones de *Acipenser naccarii*, el epitelio de revestimiento del intestino anterior y la válvula espiral es cilíndrico simple con células ciliadas y caliciformes interpuestas, mientras que en el ano es estratificado, no posee células ciliadas pero sí una gran cantidad de células caliciformes (Radaelli y col., 2000).

En el intestino de *Acipenser medirostris*, las primeras células caliciformes aparecen alrededor del día 6 después de la eclosión, siendo en este momento inactivas. A partir de los 7-8 días post-eclosión estas células comienzan a producir mucosustancias neutras y ácidas (carboxiladas y sulfatadas) (Gisbert & Doroshov, 2003).

Los dos últimos segmentos intestinales se encuentran ocupados por un material de color marrón, conocido como tapón de melanina, que es expulsado justo después de la primera ingesta de alimento exógeno (entre 9 y 12 días post-eclosión dependiendo de la especie). Según Gisbert & Sarasquete (2000) la síntesis y acumulación de gránulos de melanina durante el periodo lecitotrófico parece estar asociada con el consumo de las reservas vitelinas.

La observación de gránulos de vitelo en el interior de las vacuolas de las células epiteliales del esturión confirma la creencia de que la mayor parte de las necesidades energéticas de los embriones en esta fase son suplidas por los lípidos del vitelo, reservándose las proteínas para la construcción de tejidos.

8.2. Periodo Lecito-Exotrófico

Durante esta fase se establece la alimentación exógena para la mayoría de las especies (Buddington & Doroshov, 1986; Boglione *y col.*, 1998; Gisbert & Doroshov, 2003) y se expulsa el tapón de melanina (Gisbert & Sarasquete, 2000). Ambos procesos sufren variaciones temporales que, como hemos comentado anteriormente, varían en función de la temperatura (Gisbert & Ruban, 2004). Otro hecho común a las distintas especies de esturiones en esta fase es la adquisición de un estómago completamente diferenciado mostrando dos compartimentos; las observaciones para *Acipenser baeri* (Gisbert *y col.*, 1998) confirman la presencia de:

- Estómago glandular con glándulas gástricas.
- Estómago pilórico sin glándulas y con una gruesa pared muscular.

La porción posterior del tracto gastrointestinal es anatómicamente similar a la de adultos y podemos diferenciarla en:

- Intestino anterior o pilórico.

Gawlicka *y col.* (1995), en *Acipenser transmontanus*, observaron un fuerte incremento de la actividad esterasa inespecífica en los días posteriores a la introducción del alimento exógeno que relacionaron el grado de funcionalidad del intestino anterior. Diferentes autores señalan además la importancia de este

segmento en el metabolismo de carbohidratos y lípidos (Buddington & Christofferson, 1985; Gawlicka y col., 1995).

- Válvula espiral:

El establecimiento de la alimentación exógena suele coincidir con un aumento en la actividad enzimática en el borde en cepillo de los enterocitos de la válvula espiral (Buddington, 1995). En *Acipenser transmontanus* tras dos días de alimentación exógena, las capacidades de absorción de nutrientes están establecidas, como indica la fuerte actividad de la fosfatasa alcalina (Gawlicka y col., 1995). Además, el aumento en la actividad de diferentes peptidasas confirma que los embriones de esturión poseen los enzimas necesarios para completar la digestión de proteínas y el transporte de aminoácidos a través de la membrana. La expresión completa de estos enzimas indica una diferenciación completa de los enterocitos, que nos lleva a pensar en un grado de diferenciación mayor en este compartimento que en el intestino pilórico (Gawlicka y col., 1995).

- Recto.

Durante este periodo de alimentación mixta se produce un aumento en la longitud de esta porción intestinal, pero ni la estructura histológica ni las características ultraestructurales del epitelio sufren cambios importantes (Radaelli y col., 2000).

8.3. Periodo Exotrófico

A pesar del grado de desarrollo gástrico presente en los embriones libres de esturión hacia el final del periodo de alimentación mixta, las glándulas gástricas no son funcionales hasta la adquisición en el estómago de un pH similar al de los ejemplares adultos (Buddington & Christofferson, 1985). Transcurrido este tiempo los animales adoptan los hábitos alimentarios adultos (Gawlicka y col., 1995).

En el intestino el único hecho reseñable es el incremento generalizado de su longitud, así como el aumento en el número y altura de los pliegues mucosales (Gisbert y *col.*, 1998).

Buddington & Christofferson (1985) confirman que, justo después de la adquisición de los hábitos alimenticios de adultos, pueden observarse descensos graduales en las concentraciones de lipasa y amilasa, mientras que los niveles de proteasas siguen aumentando hasta situarse en valores similares a los de ejemplares adultos.



III. MATERIAL Y MÉTODOS

1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Partiendo de parentales de origen salvaje de la especie *Acipenser naccarii*, la Piscifactoría Sierra Nevada (Río Frío, Granada) obtuvo una generación de esturiones (F1) que crió y reprodujo en cautividad, produciendo una segunda generación de esturiones (F2) utilizada para la realización del presente trabajo.

Los huevos fertilizados fueron incubados a una temperatura de 15 ± 1 °C en jarras de McDonald con circuito cerrado y termorreguladas; transcurridos 7 días se produjo la eclosión. A partir de este momento, los animales se trasladaron a piscinas de poliéster donde fueron mantenidos a la misma temperatura de incubación (15 ± 1 °C), con un fotoperiodo artificial de 12 horas. Una vez consumido el saco vitelino (aproximadamente 7 días post-eclosión) los animales fueron alimentados con presas vivas. La introducción del alimento inerte se produjo entre 1 y 3 meses después de la fecundación.

2. DISEÑO EXPERIMENTAL

El primer paso dado para llevar a cabo el presente estudio fue el determinar y programar los períodos concretos de muestreo y así adecuar la obtención de muestras con la de resultados.

La recogida de animales se llevó a cabo en dos años consecutivos (2002 y 2003) durante los meses de junio y julio, de forma que pudiéramos comparar resultados entre dos cohortes reproductivas diferentes. Para los estudios histológicos se realizaron tres tomas de 10 muestras diariamente, desde el día 0 (día de la fecundación) al día 17 post-fecundación (9 post-eclosión) y, a partir de aquí, una toma diaria de 10 animales hasta el día 19 post-fecundación (11 días

post-eclosión). Posteriormente los muestreos se realizaron en días alternos hasta el día 29 post-fecundación (21 días post-eclosión). A partir de este momento se realizaron muestreos más espaciados en el tiempo (aproximadamente cada dos semanas) con la finalidad de seguir el desarrollo tardío de los juveniles (Tabla 8).

Para los estudios ultraestructurales, se realizaron 3 tomas diarias (durante el año 2002) de 5 muestras desde el día de la fecundación (día 0) hasta el día 17 post-fecundación (9 post-eclosión) y, a partir de aquí, una toma diaria de 5 animales hasta el día 19 post-fecundación (11 post-eclosión). Posteriormente los muestreos se realizaron en días alternos hasta el día 29 post-fecundación (21 días post-eclosión). A continuación, los muestreos se realizaron cada dos semanas hasta el día 40 después de la fecundación. En el año 2003, los muestreos iniciales (desde el día 0 dpf hasta el 19 dpf) fueron de 2 tomas diarias (cada 12 horas) de 5 animales (Tabla 8).

MUESTREOS

DPF	Año	MO	TEM	SEM/FESEM
7 - 17	2002	3 (cada 8 horas)	3 (cada 8 horas)	3 (cada 8 horas)
	2003	2 (cada 12 horas)	2 (cada 12 horas)	2 (cada 12 horas)
17 - 20	2002	1 (cada 24 horas)	1 (cada 24 horas)	1 (cada 24 horas)
	2003	1 (cada 24 horas)	1 (cada 24 horas)	1 (cada 24 horas)
20 - 40	2002	1 cada 48 horas	1 cada 48 horas	1 cada 48 horas

DPF = Días post-fecundación; MO = Microscopía óptica, TEM= Microscopía electrónica de transmisión, SEM = Microscopía electrónica de barrido, FESEM = Microscopía electrónica de emisión de campo

Tabla 8: Resumen de los muestreos realizados para los estudios histológicos, histoquímicos y ultraestructurales.

Los muestreos para la realización de los estudios enzimáticos se realizaron durante los meses de junio y julio del año 2003. Se tomaron muestras en los días 3, 7, 13, 14, 15, 16, 17, 20, 21, 24, 28, 31 y 35 post-fecundación. Los animales fueron pescados con una red, lavados con agua destilada y congelados en nitrógeno líquido. Posteriormente fueron almacenados a -80 °C hasta su utilización.

3. MICROSCOPIA ÓPTICA

3.1. Fijación

El material de estudio fue sometido a la acción del líquido de Bouin durante 48 horas, para posteriormente pasar a Formol al 5% hasta el momento de su inclusión en parafina. Los pasos seguidos a la hora de preparar las dos soluciones, así como los componentes que las forman, se detallan a continuación.

Para la elaboración del Líquido de Bouin se siguió el siguiente protocolo:

- 15 partes de una solución saturada de Ácido Pícrico (6 gr. de Ácido Pícrico en 375 ml. de agua destilada).
- 5 partes de formalina neutralizada con $MgCO_3$.
- 1 parte de Ácido Acético glacial.

3.2. Inclusión

Concluido el proceso de fijación, se procedió a la inclusión de las muestras en parafina. Los diferentes pasos de este proceso se detallan a continuación:

1. Lavar cuidadosamente las piezas con agua corriente durante 3 horas y 30 minutos para eliminar totalmente los restos de fijador.
2. La deshidratación de las piezas se realizará con una serie creciente de alcoholes. Comenzamos con dos baños en alcohol de 50° de 30 minutos.
 - Tres baños de 2 horas y 30 minutos en alcohol de 70°.
 - Dos baños de 30 minutos por alcohol de 90°.
 - Dos baños de 30 minutos por alcohol de 96°.
 - Tres baños de 30 minutos en alcohol absoluto (100°).
 - Dos baños de 15 minutos en Alcohol absoluto + sulfato cúprico anhidro.
3. Posteriormente a la deshidratación sometemos las piezas a dos baños de 15 minutos en benceno para eliminar los restos de alcohol y conseguir una mejor penetración de la parafina.
4. Dos pasos de 30 minutos en una mezcla 1:1 de benceno-parafina.
5. Por último, las muestras se infiltrarán en parafina (3 pasos de 8 horas cada uno) y se confeccionarán los bloques de parafina.

En este momento es muy importante que el material quede perfectamente orientado, para poder obtener así cortes que aporten la información más exacta posible.

3.3. Corte y montaje de las piezas

Antes de comenzar con el corte de las piezas propiamente dicho, es aconsejable pegar los bloques a pequeños tacos de madera, de forma que se facilite su fijación al microtomo. Posteriormente se tallan en tronco de pirámide de base trapezoidal para pasar finalmente a la consecución de cortes histológicos seriados de 5 µm de grosor mediante la utilización de un microtomo

de parafina (Leyca RM 2135). Los diferentes bloques fueron seccionados ventro-dorsal, dorso-ventral, sagital y frontalmente (corte transversal).

Tras la obtención de los cortes se procedió al estirado de los mismos, depositándolos de forma ordenada en un baño de agua destilada a 54° C. Se recogieron con la ayuda de un pincel en portaobjetos que previamente habían sido cubiertos por una fina capa de albúmina de Mayer (de forma que se asegurara la adhesión del material). Además, y para conseguir una correcta ordenación de los cortes y de los portaobjetos, se iba anotando sobre estos con un lápiz de diamante el número de orden correspondiente.

3.4. Tinción

Las secciones de 5 µm de grosor fueron teñidas en cubetas de vidrio provistas de cestillas móviles que permiten transportar un mayor número de portaobjetos de un líquido a otro, sin tener que manipularlos de uno en uno. Las diferentes técnicas de tinción histológica empleadas en este estudio se detallan en la tabla 9.

REACCIÓN	REFERENCIA	FUNCIÓN Y/O COMPUESTOS DETECTADOS
HEMATOXILINA-EOSINA	Mallory (1938)	Observación de la estructura general de tejidos
REACCIÓN DEL ÁCIDO PERYÓDICO DE SCHIFF	McManus (1948)	Mucopolisacáridos neutros
AZUL ALCIÁN PH 2,5	Lev & Spicer (1964)	Mucopolisacáridos ácidos
AZUL ALCIÁN PH 1	Lev & Spicer (1964)	Mucopolisacáridos ácidos sulfatados
PAS-AZUL ALCIÁN PH 2,5	Mowry (1963)	Mucopolisacáridos neutros y ácidos

Tabla 9: Principales técnicas de tinción histológica empleadas en el estudio.

3.4.1. Hematoxilina y Eosina

a) Hematoxilina de Harris

- Se disuelve 1 gramo de hematoxilina en 10 mililitros de alcohol absoluto (100°).
- Disolvemos 20 gramos de Alumbre potásico (Sulfato Alumínico-Potásico) en 200 ml de agua.
- Al cabo de 24 horas se mezclan las dos soluciones.
- Añadimos 0,5 gramos de Óxido de mercurio.
- Calentamos la solución teniendo cuidado de que no hierva.
- Dejamos enfriar.
- Filtrar.

b) Eosina

- Solución acuosa de eosina amarillenta al 1%.
- Añadimos 1 gota de Ácido acético por cada 100 mililitros de solución.

c) Protocolo de tinción

1. Desparafinar los cortes en xileno durante una hora.
2. Hidratar los cortes con una serie decreciente de alcoholes.
 - Alcohol 100°: 2 minutos
 - Alcohol 96°: 2 minutos
 - Alcohol 90°: 2 minutos
 - Alcohol 70°: 2 minutos
 - Alcohol 50°: 2 minutos
3. Someter los cortes a la acción de la Hematoxilina durante 2 minutos.
4. Lavar los cortes en agua corriente durante 5 minutos.
5. Someter los cortes a la acción de la eosina durante 7 minutos.

6. Deshidratar los cortes en una serie creciente de alcoholes.
 - Alcohol 90°: 2 minutos
 - Alcohol 96°: 2 minutos
 - Alcohol 100°: 2 minutos
 - Alcohol 100°: 2 minutos
7. Aclarado con xileno (dos baños de 2 minutos de duración cada uno).
8. El último paso es el montaje con Eukit.

3.4.2. Reacción del Ácido peryódico de Schiff (PAS)

a) Ácido peryódico

- Solución al 1% de ácido peryódico en agua destilada.

b) Reactivo de Schiff

- Disolvemos 1 gramo de fuchsina básica (Pararosanilina) en 200 ml de agua destilada hirviendo.
- Dejamos enfriar hasta la temperatura del laboratorio y agitamos.
- Filtramos y añadimos al filtrado 20 mililitros de Ácido clorhídrico 1N.
- A los 10 minutos añadimos 1 gramo de metabisulfito sódico ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) ó potásico ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$).
- Dejamos reposar en oscuridad y en frío entre 12 y 24 horas.
- Añadimos 2 gramos de carbón activo y agitamos durante 1 minuto.
- Filtramos con bomba de vacío y guardamos el filtrado en oscuridad y frío.

c) Protocolo de tinción

1. Desparafinar los cortes en xileno durante una hora.
2. Hidratar los cortes con una serie decreciente de alcoholes.

3. Inmersión de los cortes en ácido peryódico durante 12 minutos.
4. Lavado en agua corriente durante 5 minutos.
5. Paso rápido por agua destilada para eliminar los restos del peryódico.
6. Tinción con el reactivo de Schiff durante 12 minutos.
7. Lavado rápido con agua destilada.
8. Contrastar con Hematoxilina durante 2 minutos.
9. Lavar los cortes en agua corriente durante 5 minutos.
10. Deshidratar los cortes en una serie creciente de alcoholes.
11. Aclarado con Xileno (dos baños de 2 minutos de duración cada uno).
12. Montaje con Eukit.

3.4.3. Azul Alcían pH 2,5

a) Azul alcían pH 2,5

- Mezclamos 100 ml de solución al 3% de ácido acético con 1 g de azul alcían 8GX y ajustamos el pH a 2,5 usando ácido acético.

b) Protocolo de Tinción

1. Desparafinar los cortes en xileno durante una hora.
2. Hidratar los cortes con una serie decreciente de alcoholes.
3. Introducimos los cortes en una solución acuosa de Azul alcían pH 2,5 durante 30 minutos.
4. Paso rápido por agua destilada.
5. Contrastar con Hematoxilina durante 2 minutos.
6. Lavar los cortes en agua corriente durante 5 minutos.
7. Deshidratar los cortes en una serie creciente de alcoholes.
8. Aclarar con xileno (dos baños de 2 minutos de duración cada uno).
9. Montaje con Eukit.

3.4.4. Azul Alcían pH 1

1. Azul alcían pH 1

1.1. Disolvemos 1 g. de azul alcían 8GX en 100 ml de una solución de ácido clorhídrico 0,1N.

1.2. Solución de ácido clorhídrico 0,1 N.

- 50 ml de HCl (31-38% de pureza).
- 555 ml de agua destilada.

2. Protocolo de Tinción

1. Desparafinar las piezas en xileno durante una hora.
2. Hidratar las muestras con una serie decreciente de alcoholes.
3. Introducimos los cortes en una solución acuosa de Azul alcían pH 1 durante 60 minutos.
4. Paso rápido por agua destilada.
5. Contrastar con Hematoxilina durante 2 minutos.
6. Lavar los cortes en agua corriente durante 5 minutos.
7. Deshidratar los cortes en una serie creciente de alcoholes.
8. Aclarado con xileno (dos baños en de 2 minutos de duración cada uno).
9. Montaje con Eukit.

3.4.5. PAS- Azul Alcían pH 2,5

Las soluciones que se utilizan en esta técnica (Ácido peryódico, Reactivo de Schiff y Azul Alcían) fueron descritos anteriormente en los apartados 3.4.2. y 3.4.3., respectivamente.

a) Protocolo de Tinción

1. Desparafinar los cortes en xileno durante una hora.
2. Hidratar las muestras con una serie decreciente de alcoholes.
3. Introducimos los cortes en una solución acuosa de Azul alcian pH 2,5 durante 30 minutos.
4. Paso rápido por agua destilada.
5. Introducir los cortes en una solución acuosa de ácido peryódico al 1% durante 12 minutos.
6. Lavado en agua corriente durante 5 minutos.
7. Paso rápido por agua destilada para eliminar los restos del peryódico.
8. Introducimos los cortes en una solución acuosa de Reactivo de Schiff durante 12 minutos.
9. Lavado rápido con agua destilada.
10. Contrastar con Hematoxilina durante 2 minutos.
11. Lavar los cortes en agua corriente durante 5 minutos.
12. Deshidratar los cortes en una serie creciente de alcoholes.
13. Realizar con xileno (dos baños de 2 minutos de duración cada uno).
14. Montaje con Eukit.

4. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

El proceso de preparación de muestras para microscopía se llevó a cabo en el Servicio de Microscopía del Centro de Instrumentación Científica (CIC) de la Universidad de Granada, siguiendo el protocolo descrito por Megías y Renau (1998).

4.1. Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)

1. Fijación de las muestras en una mezcla 1:1 de glutaraldehído al 1,5% y paraformaldehído al 1% en tampón cacodilato 0,05M, pH 7,4 durante 2 horas y a 4° C.
 - Tampón cacodilato 0,05M pH 7,4
 - 10,701 g de Cacodilato sódico.
 - 0,25 g de Cloruro cálcico.
 - 9 g de Sacarosa.
 - 1000 ml de Agua destilada
2. Lavado en tampón cacodilato 0,05M, pH 7,4, tres pasos de 5 minutos cada uno a 4°C.
3. Post-fijación en tetróxido de osmio (OsO₄) al 2%, con ferrocianuro al 1% en tampón cacodilato 0,05M, pH 7,4 durante 2 horas y a 4°C.
4. Lavado en tampón cacodilato 0,05M, pH 7,4, tres cambios de 20 minutos a 4° C.
5. Tinción en bloque con acetato de uranilo al 2% en solución acuosa, en oscuridad durante dos horas y a temperatura ambiente.
6. Lavado en agua desionizada, 3 cambios de 20 minutos a temperatura ambiente.
7. Deshidratación de las muestras en un gradiente de concentraciones crecientes en etanol a temperatura ambiente con los siguientes pasos:
 - 20 minutos en Etanol 50°.
 - 20 minutos en Etanol 70°.
 - 20 minutos en Etanol 90°.
 - 3 cambios de 20 minutos Etanol al 100°,
8. Infiltración en una mezcla de etanol 100°/resina epoxi (Embed 812, EMS) a temperatura ambiente y en un agitador orbital (SBS), con las siguientes concentraciones:

- Etanol: resina (2:1). 60 minutos y a temperatura ambiente.
 - Etanol:resina (1:1). 60 minutos y a temperatura ambiente.
 - Etanol:resina (1:2). 60 minutos y a temperatura ambiente.
9. Inclusión de las muestras en resina pura durante 8 horas a 4° C.
 10. Polimerización en una estufa (Selecta) a 60° C durante 24 horas.
 11. Realización de cortes semifinos de 1 micra de espesor en un ultramicrotomo (Ultracut S, LEICA) con cuchilla de diamante (Diamond de 45°). Posteriormente se montarán sobre portaobjetos y serán teñidos con una mezcla de azul de toluidina al 1% y Borax al 1% en solución acuosa, durante 20-30 segundos en placa caliente (Selecta).
 12. Obtención de cortes ultrafinos en un ultramicrotomo (Ultracut S, LEICA) con cuchilla de diamante (Diamond de 45°), de 500-750 amstrongs de espesor. Estos cortes se montarán sobre rejillas de cobre de malla 300 y se teñirán con acetato de uranilo al 1% en solución alcohólica al 50% durante 1 minuto. Posteriormente se tiñeron con citrato de plomo según Reynolds (1963) en una atmósfera exenta de CO₂, durante 5 minutos.
 13. Por último, las rejillas se observaron en un microscopio electrónico de transmisión Zeiss 902.

4.2. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) y de Barrido de Emisión de Campo (FESEM)

1. Fijación de la muestra en una solución de Glutaraldehído al 2,5% en PBS, pH 7,4 durante 24 horas y a 4° C.
2. Lavado de la misma en tampón PBS, pH 7,4 (3 cambios de 20 minutos cada uno a 4° C).
3. Post-fijación con tetróxido de osmio al 2% en oscuridad durante 1 hora y a temperatura ambiente.
4. Lavado en agua desionizada para eliminar los restos de tetróxido de osmio (3 cambios de 20 minutos cada uno).

5. Deshidratación en un gradiente de concentraciones crecientes de etanol, con los siguientes pasos:
 - 15 minutos en Etanol 50°.
 - 15 minutos en Etanol 70°.
 - 15 minutos en Etanol 90°.
 - 2 cambios de 15 minutos cada uno en Etanol 100°
6. Deseccación por el método por punto crítico (Anderson, 1951) con CO₂ en un secador de Punto crítico Polaron CPD7501.
7. Recubrimiento de las muestras por Evaporación de Carbón (Evaporador Hitachi).
8. Observación de las muestras en un microscopio electrónico de barrido de emisión de campo Gemini-1530 de Leo del CIC de la Universidad de Granada.

5. ANÁLISIS ENZIMÁTICOS

5.1. Preparación de las muestras

Con la ayuda de un homogeneizador automático, se homogeniza 1 g de muestra con 4 ml de tampón Tris-HCl 100 mM, 0,1% Tritón 0,1 mM (proporción 1:4); para evitar el deterioro de las enzimas, la descongelación, homogenizado y posterior conservación de las muestras se hace en hielo.

Los homogenizados son centrifugados a 16000 rpm (30000 g) durante 30 minutos y a 4° C, en una centrífuga "Kontron" mod. Centrikon H-401. Tras la centrifugación, se recoge el sobrenadante con ayuda de una pipeta automática y se reparte entre eppendorf previamente numerados. Una vez introducidos en

un baño de hielo, se procede a la determinación de la actividad enzimática, proteásica y α -amilásica.

5.2. Determinación de la actividad proteolítica total

La actividad proteolítica fue estimada utilizando el método de la hidrólisis de la caseína de Kunitz (1947), modificado por Walter (1984). Una vez que la caseína utilizada como sustrato precipita, el Ácido Tricloroacético (TCA) la separa de su sustrato proteico, quedando péptidos solubles que son medidos para determinar la actividad proteolítica total; como estándar se usa tirosina.

Para caracterizar las proteasas, se ensayó un amplio rango de pH, caracterizando las proteasas según pH. Para las medidas de pH se utilizó un lector de placas (Power Wave X, Microplate Scanning Spectrophotometer. Biotek Instruments Inc.).

a) Reactivos

Se utilizaron diferentes tampones en función de su idoneidad para cada uno de los pH ensayados:

pH	TAMPÓN
1,5	KCl-HCl 0,1M
3,0	Glicina-HCl 0,2M
4,0	Ác. Cítrico 0.1M-Fosfato 0,2M
7,0	Ác. Cítrico 0.1M-Fosfato 0,2M
8,5	Tris-HCl 0,1M
9,0	Tris-HCl 0,1M
10,0	Glicina-NaOH 0,1M

- Ácido Tricloroacético (TCA) al 8% w/v en agua destilada.
- Solución de caseína 10 mg/l en agua destilada.

b) Técnica

1. Los extractos iniciales que corresponden a huevos fueron diluidos en proporción 1:3 con el tampón de dilución (Tris-HCl 100 mM, 0,1% Tritón 0,1 mM), mientras que el resto de los extractos fue utilizado concentrado.
2. Se utilizan tubos Eppendorf preparados según el siguiente protocolo:

	CONTROL	TEST
CASEINA (ml)	0,125	0,125
TAMPÓN (ml)	0,125	0,125
EXTRACTO (ml)	0,05	0,05

3. Incubar los tubos Eppendorf durante una hora a la temperatura de incubación.
4. Añadir 0.6ml de TCA. al 8% w/v. Mantener durante 60 minutos en un baño de hielo.
5. Centrifugar a 4000 rpm durante 10 minutos.
6. El sobrenadante se toma con una pipeta Pasteur, se lleva la microplaca y se mide la absorbancia en el lector a 280 nm.

Como estándar se utilizó la L-Tirosina, preparándose una curva patrón con concentraciones de: 2,7; 8,2; 13,6; 19,1; 24,5 y 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$, a partir de la solución madre al 0.03%, según el siguiente protocolo:

	B	T₁	T₂	T₃	T₄	T₅	T₆
L-Tir (ml)	x	0,05	0,15	0,25	0,35	0,45	0,55
Tampón (ml)	0,55	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1	x

Se define la Unidad de Actividad Proteolítica Total como la cantidad de enzima que libera un mM de tirosina/ml/minutos.

5.2.1. Determinación de la actividad α -amilasa

La actividad α -amilasa fue determinada mediante el método de la hidrólisis del almidón. Los azúcares (o equivalente reducido) son estimados cuantitativamente usando el procedimiento colorimétrico de Somogy-Nelson (Somogy, 1951), descrito por Robot y Whelan (1968). Cuando el reactivo (cobre) se calienta es reducido por el tartrato y el óxido de cobre formado se rompe por agitación suave. Para determinar la actividad se adiciona un reactivo cromogénico (solución arseniato-molibdato) que desarrolla un color cuya densidad óptica es proporcional al azúcar que contiene la muestra. Como estándar se usa maltosa.

a) Reactivos

- Solución de almidón al 2% w/v, en agua destilada.
- Tampón fosfato-citrato 0,1M, NaCl 0,05M, pH 7,5
- Reactivos de Somogy-Nelson (1-4):

REACTIVO 1	REACTIVO 2	REACTIVO 3	REACTIVO 4
Bicarbonato Sódico 2,5% w/v	Sulfato de Cobre x5H ₂ O 15% w/v + unas gotas de H ₂ SO ₄	Molibdato amónico 5% w/v + 2ml de H ₂ SO ₄	1 ml REACTIVO 2 + 25 ml REACTIVO 1
Tartrato sódico- potásico 2,5% w/v		Arseniato sódico x 7H ₂ O 0,6% w/v	
Sulfato sódico anhidro 20% w/v			

b) Técnica

En este caso, ninguna de las muestras fueron diluidas, todas se utilizaron concentradas.

1. Preparar tubos con tapón de rosca de teflón, según el siguiente protocolo:

	CONTROL	TEST
TAMPÓN	0,125 ml	0,125 ml
ALMIDÓN	0,125 ml	0,125 ml
EXTRACTO	0,05 ml	0,05 ml

2. Incubar las muestras durante 1 hora.
3. Inmediatamente después añadir 0,3ml del reactivo 4 de Somogy-Nelson.
4. Hervir las muestras durante 20 minutos exactos; enfriar a temperatura ambiente.

5. Añadir 0,3ml del reactivo 3 de Somogy-Nelson y agitar hasta que no desprenda más CO₂.
6. Añadir 3,33ml de agua destilada, agitar y dejar reposar a temperatura ambiente durante 5-10 minutos.
7. Medir la absorbancia a 600 nm.

Como estándar se utilizó la maltosa, preparando una curva estándar con concentraciones de 50, 100, 150, 200, 250 y 300 µg/ml, a partir de la solución madre al 0,03%, según el siguiente protocolo:

	B	T₁	T₂	T₃	T₄	T₅	T₆
MALTOSA (ml)	x	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3
TAMPÓN (ml)	0,3	0,25	0,2	0,15	0,1	0,05	x

Se define la unidad de Actividad α-Amilasa como la cantidad de enzima que puede producir un mM de maltosa/ml/minutos.

5.3. Determinación del contenido Proteico

a) Reactivos

- Albúmina al 0,06%.
- Kit Bio-Rad.

b) Técnica

Para la preparación de las muestras se introduce en cada uno de los tubos de ensayo 5µl de la muestra diluida, añadimos 795 µl de agua destilada (hasta un volumen de 800 µl). Posteriormente se añaden 200 µl del Kit Bio-Rad

(resultando por tanto un volumen final de 1000 μ l; el mismo que en los tubos de la recta patrón.

Como estándar se utilizó la albúmina, preparando una curva estándar según el siguiente protocolo:

[Albúmina] (μg/ml)	SOLUCIÓN MADRE (μl)	AGUA DESTILADA (μl)	KIT BIO-RAD (μl)	VOLUMEN FINAL (μl)
0	0	800	200	1000
3	5	795	200	1000
6	10	790	200	1000
12	20	780	200	1000
24	40	760	200	1000
48	80	720	200	1000

Para la representación gráfica de los resultados de las diferentes actividades enzimáticas a lo largo del desarrollo en *Acipenser naccarii* se utilizó el programa Microsoft Excel. Con este mismo programa se aproximó a cada gráfica de actividad, una línea de tendencia asociada a la media con el propósito de estimar máximos y mínimos en la evolución de las actividades enzimáticas.



IV. RESULTADOS

ESTUDIOS HISTOLÓGICOS Y ULTRAESTRUCTURALES

Como comentamos en apartados anteriores, en los peces las distintas fases del desarrollo pueden relacionarse con el tipo de alimentación que los animales tienen en cada momento (Balon, 1975, 1999). Distinguimos así un periodo lecitotrófico en donde los animales se nutren exclusivamente de las reservas vitelinas y que incluye a las fases de embrión y de embrión libre. Posteriormente, durante el periodo lecito-exotrófico, los animales utilizan tanto vitelo como alimento de origen exógeno. Tras el consumo total de las reservas vitelinas los animales inician el periodo exotrófico, nutriéndose únicamente de alimento de origen exógeno.

1. PERIODO LECITOTRÓFICO O ENDOTRÓFICO

Este periodo se inicia con la fertilización del huevo y concluye en el momento de la primera alimentación exógena, por lo que durante esta fase el animal se nutre exclusivamente de sus reservas nutritivas internas (vitelo). Nuestro estudio se inicia en el momento de la eclosión.

1.1. Eclosión

El momento de la eclosión sufre variaciones temporales relacionadas con la temperatura de incubación, así las cohortes reproductivas de Junio del año 2002 y la de Junio del año 2003 (incubadas a $15^{\circ}\text{C}\pm 1$) eclosionaron a los 7 días 18 horas post-fecundación, mientras que en la cohorte de Julio del año 2002 (incubada a $17^{\circ}\text{C}\pm 1$), la eclosión se produjo en el día 5 post-fecundación. En todos los ejemplares analizados (pertenecientes a las 3 cohortes reproductivas), en el momento de la eclosión los embriones de *Acipenser naccarii* poseen un sistema digestivo dividido en dos regiones principales (Figura 10):

- La región anterior está representada por un gran saco vitelino central que dará lugar a la porción gástrica y al intestino anterior. La boca aún no está comunicada con el exterior (Figura 11).
- En la región posterior podemos observar un primordio de la válvula espiral parcialmente diferenciado. El ano tampoco está abierto, por lo que en este estadio de desarrollo no existe ningún tipo de comunicación del tracto gastrointestinal con el exterior.

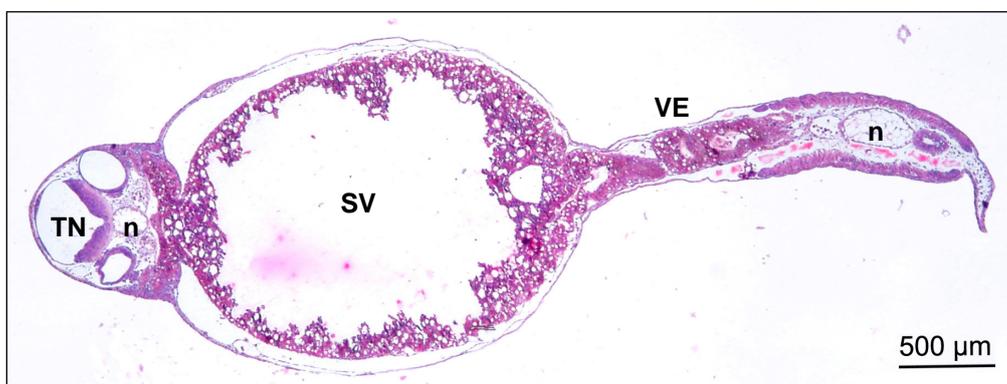
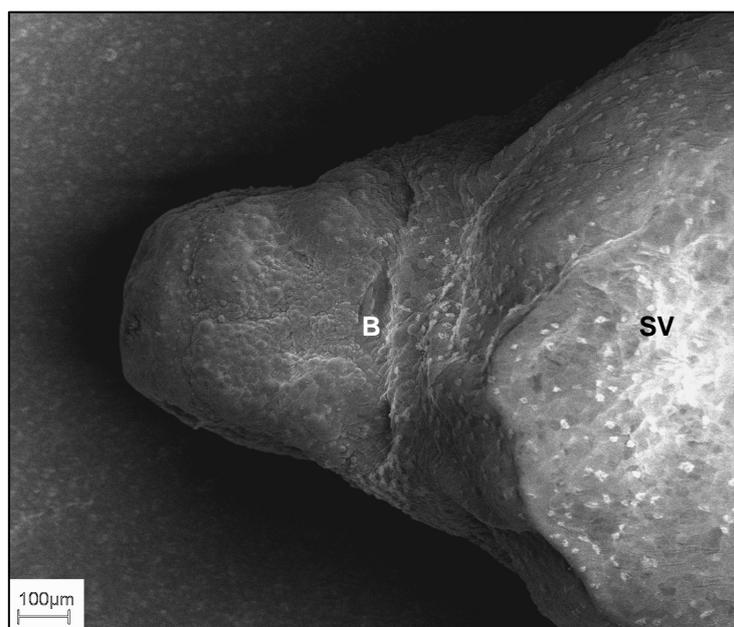


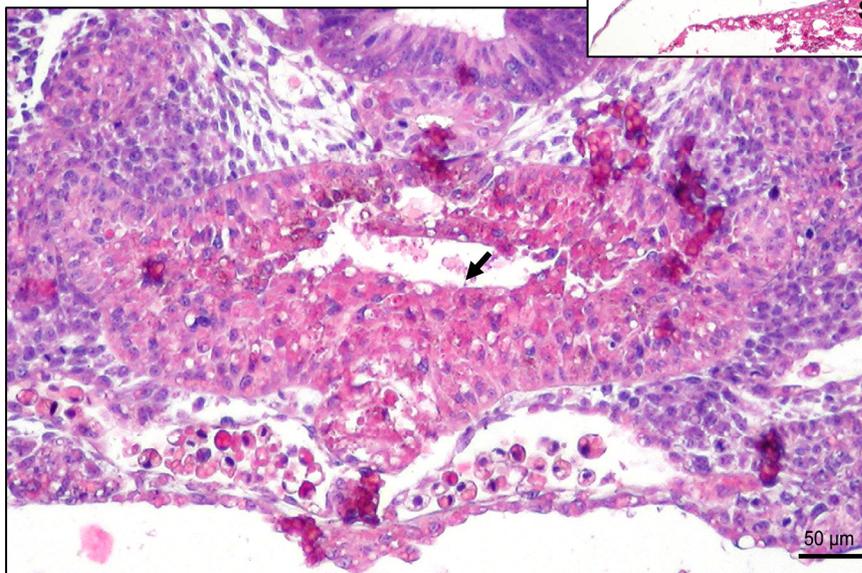
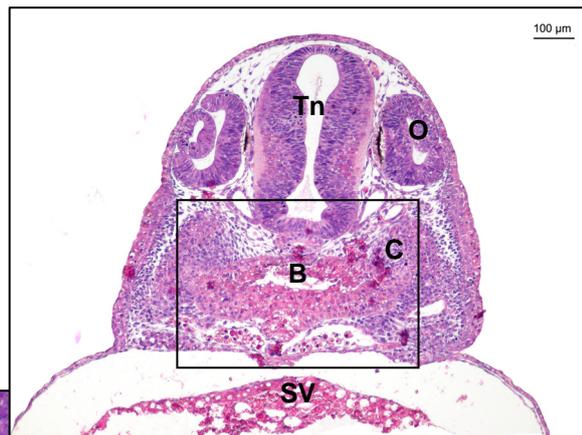
Figura 10: Sección dorso-ventral de un embrión recién eclosionado. H-E. SV, Saco vitelino; VE, Válvula espiral; TN, Tubo neural; n, notocorda.

Figura 11: Vista ventral de un embrión recién eclosionado en el que podemos observar como la boca aún ésta no está abierta. FESEM. B, Boca; SV, Saco Vitelino.



En este momento del desarrollo, la cavidad orofaríngea se encuentra tapizada por una mucosa constituida por un epitelio estratificado en diferenciación y una delgada lámina propia de tejido conjuntivo. Este epitelio está formado por células cúbicas, que presentan una gran cantidad de vacuolas apicales llenas de material vitelínico y algunos gránulos de pigmento, con algunas células ciliadas intercaladas. La región posterior de la cavidad orofaríngea no está diferenciada y aún no se establece conexión con la región gástrica, ya que en la luz del conducto se acumula una gran cantidad de material vitelínico. A ambos lados de la cavidad bucal podemos observar una concentración de tejido cartilaginoso en diferenciación, que en estadios posteriores dará lugar a los arcos branquiales (Figura 12).

Figura 12: a - Imagen panorámica de la porción corporal anterior en sección dorso-ventral de un embrión de *Acipenser naccarii* en el momento de la eclosión, donde podemos observar la cavidad orofaríngea. H-E. SV, Saco vitelino; Tn, Tubo neural; O, Ojo; C, Cartílago; B, Boca.



b - Detalle del epitelio de la boca de un embrión recién eclosionado (flecha).

El saco vitelino ocupa la mayor parte de la cavidad corporal y adopta la forma típica de bolsa. Esta estructura está compuesta por una gran masa central de vitelo intraembrionario, rodeado por un epitelio endodérmico en proceso de diferenciación, cuyas células presentan una gran cantidad de vacuolas apicales, que contienen en su interior gránulos de vitelo de diferentes tamaños (Figura 13).

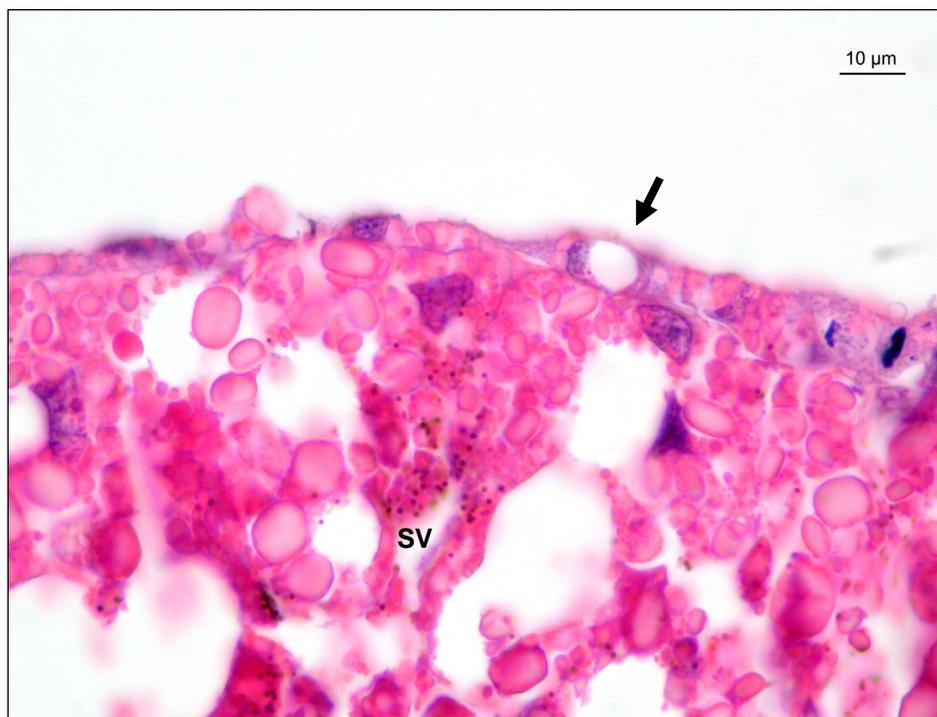


Figura 13: Detalle del epitelio endodérmico en proceso de diferenciación del saco vitelino. H-E.

Los estudios ultraestructurales con TEM ponen de manifiesto la presencia en las células epiteliales de un núcleo muy eucromático con nucleolo bien visible, situado en posición basal, así como abundantes inclusiones vitelínicas que ocupan la mayor parte de su citoplasma (Figura 14).

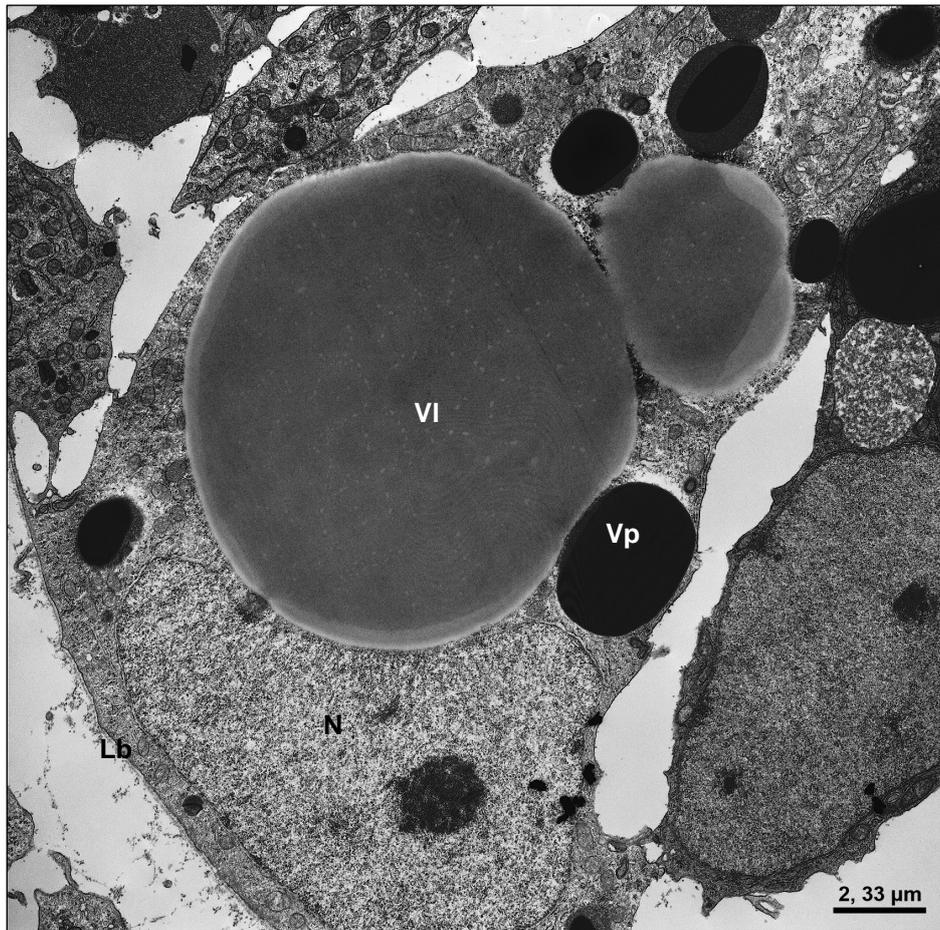


Figura 14: Detalle del epitelio endodérmico del saco vitelino de un embrión de *Acipenser naccarii* en el momento de la eclosión, donde podemos observar una lámina basal (Lb) incipiente, un núcleo (N) basal, gran número de inclusiones de vitelo tanto lipídico (VI) como proteico (Vp), así como unos amplios espacios intercelulares. TEM.

Las caras laterales de estas células muestran abundantes espacios intercelulares dilatados (Figura 14), que se resuelven a nivel apical en complejos de unión (Figura 15). La cara apical presenta expansiones citoplasmáticas filiformes irregulares que representan un aumento de la superficie celular, relacionado con los procesos de captación del material de reserva (Figura 15).



Figura 15: Detalle del ápice de las células endodérmicas del epitelio del saco vitelino de un embrión de *Acipenser naccarii* en el momento de la eclosión, donde podemos observar expansiones citoplasmáticas irregulares y complejos de unión (flechas). TEM.

El citoplasma apical, en aquellas células que no están repletas de vitelo, se caracteriza por presentar un aparato de Golgi bien desarrollado, así como cisternas de retículo endoplasmático rugoso (REr), mitocondrias y abundantes ribosomas libres (Figura 16).

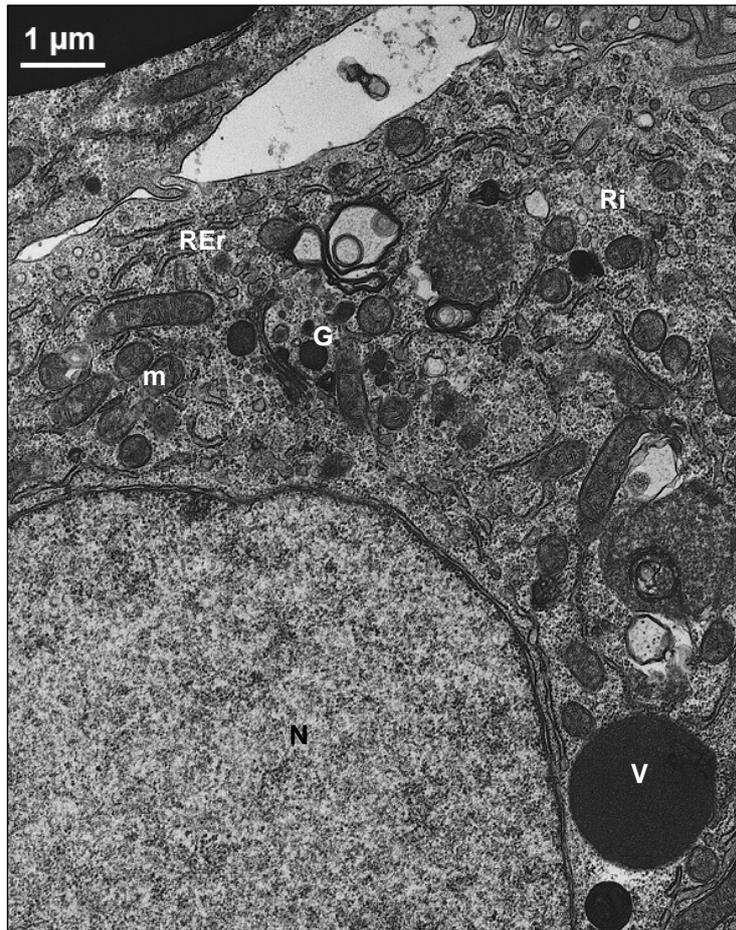


Figura 16: Detalle del citoplasma supranuclear de las células del epitelio endodérmico del saco vitelino de un embrión de *Acipenser naccarii* en el momento de la eclosión. retículo endoplásmico rugoso (REr), ribosomas libres (Ri), mitocondrias (m), complejo de Golgi (G) con vesículas asociadas; V, vitelo.

En la región corporal posterior, puede distinguirse un primordio intestinal, constituido por un epitelio cilíndrico en diferenciación, cuyas células se caracterizan por exhibir un citoplasma basófilo, núcleos en posición basal y diferentes vacuolas apicales que contienen en su interior muchos gránulos, tanto de vitelo como de melanina (producto de la degradación del vitelo) (figura 17).

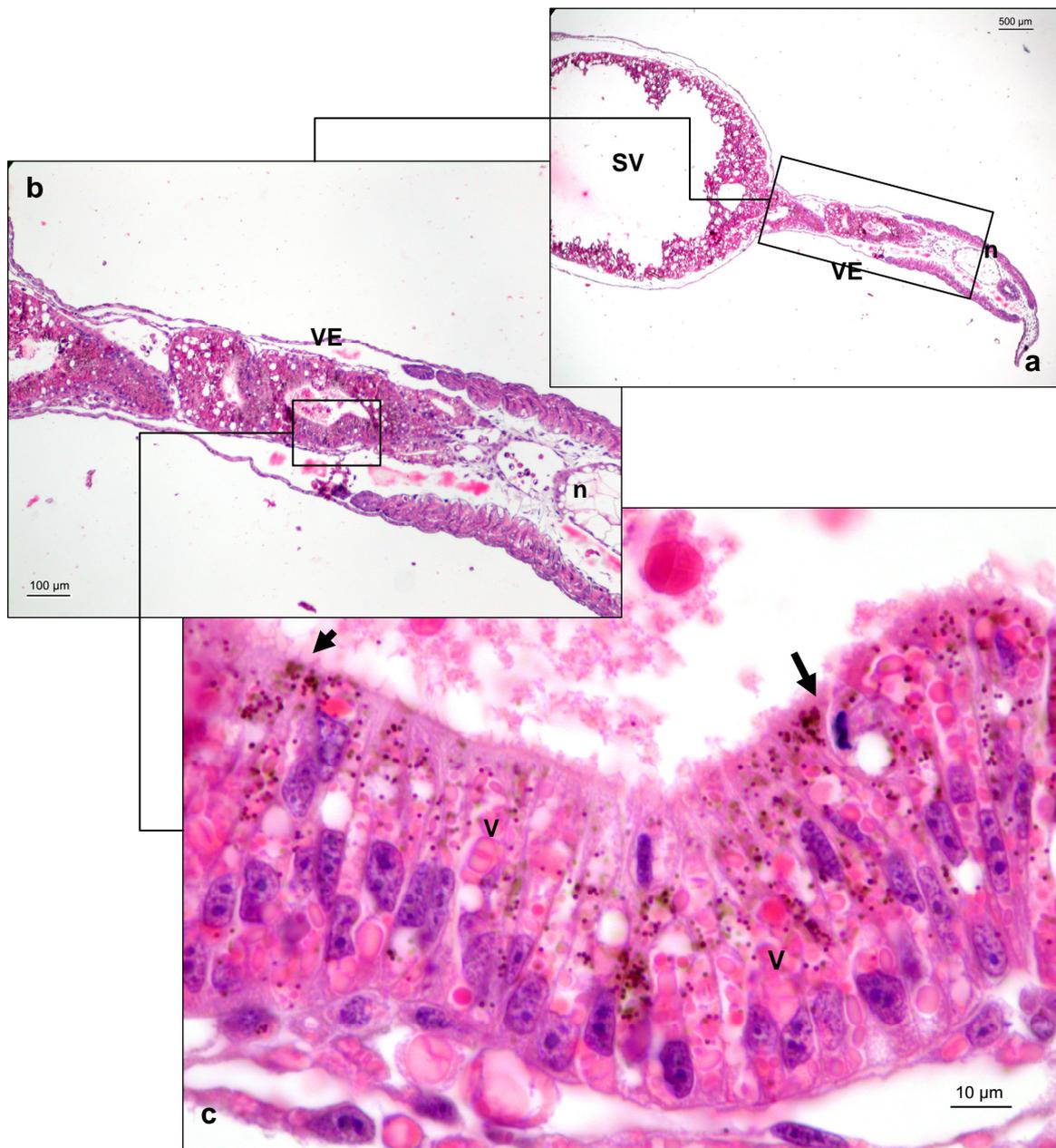


Figura 17: a y b: Micrografías panorámicas de la porción corporal posterior de un embrión *Acipenser naccarii* recién eclosionado en sección dorsventral, donde podemos observar con diferentes aumentos la válvula espiral. H-E. c - Detalle del epitelio cilíndrico en diferenciación de la válvula espiral donde podemos observar la gran concentración de gránulos, tanto de vitelo (V) como de melanina (Flechas). H-E. SV, Saco vitelino; VE, Válvula espiral; n, notocorda; V, Vitelo.

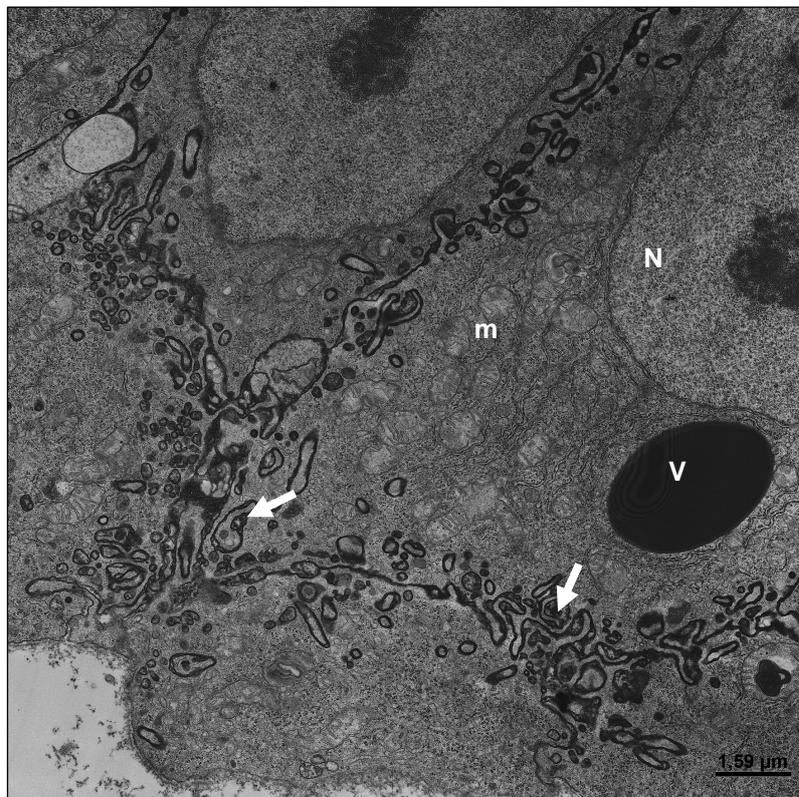
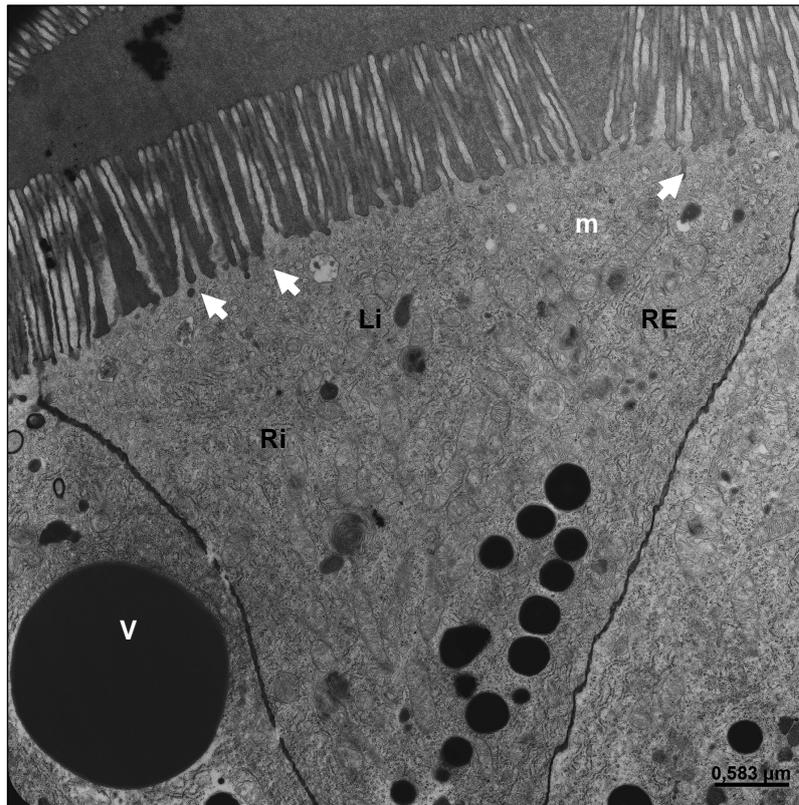
Ninguna de las técnicas histoquímicas empleadas para el estudio de mucopolisacáridos (PAS, AA pH 2,5 y AA pH 1) dan resultado positivo en este momento de desarrollo.

Las células epiteliales analizadas con TEM muestran a nivel apical abundantes y largas microvellosidades con numerosas invaginaciones pinocíticas en su base.

En el citoplasma apical, entre las numerosas vesículas pinocíticas, se localiza abundante retículo endoplasmático (RE), mitocondrias, lisosomas, ribosomas así como gránulos de vitelo de diferente densidad y tamaño. Dichas características ultraestructurales demuestran la intervención de estas células en la absorción de material vitelínico (Figura 18) que se distribuye por todo el citoplasma, incluyendo la región basal, donde además podemos apreciar la situación de los núcleos y la gran abundancia de interdigitaciones, apareciendo en los espacios intercelulares pequeñas partículas de naturaleza lipoproteica (flecha en figura 19). La lámina basal es aún muy incipiente.

Figura 18: Detalle del citoplasma apical del epitelio del primordio intestinal en un embrión de *Acipenser naccarii* en el momento de la eclosión. Flechas, vesículas pinocíticas; Li, lisosomas; Ri, ribosomas libres; RE, retículo endoplásmico; V, vitelo.

Figura 19: Detalle del citoplasma basolateral del epitelio del primordio intestinal en un embrión de *Acipenser naccarii* en el momento de la eclosión. N, núcleo; m, mitocondrias; V, vitelo.



1.2. Fase de embrión libre

Durante el tiempo que dura esta fase, los embriones sufren una gran cantidad de cambios tanto anatómicos como estructurales y funcionales en su sistema digestivo que los preparan para la captura y asimilación de la alimentación exógena.

En la tabla 11 se resumen los principales cambios estructurales que tienen lugar a lo largo del desarrollo del tracto digestivo de los embriones de *Acipenser naccarii* y el momento en el que éstos aparecen.

La fase de embrión libre está caracterizada por la apertura de la boca y el ano, así como por la diferenciación zonal del canal gastrointestinal. Hacia la mitad de esta fase es posible diferenciar en los embriones de *Acipenser naccarii* el esófago, el esbozo de estómago y el intestino, que posee ya un epitelio cilíndrico simple con ribete en cepillo.

➤ **Cavidad orofaríngea**

El primer proceso de interés a la hora de la adopción de un sistema gastrointestinal similar al de adultos es la apertura de la boca, que se produce alrededor de los 3 días post-eclosión, y la diferenciación de ésta en dos valvas orales (Figura 20).

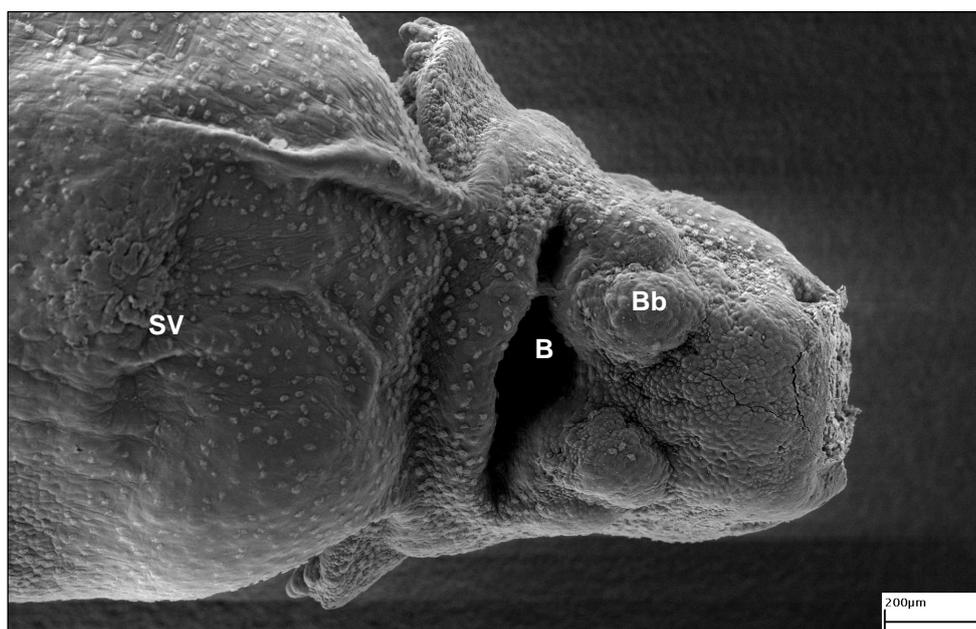


Figura 20: Imagen panorámica de un embrión libre de *Acipenser naccarii* de 3 dpe, donde podemos observar como la boca se ha abierto y las barbillas comienzan a desarrollarse. FESEM. SV, Saco vitelino; B, Boca; Bb, Barbillas.

En este momento la mucosa de la cavidad orofaríngea presenta un epitelio estratificado, con células epiteliales cúbicas que contienen en su interior una gran cantidad de gránulos de material vitelínico y de melanina, que desaparecerán alrededor de los 4-5 días post-eclosión (Figura 21).

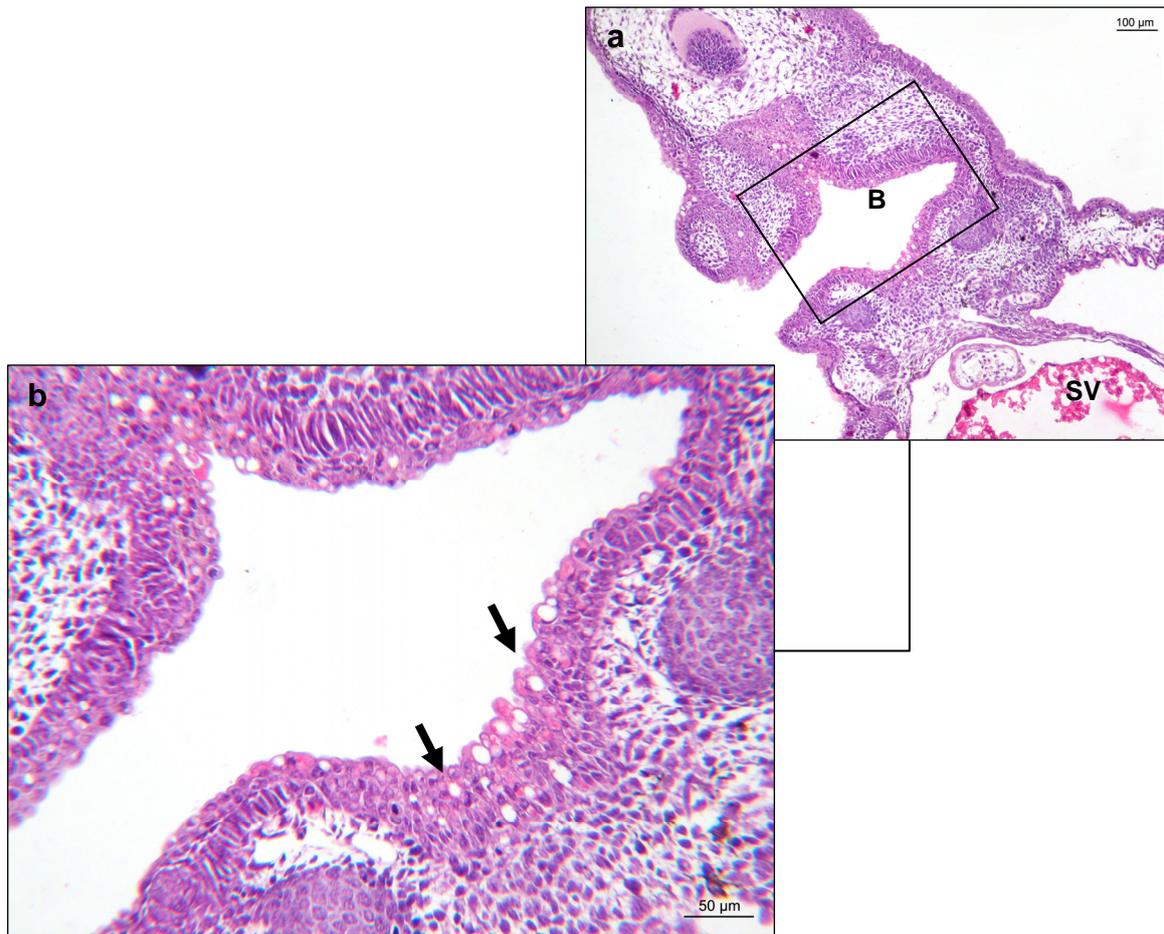


Figura 21: a - Imagen panorámica de la porción corporal anterior de un embrión libre de *Acipenser naccarii* de 3 dpe en sección dorso-ventral, donde podemos observar la cavidad bucal y el saco vitelino. H-E. b - Detalle del epitelio estratificado en diferenciación de la cavidad bucal (flechas). H-E. B, Boca; SV, Saco Vitelino.

Hacia el final del periodo lecitotrófico, además de las células epiteliales típicas, provistas en su polo apical de micropliegues, podemos distinguir en el epitelio de la cavidad orofaríngea células ciliadas y células mucosas (figura 22b). Las células ciliadas se distribuyen a lo largo de toda la cavidad orofaríngea, y se sitúan entre los demás tipos celulares. La presencia de estas células en la mucosa bucal se mantiene hasta el inicio de la alimentación exógena (Figuras 22).

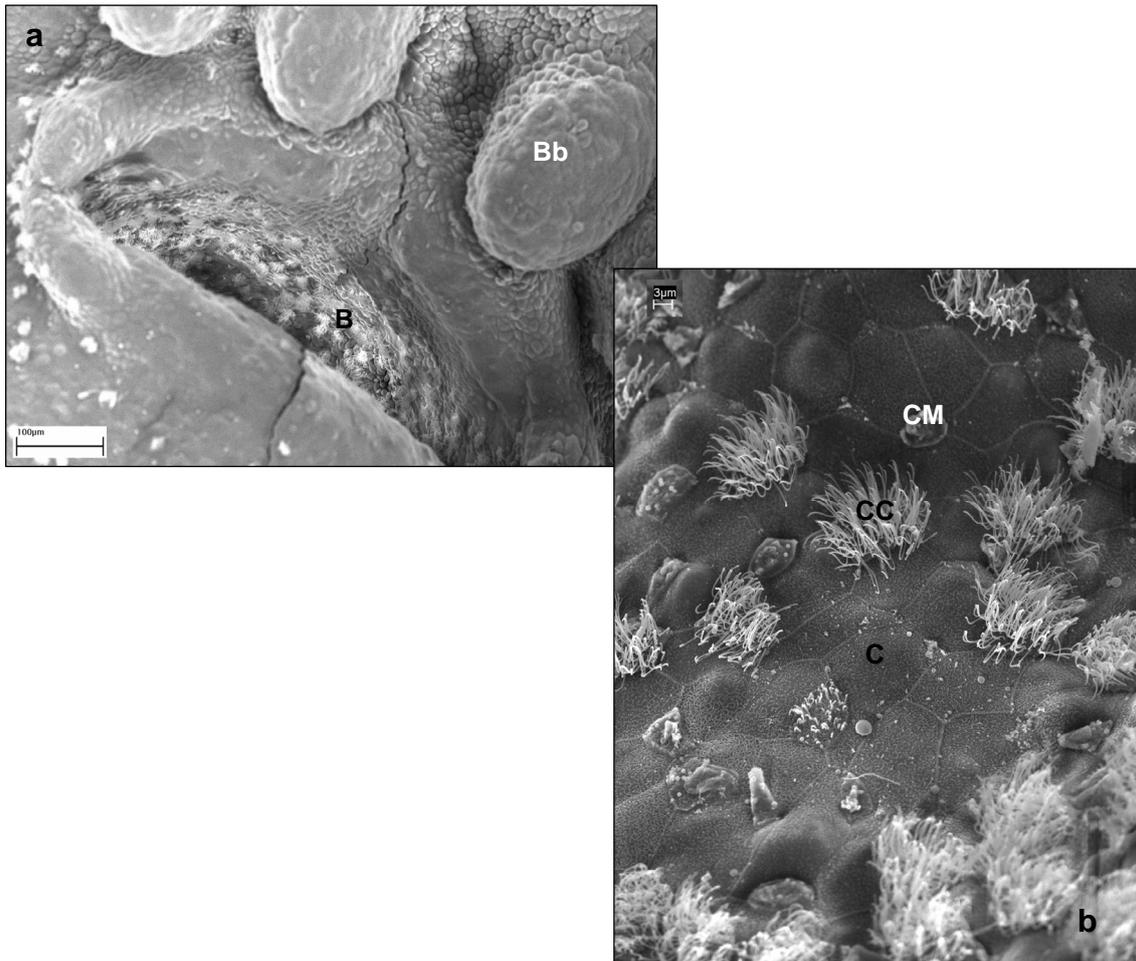


Figura 22: a- Imagen panorámica de la boca en un embrión libre de *Acipenser naccarii* de 7 dpe. B, boca; Bb, barbillas. FESEM. b- Detalle del epitelio de la cavidad orofaríngea en un embrión libre de *Acipenser naccarii* de 7 dpe donde podemos observar células con micropliegues en su polo apical (C), células ciliadas (CC) y células mucosas (CM). FESEM.

Las células mucosas (Figuras 22b y 23) comienzan a aparecer alrededor del día 5 dpe, momento en el cual no muestran reactividad alguna frente a las técnicas histoquímicas empleadas para poner de manifiesto la presencia de mucopolisacáridos (PAS, AA pH 2,5 y AA pH1). A los 6 días post-eclosión las células mucosas del epitelio bucofaríngeo dan positivo para la técnica combinada del PAS-Azul alcian (pH 2,5) (Figura 24), lo que demuestra la

existencia de mucosustancias de carácter neutro y ácido, concretamente carboxiladas, ya que la reacción para la técnica del Azul alcian a pH 1 es negativa (Figura 24). Tanto el número como el tamaño de este tipo celular aumentan con el crecimiento del animal, de forma que hacia el día 7 post-eclosión las células productoras de mucosustancias tanto neutras como ácidas se distribuyen ya por toda la cavidad bucal.

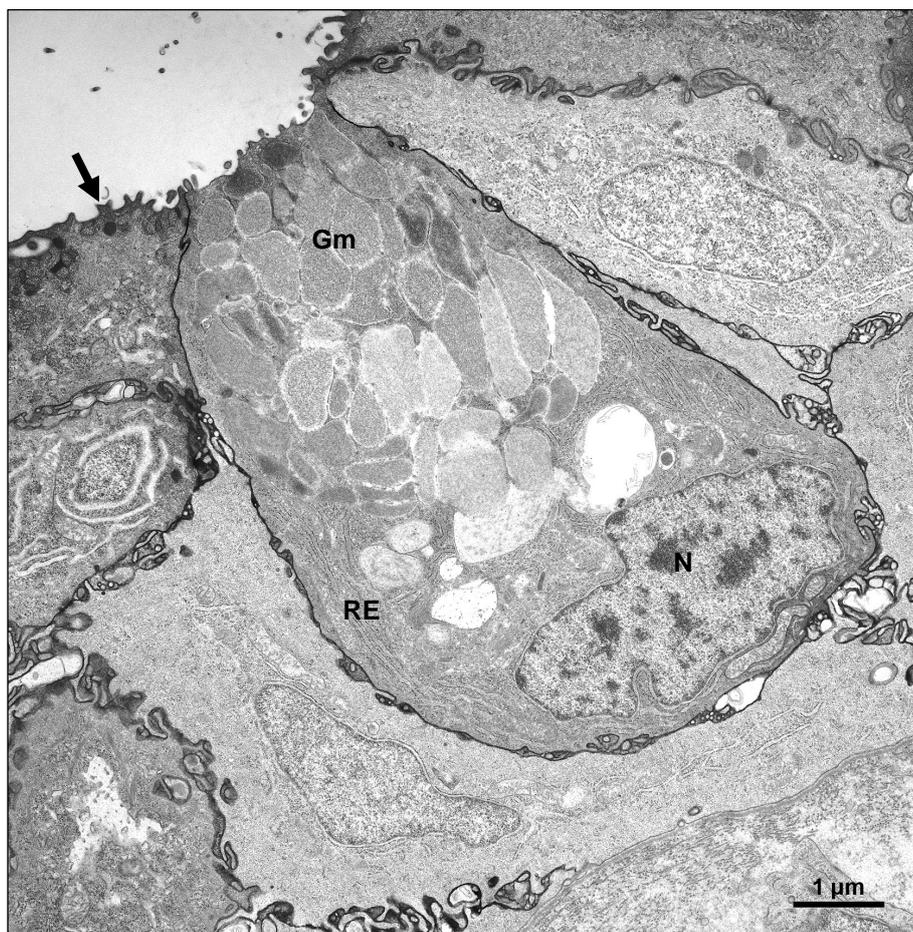


Figura 23: Detalle de una célula mucosa de la cavidad orofaríngea de un embrión libre de *Acipenser naccarii* de 7 dpe. Flecha, Micropliegues; Gm, Gránulos mucosos; N, núcleo; RE, retículo endoplásmico. TEM.

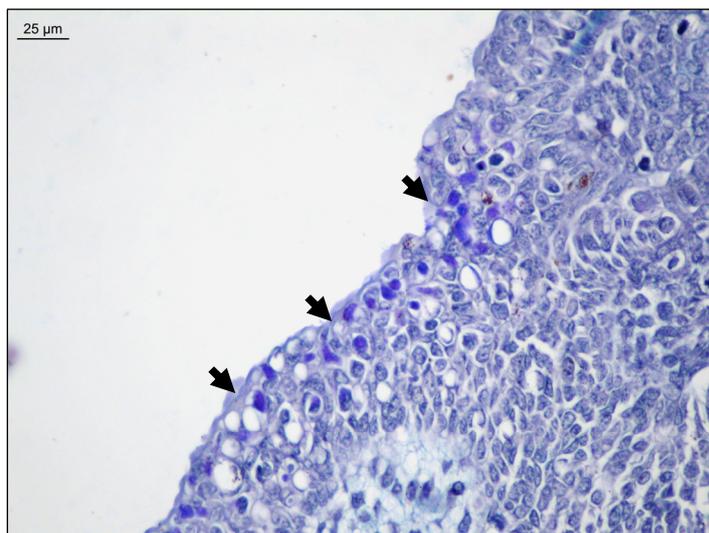


Figura 24: Detalle del epitelio de la cavidad orofaríngea de un embrión libre *Acipenser naccarii* de 7 dpe en sección dorso-ventral, donde podemos observar las células mucosas PAS-AA pH 2,5 + (flechas). PAS-AA pH 2,5.

Otras estructuras presentes en el epitelio bucofaríngeo en este periodo son los botones gustativos y los dientes (Figura 25).



Figura 25: Imagen panorámica de la cavidad bucal de un embrión libre de *Acipenser naccarii* de 7 dpe en sección dorso-ventral. H-E. Bg, Botón gustativo; C, Cartílago; L, Labio; PD, Primordio dental.

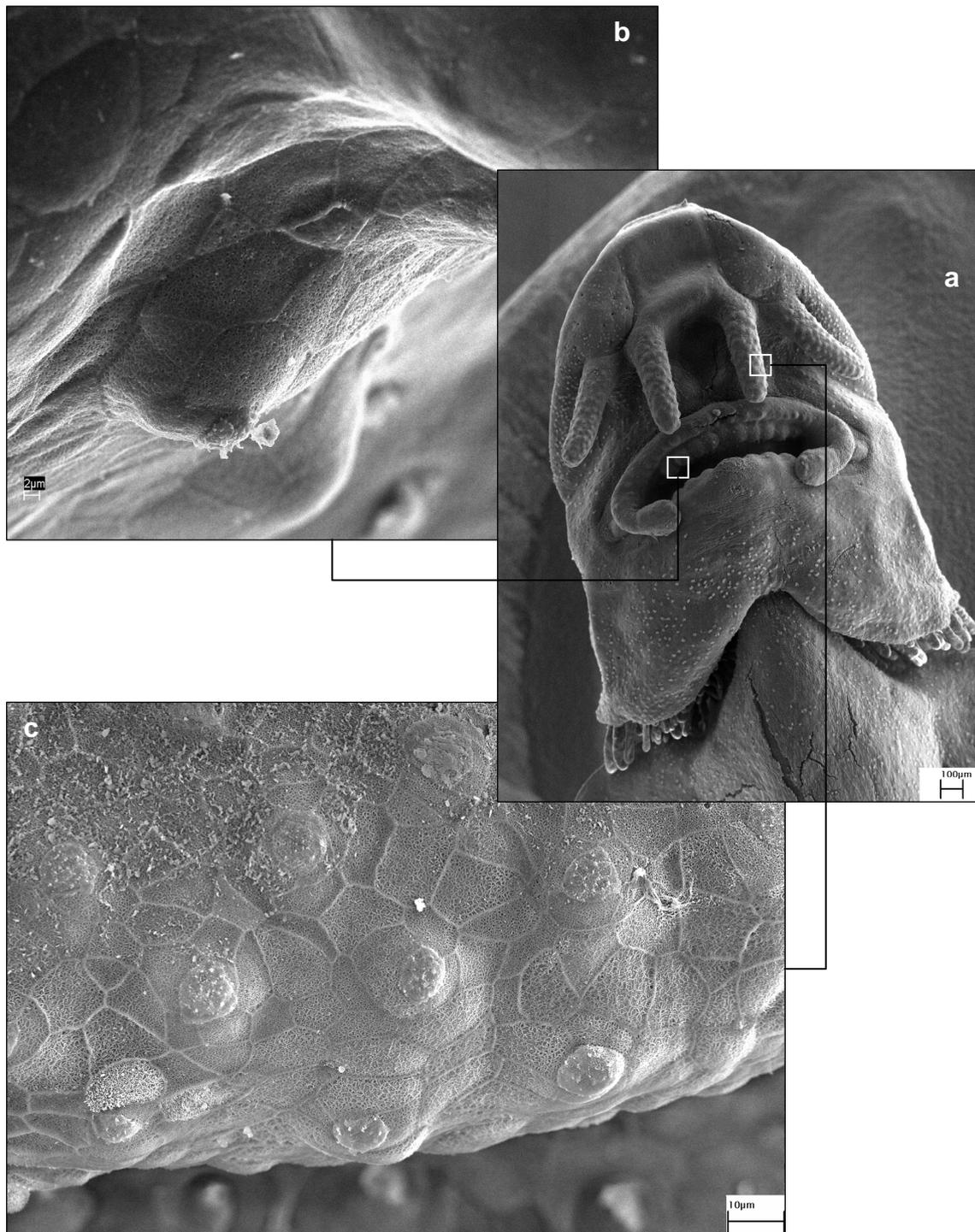


Figura 26: a - Imagen panorámica de la boca de un embrión libre de *Acipenser naccarii* de 7 días post-eclosión. FESEM. b - Detalle de un botón gustativo del labio superior. C- Detalle de un botón gustativo en una barbilla. FESEM.

El proceso de diferenciación de los gérmenes dentarios comienza con el engrosamiento y la posterior evaginación de parte del epitelio bucal hacia los 2 dpe, para formar la lámina dental. Posteriormente el epitelio se plegará hasta adoptar forma de campana. En este momento podemos distinguir la presencia del órgano del esmalte que rodea a la papila dental (Figura 27).

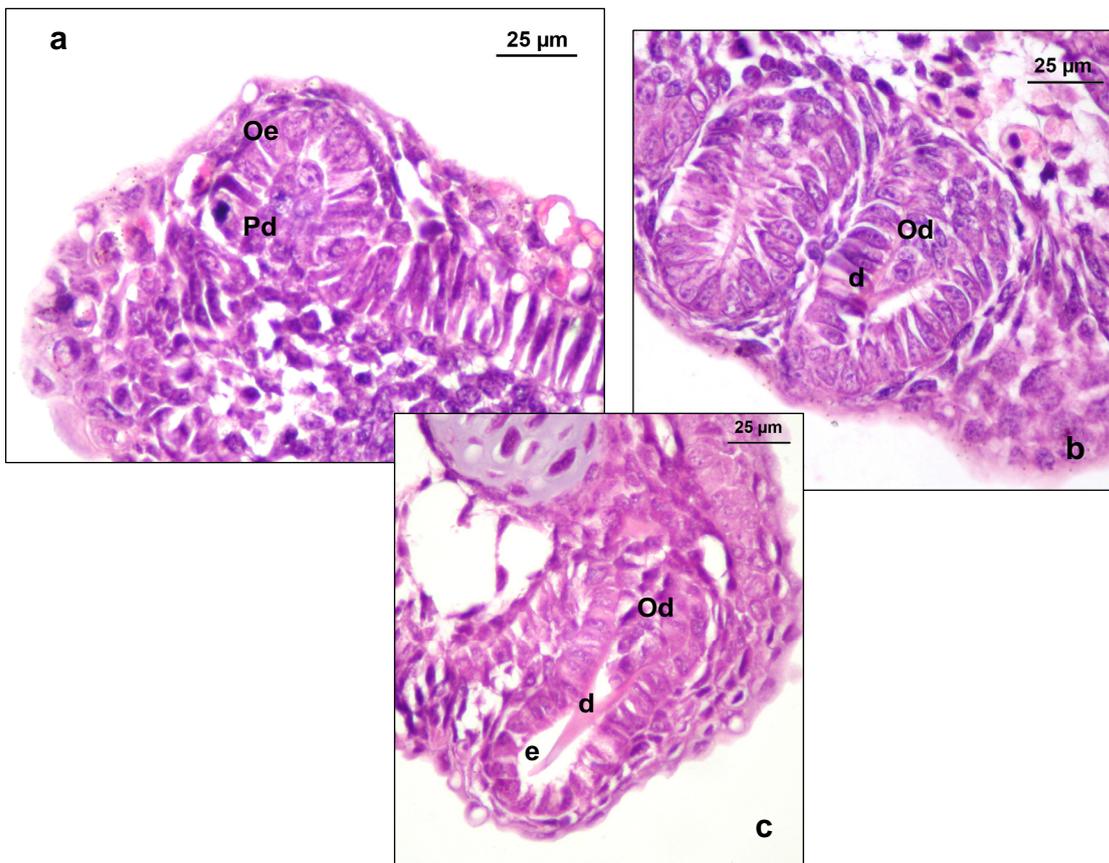


Figura 27: Micrografías donde se muestran diferentes estadios de desarrollo de las estructuras dentarias en embriones libres de *Acipenser naccarii* en sección dorsoventral. a- Detalle de la mandíbula inferior a los 3 dpe, donde podemos observar el estadio de campana. b- Detalle de la mandíbula superior a los 4 dpe donde podemos observar como ya ha comenzado la formación de dentina. c- Detalle de la mandíbula superior a los 5 dpe donde podemos ver como se inicia la secreción de fibras. H-E. e, esmalte; d, dentina; Pd, papila dental; Od, odontoblastos; Oe, órgano del esmalte.

Las células superficiales de la papila dental comienzan a secretar una matriz que, alrededor de los 4 días post-eclosión comenzará a mineralizarse. En los días posteriores se produce un aumento en la altura y el grosor de las estructuras dentarias, pero su ápice no llega a atravesar el epitelio de la cavidad bucofaríngea.

➤ **Esófago**

El proceso de evolución del esófago cursa desde su parte posterior hacia la bucofaringe. En los primeros días posteriores a la eclosión aún se encuentra indiferenciado. Hacia el día 6-7 post-eclosión, podemos observar ya la comunicación entre el conducto esofágico y el estómago, con la presencia de pliegues longitudinales (Figura 28). En este momento, el esófago es una estructura tubular, de poca longitud y limitada por un epitelio estratificado con células cilíndricas con microvellosidades apicales, en el que se intercalan células mucosas y unas pocas células ciliadas. Una gran cantidad de células del epitelio esofágico presentan vacuolas supranucleares con gránulos de vitelo y melanina en su interior (Figura 28c).

Durante el transcurso de esta fase de embrión libre, se produce un cambio en el epitelio del esófago; poco tiempo antes del inicio de la alimentación exógena pueden distinguirse dos zonas en función de las características celulares:

- Una porción anterior, provista de células cilíndricas con microvellosidades y una gran cantidad de células mucosas (función secretora).
- Otra porción más posterior con una menor cantidad de células mucosas pero una alta concentración de células ciliadas (función de transporte de alimento).

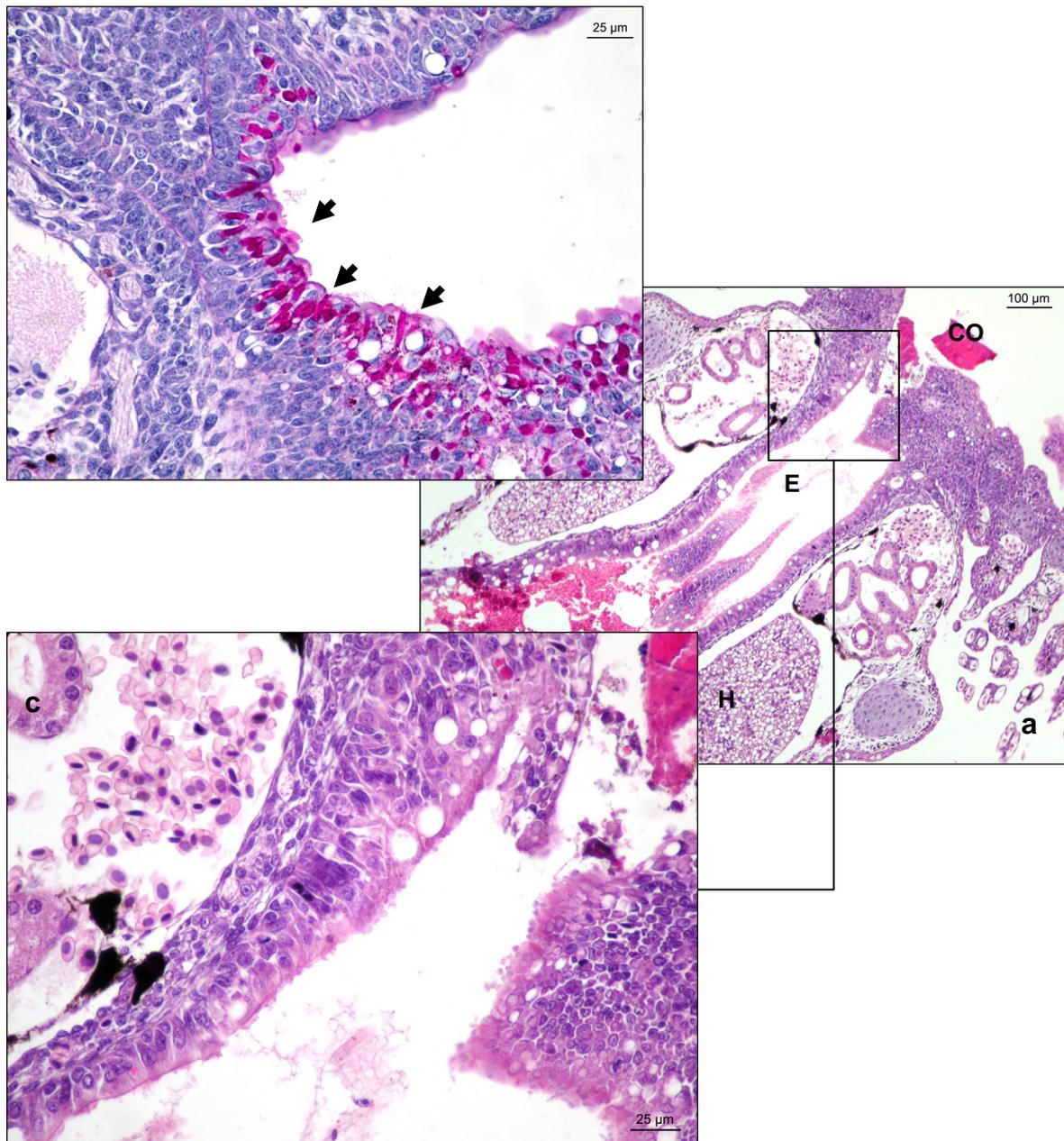


Figura 28: a –Imagen panorámica de la porción corporal anterior de un embrión libre de *Acipenser naccarii* de 7 dpe en sección dorso-ventral, donde podemos observar la cavidad orofaríngea (CO), el esófago (E), el hígado (H), el estómago glandular (EG). H-E. b - Imagen panorámica del conducto esofágico. PAS. c - Detalle del epitelio de la porción anterior del esófago. H-E.

Al final del periodo de embrión libre las células mucosas esofágicas muestran positividad para la técnica del PAS y Azul alcian pH 2,5, lo que indica la producción de mucosustancias neutras y ácidas (Figura 29).

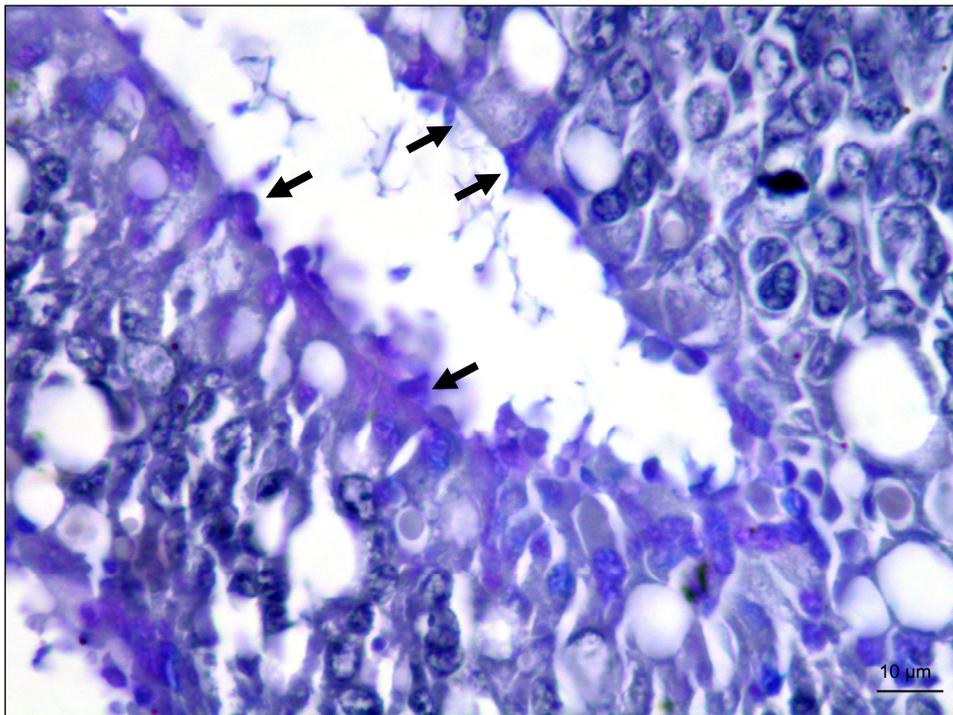


Figura 29: Detalle de las células mucosas esofágicas PAS-AA pH 2,5 + (flechas) en un embrión libre de *Acipenser naccarii* de 7 dpe en sección dorso-ventral. PAS-AA pH 2,5.

➤ Estómago

En embriones libres de 2 días dpe, la mayor parte de la cavidad corporal está aún ocupada por un gran saco vitelino intraembrionario que está delimitado por un epitelio cúbico simple. Dentro de las células epiteliales se distinguen una gran cantidad de gránulos de vitelo (Figura 30).

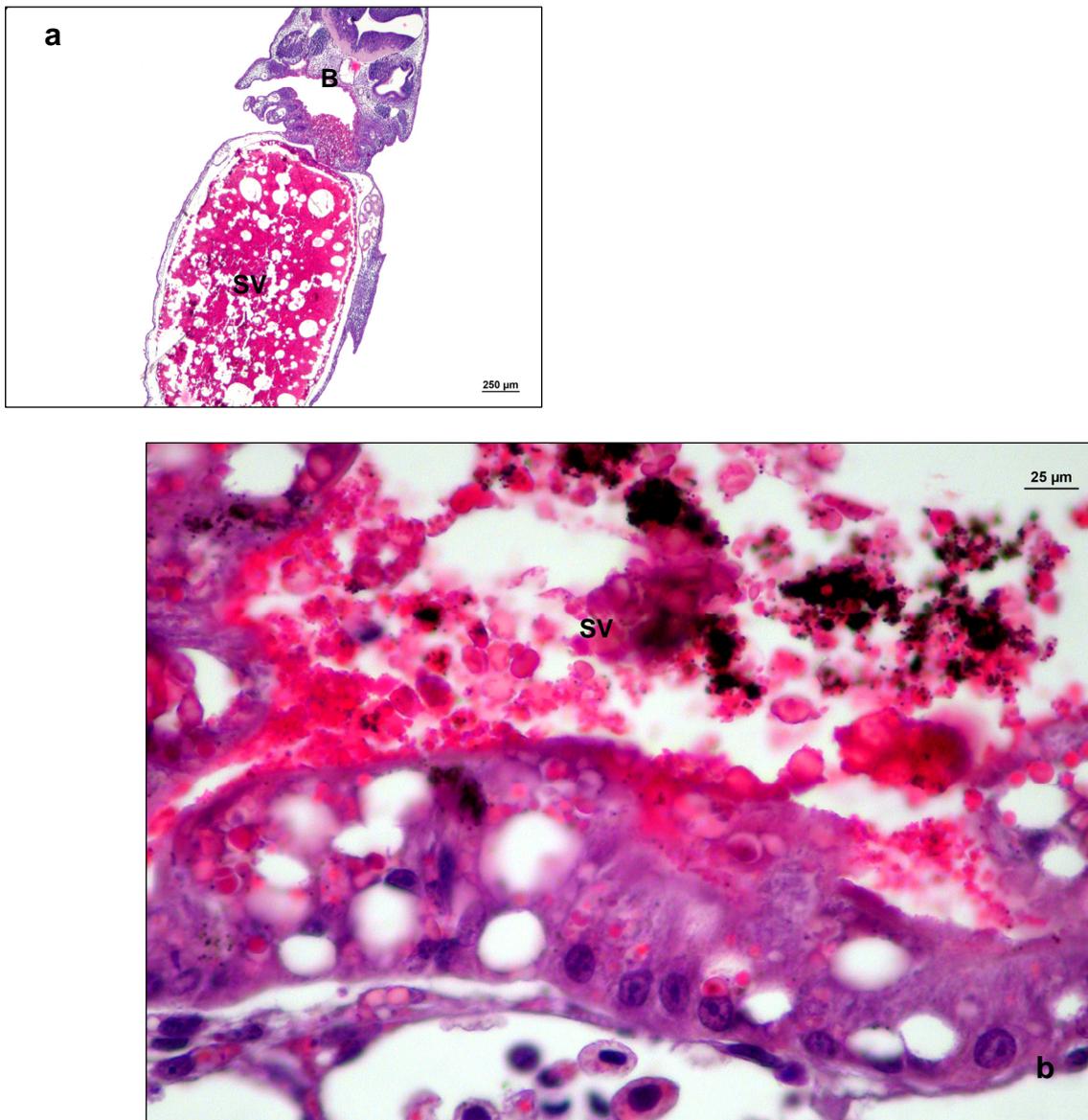


Figura 30: a - Imagen panorámica de la porción corporal anterior de un embrión libre de *Acipenser naccarii* de 2 dpe en sección dorso-ventral. H-E. b - Detalle del epitelio del saco vitelino. H-E. B, Boca; SV, Saco Vitelino.

En este momento de desarrollo, ninguna de las técnicas histoquímicas empleadas para el análisis de mucopolisacáridos (PAS, AA pH 2'5 y AA pH 1) da resultado positivo en el estómago.

En momentos posteriores del desarrollo, el saco vitelino sufre una serie de modificaciones encaminadas a la adquisición de la estructura de estómago cecal. El primer acontecimiento obvio en el proceso de desarrollo del estómago cecal es la aparición, alrededor de los 3 dpe, de un surco en la pared del tubo digestivo (Figura 31).

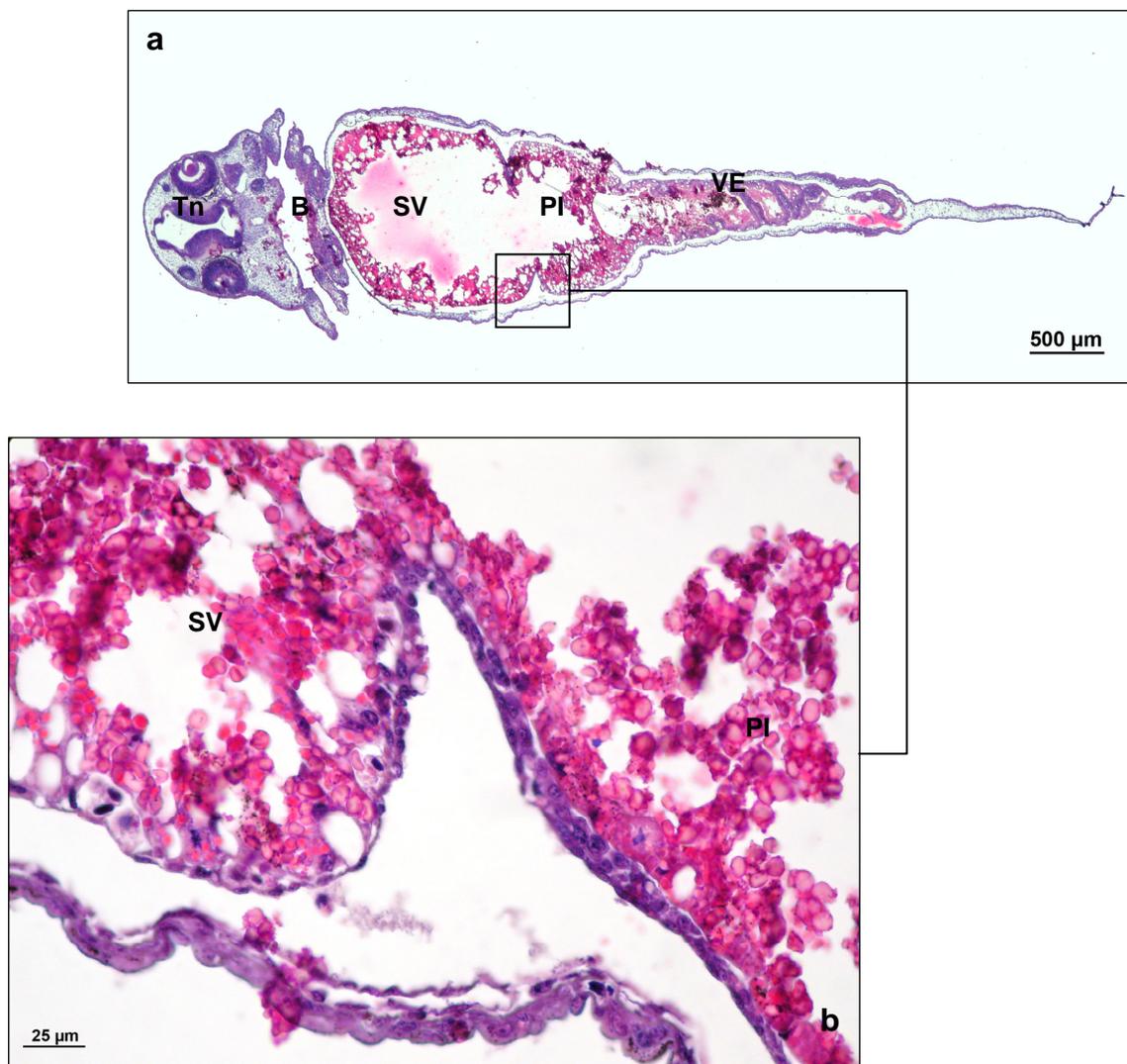


Figura 31: a - Imagen panorámica de un embrión libre de *Acipenser naccarii* de 3 dpe en sección dorso-ventral. H-E. b - Detalle del pliegue en el saco vitelino. H-E. B, Boca; SV, Saco Vitelino; PI, Primordio intestinal; VE, Válvula espiral; Tn, Tubo neural.

Este surco, localizado en la región dorsal-posterior del saco vitelino progresa en sentido anterior-ventral, acabará dividiendo al canal alimentario en dos porciones bien definidas (Figura 32):

- Esbozo gástrico
- Esbozo intestinal

La porción anterior de este surco se convertirá en la pared inferior del estómago, mientras que la parte posterior dará lugar a la pared superior del intestino anterior.

El proceso de desarrollo del estómago continúa con la adquisición gradual por parte de la gran bolsa vitelina de una forma más tubular y una proliferación de fibras musculares lisas en la zona de unión con el intestino anterior hacia el día 4 post-eclosión. En este momento el estómago aún no está dividido en sus dos porciones constituyentes, pero si es independiente de la porción intestinal que lo sigue.

Entre los días 5 y 6 post-eclosión se produce un plegamiento en el plano frontal del conducto gástrico, hasta la adquisición de una forma parecida a una "U". La porción glandular constituirá el tramo descendente, mientras que la región pilórica se elevará hasta casi el nivel de la desembocadura esofágica para formar la rama ascendente. A su vez, la zona de curvatura se estirará para formar una porción cerrada, dando el estómago de tipo cecal. En estos momentos la porción pilórica es fácilmente reconocida por la presencia de una pared de músculo liso muy desarrollada (Figura 33).

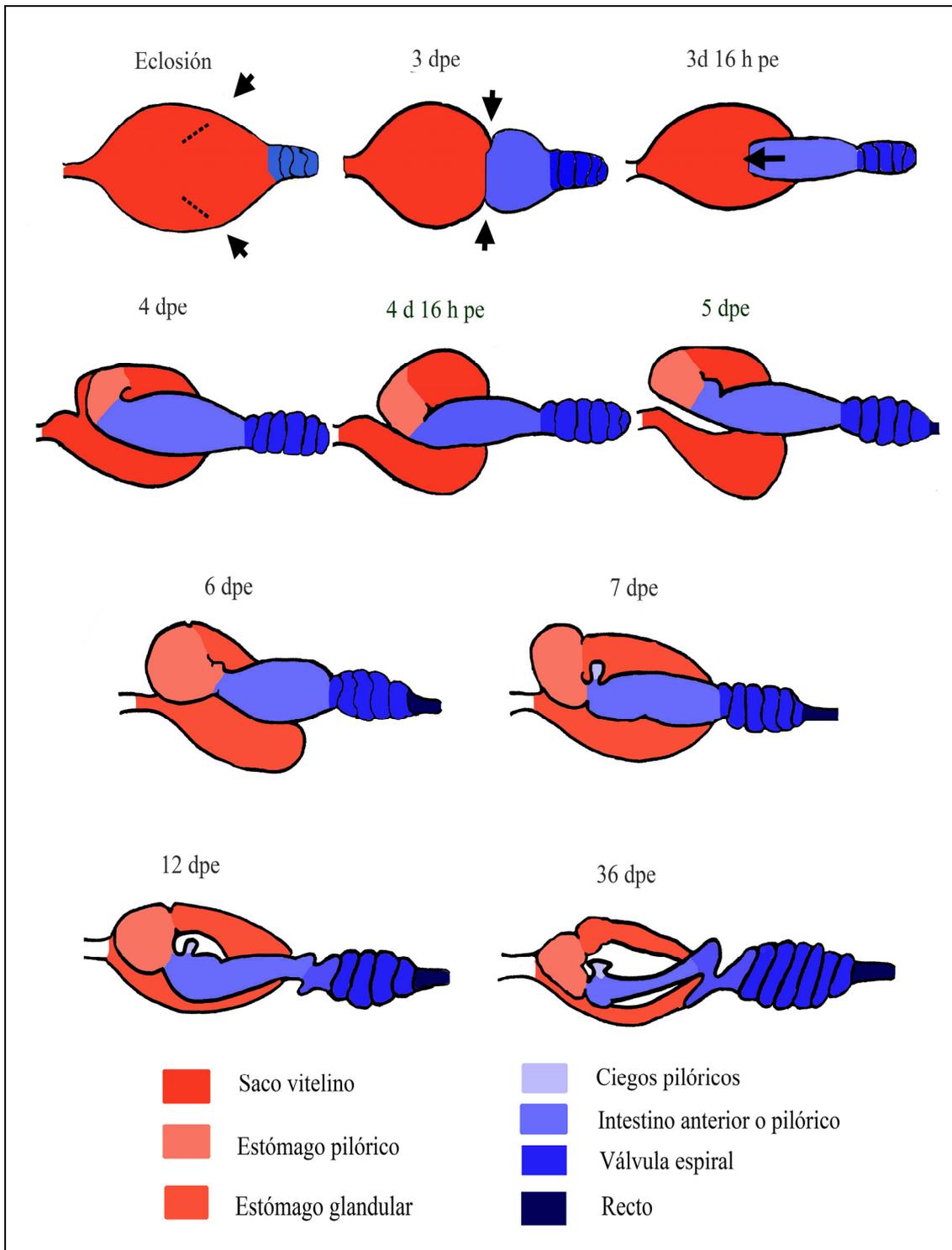


Figura 32: Representación esquemática del proceso de diferenciación del estómago en *Acipenser naccarii*.

El epitelio del estómago glandular y el del estómago pilórico está compuesto en estos momentos del desarrollo, por dos tipos de células cilíndricas de núcleo basal, unas con microvellosidades apicales y otras ciliadas. A lo largo de todo el epitelio gástrico podemos observar abundancia de gotas lipídicas de grandes dimensiones dentro de las células epiteliales (figura 33).

En los primeros días de este periodo, las células epiteliales no muestran reactividad frente a las técnicas histoquímicas empleadas sin embargo, en el día 6-7 post-eclosión, manifiestan su PAS positividad tanto en la región pilórica como en la región glandular.

El último de los procesos importantes en el desarrollo del estómago es la formación de glándulas gástricas. Entre los días 6 y 7 post-eclosión en la capa de tejido conjuntivo de la lámina propia o corion del estómago glandular, comienzan a observarse una serie de agregados celulares que darán lugar a las glándulas tubulares. Las células glandulares, denominadas células oxíntico-pépticas, muestran ausencia de PAS positividad en su citoplasma y descansan sobre una lámina basal débilmente positiva frente a la técnica del Ácido Peryódico de Schiff (flecha en figura 33 b).

En embriones libres de 7 días post-eclosión el estómago adquiere su configuración definitiva, en las dos regiones citadas, conectadas entre sí a través de un esfínter.

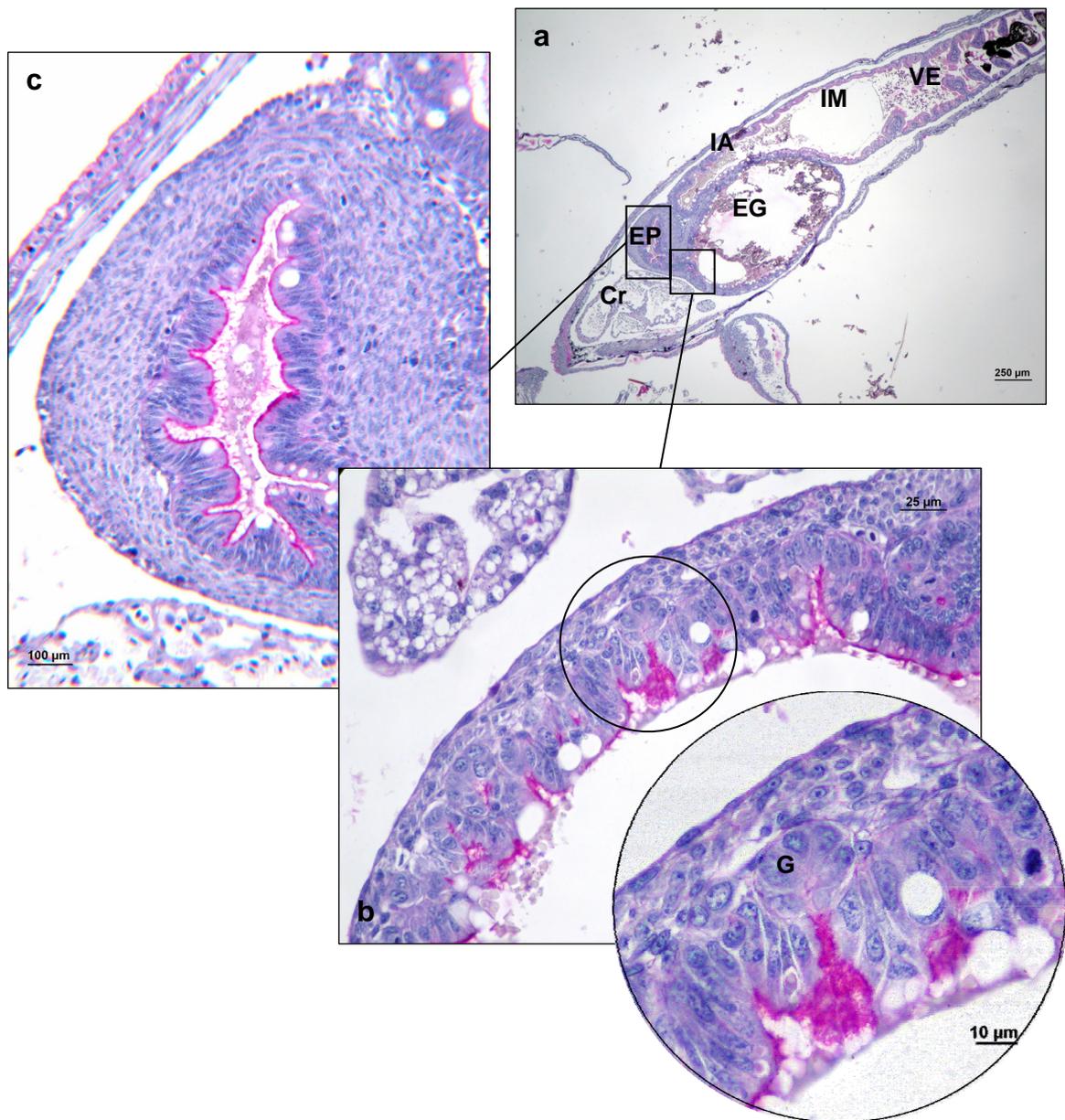


Figura 33: a - Imagen panorámica de un embrión libre de *Acipenser naccarii* de 7 dpe en sección dorso-ventral. PAS. b – Imagen de la pared del estómago glandular donde podemos observar la PAS-positividad de la porción apical del epitelio y detalle de una glándula gástrica. PAS. c- Imagen de la pared del estómago pilórico, obsérvese el desarrollo de la capa muscular. PAS. Cr, Corazón; EG, Estómago glandular; EP, Estómago pilórico; IA, Intestino anterior; IM, intestino medio; VE, Válvula espiral; G, Glándula gástrica.

Las características ultraestructurales de las células epiteliales del saco vitelino al comienzo del periodo de embrión libre (2 dpe) reflejan todavía cierto grado de indiferenciación. En la superficie apical se observan escasas microvellosidades y en las caras laterales complejos de unión, estando los espacios intercelulares más reducidos. El citoplasma apical presenta gran cantidad de filamentos, muchos de los cuales se anclan en las placas de anclaje de los desmosomas. El resto de las características ultraestructurales son similares a las descritas en el momento de la eclosión (Figura 34).

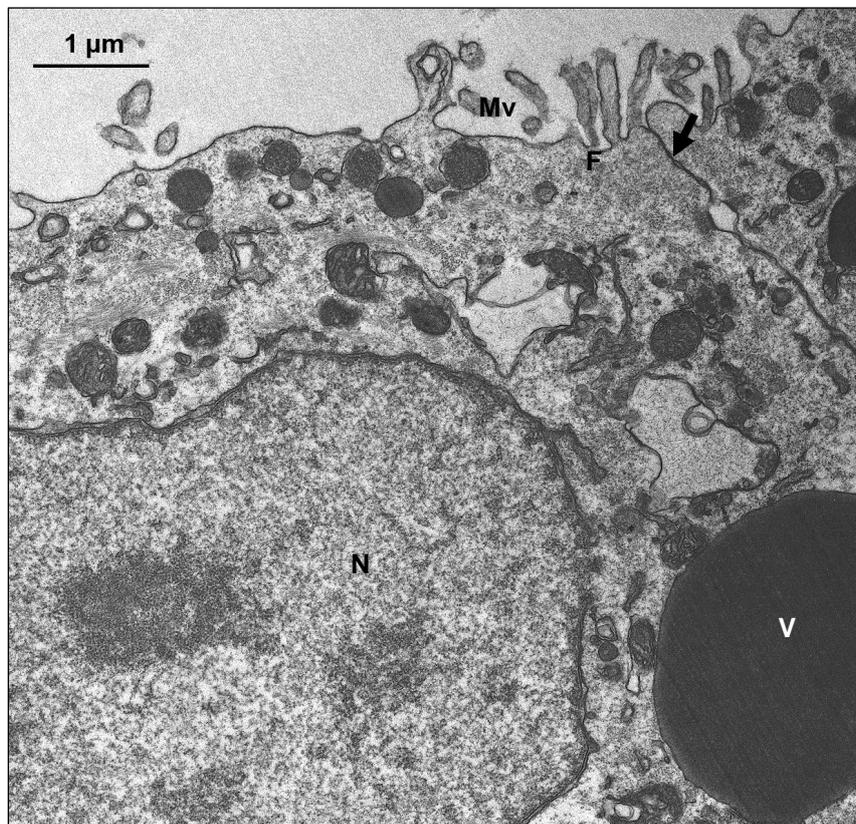


Figura 34: Detalle de una célula epitelial del saco vitelino de un embrión libre de *Acipenser naccarii* de 2 dpe, donde podemos observar microvellosidades apicales (Mv) y complejos de unión en las caras laterales (flechas), así como gran cantidad de filamentos (F) en el citoplasma apical. N, núcleo; V, vitelo. TEM.

Hacia el final del periodo de embrión libre (6 dpe), la morfología celular del epitelio del estómago en desarrollo muestra cambios significativos, de manera que las células adquieren una forma cilíndrica y un núcleo con forma ovalada. En la superficie apical de las células epiteliales, podemos observar una mayor cantidad de microvellosidades y en el citoplasma una gran cantidad de ribosomas, mitocondrias alargadas, aparato de Golgi bien desarrollado y vesículas (que se restringen a la porción apical) relacionadas con la PAS positividad observada a microscopía óptica (Figura 35).



Figura 35: Detalle del epitelio del estómago en un embrión libre de *Acipenser naccarii* de 6 dpe, donde podemos observar células con una forma cilíndrica y un núcleo (N) más ovalado, así como gran cantidad de ribosomas libres (Ri), mitocondrias (m), aparato de Golgi (G) y vesículas en el citoplasma apical (flechas). TEM.

En este momento de desarrollo, como se ilustra en la figura 36, las glándulas gástricas ya están formadas y en el citoplasma de las células oxíntico-pépticas destaca el inicio de desarrollo de la red túbulo vesicular en el citoplasma apical, junto con la gran cantidad de mitocondrias supranucleares. Las gotas lipídicas son relativamente abundantes en el citoplasma basal y junto con la presencia de un Aparato de Golgi yuxtannuclear bien desarrollado, podemos señalar la ausencia de gránulos de secreción, indicativo de la no funcionalidad del órgano en estos momentos de desarrollo.

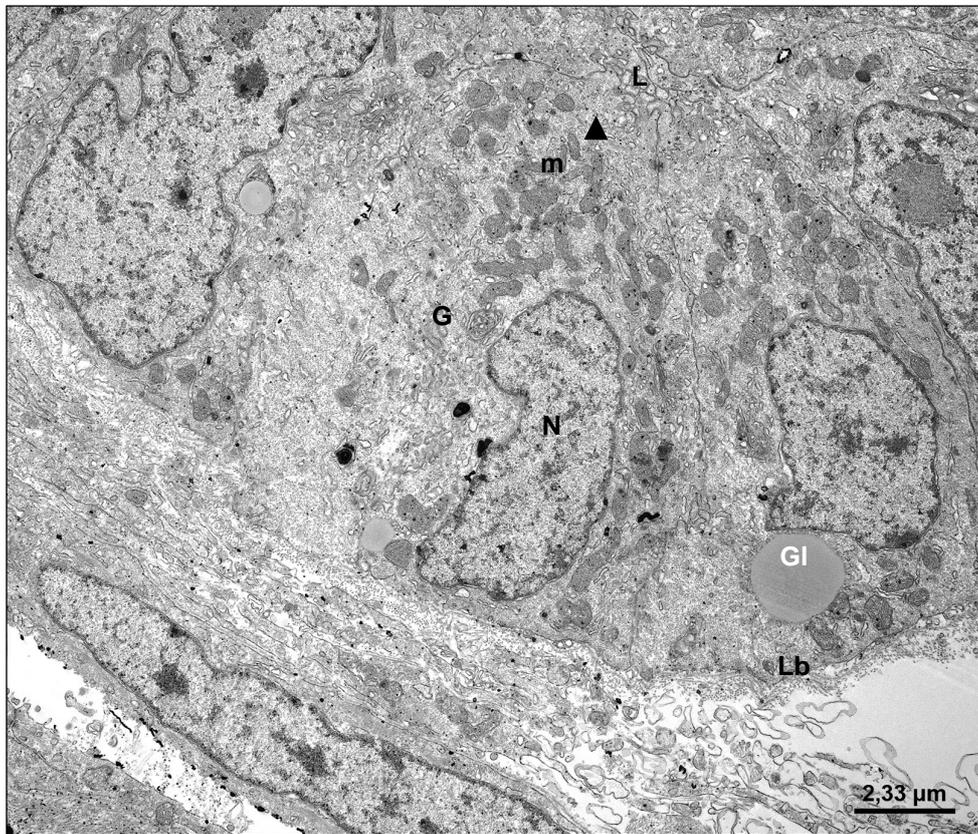


Figura 36: Detalle de las células glandulares gástricas de un embrión libre de *Acipenser naccarii* de 6 dpe, donde podemos observar la concentración de mitocondrias (m) en el citoplasma apical, una red túbulo-vesicular apical incipiente (cabeza de flecha), la presencia de un aparato de Golgi (G) yuxtannuclear y la total ausencia de gránulos de secreción citoplasmáticos. TEM. L, Luz glandular, Gl, gota lipídica; Lb, lámina basal.

➤ **Intestino anterior y medio**

El proceso de diferenciación de la mucosa intestinal comienza, como ya hemos comentado, alrededor de los 3 días post-eclosión, con la aparición de un pliegue oblicuo en la región dorsal-posterior del saco vitelino y progresa en dirección postero-anterior, siendo el intestino anterior o pilórico el último en diferenciarse debido a la presencia de gran cantidad de vitelo en su interior hasta el día 8-9 post-eclosión (Figura 37).

En embriones de 3 días dpe, el intestino no aparece como una estructura individualizada; su aspecto es el de una bolsa que engloba cierta cantidad de vitelo y que se encuentra tapizada por un epitelio en diferenciación (Figura 31). Los enterocitos presentan un núcleo basal y abundantes inclusiones en el citoplasma supranuclear correspondientes a gránulos de vitelo.

Alrededor del día 5 post-eclosión se produce un incremento generalizado de la longitud del intestino y, al mismo tiempo, una distinción clara entre el intestino pilórico y el medio (Figura 32). La mucosa de la porción intestinal pilórica tiene una estructura similar a la del intestino medio, sin embargo, encontramos diferencias en la orientación de los pliegues mucosales; en el intestino pilórico el sentido de plegamiento es transversal a la dirección del conducto intestinal, mientras que en el intestino medio éstos pasan a ser oblicuos (Figura 37b).

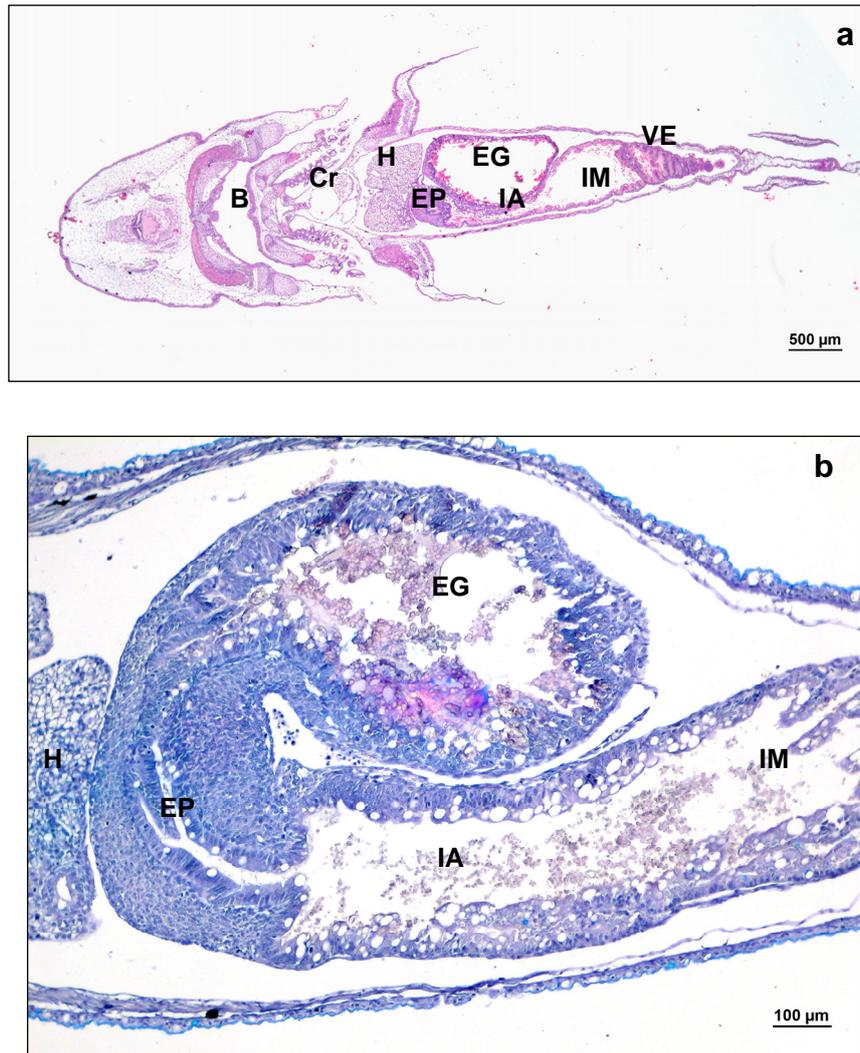


Figura 37: a- Imagen panorámica de un embrión libre de *Acipenser naccarii* de 7 dpe en sección dorso-ventral. H-E. H, Hígado; Cr, Corazón; B, boca; EG, Estómago glandular; EP, Estómago pilórico; IA, Intestino anterior; IM, Intestino medio; VE, Válvula espiral. b- Imagen de la porción media de un embrión libre de *Acipenser naccarii* en sección ventro-dorsal, donde podemos observar como el sentido del plegamiento de la mucosa intestinal es perpendicular en el intestino anterior y oblicuo en el intestino medio. PAS-AA pH 2,5.

Las primeras células caliciformes aparecen en el intestino medio alrededor del día 6 post-eclosión y a partir del día 7 post-eclosión podemos observarlas

en el intestino pilórico. Las células caliciformes se tiñen con el azul alcian, tanto a pH 2,5 como a pH 1, lo que revela la presencia de mucosustancias ácidas carboxiladas (AA pH 2,5 +) y sulfatadas (AA pH 1 +). La reacción positiva frente a la técnica combinada PAS-AA pH 2,5 nos indica un predominio de las mucosustancias ácidas, como queda reflejado por la coloración mostrada por la célula caliciforme en la figura 38. El epitelio intestinal en este momento consta ya en una única capa de células columnares con microvellosidades, células caliciformes y unas pocas células ciliadas (Figura 38).

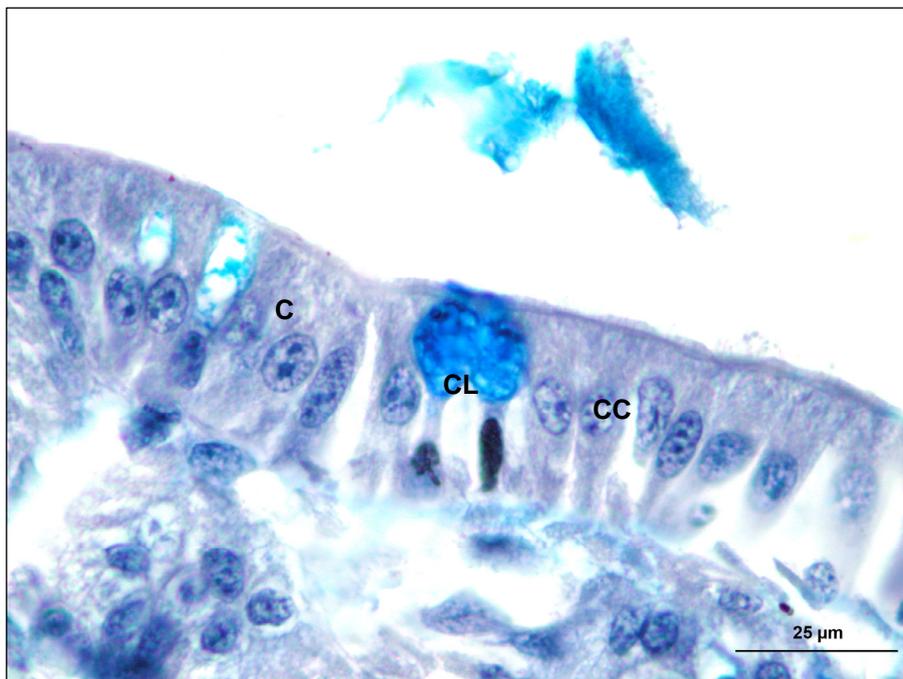


Figura 38: Detalle del epitelio intestinal. C, células con microvellosidades; CC, células ciliadas; CL, células caliciformes (CL). PAS-AA pH 2,5.

Al final del periodo de embrión libre los enterocitos del intestino anterior, medio y ciegos pilóricos revelan rasgos ultraestructurales que los relacionan con procesos de absorción de lípidos.

Las largas microvellosidades apicales muestran invaginaciones basales implicadas en procesos de endocitosis (Figura 39).

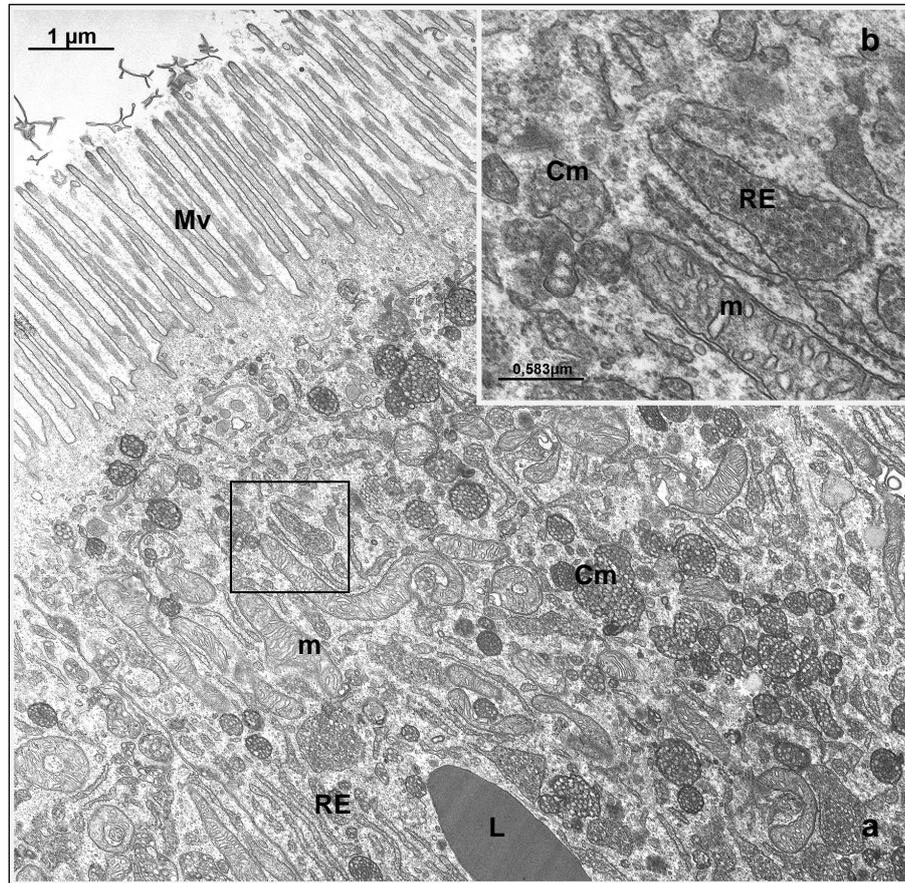


Figura 39: a- Ultraestructura de un enterocito de un embrión libre de *Acipenser naccarii* de 7 dpe. TEM. Mv, microvellosidades; m; mitocondrias; Cm, cuerpos de aspecto multivesicular; RE, retículo endoplásmico; L, lípidos. b- Detalle de la imagen anterior donde podemos observar la presencia de partículas lipídicas en el interior de las cavidades dilatadas del retículo endoplásmico. TEM.

El citoplasma apical presenta abundantes cuerpos con aspecto multivesicular constituidos por pequeñas partículas lipídicas, junto a gran cantidad de mitocondrias muy alargadas con crestas transversales y matriz poco densa. Las cavidades del retículo endoplasmático se encuentran

ampliamente dilatadas y contienen en su interior abundantes partículas lipídicas de pequeño tamaño (Figura 39 b), desde aquí se dirigen a los complejos de Golgi a cuyos sáculos se incorporan (Figura 40) y, una vez modificados, se desprenden como grandes vesículas que se dirigen hacia la membrana plasmática lateral, para descargar por exocitosis su contenido en los espacios intercelulares (Figura 41). Parte de los lípidos absorbidos por la células, se acumulan en forma de gotitas que coalescen para forman grandes gotas que se distribuyen por todo el citoplasma y poseen una función de reserva energética (Figura 41).

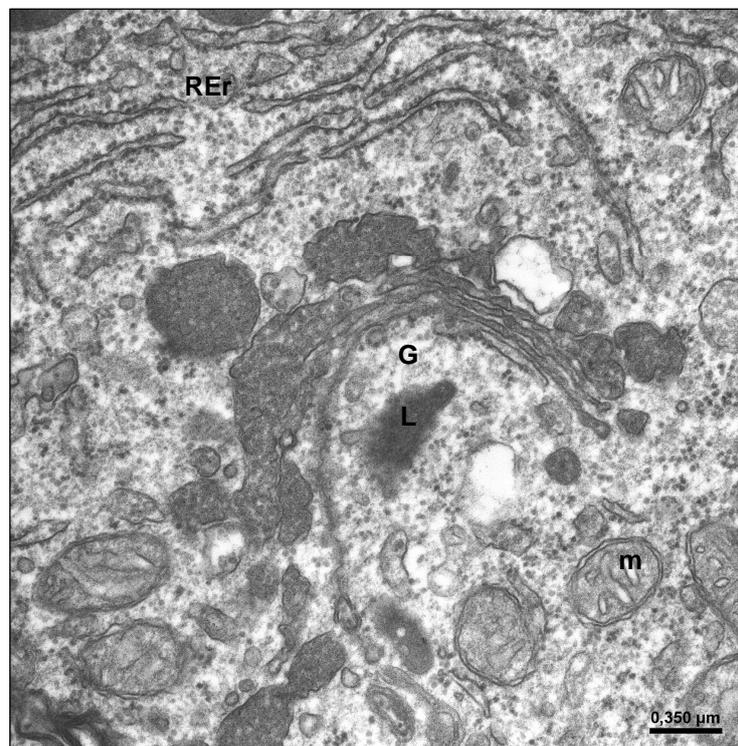


Figura 40: Detalle del citoplasma en un enterocito de un embrión libre de *Acipenser naccarii* donde podemos observar un complejo de Golgi (G,) así como las vesículas con contenido lipoproteico a él asociadas. Los cuerpos de aspecto multivesicular (Cm) se asocian con el Aparato de Golgi (G). TEM. L, lípidos, m, mitocondrias, RE, retículo endoplásmico.

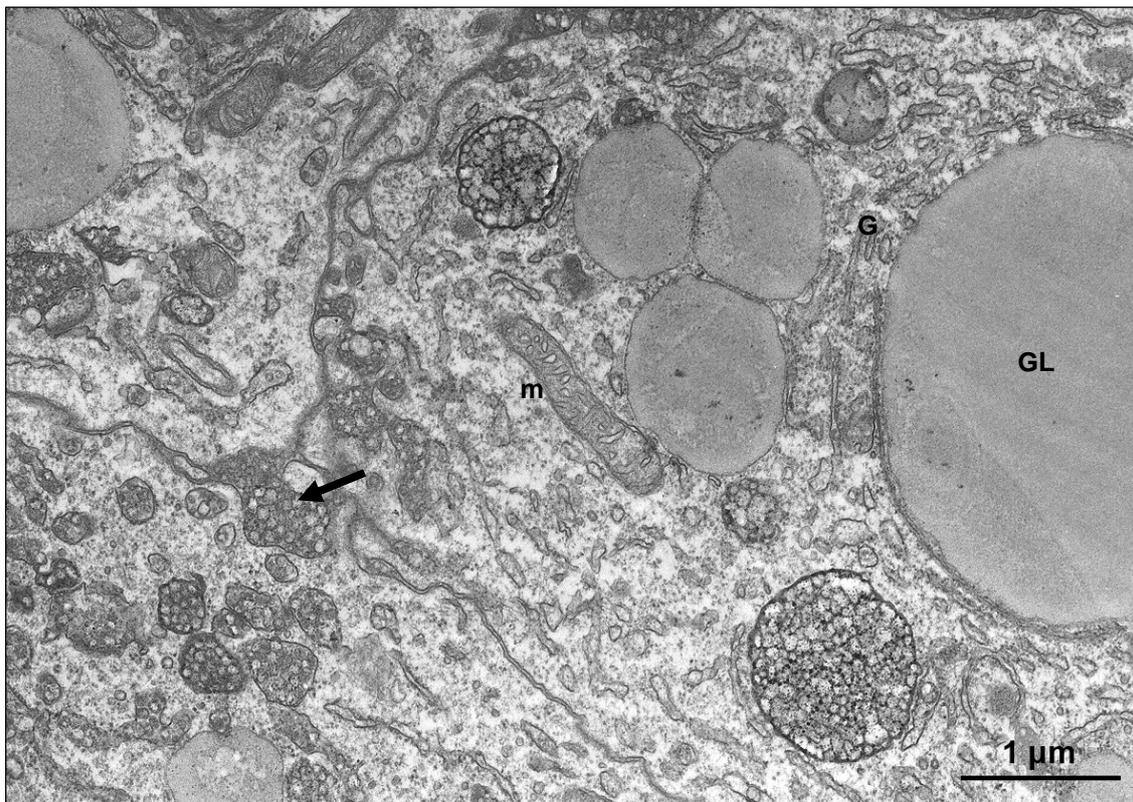


Figura 41: Detalle del citoplasma en un enterocito de un embrión libre de *Acipenser naccarii*, donde podemos observar grandes vesículas que vierten su contenido lipídico en los espacios intercelulares (flechas) junto con grandes gotas lipídicas (GL) y mitocondrias (m). TEM.

En el epitelio intestinal, junto a los enterocitos descritos encontramos células caliciformes y células cuya superficie apical muestra cilios además de microvellosidades, con características ultraestructurales similares a las de los enterocitos (Figura 42).

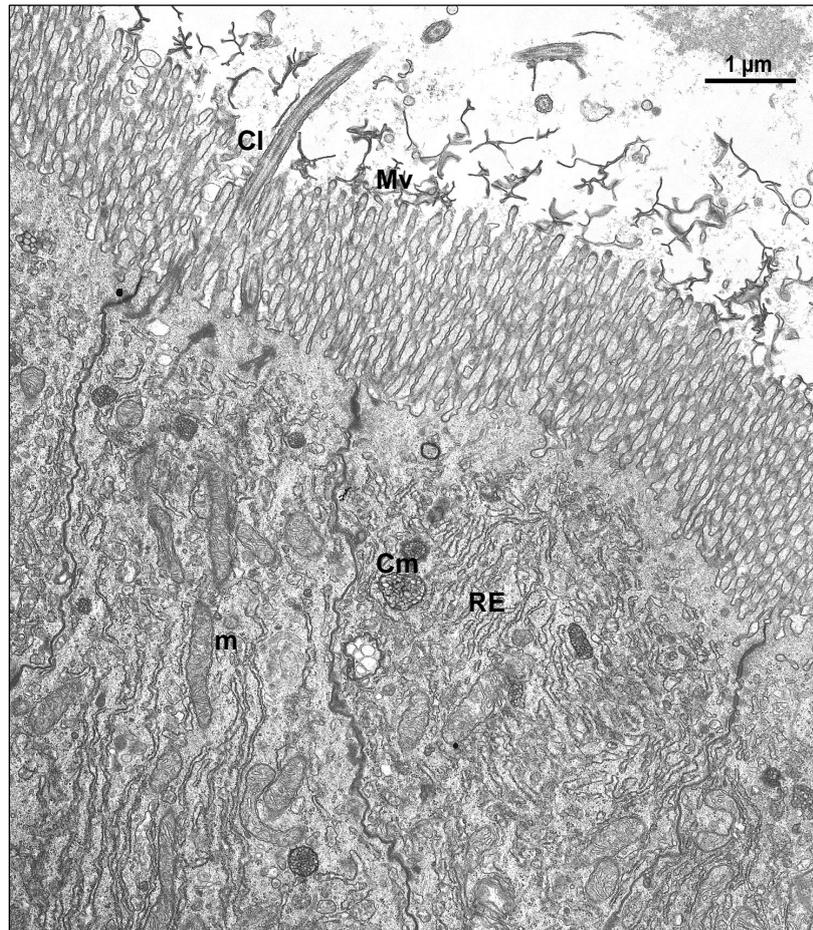


Figura 42: Detalle de las células ciliadas con microvellosidades del epitelio intestinal en un embrión libre de *Acipenser naccarii* de 7 dpe. CI, cilio; Cm, cuerpos de aspecto multivesicular; m, mitocondrias; Mv, microvellosidades; RE, retículo endoplásmico.

➤ Ciegos pilóricos

Alrededor de los 6 días post-eclosión aparece en la zona donde se sitúa el esfínter pilórico una especie de evaginación de la pared del intestino anterior, que empiezan a organizarse en forma de sacos ciegos para formar los ciegos pilóricos (Figura 43a). La mucosa de los apéndices pilóricos se diferencia antes del inicio de la alimentación exógena y el epitelio adquiere la típica estructura columnar observada en el intestino anterior y medio (Figura 43b).

Las características histoquímicas de los ciegos pilóricos son idénticas a las descritas para el intestino anterior y medio en momentos en estadios similares de desarrollo.

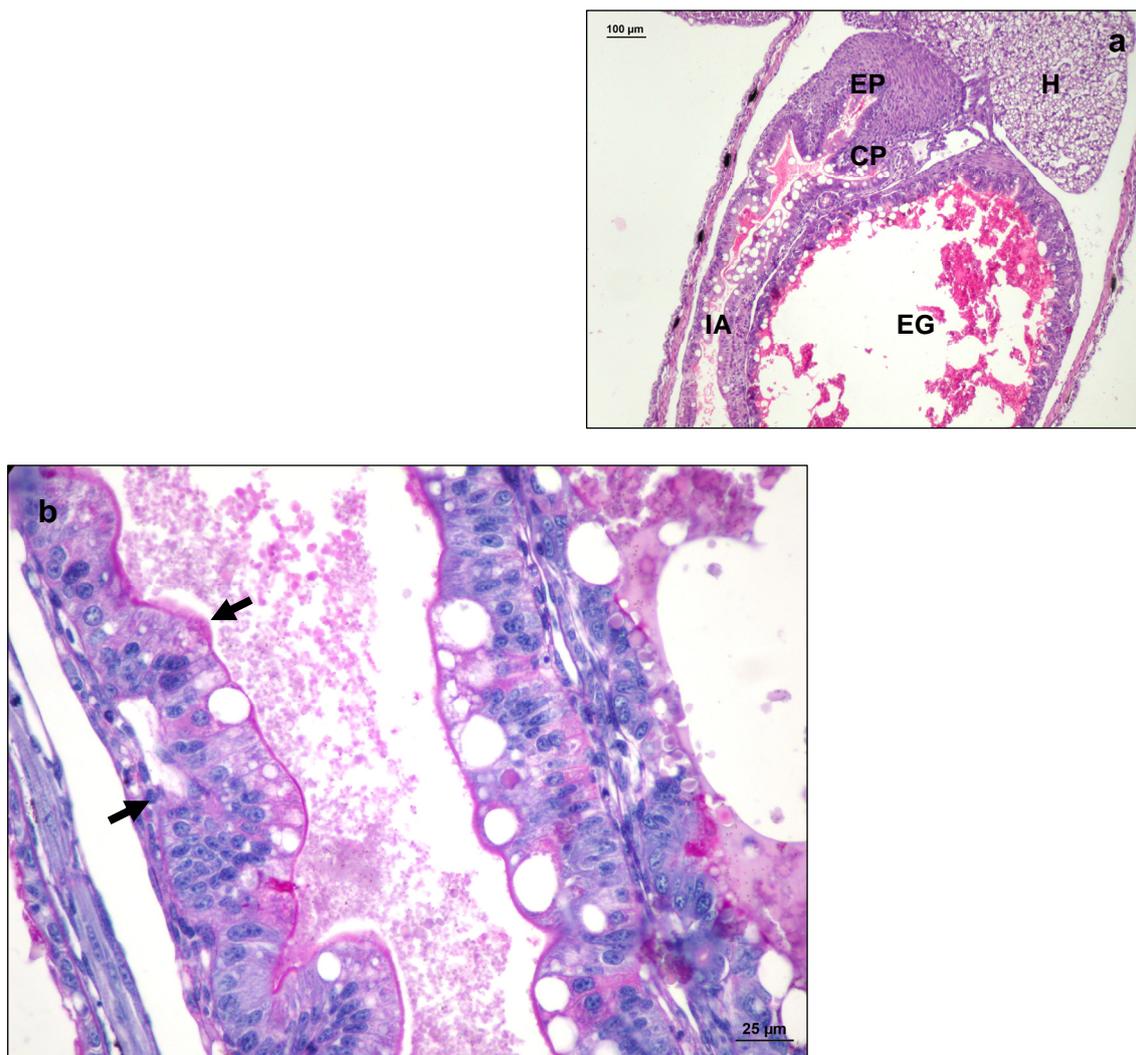


Figura 43: a - Micrografía panorámica de un embrión libre de *Acipenser naccarii* en sección dorso-ventral momentos antes del inicio de la alimentación exógena. PAS. b – Detalle del epitelio de los ciegos pilóricos. Obsérvese la fuerte PAS-positividad (flechas) mostrada por el ribete en cepillo; la lámina basal aparece débilmente positiva. H, Hígado; EG, Estómago glandular; EP, Estómago pilórico; CP, Ciegos pilóricos; IA, Intestino anterior.

➤ **Intestino posterior o válvula espiral**

La diferenciación de la válvula espiral tiene lugar muy pronto en el desarrollo del animal, de hecho hacia el día 2-3 post-eclosión este segmento intestinal posee una estructura anatómica muy similar a la de ejemplares juveniles (Figura 44). Durante los primeros días del periodo de embrión libre el lumen de la válvula espiral está recubierto por un epitelio columnar simple con algunas células ciliadas interpuestas, no existiendo diferencias estructurales entre los enterocitos de la porción anterior y posterior de la válvula espiral (Figura 45).

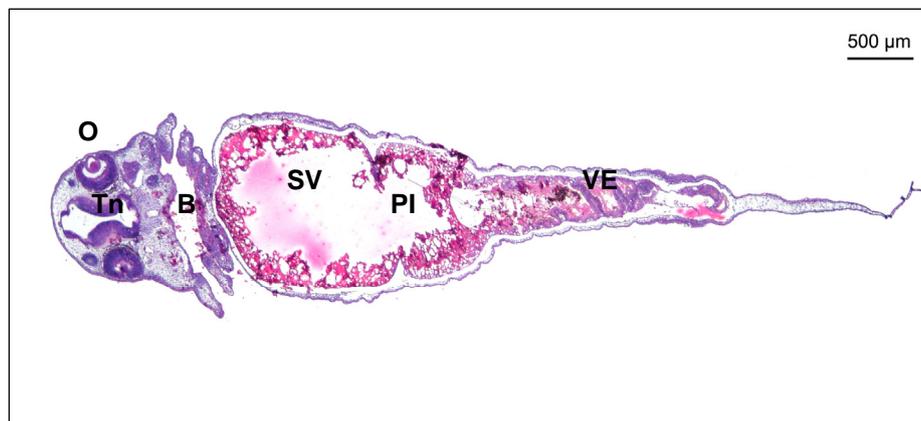
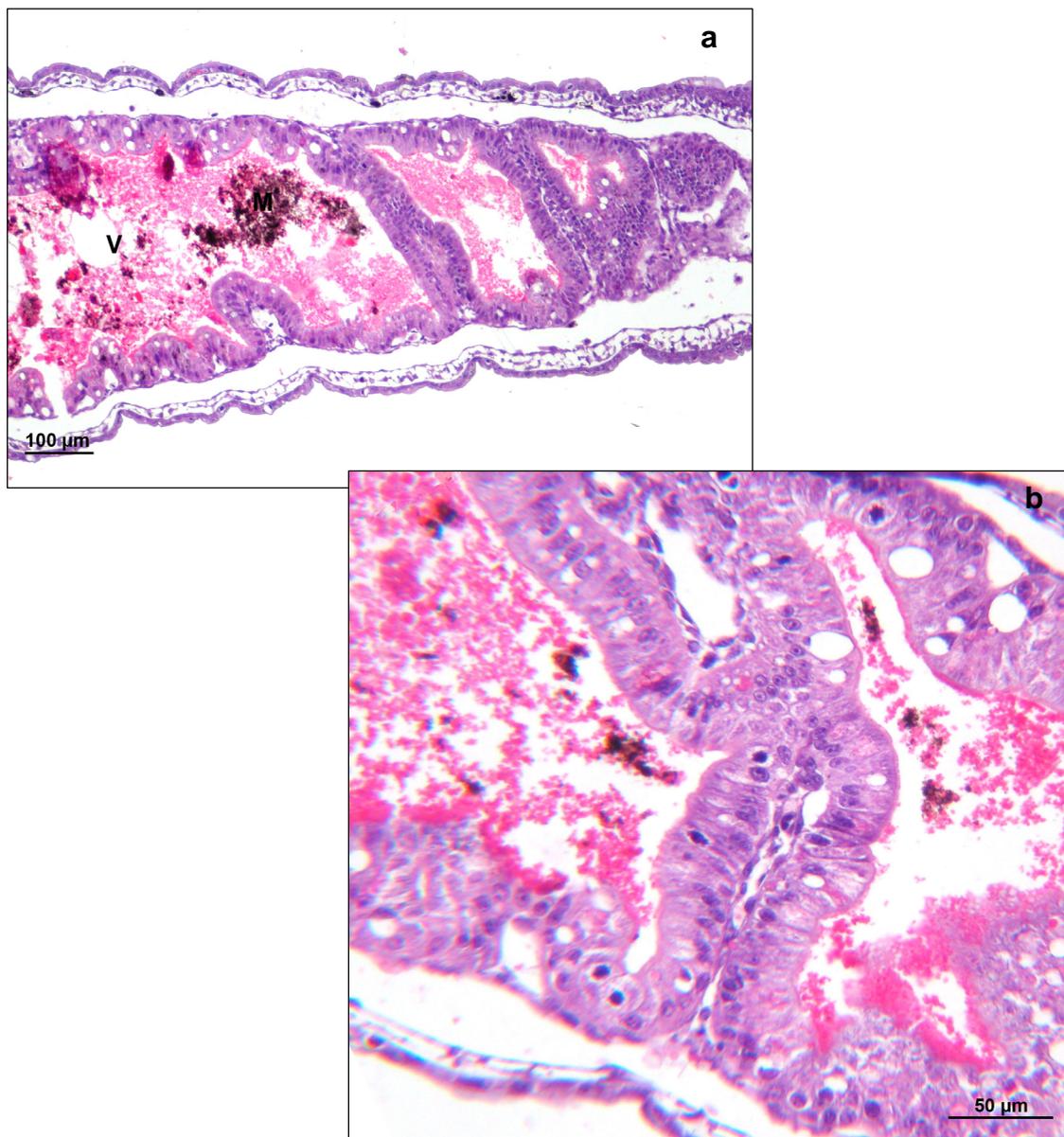


Figura 44: Imagen panorámica de una sección ventro-dorsal de un embrión libre de *Acipenser naccarii* de 3 dpe. H-E. B, Boca; SV, Saco Vitelino; PI, Primordio intestinal; VE, Válvula espiral; O, Ojo; Tn, Tubo neural.

Figura 45: a - Imagen panorámica de la válvula espiral en un embrión libre de *Acipenser naccarii* de 3 dpe en sección dorso-ventral. H-E. b - Detalle del epitelio de la válvula espiral. H-E. V, Vitelo; M, Melanina.



Las primeras células caliciformes aparecen alrededor del día 3 post-eclosión; son de pequeño tamaño y poco numerosas en la región anterior, aumentando su número hacia la zona más posterior. Estas células presentan una fuerte alcianofilia tanto a pH 2,5 como pH 1 (Figuras 46a y 46b), lo que indica la presencia de mucosustancias ácidas (tanto del tipo de las sialomucinas como sulfomucinas).

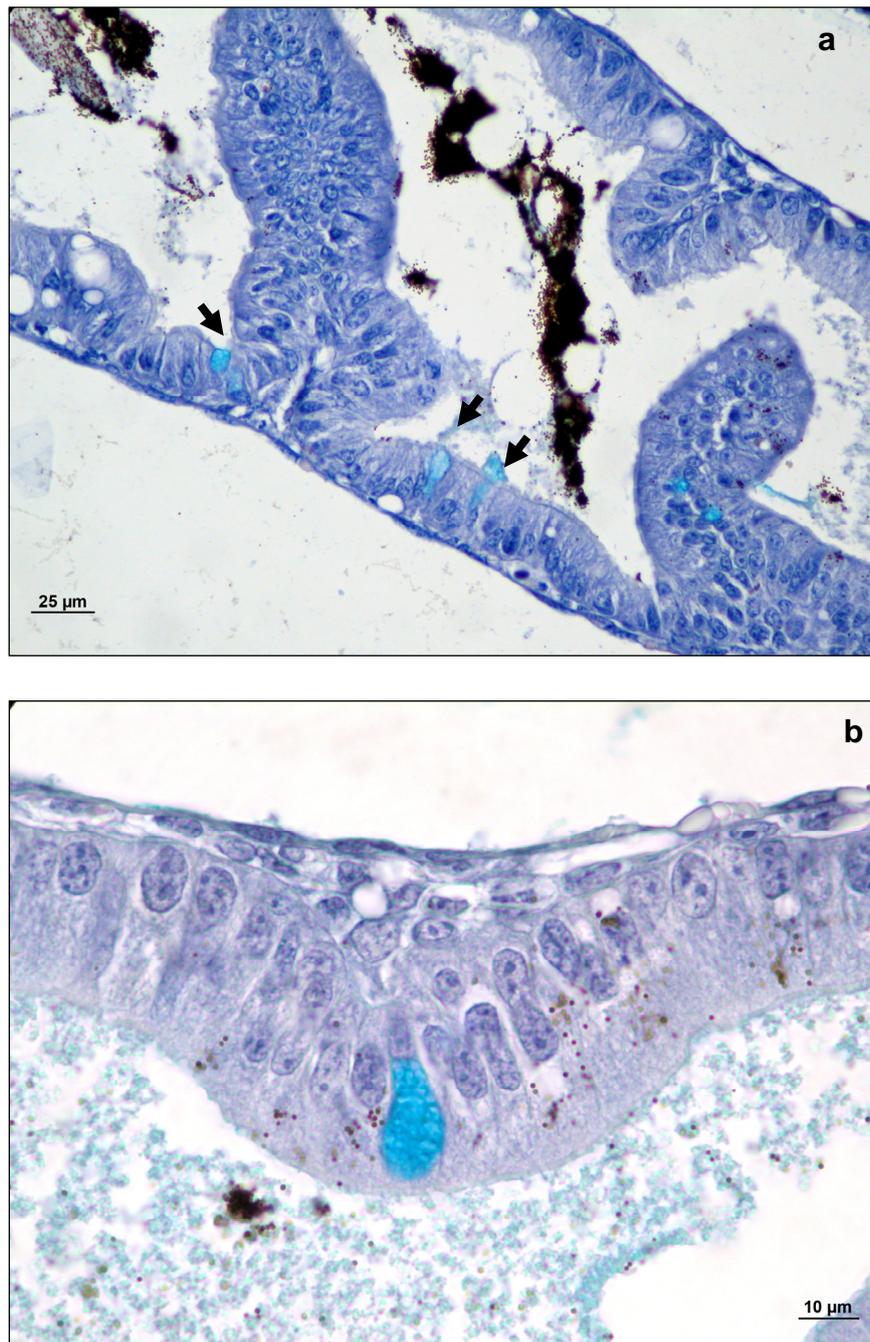


Figura 46: a- Micrografía de la válvula espiral en un embrión libre de *Acipenser naccarii* de 3 dpe en sección dorso-ventral, donde podemos observar las células caliciformes (flechas). AA pH 1. b- Detalle del epitelio de la válvula espiral en un embrión libre de *Acipenser naccarii* de 3 dpe, donde podemos observar una célula caliciforme. AA pH 2,5.

El interior de la válvula espiral está lleno de gran cantidad de vitelo, que irá siendo consumido conforme el animal se desarrolla. Como un subproducto de la utilización de las reservas vitelinas se produce la acumulación de melanina en la luz de la porción final de la válvula espiral. El depósito continuado de gránulos de melanina conlleva la formación de una masa que termina por ocupar toda la luz de la porción posterior de la válvula espiral. Dicha masa se denomina tapón de melanina y será expulsada justo después de la primera alimentación exógena (Figura 47).

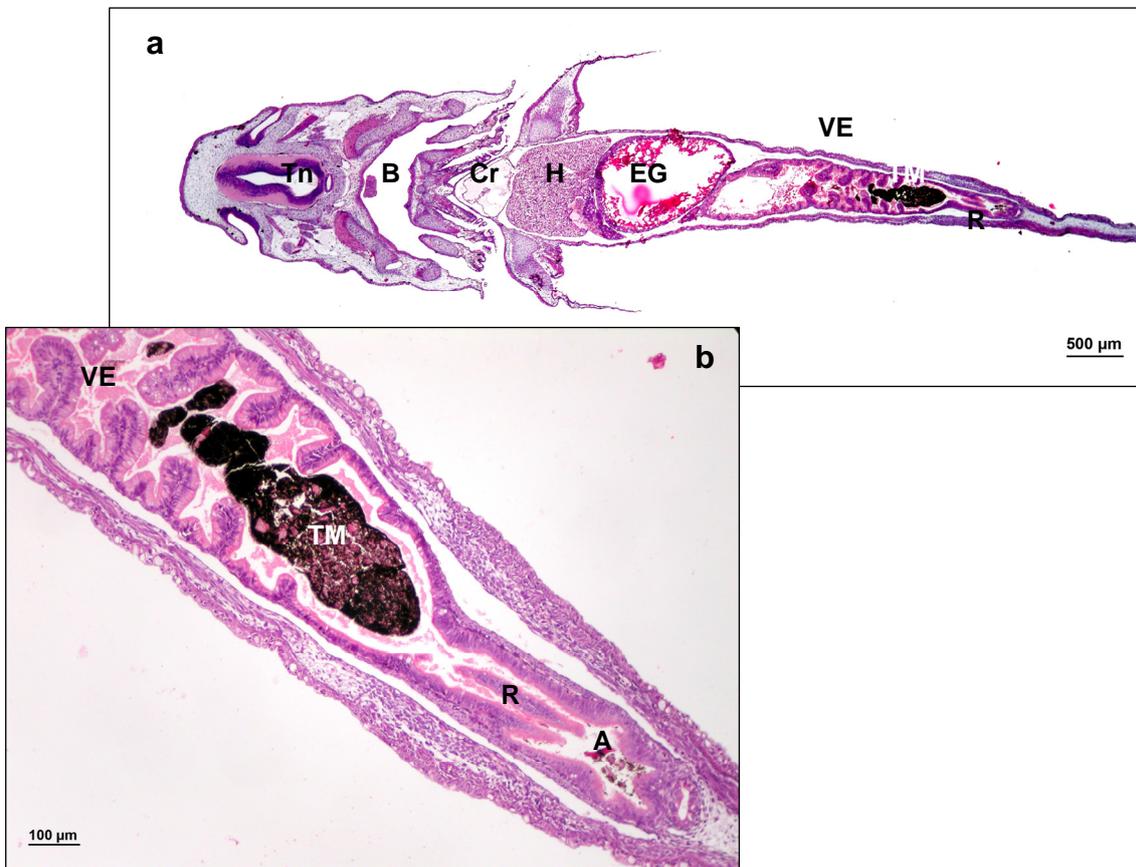


Figura 47: a - Imagen panorámica de un embrión libre de 7 dpe en sección dorso-ventral, donde podemos observar la válvula espiral con el tapón de melanina. H-E. b- Porción final de la válvula espiral mostrando el tapón de melanina. H, Hígado; B, boca; Cr, Corazón; EG, Estómago glandular; IM, Intestino medio; VE, Válvula espiral; R, Recto; TM, Tapón de melanina; A, ano.

Alrededor del día 7 post-eclosión el epitelio que tapiza la válvula espiral está completamente diferenciado y consta de un estrato simple de enterocitos con células ciliadas y caliciformes (Figura 48). Los enterocitos poseen microvellosidades apicales, un núcleo basal y una gran cantidad de vacuolas supranucleares. En este momento de desarrollo no existen diferencias significativas en cuanto a las características histológicas e histoquímicas entre los enterocitos de la porción anterior y los de la porción posterior de la válvula espiral.

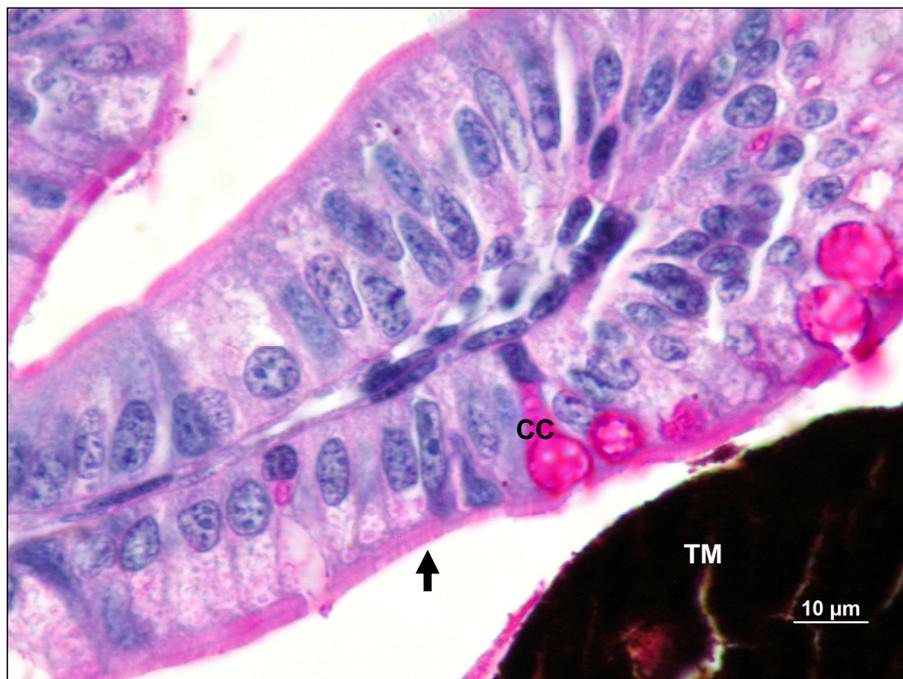
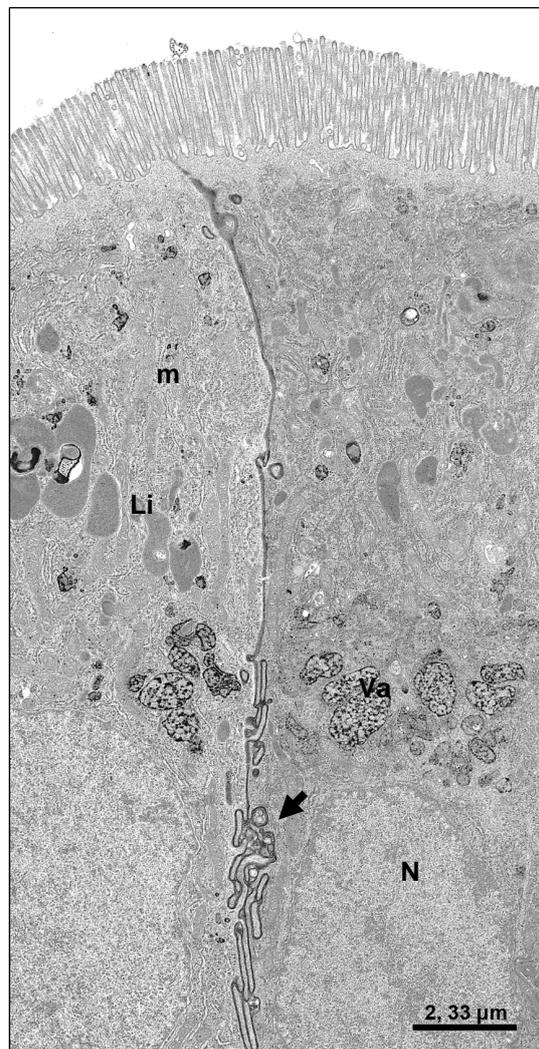


Figura 48: Detalle de un pliegue de la mucosa de la válvula espiral en un embrión libre de *Acipenser naccarii* de 7 dpe en sección dorso-ventral, donde se puede observar la PAS positividad de las células caliciformes (CC) y el ribete en cepillo (flecha). PAS.

Las células caliciformes distribuidas tanto en la porción posterior como en la anterior de la válvula espiral, están caracterizadas por su positividad frente a la técnica combinada del PAS-Azul alcian pH 2,5, lo que indicaría la producción de mucosustancias ácidas y neutras.

Los estudios con TEM ponen de manifiesto la presencia de enterocitos columnares con largas microvellosidades apicales y núcleos eucromáticos situados en posición basal. La membrana plasmática en las caras laterales presenta numerosas interdigitaciones. En el citoplasma es de destacar la presencia de numerosos lisosomas, así como la de mitocondrias y vacuolas cargadas de partículas lipoproteicas con posición supranuclear y relacionadas con el aparato de Golgi (Figura 49).

Figura 49: Detalle del epitelio de la válvula espiral en un embrión libre de *Acipenser naccarii* de 7 dpe, donde podemos observar enterocitos con núcleos (N) basales y caras laterales con numerosas interdigitaciones (flecha). TEM. m, mitocondrias; Li, lisosomas; Va, vacuolas con contenido lipoproteico.



Intercaladas con las células anteriormente descritas podemos observar células epiteliales provistas en su polo apical tanto de cilios como de microvellosidades (Figura 50).

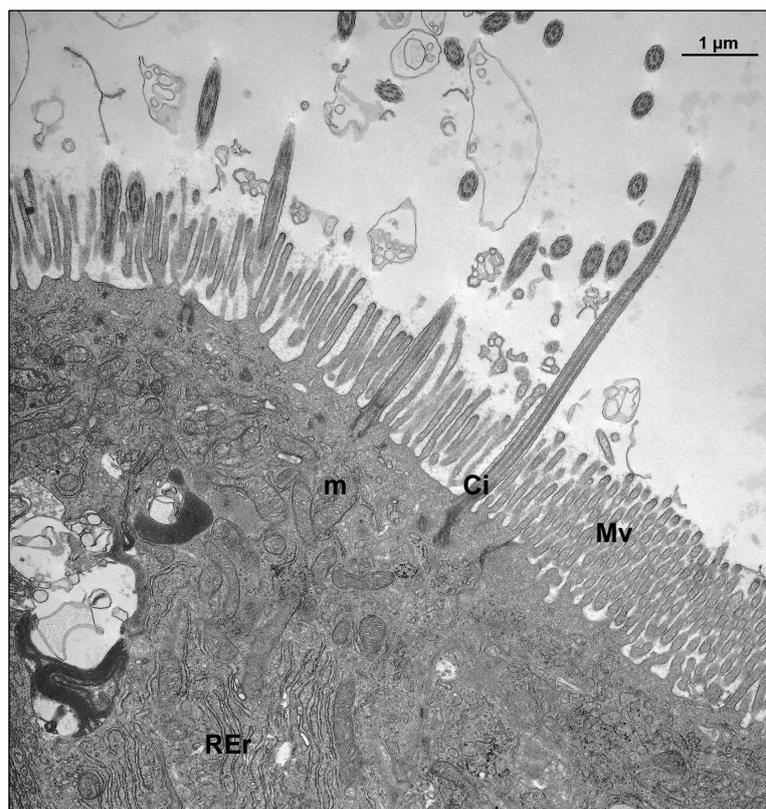


Figura 50: Detalle de una célula ciliada con microvellosidades del epitelio de la válvula espiral en un embrión libre de *Acipenser naccarii* de 7 dpe. Ci, cilio; Mv, microvellosidades; m, mitocondrias; REr, retículo endoplásmico rugoso. TEM.

Las características ultraestructurales de los enterocitos son bastante similares a las descritas para el intestino anterior y medio, presentando gran desarrollo de orgánulos implicados en el metabolismo lipídico. En el citoplasma de dichas células junto a gotas lipídicas de tamaño y distribución variable (Figuras 51a y 51b), encontramos partículas lipoproteicas resintetizadas a nivel del retículo endoplasmático, orgánulo celular abundante en el citoplasma

apical; dichas partículas se dirigen al complejo de Golgi, donde tras su modificación y empaquetamiento son descargadas hacia las caras laterales y basales (Figura 52) pasando desde éstas regiones hacia la sangre a través de capilares sinusoides (Figura 53).

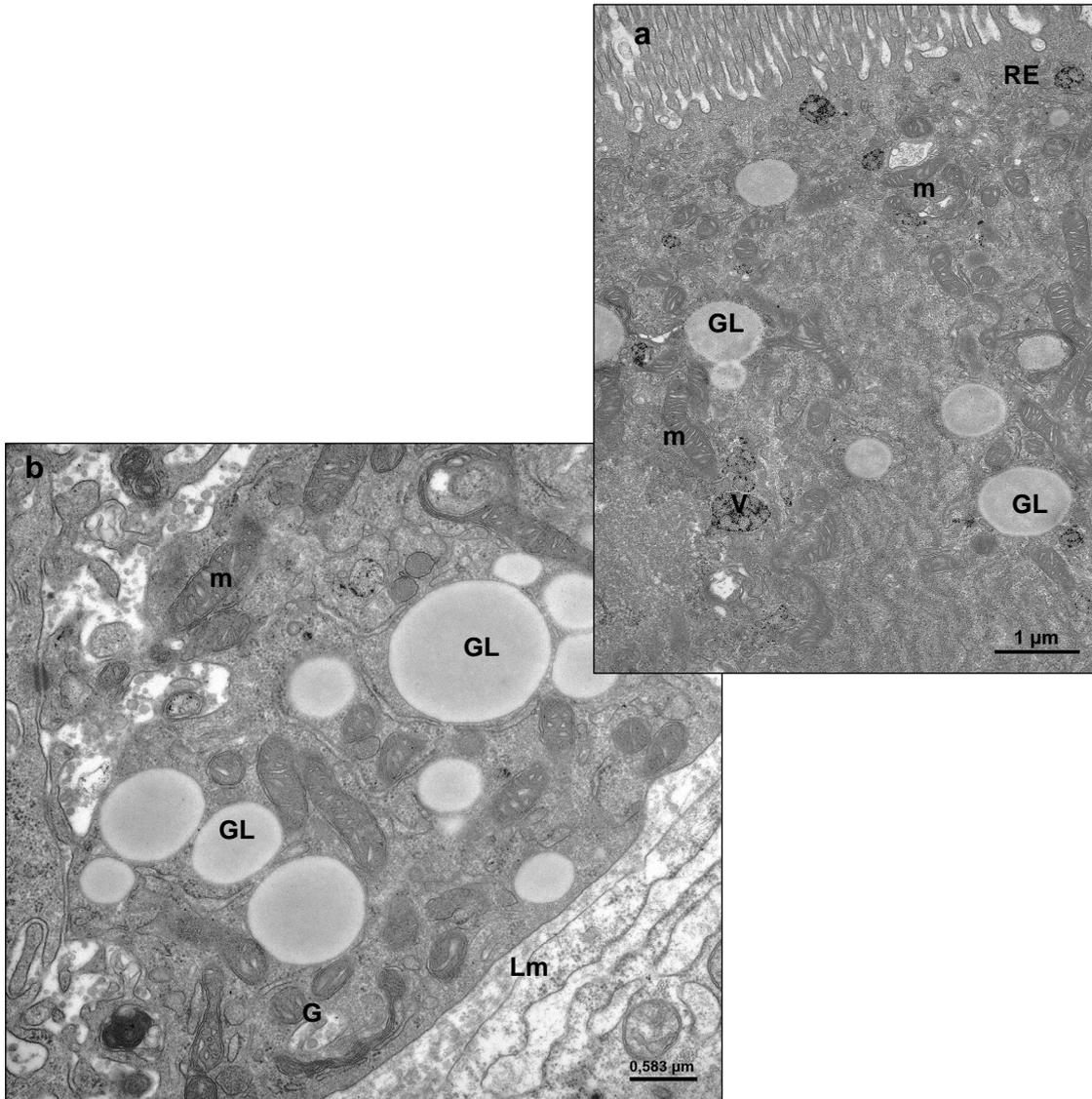


Figura 51: Micrografías de detalle del citoplasma de los enterocitos de la válvula espiral de un embrión libre de *Acipenser naccarii* de 7 dpe. a- Citoplasma apical. b- citoplasma basal. TEM. V, vesículas con contenido lipoproteico; G, Aparato de Golgi; GL, gota lipídica; Lm, Lámina basal; m, mitocondrias; RE, retículo endoplásmico.

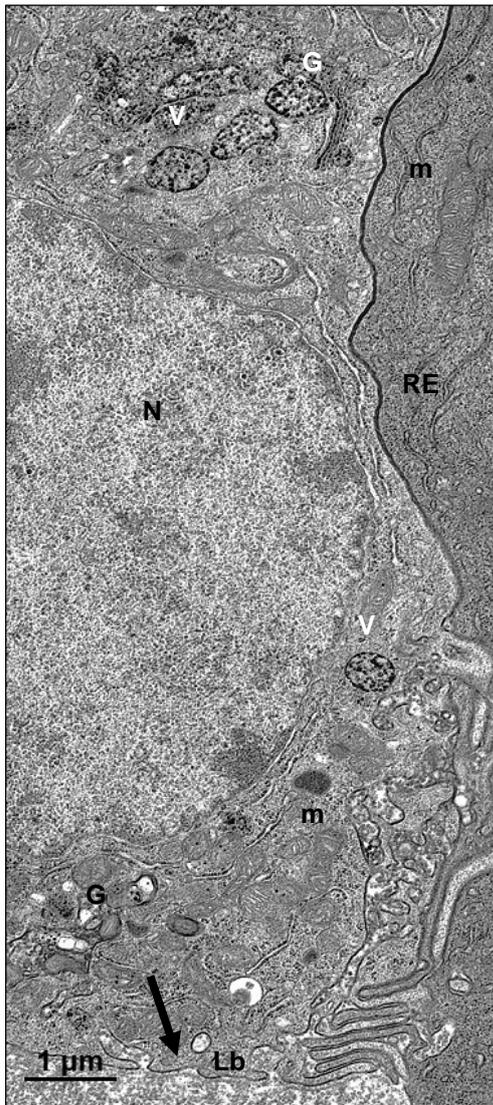
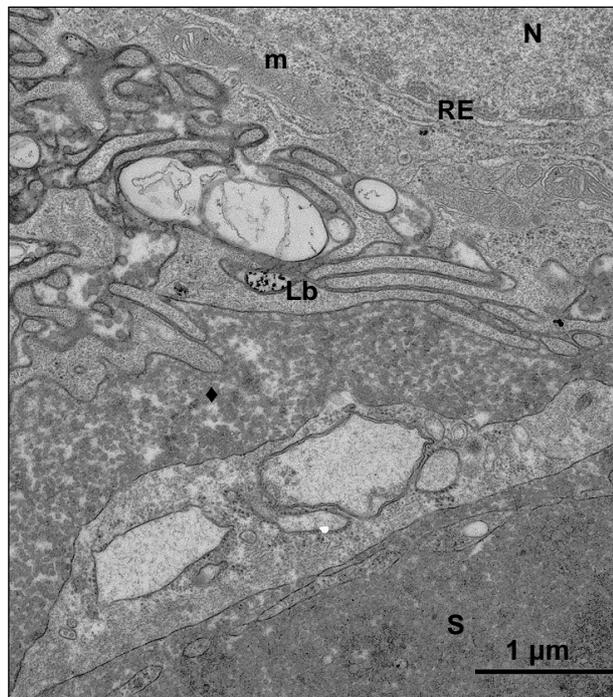


Figura 53: Detalle del citoplasma basolateral de un enterocito de la válvula espiral de un embrión libre de *Acipenser naccarii* de 7 dpe, donde podemos observar partículas lipídicas (♦) en el espacio extracelular, cerca de sinusoides (S). TEM. Lb, Lámina basal; N, núcleo; m, mitocondrias; RE, Retículo endoplásmico.

Figura 52: Micrografía de la porción basolateral de un enterocito de la válvula espiral en un embrión libre de *Acipenser naccarii* de 7dpe, donde podemos observar como las vesículas con contenido lipoproteico (V) se asocian con el aparato de Golgi (G) y posteriormente se descargan en los espacios intercelulares y basales (flecha). TEM.



➤ **Recto**

En el día 3 post-eclosión aparece un ano primitivo (Figura 54).

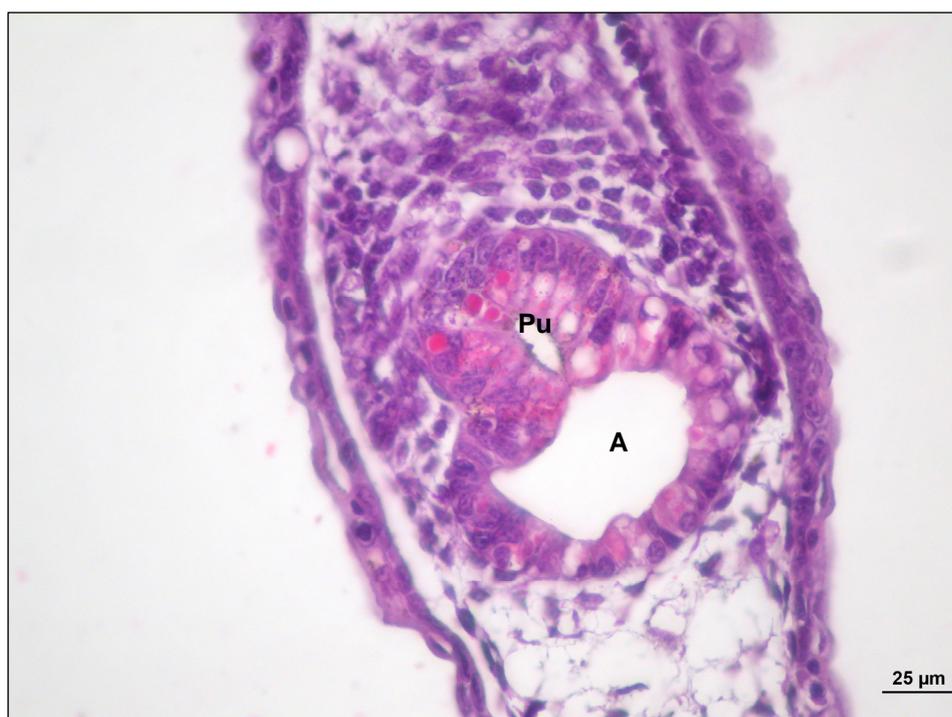


Figura 54: Sección dorsoventral de un embrión libre de *Acipenser naccarii* de 3 dpe en sección dorso-ventral, donde podemos observar como el ano ya está formado. H-E. A, ano; Pu, poro urinario.

Entre los 4 y los 5 días post-eclosión se produce una diferenciación de la porción final de la válvula espiral, que se estira y estrecha su diámetro para formar un primordio rectal. En este momento el epitelio de revestimiento del recto está compuesto por células columnares ciliadas que se disponen en una única capa, interpuestas con algunas células caliciformes. En los días posteriores el recto continúa aumentando su longitud y el grado de diferenciación de su epitelio, aumentando el número de células caliciformes y el de células ciliadas. En este momento de desarrollo los enterocitos del recto

poseen núcleos alargados que se sitúan en una porción central, en vez de la disposición basal que se observa en los núcleos de los enterocitos de la válvula espiral (Figura 55).



Figura 55: Imagen panorámica de la porción posterior de la válvula espiral de un embrión libre de *Acipenser naccarii* de 7 dpe en sección dorso-ventral, donde podemos observar el recto y el ano. H-E. R, Recto; A, Ano; TM, Tapón de melanina.

El recto presenta unas características histoquímicas similares a las de los segmentos intestinales anteriormente descritos, así las células caliciformes, que se presentan en una concentración algo menor que en la válvula espiral, reaccionan positivamente tanto a la técnica del PAS como a la del AA pH 2,5 y pH 1, hecho que indica que producen una mezcla de mucopolisacáridos neutros y ácidos (Figura 56).

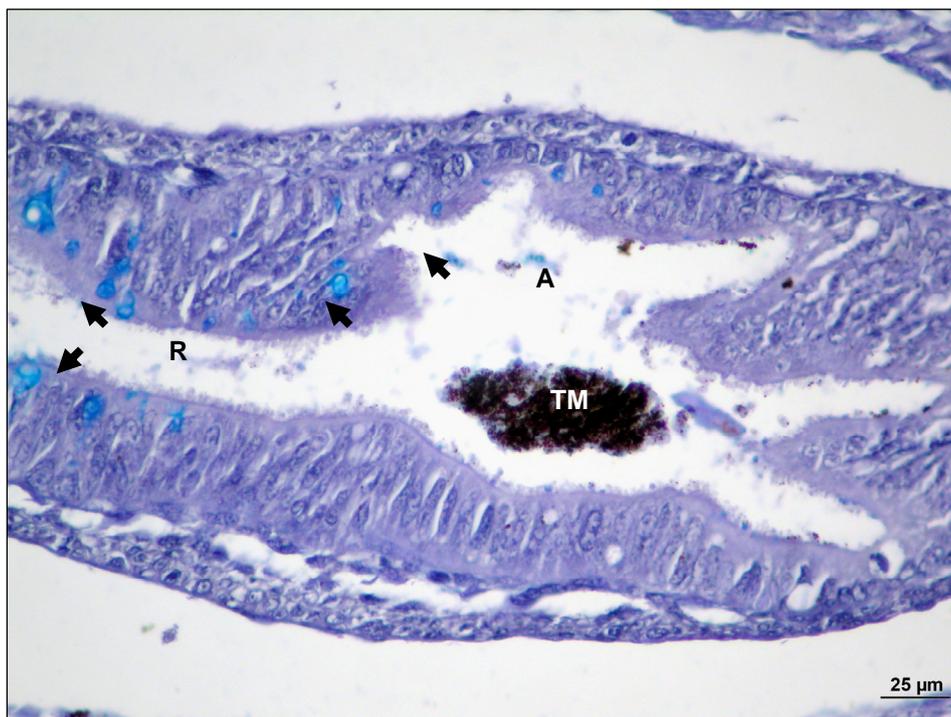


Figura 56: Imagen del recto (R) y el ano (A) en un embrión libre de *Acipenser naccarii* de 7 días post-eclosión en sección dorso-ventral, donde podemos observar las células caliciformes (flechas) y el tapón de melanina (TM). AA pH 2,5.

➤ Glándulas anejas

El rudimento hepático se observa claramente alrededor de los tres días post-eclosión, en posición dorsal al saco vitelino. Los hepatocitos adoptan una morfología poligonal, con un núcleo central y un citoplasma de reducidas dimensiones, donde pueden observarse vacuolas de gran tamaño (Figura 57). Estas vacuolas no se tiñen con H-E ni con ninguna de las técnicas histoquímicas utilizadas (PAS, Azul alcian pH 2,5 y Azul alcian pH 1). El número de vacuolas posiblemente de naturaleza lipídica en el interior de los hepatocitos aumenta conforme el embrión va desarrollándose.

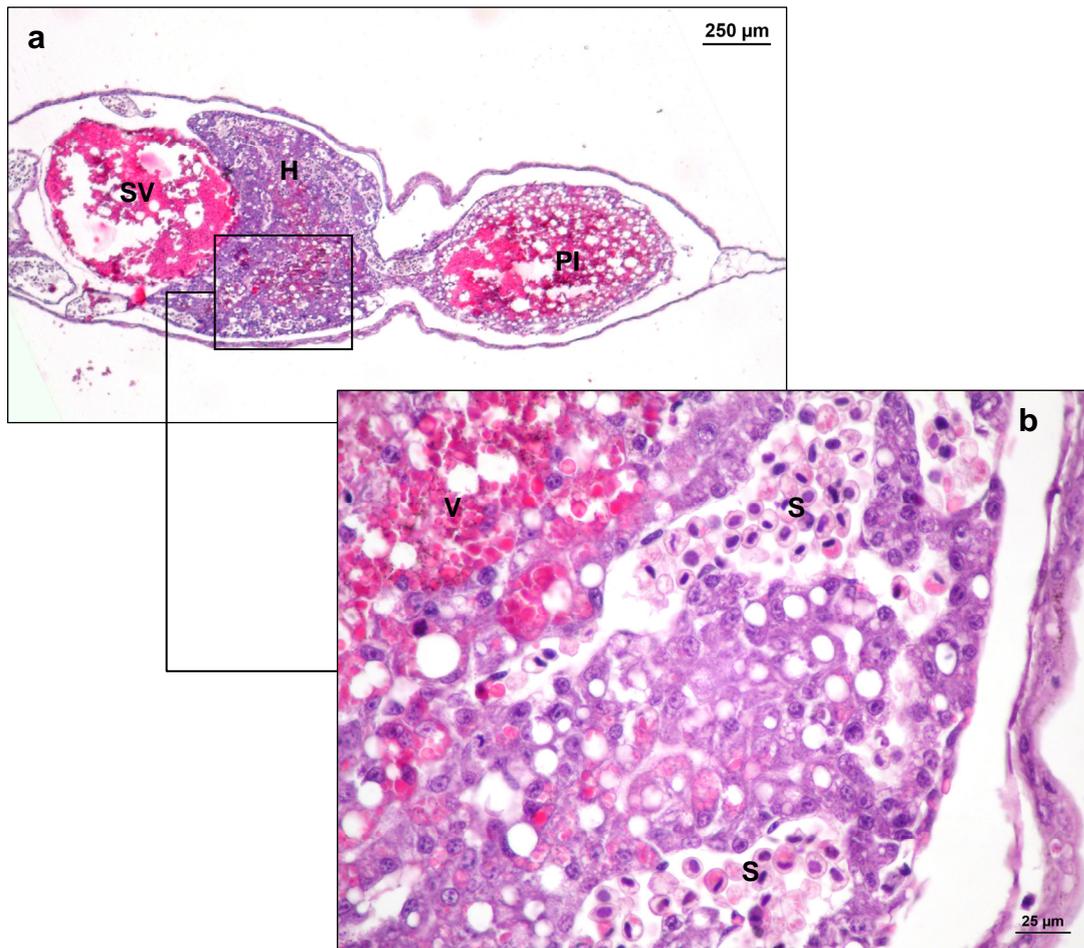


Figura 57: a - Imagen panorámica de un embrión libre de 3 dpe en sección dorso-ventral, donde podemos observar el rudimento hepático. H-E. b - Detalle de la imagen anterior donde podemos observar como las células hepáticas comienzan a organizarse en torno a sinusoides. SV, Saco Vitelino; H, Hígado; PI, Primordio intestinal; V, Vitelo.

Los lóbulos hepáticos comienzan a formarse alrededor de 6 días después de la eclosión y se pueden diferenciar claramente en embriones de 7 días post-eclosión.

La vesícula biliar es otra de las estructuras que aparecen en este momento del desarrollo; se localiza en el lóbulo hepático izquierdo y está revestida por un

epitelio monoestratificado cúbico, rodeado por una gruesa capa de tejido conectivo (Figura 58).

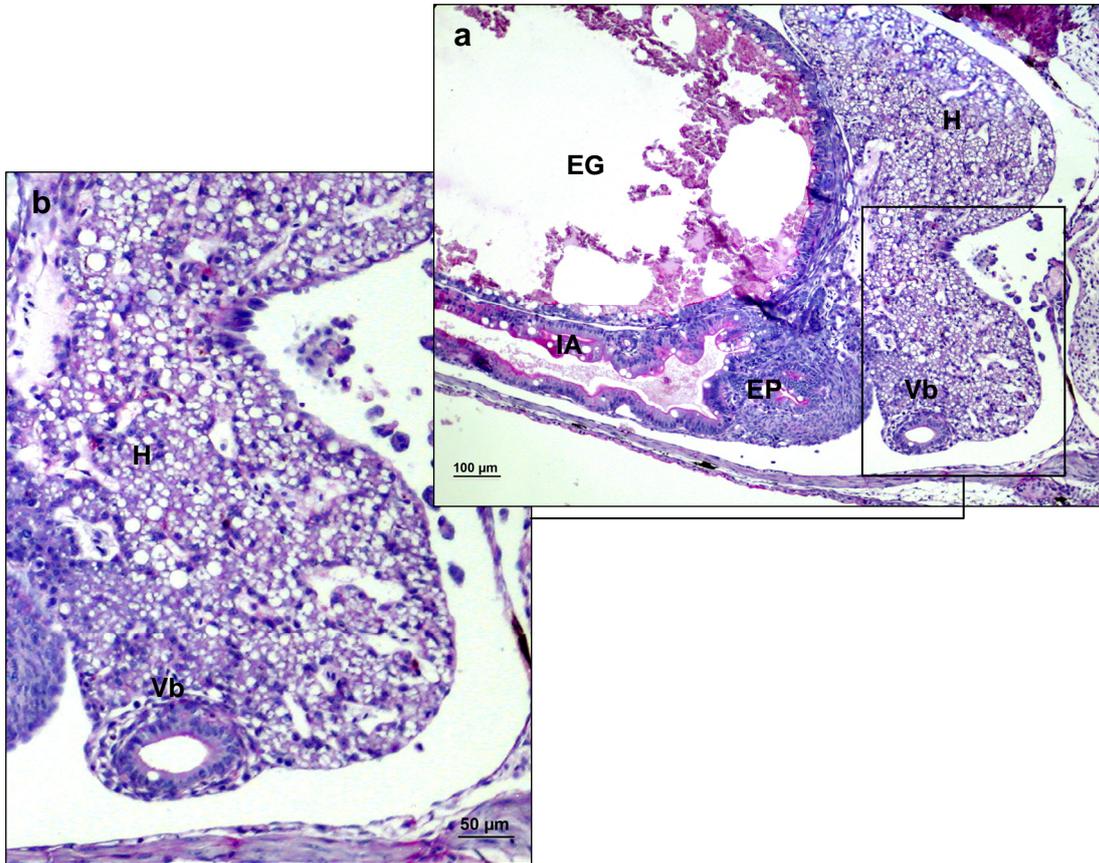


Figura 58: a- Imagen panorámica de la porción corporal anterior de un embrión libre de *Acipenser naccarii* de 7 dpe en sección dorso-ventral, donde podemos observar el hígado (H) y la vesícula biliar (Vb). PAS. EG, Estómago glandular; EP, Estómago pilórico; IA, Intestino anterior. b – Imagen aumentada del lóbulo hepático y la vesícula biliar. PAS.

El rudimento del páncreas exocrino aparece en torno a los 6 días post-eclosión, como un pequeño núcleo de células localizadas junto los hepatocitos (Figura 59a). Estas células se organizan en acinos, poseen núcleos basales y su citoplasma es fuertemente basófilo. En ejemplares de 7 días post-eclosión, el tejido pancreático adquiere una estructura similar a la observada en

ejemplares juveniles y adultos, formando una especie de cuña en el lóbulo hepático izquierdo; en el interior de sus células pueden observarse gránulos de zimógeno (Figura 59b).

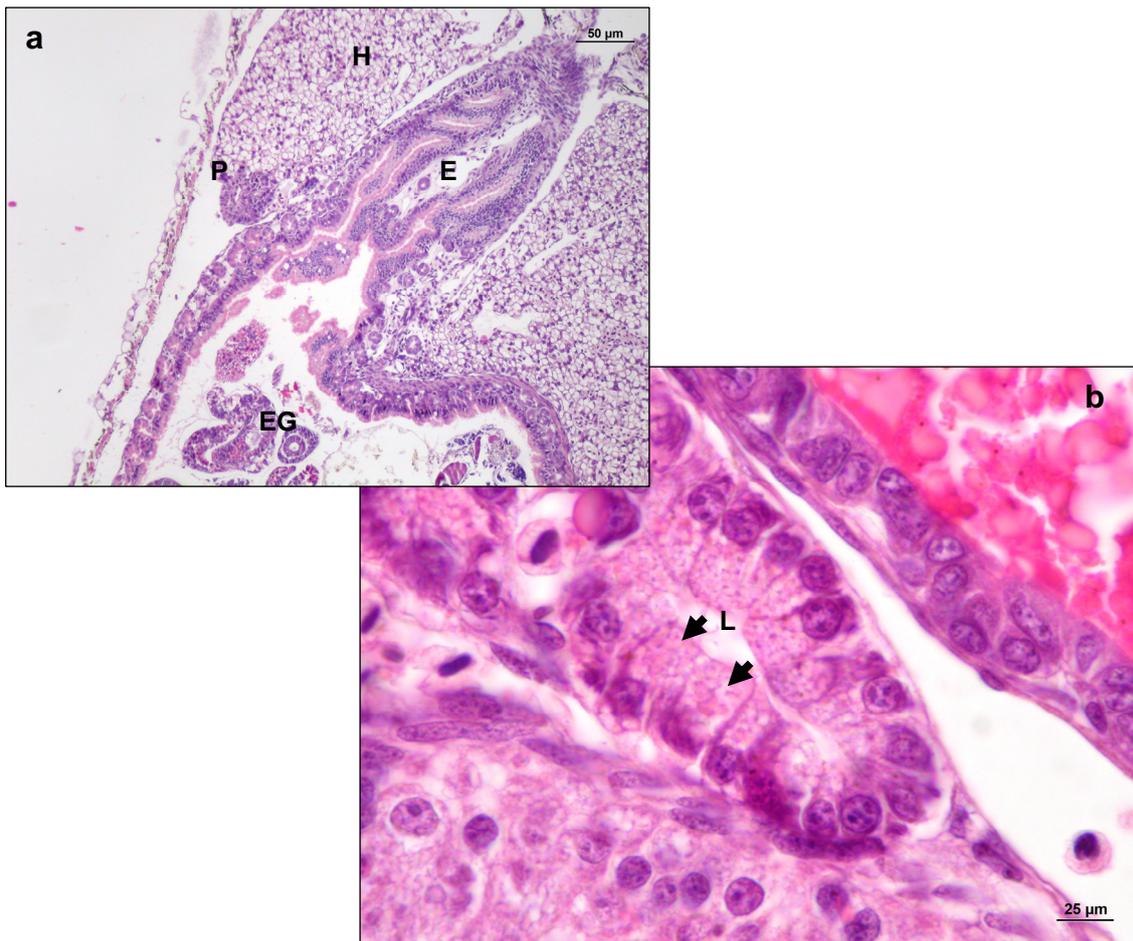


Figura 59: a - Imagen panorámica de la porción corporal anterior de un embrión libre de *Acipenser naccarii* de 7 dpe en sección dorso-ventral, donde podemos observar el hígado (H) y el páncreas (P). H-E. E, Esófago; EG, Estómago glandular. b - Detalle del tejido pancreático cuyas células poseen gránulos de zimógeno en su interior (flechas). H-E. L, luz del acino.

La ultraestructura de los hepatocitos y de las células acinares pancreáticas será descrita en estadios posteriores del desarrollo, donde ya se muestran, de forma más explícita, las características específicas de estos tipos celulares.

2. PERIODO LECITO-EXOTRÓFICO

Este periodo se inicia en el momento en el que los embriones libres ingieren alimento de origen exógeno por primera vez, hecho que tiene lugar en torno a los 8 días después de la eclosión en *Acipenser naccarii*. Durante los días que abarca este periodo, los animales presentan un tipo de alimentación mixta, ya que ingieren alimento exógeno pero también se nutren de los restos de vitelo que aún poseen. Se considera que este periodo es crítico en el desarrollo debido a la gran influencia que ejerce tanto en la supervivencia como en el crecimiento de los embriones libres.

Cuando los embriones libres de *Acipenser naccarii* inician la alimentación exógena, poseen una organización anatómica e histológica del tracto digestivo muy similar a la de ejemplares juveniles o adultos. El estómago presenta una porción anterior con glándulas gástricas, encargada de iniciar la digestión química del alimento y una porción posterior que, aunque carece de glándulas, facilita el triturado del alimento gracias a la presencia de una capa muscular muy desarrollada. Los ciegos están desarrollados y el epitelio intestinal presenta una gran cantidad de vacuolas citoplasmáticas relacionadas con el metabolismo lipídico. Se produce la expulsión del tapón de melanina y por primera vez observamos restos de alimento de origen externo en el lumen de la válvula espiral. Además de lo anterior, las características histológicas del hígado y la presencia de gránulos de zimógeno en las células pancreáticas, sugieren un alto grado de funcionalidad del canal alimentario.

Los contenidos de cada compartimento del sistema en los días inmediatamente anteriores y posteriores se expresan en la tabla 12.

DPE	ESTÓMAGO		INTESTINO		VÁLVULA ESPIRAL
	GLANDULAR	PILÓRICO	ANTERIOR	MEDIO	
7 d 16 h	Vitelo	Vitelo	Vitelo	Vitelo	Tapón de melanina
8 d	Vitelo	Vitelo	Vitelo	Vitelo	Tapón de Melanina
8d 8h	Vitelo	Vitelo	Vitelo	Vitelo	Tapón de Melanina
8 d 16 h	Vitelo y <i>Artemia</i>	Vitelo y <i>Artemia</i>	Vitelo	Vitelo	Tapón de Melanina
9	Vitelo y <i>Artemia</i>	Vitelo y <i>Artemia</i>	<i>Artemia</i>	<i>Artemia</i>	Tapón de Melanina
9 d 8h	Vitelo y <i>Artemia</i>	Vitelo y <i>Artemia</i>	<i>Artemia</i>	<i>Artemia</i>	<i>Artemia</i>

DPE: Días post-eclosión.

Tabla 11: Contenido de las diferentes porciones del tracto gastrointestinal del esturión *Acipenser naccarii* durante el periodo lecito-exotrófico.

Los primeros restos de alimento de origen exógeno pueden observarse en el estómago de embriones libres de 8 días, aunque el tapón de melanina es aún visible. Al final del día 9 dpe se produce la expulsión del tapón de melanina y el establecimiento de la continuidad entre las diferentes partes del tracto gastrointestinal. En este momento es posible diferenciar restos de alimento de origen externo en el lumen de la válvula espiral (Figura 60).



Figura 60: Imagen panorámica de un juvenil de *Acipenser naccarii* de 12 dpe en sección dorso-ventral, donde podemos observar como tanto la porción gástrica como la intestinal (incluyendo la válvula espiral) contienen partículas de alimento exógeno. PAS. EG, Estómago glandular; EP, Estómago pilórico; CP, Ciegos pilóricos; IA, Intestino anterior; IM, Intestino medio; VE, Válvula espiral.

➤ **Cavidad orofaríngea**

Durante el periodo de alimentación mixta no se establecen cambios de gran importancia en esta región. El epitelio de la cavidad orofaríngea sigue manteniendo las mismas características histológicas e histoquímicas que en el periodo anterior, los botones gustativos de igual manera mantienen su estructura histológica, pero en este periodo son más numerosos (Figura 61).

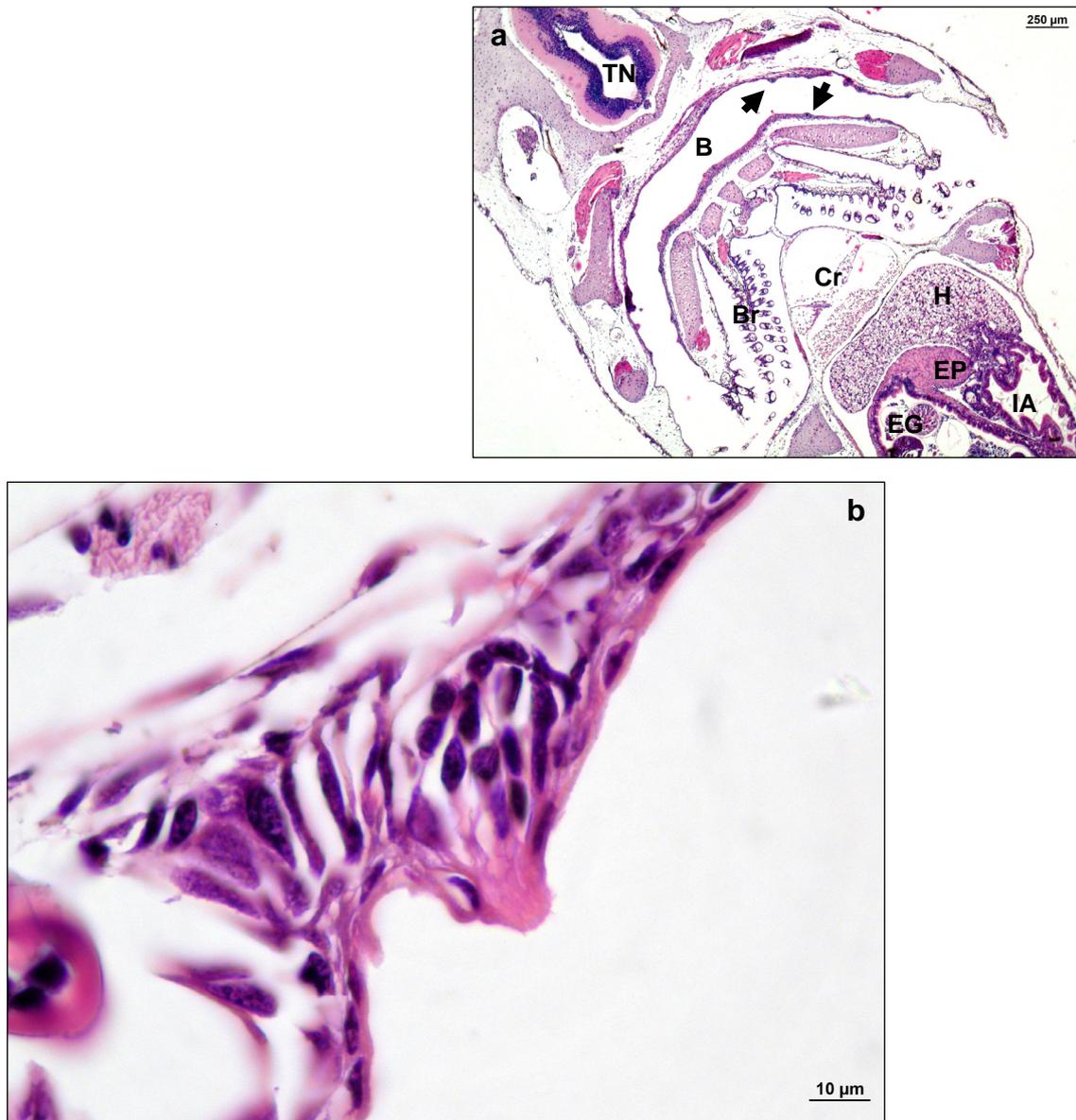


Figura 61: a - Imagen panorámica de la región orofaríngea de un juvenil de *Acipenser naccarii* de 12 dpe en sección dorso-ventral. H-E. B, Boca; Br, Branquias; Flechas, Botón gustativo; Cr, Corazón; EG, Estómago glandular; EP, Estómago pilórico; H, Hígado; IA, intestino anterior; TN, Tubo neural. b - Detalle de un botón gustativo de la cavidad orofaríngea. H-E.

En embriones de 9 dpe, los dientes presentan forma cónica y han atravesado ya el epitelio bucofaríngeo (Figura 62).

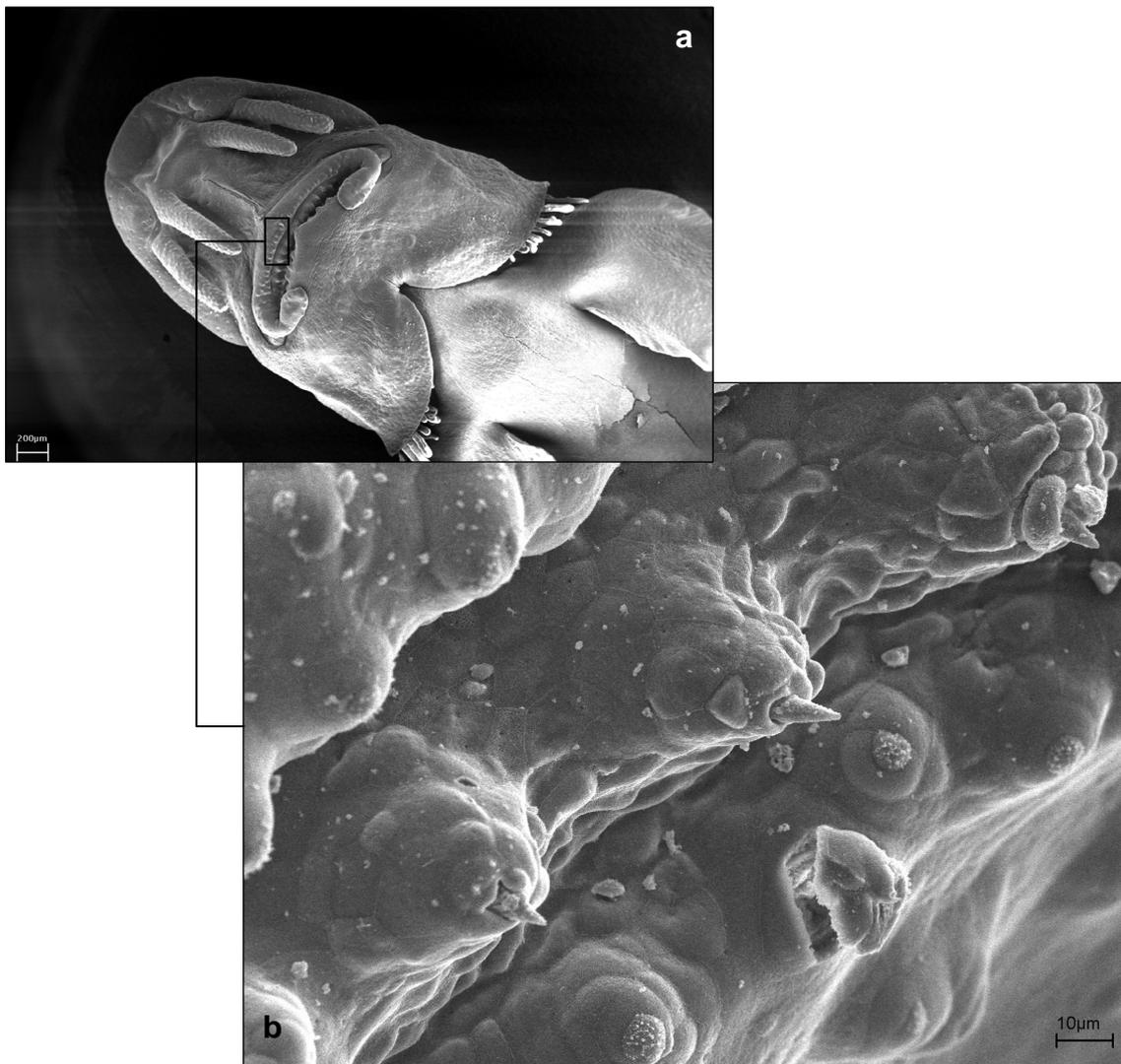


Figura 62: a - Imagen panorámica de la porción corporal anterior de un juvenil de *Acipenser naccarii* 12 dpe. FESEM. b - Detalle de los dientes que han atravesado el epitelio de la cavidad orofaríngea. FESEM.

En secciones transversales de microscopía óptica se pueden observar claramente desarrolladas la capa de esmalte, la de dentina y la cavidad pulpar, lo cual coincide con la estructura típica descrita para teleósteos (Figura 63).

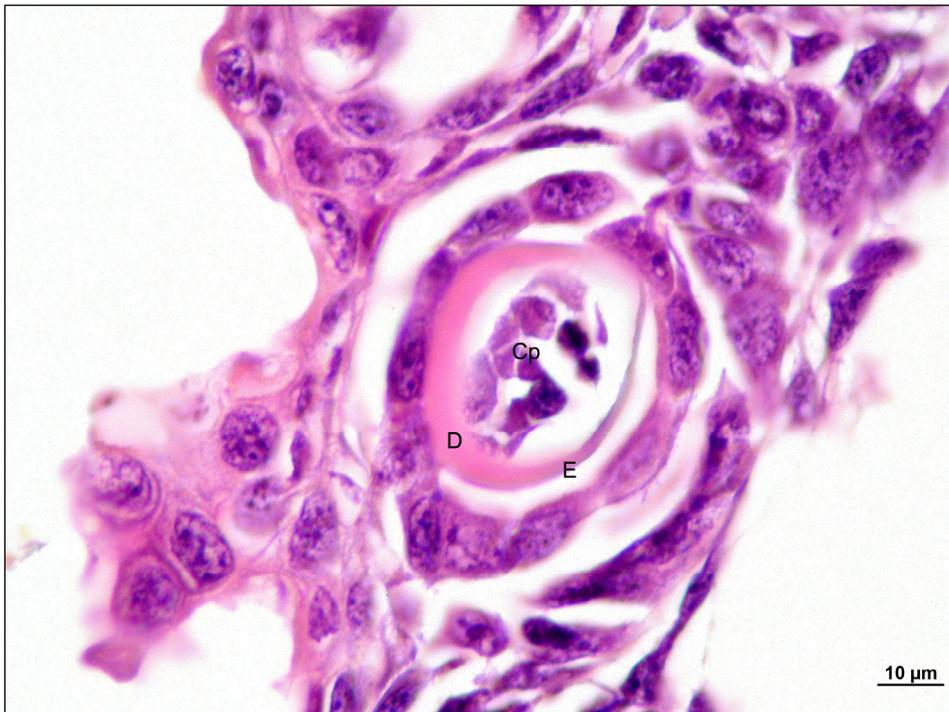


Figura 63: Detalle del epitelio de la cavidad orofaríngea de un juvenil de *Acipenser naccarii* de 12 dpe, donde podemos observar un diente en sección dorsoventral. H-E. Cp, Cavidad pulpar; E, Esmalte; D, Dentina.

➤ **Esófago**

El esófago no experimenta cambios de importancia durante el periodo de alimentación mixta y mantiene las mismas características histológicas e histoquímicas que en el periodo lecitotrófico.

➤ **Estómago**

El estómago, que anatómicamente es muy similar al de ejemplares juveniles y adultos, mantiene las mismas características histológicas e histoquímicas descritas para el periodo anterior. Como únicos cambios, citar el aumento de

glándulas gástricas en la porción glandular del estómago y el incremento en el grosor de las capas musculares del estómago pilórico (Figura 60), datos que indican un alto grado de especialización gástrica.

Mientras que el estómago glandular estaría involucrado en el inicio del proceso de digestión química del alimento mediante la síntesis de pepsinógeno y HCl en las glándulas gástricas, la porción pilórica facilitaría la fragmentación del alimento mediante las contracciones de sus paredes musculares (Figuras 64a y 64b).

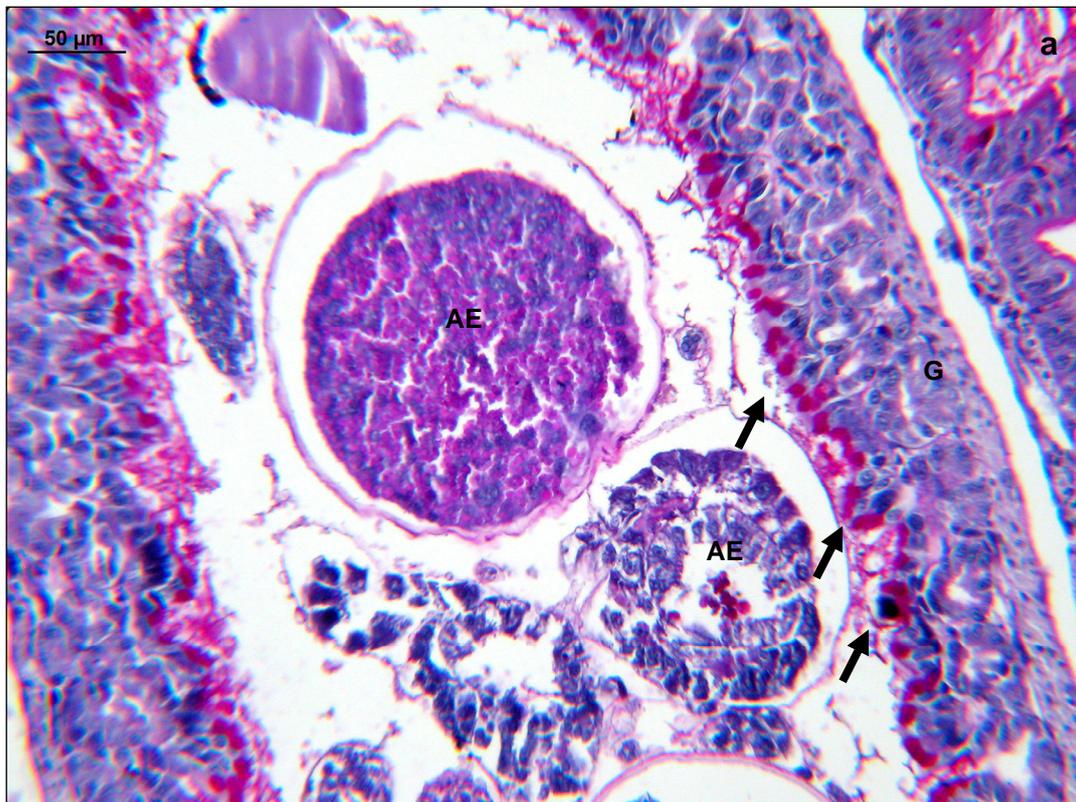


Figura 64: a - Detalle de la pared del estómago glandular de un juvenil de *Acipenser naccarii* de 12 dpe en sección dorso-ventral, donde podemos observar la PAS-positividad de sus células epiteliales (flechas) y las glándulas gástricas en el corion. PAS. AE, Alimento exógeno; G, glándula gástrica.

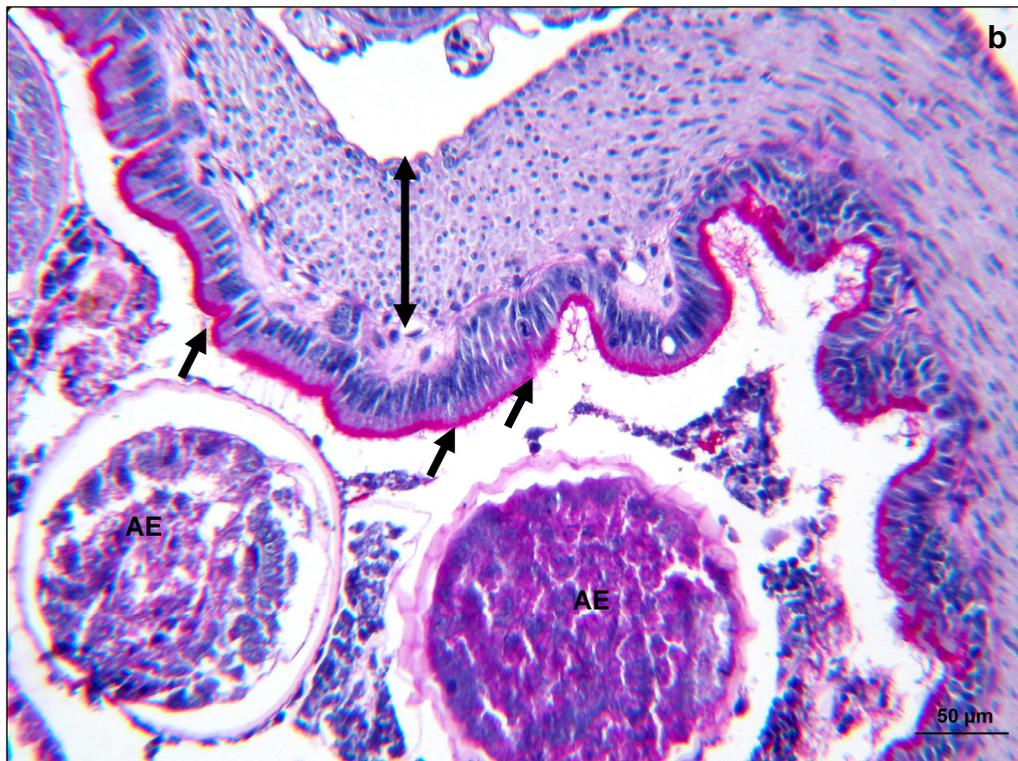


Figura 64 b - Detalle de la pared del estómago pilórico de un juvenil de *Acipenser naccarii* de 12 dpe en sección dorso-ventral, donde podemos observar un epitelio cilíndrico con ribete en cepillo PAS+ (flechas) y un gran desarrollo de la capa muscular (flecha doble). PAS. AE, alimento exógeno.

➤ **Intestino anterior, medio y válvula espiral**

En el intestino se produce un aumento en la longitud y en el grado de plegamiento de la mucosa, que afecta a sus diferentes porciones incluidos los ciegos pilóricos, lo cual genera un incremento de la superficie de absorción (Figura 65).

Los enterocitos de estas regiones intestinales se especializan en la absorción de lípidos, como lo demuestra la presencia de gran cantidad de vacuolas lipídicas en su citoplasma supranuclear (Figura 66).

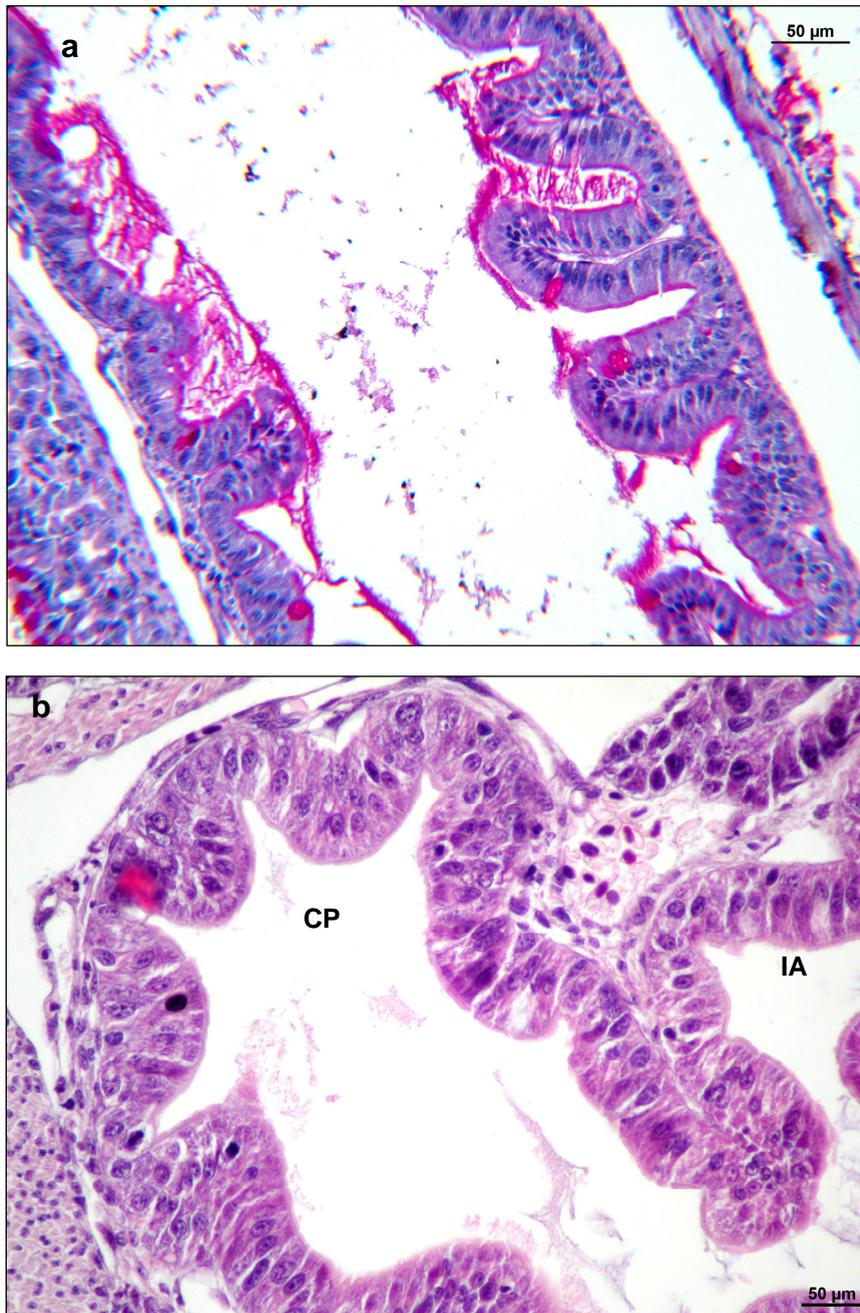


Figura 65: a - Epitelio intestinal de un juvenil de *Acipenser naccarii*, de 12 dpe en sección dorsoventral donde podemos observar como la altura de los pliegues intestinales se ha incrementado. PAS. b – Imagen panorámica de los ciegos pilóricos donde podemos observar como se ha acrecentado el plegamiento de la mucosa. H-E. CP, Ciegos pilóricos; IA, intestino anterior.

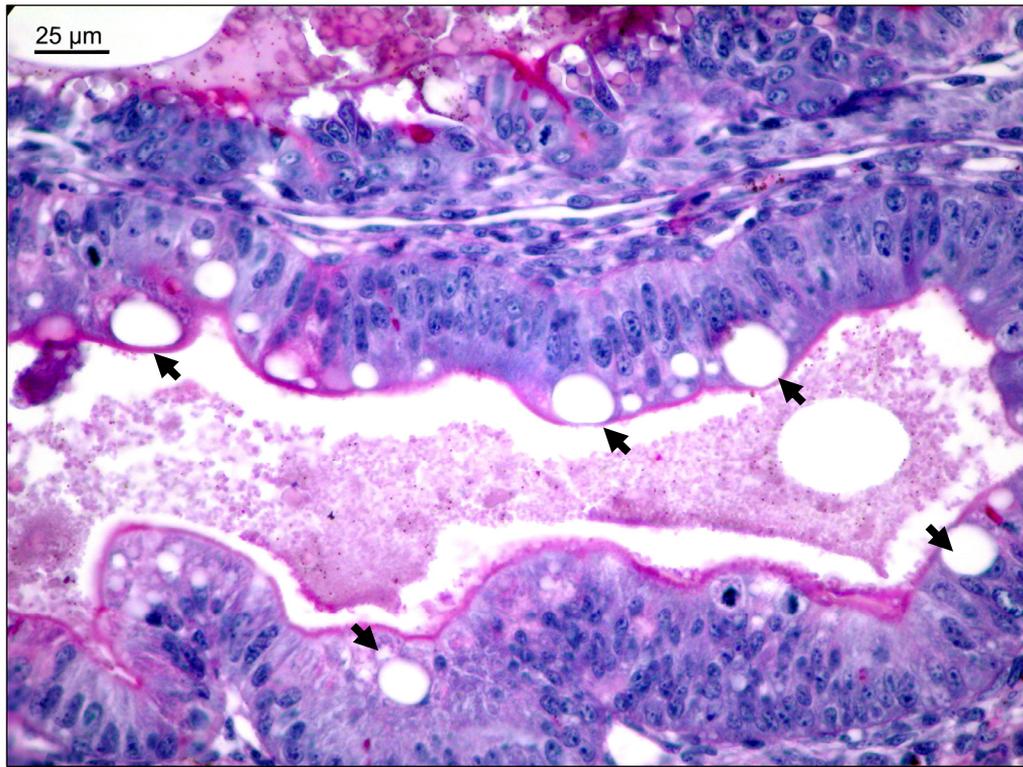


Figura 66: Porción pilórica del intestino de un juvenil de *Acipenser naccarii* de 12 dpe en sección dorso-ventral, donde podemos observar una gran acumulación de gotas lipídicas (flechas) en el interior de los enterocitos. PAS.

El epitelio de la válvula espiral mantiene las mismas características histológicas e histoquímicas descritas para la fase lecitotrófica.

1.5. Glándulas anejas: Hígado y páncreas

En el hígado resaltar la mayor vacuolización de los hepatocitos y el establecimiento, alrededor del día 8 dpe, de la conexión entre el hígado y el intestino anterior mediante el conducto biliar, que al igual que la vesícula biliar, está tapizado por un epitelio columnar simple (Figura 67)

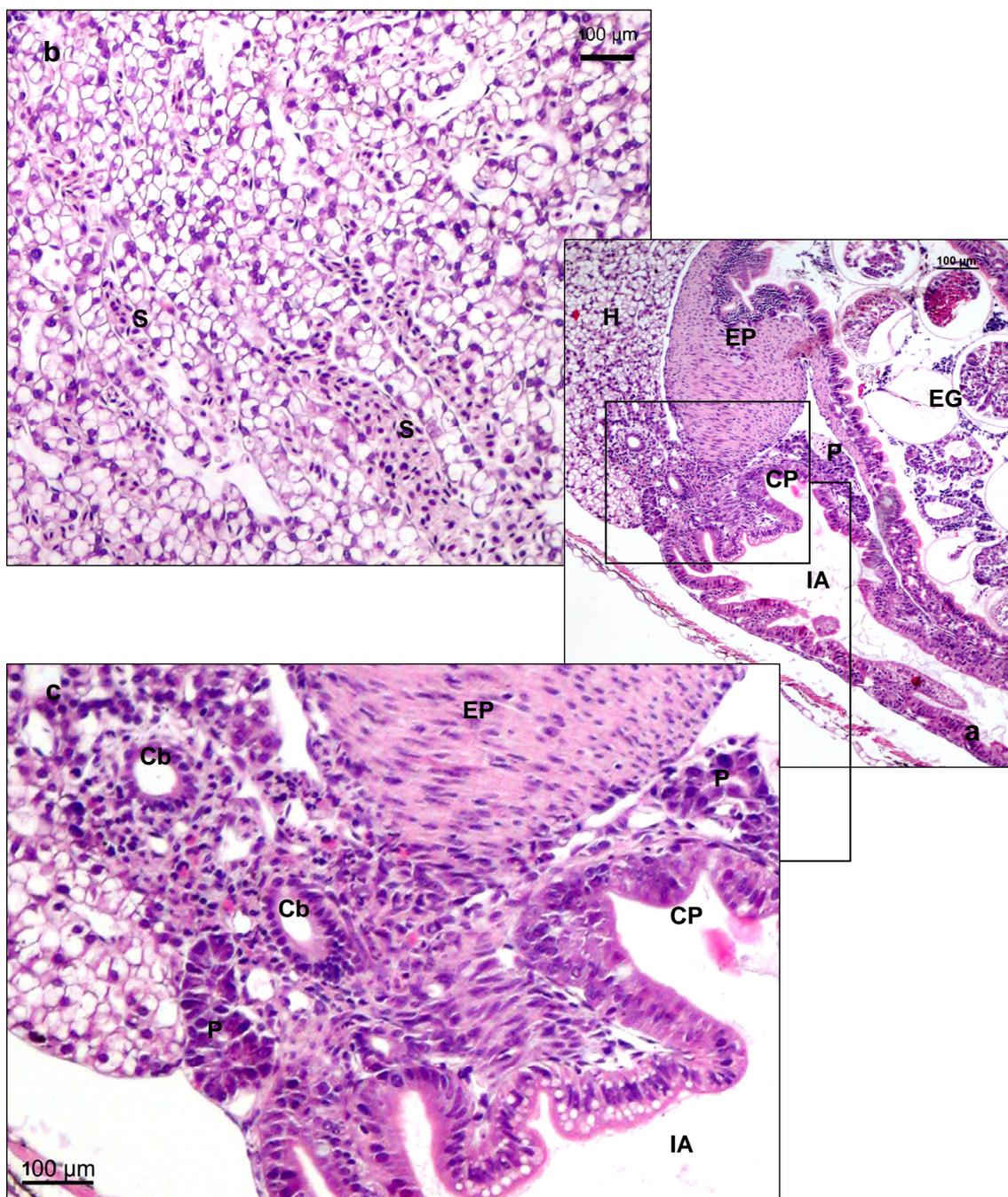


Figura 67: a- Imagen panorámica de la porción corporal media de un juvenil de *Acipenser naccarii* de 12 dpe en sección dorso-ventral. H-E. b - Detalle del Hígado. H-E. c- Detalle de la conexión del conducto biliar con la primera porción del intestino pilórico. H-E. Cb, Conducto biliar; CP, Ciegos pilóricos; EG, Estómago glandular; EP, Estómago pilórico; H, Hígado; IA, Intestino anterior; P, Páncreas; S, Sinusoide.

El tejido pancreático adquiere de manera definitiva su estructura característica en acinos y además de la localización que poseía en el periodo anterior, ahora se distribuye también en las proximidades del esfínter pilórico, justo en el espacio existente entre la porción glandular del estómago y los ciegos pilóricos, y alrededor de la porción anterior de la válvula espiral (Figura 68).

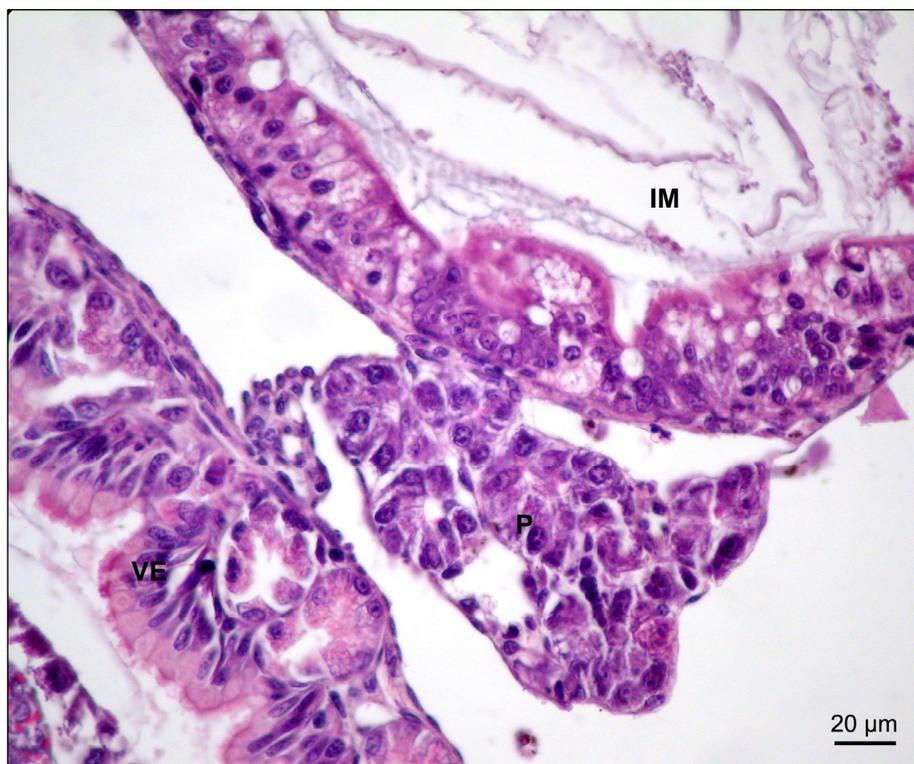


Figura 68: Detalle de la porción de tejido pancreático presente en las cercanías de la válvula espiral de un juvenil *Acipenser naccarii* de 12 dpe. H-E. IM, intestino medio; P, páncreas; VE, válvula espiral.

3. PERIODO EXOTRÓFICO

El período de alimentación exclusivamente exógena tiene su inicio cuando las reservas vitelinas están completamente reabsorbidas y se prolongará durante el resto de vida del animal.

La fase de desarrollo inicial de este periodo se denomina juvenil y durante su transcurso los animales adquieren un sistema digestivo anatómicamente similar al de adultos (Figura 69) y se instaura la dieta inerte. En *Acipenser naccarii* la introducción de la alimentación inerte (o destete) se produce entre uno y tres meses después de la eclosión, variando el momento en función tanto de la temperatura de desarrollo como de la cantidad y calidad del vitelo. La fase juvenil en *Acipenser naccarii* se extiende hasta el momento de la primera maduración sexual, momento en el que se inicia la fase adulta.

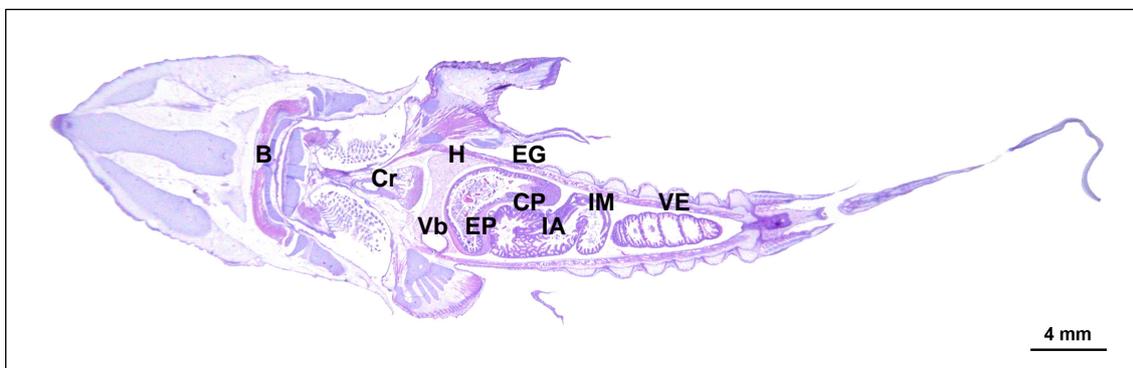


Figura 69: Imagen panorámica de un juvenil de *Acipenser naccarii* de 36 dpe en sección dorso-ventral. H-E. B, boca; CP, Ciegos pilóricos; Cr, Corazón; EG, Estómago glandular; EP, Estómago pilórico; H = Hígado, IA: Intestino anterior; IM, Intestino medio; VE, Válvula espiral.

➤ **Cavidad orofaríngea**

Durante el tiempo que dura este periodo se aprecian pocos cambios importantes en esta estructura. Únicamente podemos señalar el aumento inicial en el número, grosor y longitud de las estructuras dentarias, que durante la primera parte del periodo exotrófico siguen manteniendo la misma disposición que en edades anteriores (Figura 70).

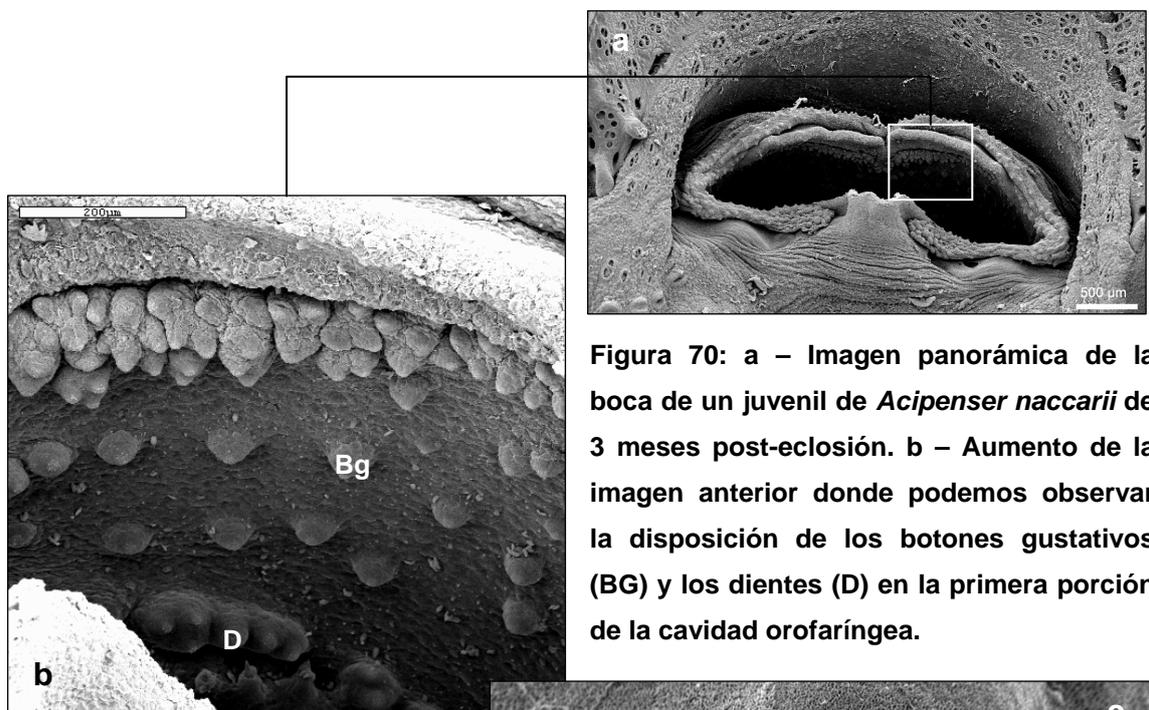
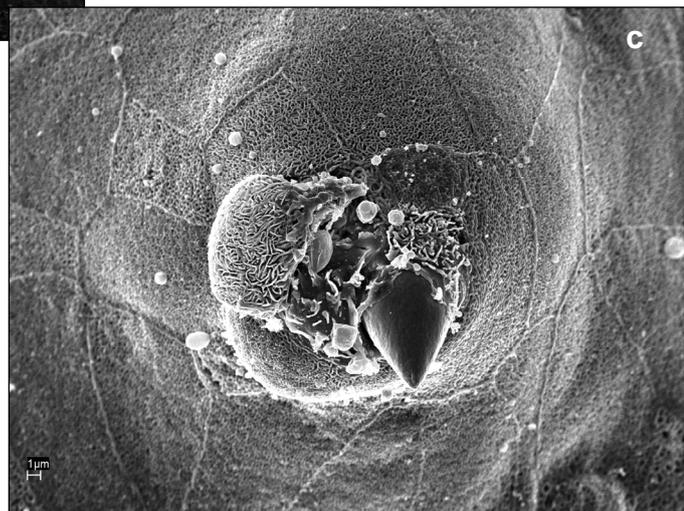


Figura 70: a – Imagen panorámica de la boca de un juvenil de *Acipenser naccarii* de 3 meses post-eclosión. b – Aumento de la imagen anterior donde podemos observar la disposición de los botones gustativos (BG) y los dientes (D) en la primera porción de la cavidad orofaríngea.

c- Detalle de un diente en la mandíbula inferior de un ejemplar de *Acipenser naccarii* de un mes post-eclosión. FESEM.



Aunque los ejemplares adultos de *Acipenser naccarii* no poseen dientes, en nuestro estudio hemos constatado la presencia de dientes en ejemplares de 3 meses post-eclosión. El momento concreto de pérdida de las estructuras dentarias se produce fuera del intervalo de tiempo que abarca este estudio y puede constituir, junto con otras características histológicas y funcionales, uno de los procesos necesarios para la adquisición del estado adulto.

➤ **Esófago**

Durante el periodo de alimentación exógena, el único cambio de importancia que tiene lugar en el conducto esofágico es el aumento en el plegamiento de su mucosa, que pasa a organizarse en pliegues longitudinales primarios que se conectan con otros pliegues secundarios de menor tamaño y grosor. El epitelio cilíndrico muestra un predominio considerable de células ciliadas (Figura 71) y abundantes células mucosas, que mantienen las mismas características histoquímicas descritas en el periodo lecito-exotrófico.

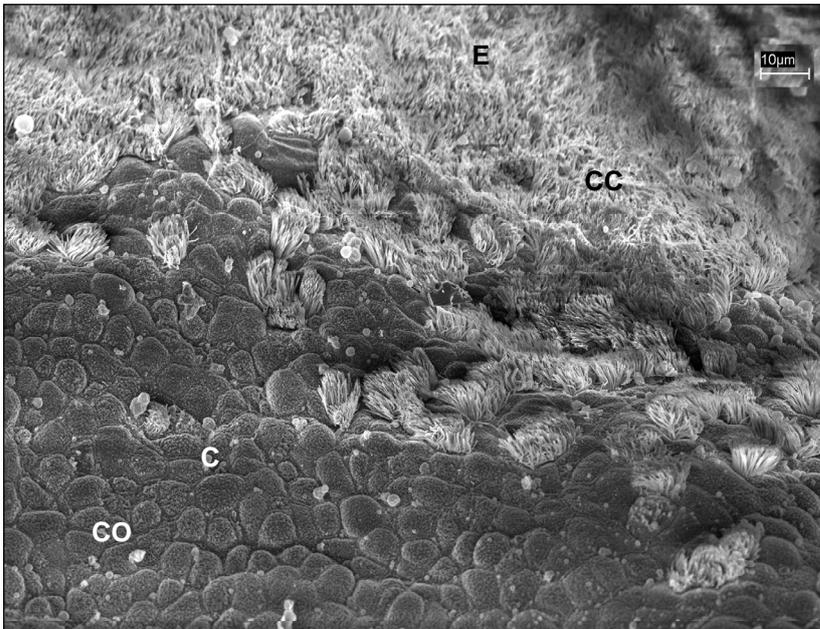


Figura 71: Detalle de la transición de la mucosa de la cavidad orofaríngea (CO) en un juvenil de *Acipenser naccarii* de 30 dpe. FESEM. C, células con micro-vellosidades apicales; CC, células ciliadas; E, esófago.

Las células epiteliales analizadas con TEM presentan abundantes y largos cilios en su porción apical. Las caras laterales aparecen unidas mediante complejos de unión bien desarrollados e interdigitaciones. En el citoplasma apical, por debajo de los corpúsculos basales y entre las raíces ciliares, se sitúan abundantes mitocondrias de matriz densa que proporcionan la energía necesaria para el movimiento ciliar (Figura 72). Los ribosomas libres son abundantes y el aparato de Golgi, bien desarrollado, muestra una disposición supranuclear. En ocasiones se observa en el interior celular grandes gotas lipídicas (Figura 73).

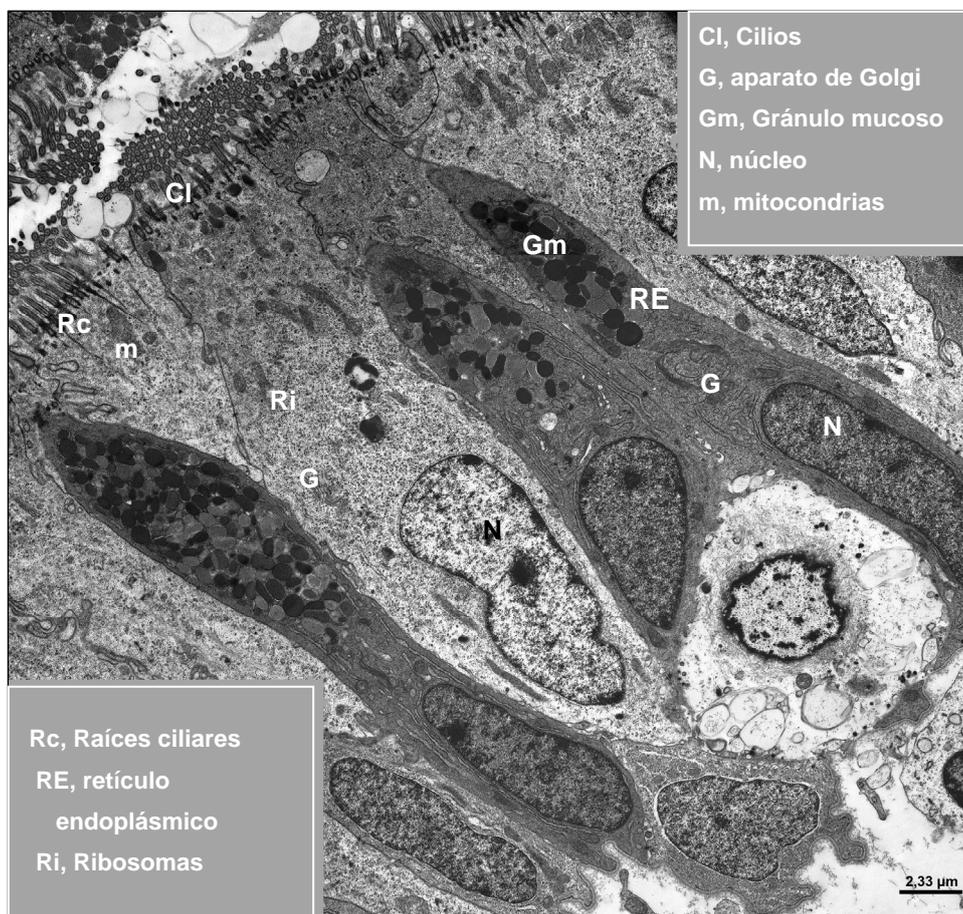


Figura 72: Detalle del epitelio esofágico de un juvenil de *Acipenser naccarii*, donde podemos observar células epiteliales con largos cilios y células mucosas. TEM.

Las células mucosas columnares poseen gran cantidad de granulaciones de distinta densidad electrónica y descargan su producto de secreción a la luz por un mecanismo de apocrinia (Figura 73). Dicho moco, destinado a la lubricación y protección de la pared esofágica, es repartido sobre la superficie del epitelio por medio del movimiento ciliar.

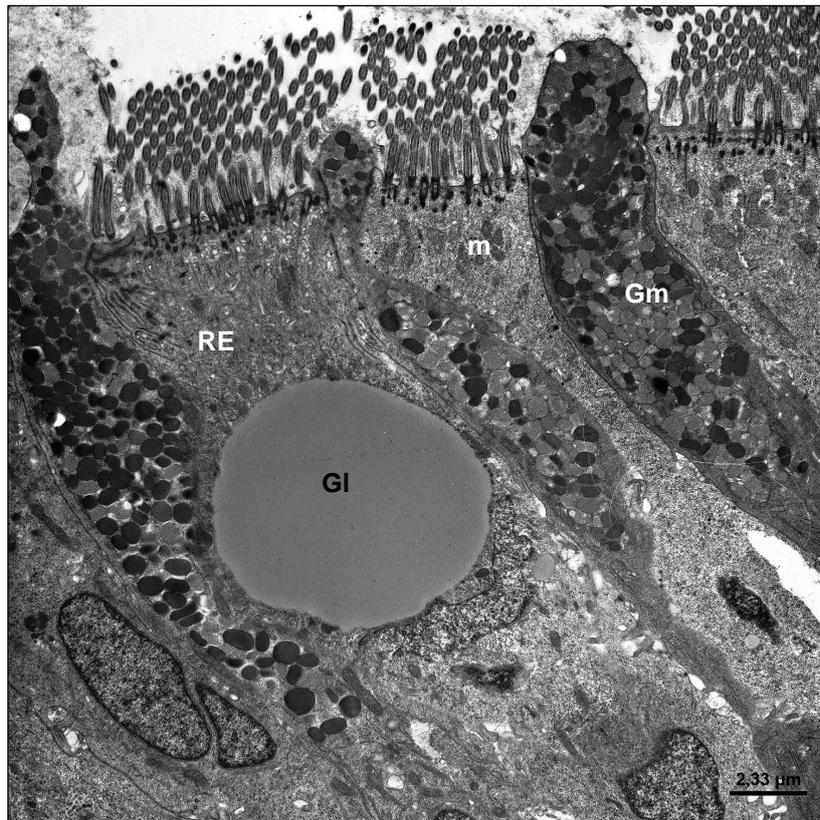


Figura 73: Detalle del epitelio esofágico de un juvenil de *Acipenser naccarii*. TEM. Gm, gránulos mucosos; Gl, Gota lipídica, RE, retículo endoplásmico.

➤ **Estómago**

Una vez adquiridos los hábitos de alimentación adultos, el compartimento gástrico únicamente sufre cambios en cuanto al plegamiento de su mucosa,

manteniendo las características estructurales e histoquímicas descritas en el periodo anterior.

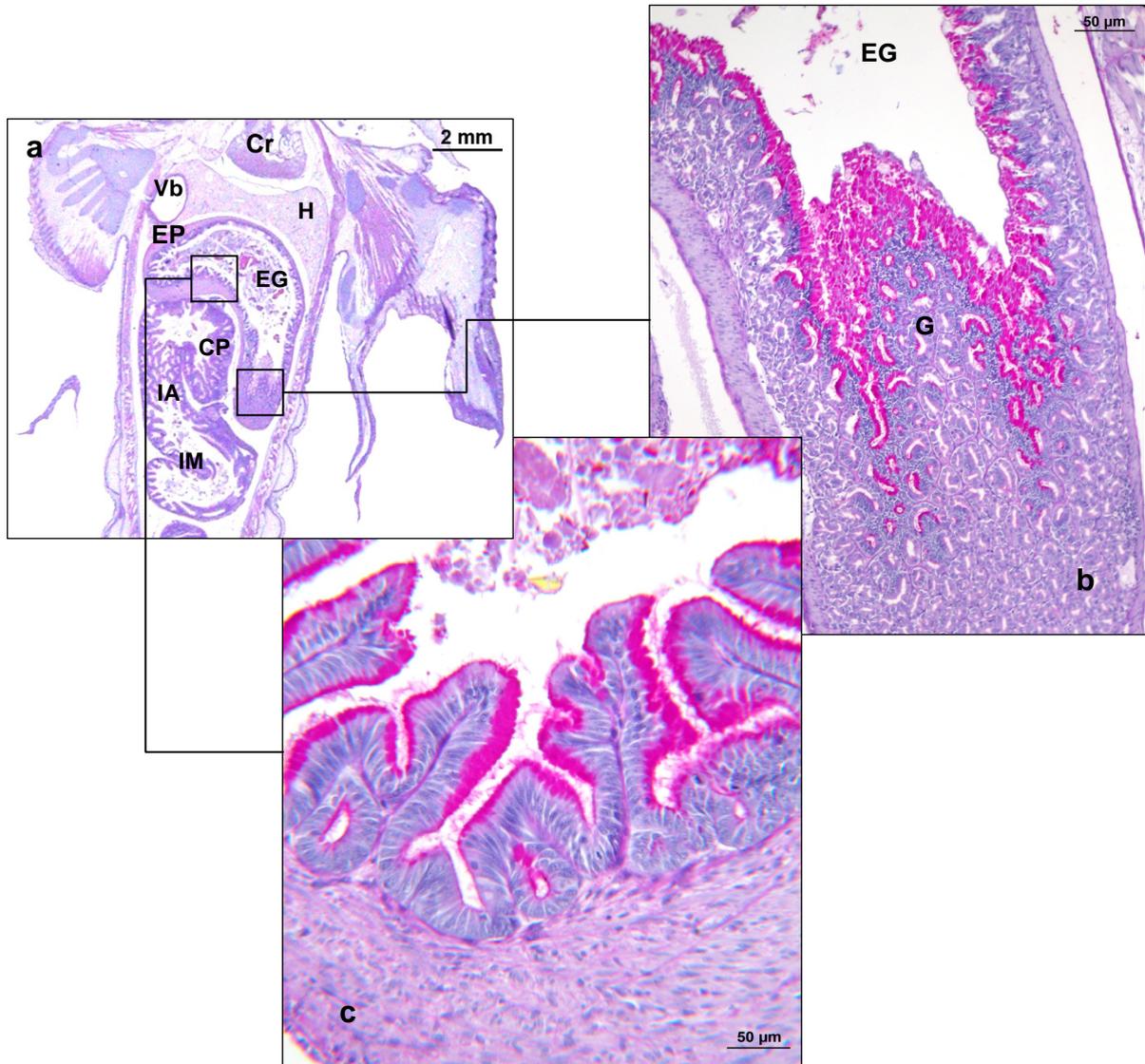


Figura 74: a - Imagen panorámica de la porción media de un juvenil de *Acipenser naccarii* de 36 días dpe en sección dorso-ventral. H-E. H = Hígado, EG: Estómago glandular; EP: Estómago pilórico; CP: Ciegos pilóricos; IA, Intestino anterior; IM, Intestino medio; Vb, Vesícula biliar. b – Imagen panorámica del fondo del estómago glandular. PAS. G, Glándula gástrica. c – Detalle de la pared del estómago pilórico. PAS.

En el estómago pilórico la mucosa se organiza en pliegues primarios y secundarios que tienen una longitud mayor que los presentes en el estómago glandular; se produce además un aumento en el grosor de sus capas musculares (Figura 74).

Las células epiteliales gástricas mucosecretoras son cilíndricas con núcleo basal irregular. Su superficie apical presenta microvellosidades cortas y espaciadas, provistas de un prominente glicocálix. En el citoplasma, junto con una abundancia de ribosomas y filamentos intermedios, el carácter más llamativo es la presencia de abundantes granulaciones electrodensas, responsables de la PAS-positividad que se observa en dichas células a microscopía óptica (Figura 75).

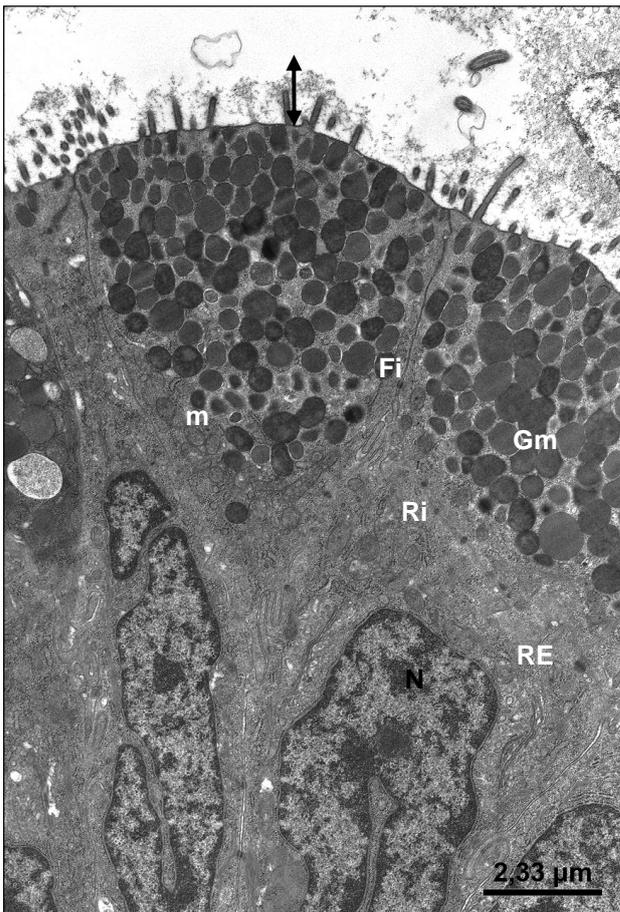


Figura 75: Detalle del epitelio gástrico de un juvenil de *Acipenser naccarii*, donde podemos observar las células mucosecretoras con microvellosidades apicales y un prominente glicocálix (flecha doble). En el citoplasma podemos señalar la presencia de gránulos mucosos (Gm) de diferente grado de electrodensidad. TEM. Ri, ribosomas libre; Fi, filamentos intermedios; N, núcleo, RE, Retículo endoplásmico; m, mitocondrias.

También observamos en el epitelio gástrico junto a las células mucosas algunas células provistas en su polo apical de abundantes cilios; estas células se unen por sus caras laterales a las anteriores mediante complejos de unión característicos, abundantes interdigitaciones y desmosomas (Figura 76).

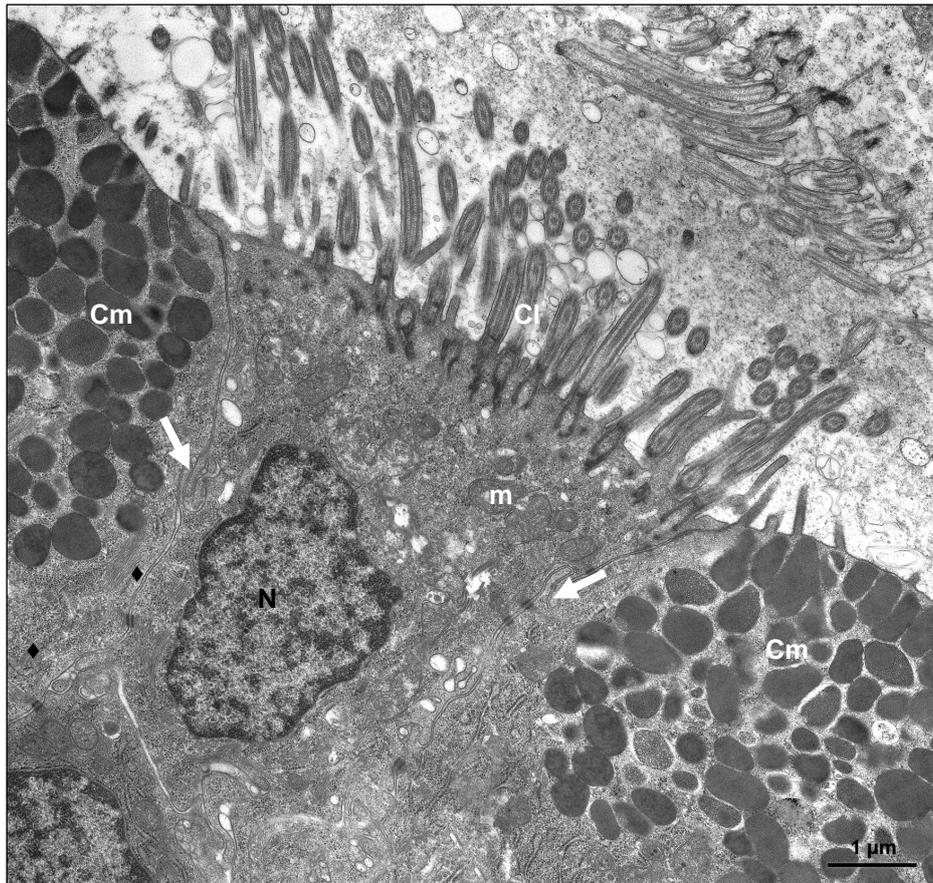


Figura 76: Detalle del epitelio gástrico de un juvenil de *Acipenser naccarii* donde podemos observar como junto a las células mucosecretoras (Cm) se disponen células con gran cantidad de cilios (CI). TEM. m, mitocondrias; flechas, interdigitaciones; ♦, desmosomas; N, núcleo.

Entre las células epiteliales mucosas, en su porción basal, se observan pequeñas células endocrinas pertenecientes al sistema entero-endocrino,

provistas de un gran núcleo y granulaciones de pequeño tamaño, algunas de ellas de centro denso (Figura 77).

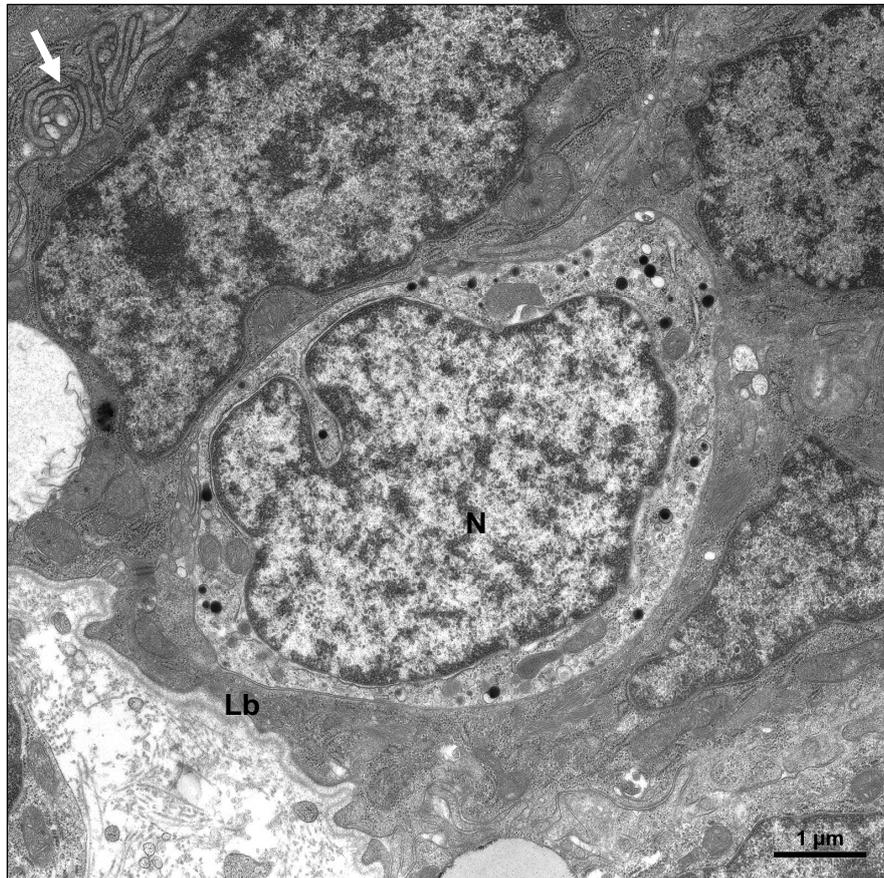


Figura 77: Detalle de la porción basal del epitelio gástrico, donde podemos observar una célula endocrina. Obsérvese el gran desarrollo y el trayecto sinuoso de la lámina basal (Lb). TEM. Flecha, interdigitaciones; N, núcleo (N).

Las células glandulares oxíntico-pépticas muestran en este momento del desarrollo, las características ultraestructurales típicas de las células principales y parietales de mamíferos. Estas células, de forma piramidal, presentan un núcleo basal con un nucleolo bien definido. La superficie apical va provista de microvellosidades y las células vecinas aparecen fuertemente unidas mediante complejos de unión y desmosomas. El citoplasma,

especialmente en su tercio superior, muestra un notable desarrollo de una red túbulo-vesicular de membranas lisas entre cuyos elementos aparecen mitocondrias con crestas laminares, matriz homogénea y gránulos osmiófilos (Figura 78).

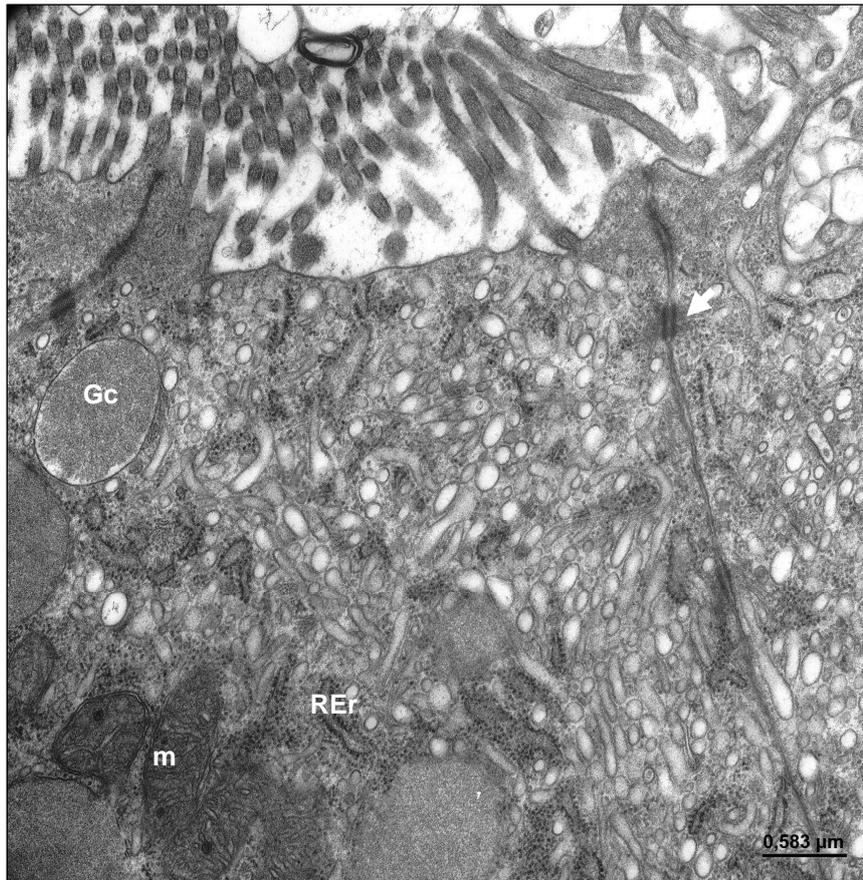


Figura 78: Detalle de la red túbulo-vesicular en el citoplasma apical de las células oxíntico-pépticas de un juvenil de *Acipenser naccarii*. TEM. m, mitocondrias; REr, retículo endoplasmático rugoso; Gc, gránulos de zimógeno; Flecha, desmosomas.

En las regiones citoplasmáticas basales se observa un notable desarrollo de los elementos saculares del retículo endoplasmático rugoso (REr). Otro elemento citoplasmático importante que coexiste con los ya citados es el conjunto de los gránulos de zimógeno con forma esférica, tamaño variable y

contenido electrodensos, que se descargan en la luz glandular mediante un proceso de exocitosis (Figura 79).

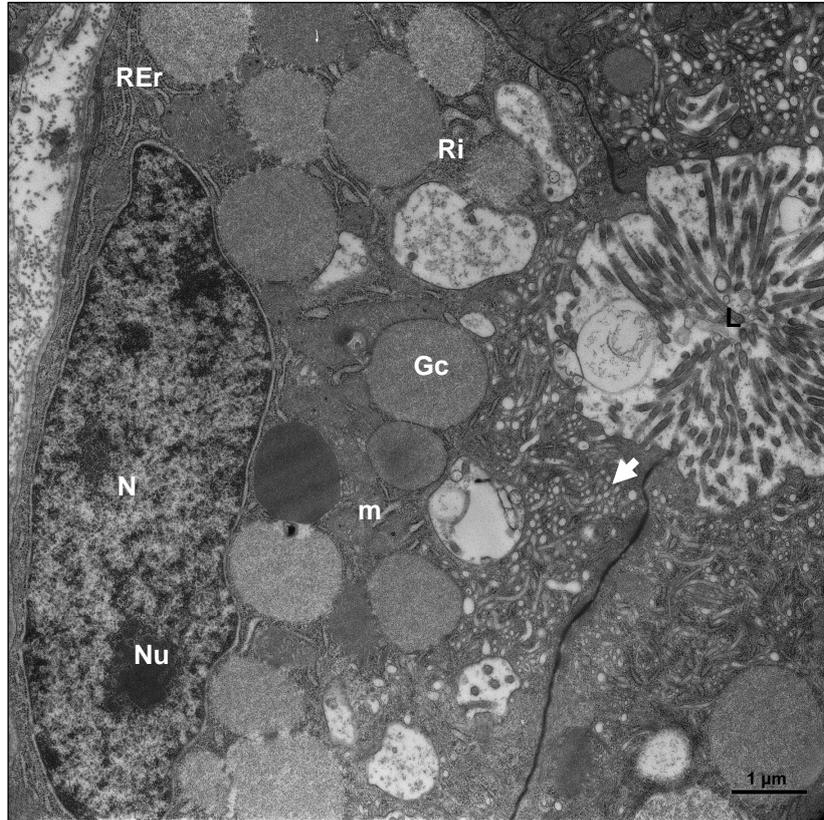


Figura 79: Detalle de una glándula gástrica en un juvenil de *Acipenser naccarii*, donde podemos observar las características ultraestructurales de las células oxíntico-pépticas. TEM. L, Luz de la glándula; flecha, red túbulo-vesicular; Gc, gránulos de zimógeno; m, mitocondrias; N, núcleo; Nu, nucleolo; REr, retículo endoplásmico rugoso; Ri; ribosomas.

Las características ultraestructurales descritas revelan la total funcionalidad del estómago glandular en este momento de desarrollo.

➤ **Intestino anterior, medio y ciegos pilóricos**

Durante el periodo de alimentación exógena se produce un aumento generalizado en el grosor de las capas musculares de la pared intestinal. La mucosa es la capa de mayor espesor del intestino. Los pliegues mucosales muestran gran complejidad (Figura 80) y se encuentran limitados por un epitelio cilíndrico simple con borde en cepillo, donde podemos observar abundantes células ciliadas intercaladas y células caliciformes. Estas últimas mantienen las mismas características histoquímicas que en el periodo lecito-exotrófico (Figura 81).

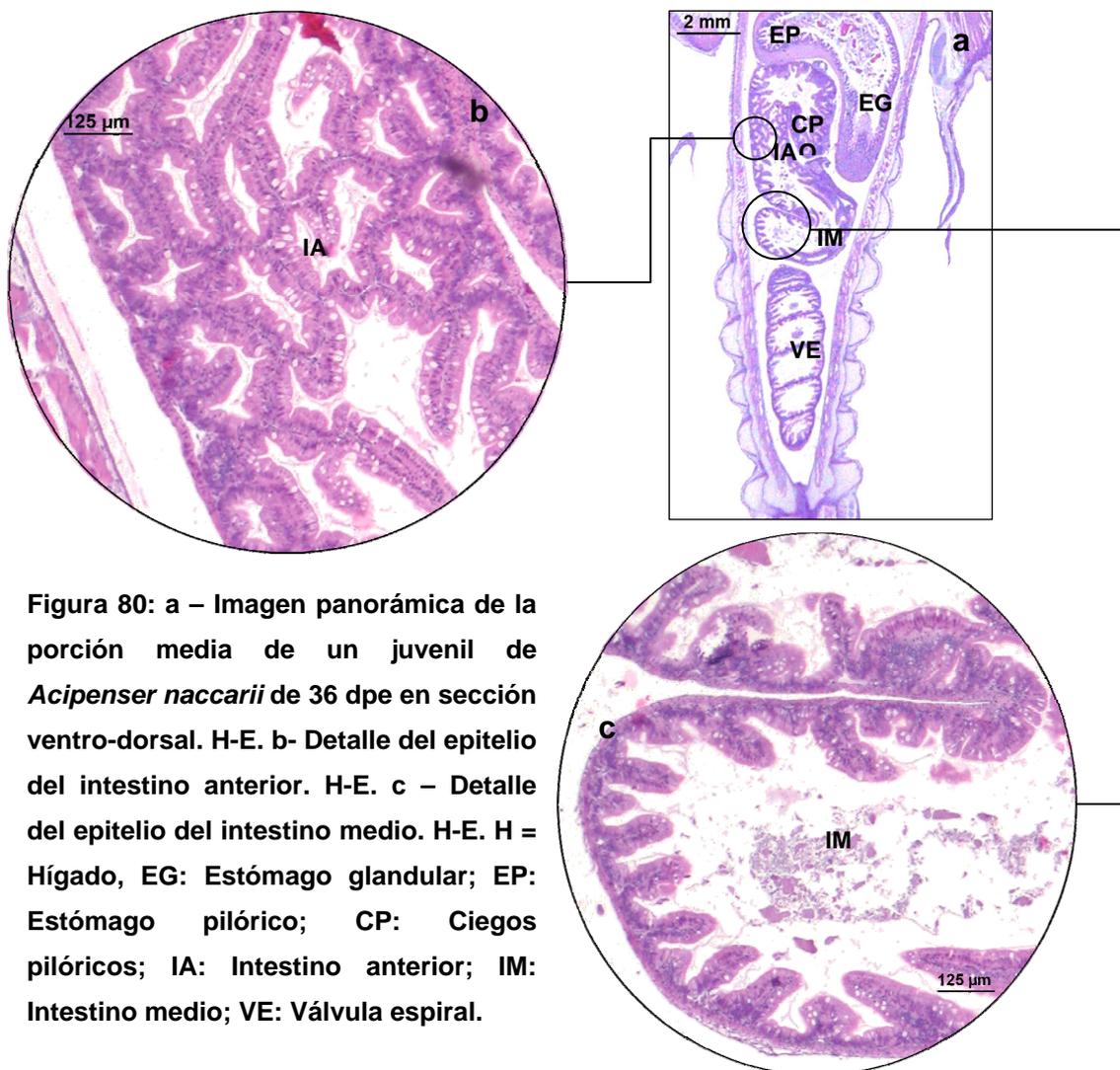


Figura 80: a – Imagen panorámica de la porción media de un juvenil de *Acipenser naccarii* de 36 dpe en sección ventro-dorsal. H-E. b- Detalle del epitelio del intestino anterior. H-E. c – Detalle del epitelio del intestino medio. H-E. H = Hígado, EG: Estómago glandular; EP: Estómago pilórico; CP: Ciegos pilóricos; IA: Intestino anterior; IM: Intestino medio; VE: Válvula espiral.

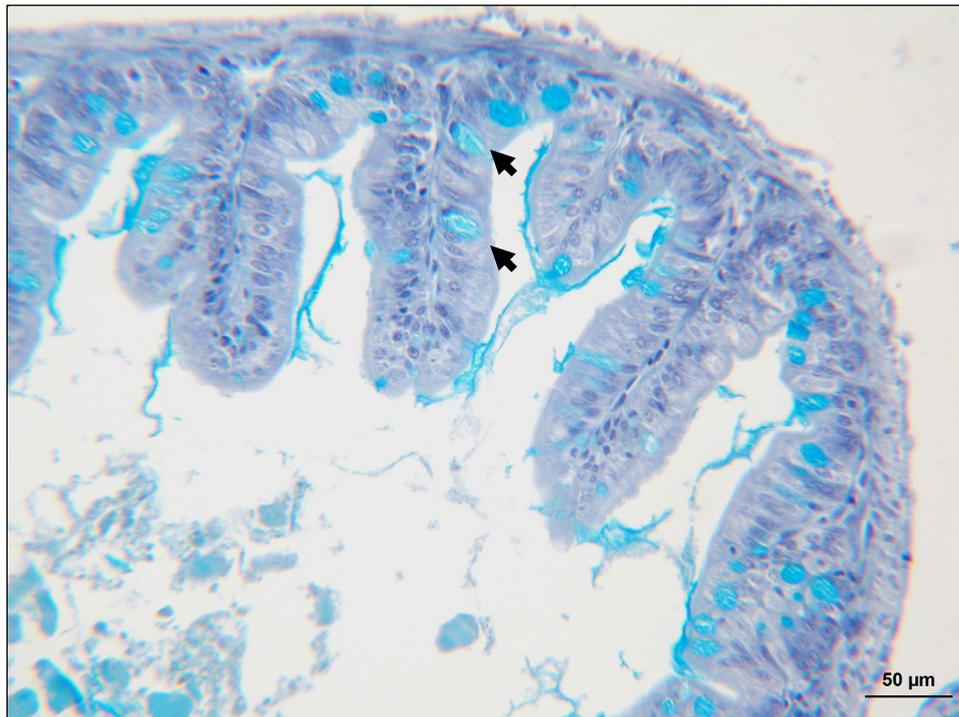


Figura 81: Detalle del epitelio intestinal de un embrión de *Acipenser naccarii* de 36 dpe en sección ventro-dorsal, donde podemos observar células caliciformes (flechas). AA pH 2,5.

Los ciegos pilóricos experimentan un aumento generalizado de su tamaño y de la complejidad de sus pliegues internos (Figura 82). Las características histoquímicas citadas (PAS positividad y alcianofilia a pH 2,5 y 1) para el intestino se mantienen en este compartimento digestivo (Figura 83).

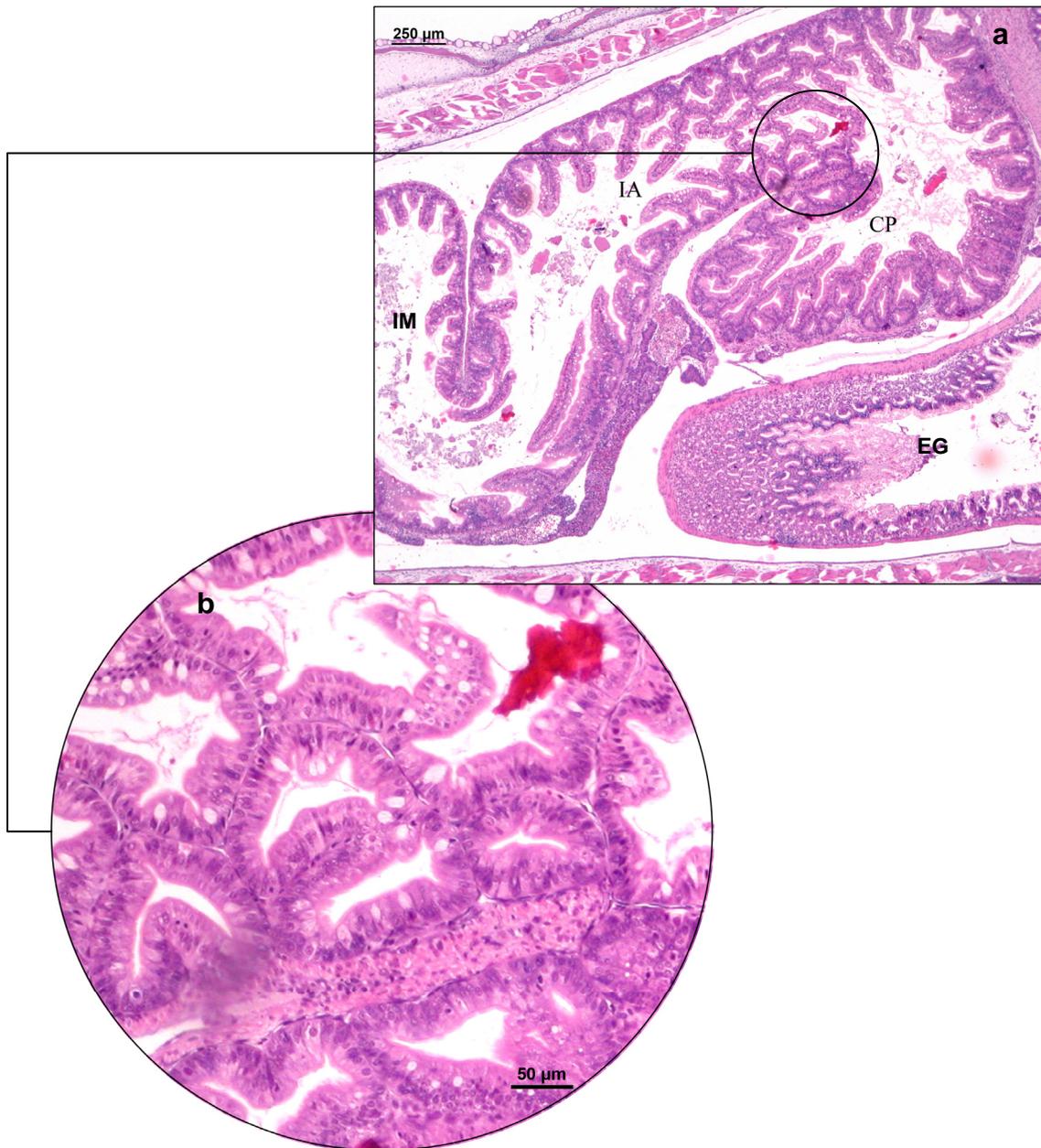


Figura 82: a – Imagen panorámica de la porción media de un juvenil de *Acipenser naccarii* de 36 dpe en sección ventro-dorsal. H-E. Detalle del epitelio de los ciegos pilóricos. H-E. EG, Estómago glandular; CP, Ciegos pilóricos; IA, Intestino anterior; IM, Intestino medio.

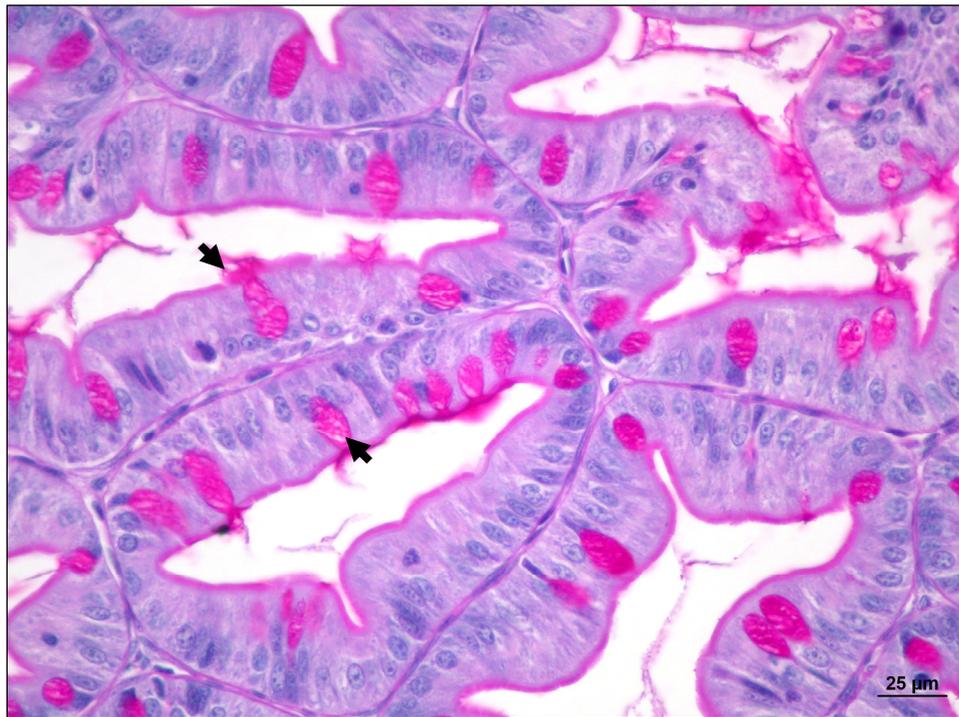


Figura 83: Detalle del epitelio de los ciegos pilóricos de un juvenil de *Acipenser naccarii* de 36 dpe en sección ventro-dorsal. Obsérvese la PAS-positividad mostrada por las células caliciformes (flechas), así como por el ribete en cepillo y la lámina basal. PAS.

Con TEM el epitelio intestinal aparece constituido por los tipos de células relacionadas en microscopía óptica. Las células caliciformes son muy abundantes y presentan gránulos mucosos de densidad electrónica variable, algunos de los cuales muestran un núcleo de mayor densidad. Dichas caliciformes se encuentran unidas mediante complejos de unión e interdigitaciones presentes en sus caras laterales a las células ciliadas y enterocitos provistos de microvellosidades apicales (Figura 84). Las células ciliadas presentan en su superficie apical, junto a largos cilios, microvellosidades ramificadas. En el citoplasma apical, junto a los corpúsculos basales, se observa un desarrollo considerable de las raíces ciliares en cuyas proximidades aparecen abundantes mitocondrias implicadas, como es habitual, en el aporte de energía para los movimientos de los cilios (Figura 85).

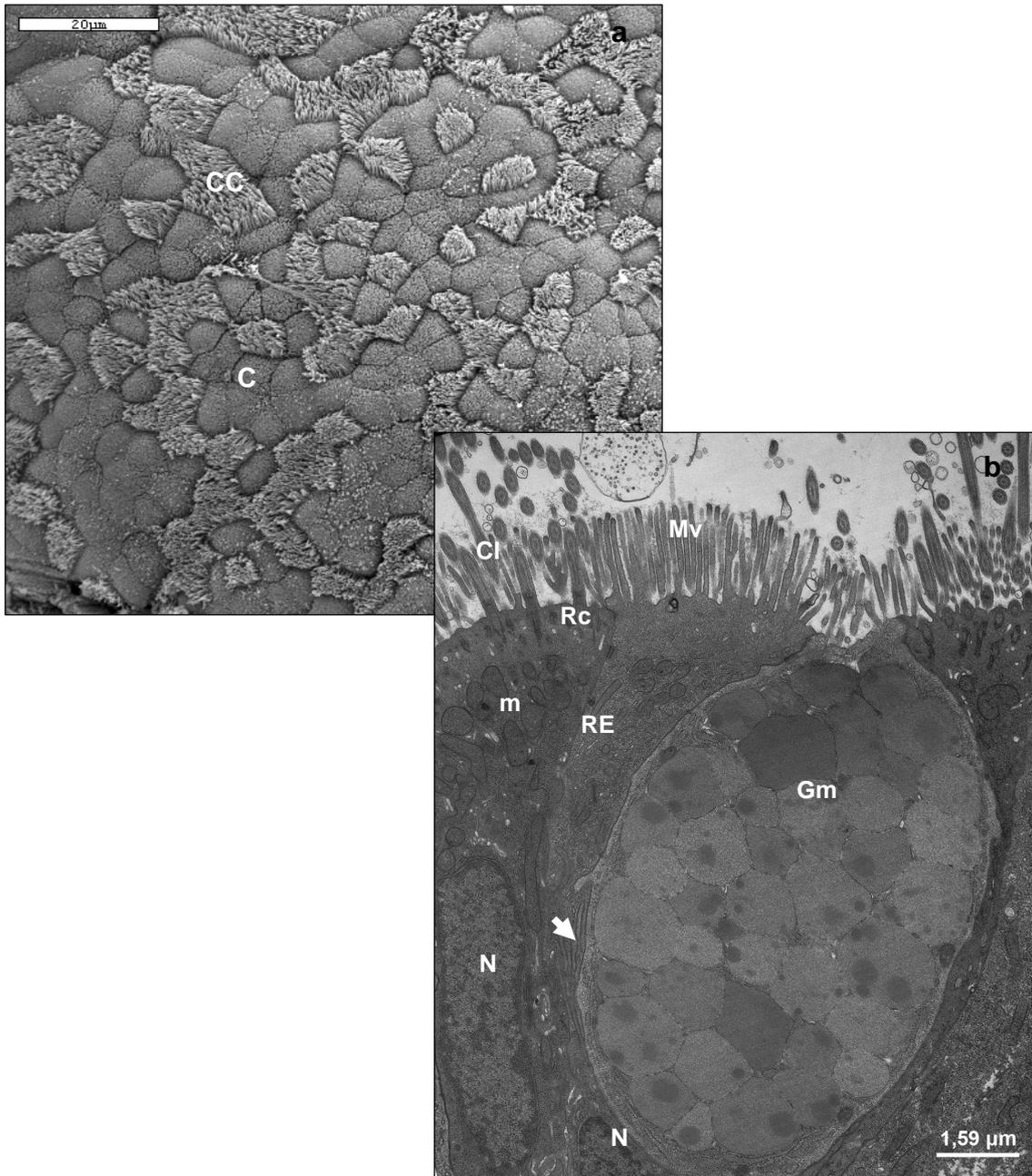


Figura 84: a- Detalle de la superficie interna del intestino de un juvenil de *Acipenser naccarii*, donde podemos observar la presencia de células con microvellosidades apicales (C) y células ciliadas (CC). SEM. b- Detalle del epitelio intestinal de un juvenil de *Acipenser naccarii* donde podemos observar una célula caliciforme. TEM. Cl, cilios; Mv, microvellosidades; Rc, raíces ciliares; m, mitocondrias; Gm, gránulos mucosos; flechas, interdigitaciones.

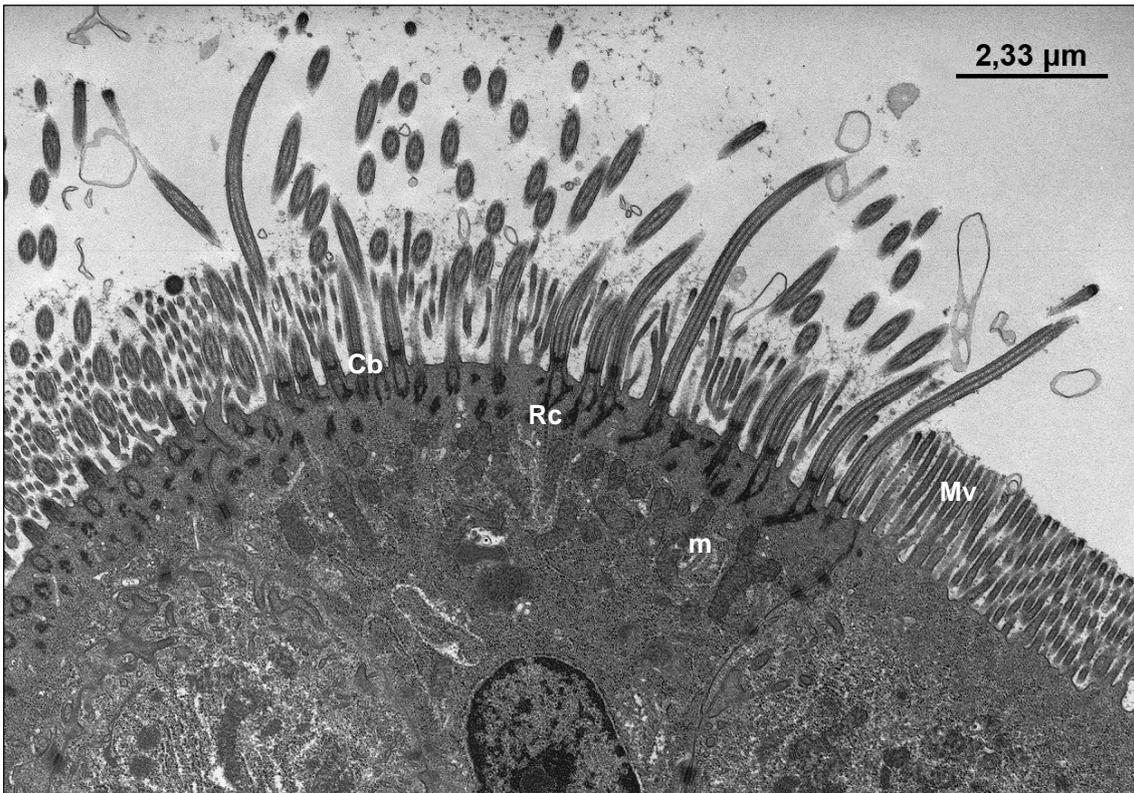


Figura 85: Detalle del citoplasma apical de las células ciliadas del intestino de un juvenil de *Acipenser naccarii* donde podemos observar los corpúsculos basales (Cb) de los cilios junto con un desarrollo considerable de las raíces ciliares (Rc) y abundantes mitocondrias (m). TEM. Mv, microvellosidades; N, Núcleo.

La mayor parte de los enterocitos presentan largas microvellosidades y escasas invaginaciones pinocíticas. Es de destacar la existencia de dos tipos de enterocitos atendiendo a la densidad de su citoplasma y que podemos denominar como enterocitos claros y oscuros. Las características ultraestructurales son similares en ambos salvo por el hecho de que las mitocondrias son mas abundantes en los enterocitos oscuros (Figura 86).

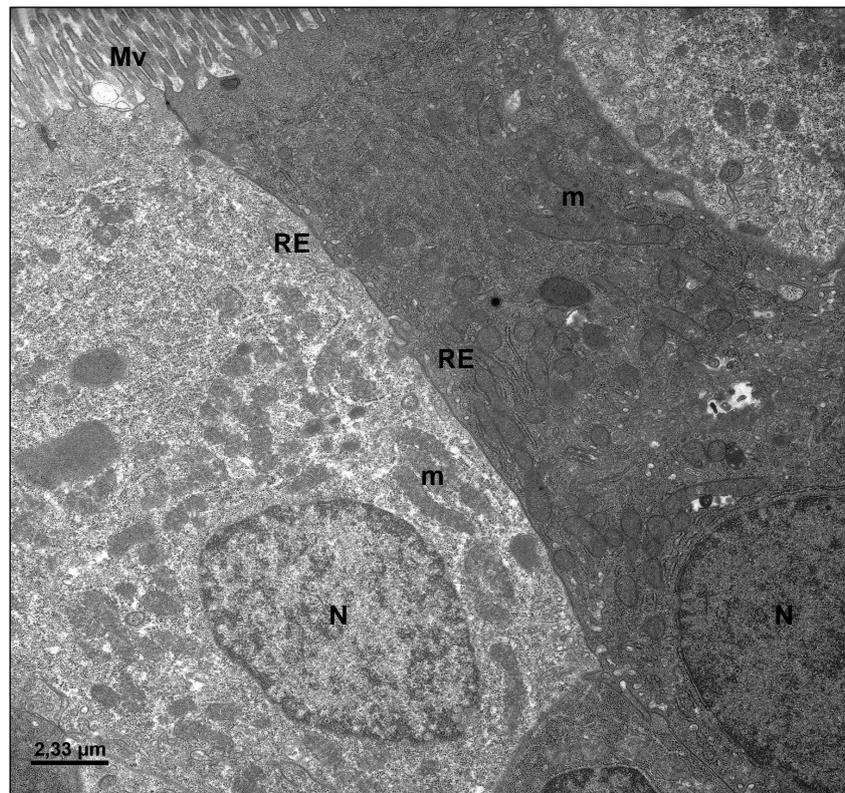


Figura 86: Detalle del epitelio intestinal de un juvenil de *Acipenser naccari* donde podemos observar diferencias en la densidad citoplasmática de los enterocitos. TEM. m, mitocondrias; Mv. Microvellosidades; N, núcleo; RE, retículo endoplásmico.

En el citoplasma apical junto a las mitocondrias encontramos un desarrollo considerable de cisternas de RER cuya cavidad se encuentran bastante dilatada y contiene un material de cierta densidad electrónica; en coincidencia con este desarrollo del RER, los complejos de Golgi aparecen bien desarrollados (Figura 87) y en sus proximidades se encuentran abundantes vesículas, que también se observan en el citoplasma basolateral, descargando su contenido lipoproteico en los estrechos espacios intercelulares (Figura 88). En el citoplasma basal es de destacar la presencia de abundantes mitocondrias provistas de granulaciones osmiófilas en posición infranuclear junto a cisternas de RER (Figura 88).

Figura 87: Detalle del citoplasma apical de los enterocitos del intestino de un juvenil de *Acipenser naccarii* donde podemos observar gran cantidad de mitocondrias (m), un retículo endoplásmico rugoso (REr) y un Complejo de Golgi (G) muy desarrollados. TEM.

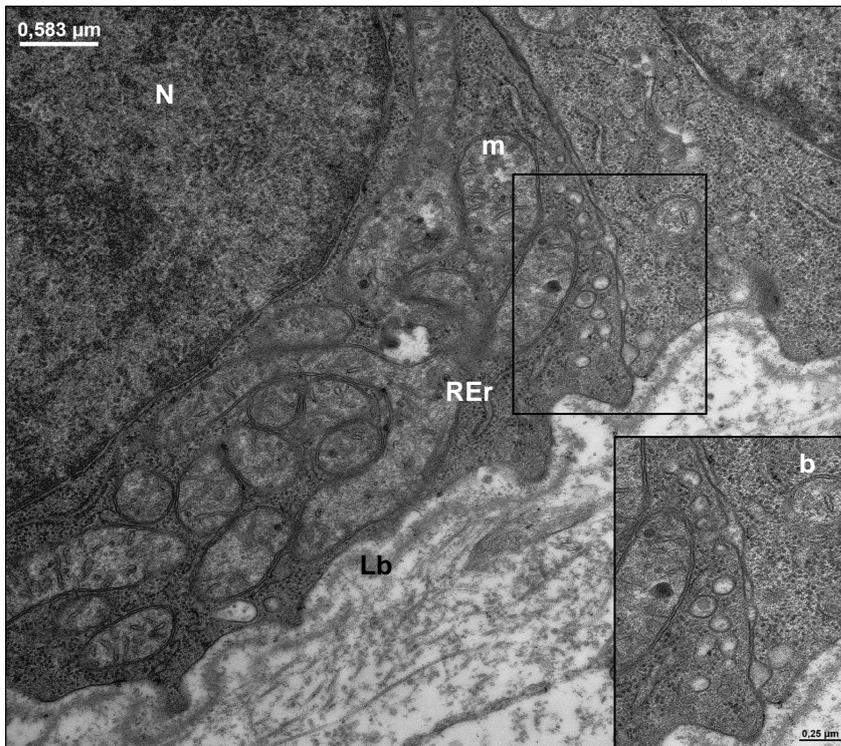
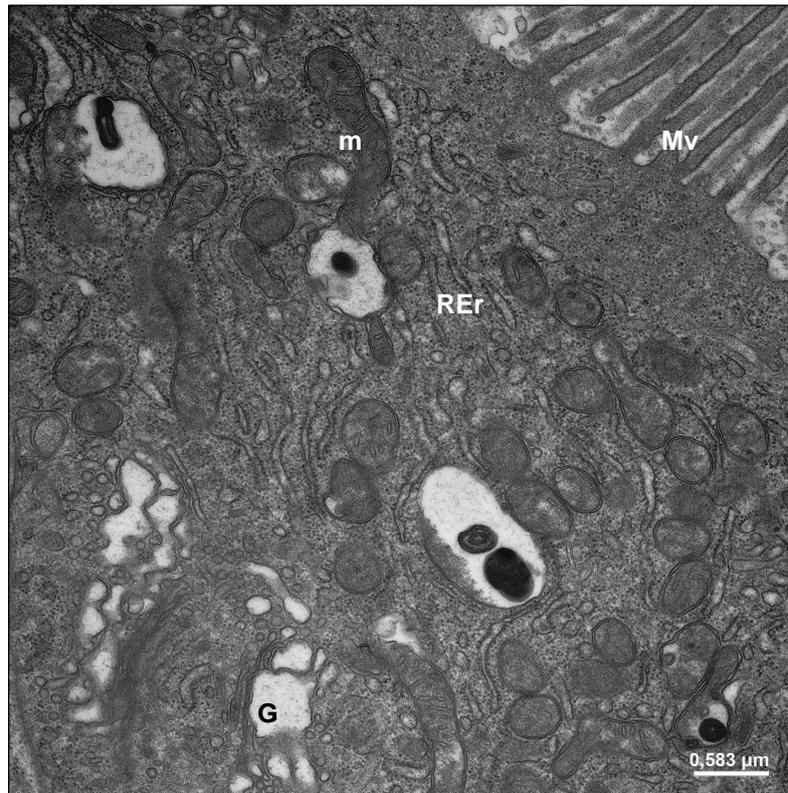


Figura 88: Detalle del citoplasma basolateral de un enterocito del intestino de un juvenil de *Acipenser naccarii*, donde podemos observar gran cantidad de mitocondrias (m) y retículo endoplásmico rugoso (RER). TEM. Lb, lámina basal. b- Detalle de la imagen anterior.

En las caras laterales destacar la presencia de abundantes desmosomas en cuyas placas densas se insertan numerosos filamentos intermedios (de queratina) (Figura 89).

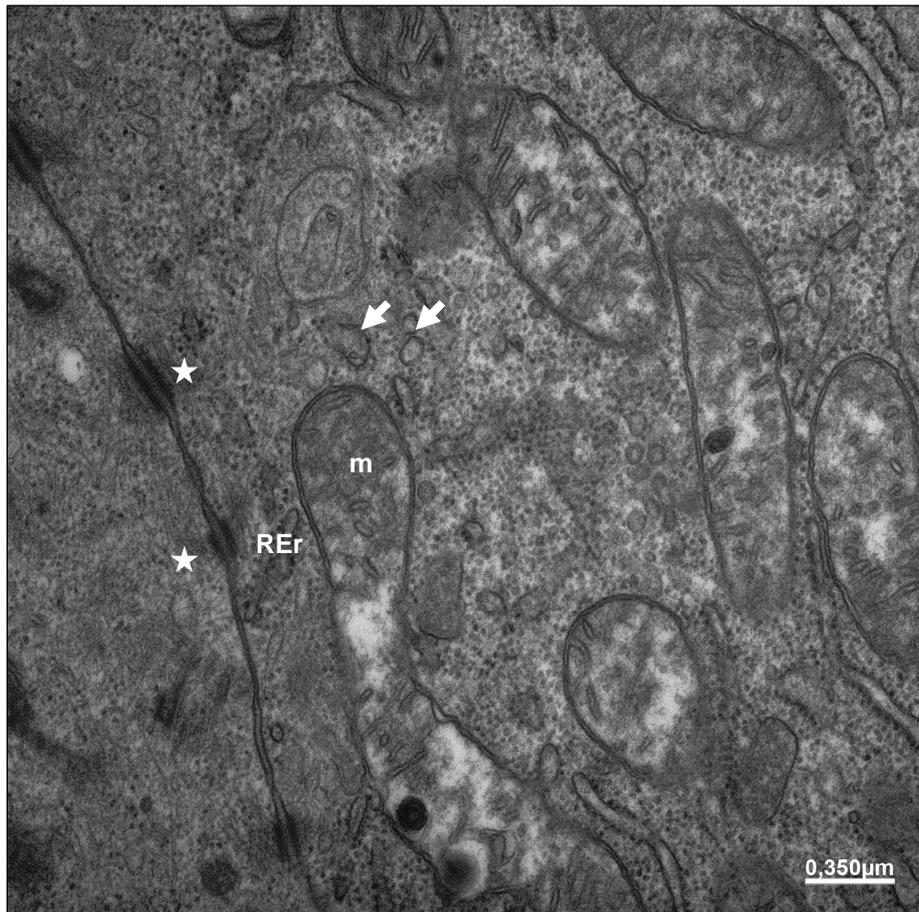


Figura 89: Detalle del citoplasma lateral de los enterocitos de un juvenil de *Acipenser naccarii*. TEM. Estrella, desmosomas; m, mitocondrias; REr, retículo endoplasmático rugoso; flechas, vesículas con contenido lipoproteico.

➤ **Intestino posterior o Válvula espiral**

La válvula espiral presenta la misma estructura histológica que las paredes intestinales. Los pliegues mucosales son más cortos que en el intestino

anterior, estando limitados por un epitelio constituido por abundantes células ciliadas, células caliciformes y enterocitos que presentan un núcleo que se localiza en posición basal y pequeñas vacuolas supranucleares, que aumentan considerablemente a medida que nos desplazamos hacia la región posterior de la válvula espiral (Figura 90).

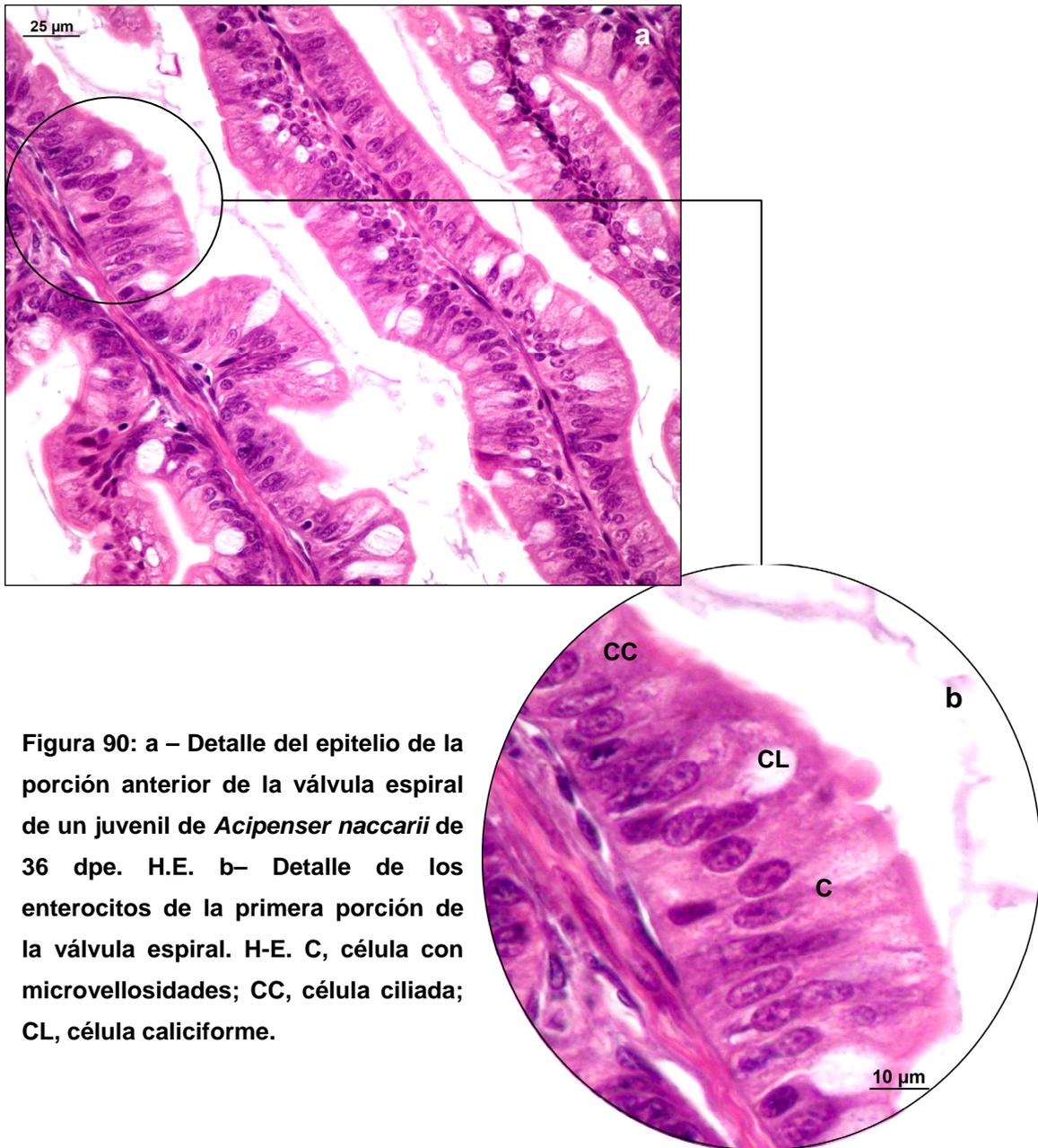


Figura 90: a – Detalle del epitelio de la porción anterior de la válvula espiral de un juvenil de *Acipenser naccarii* de 36 dpe. H.E. b– Detalle de los enterocitos de la primera porción de la válvula espiral. H-E. C, célula con microvellosidades; CC, célula ciliada; CL, célula caliciforme.

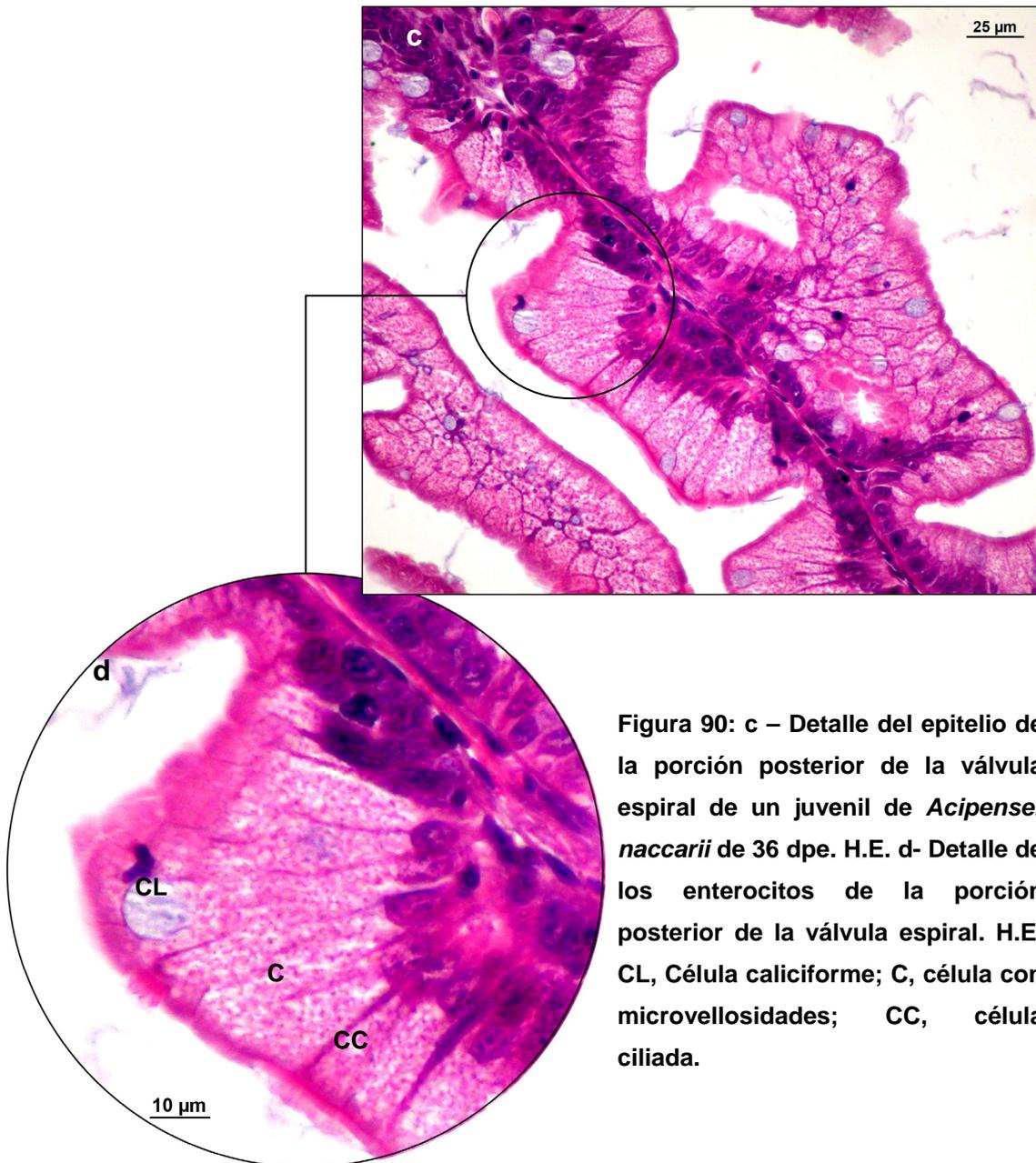


Figura 90: c – Detalle del epitelio de la porción posterior de la válvula espiral de un juvenil de *Acipenser naccarii* de 36 dpe. H.E. d- Detalle de los enterocitos de la porción posterior de la válvula espiral. H.E. CL, Célula caliciforme; C, célula con microvellosidades; CC, célula ciliada.

La válvula espiral mantiene las mismas características histoquímicas que en edades anteriores. Únicamente podemos señalar un aumento generalizado en el número de células caliciformes a lo largo de toda la estructura, pero mucho más marcado hacia las regiones posteriores (Figura 91).

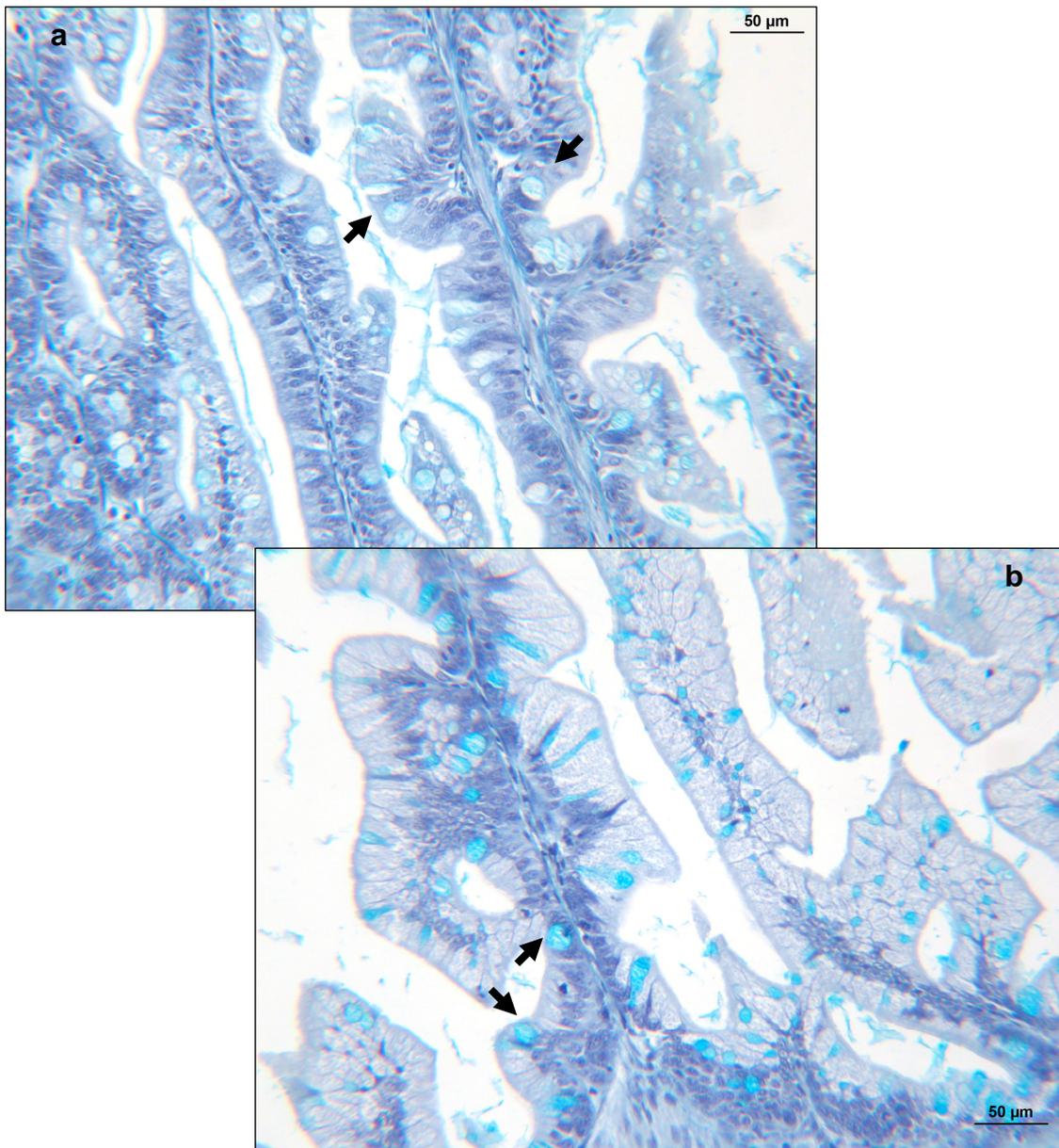


Figura 91: Detalles del epitelio de la válvula espiral (a- porción anterior; b- porción posterior) en un juvenil de *Acipenser naccarii* de 36 días dpe, donde podemos observar como el número de células caliciformes (flechas) aumenta hacia las regiones más próximas el recto. AA pH 1.

Los estudios ultraestructurales ponen de manifiesto en la lámina epitelial de los tipos celulares descritos en microscopía óptica: células ciliadas, células

caliciformes y enterocitos (Figura 92) apreciándose mediante SEM un predominio considerable de las células ciliadas sobre los enterocitos (figura 94).

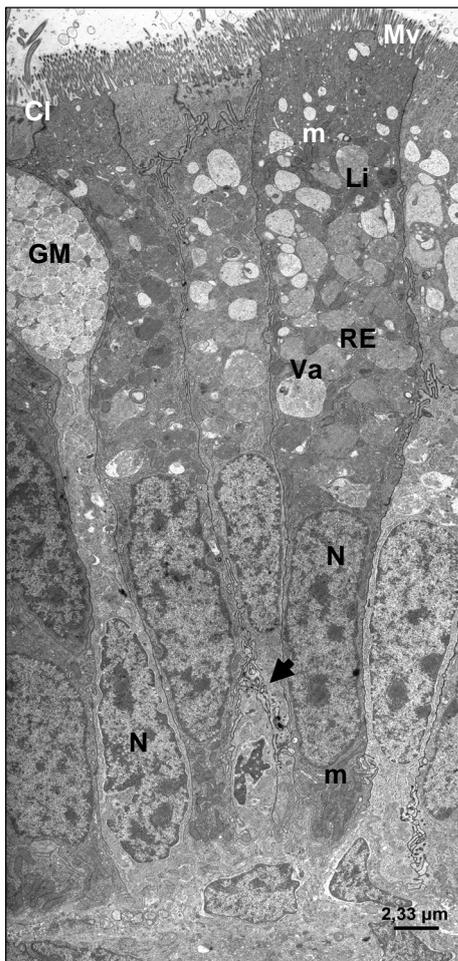


Figura 92: Montaje de dos imágenes panorámicas del epitelio de la válvula espiral de un juvenil de *Acipenser naccarii* donde podemos observar enterocitos, células ciliadas y células caliciformes. CI, cilio; flecha, interdigitaciones; Gm, gránulo mucoso; Li, lisosoma; N, núcleo; m, mitocondrias; Mv, microvellosidades; RE, retículo endoplásmico; Va, vacuolas.

Éstos últimos, presentan características ultraestructurales que los relacionan con la captación de proteínas de la dieta por pinocitosis. Estas células, relacionadas con las vecinas mediante complejos de unión e interdigitaciones (figura 92a), muestran en su borde apical numerosas microvellosidades de altura y diámetro homogéneo y cuyo eje aparece ocupado por un haz filamentoso que continúa en la porción citoplasmática subyacente formado la red terminal. Entre las microvellosidades la membrana plasmática

forma numerosas invaginaciones tubulares, la mayoría de las cuales, tras atravesar la región de la red terminal, acaban a nivel subapical entre una vasta red túbulo-vesicular (figuras 92a y 93). Las vesículas pinocíticas coalescen para formar grandes vacuolas. Todos estos elementos membranosos se localizan en la porción supranuclear coexistiendo con abundantes lisosomas, así como abundantes mitocondrias de crestas tubulares y matriz densa. En las áreas subyacentes a la región vacuolada se observa un importante desarrollo del REr y Aparato de Golgi con posición supranuclear.

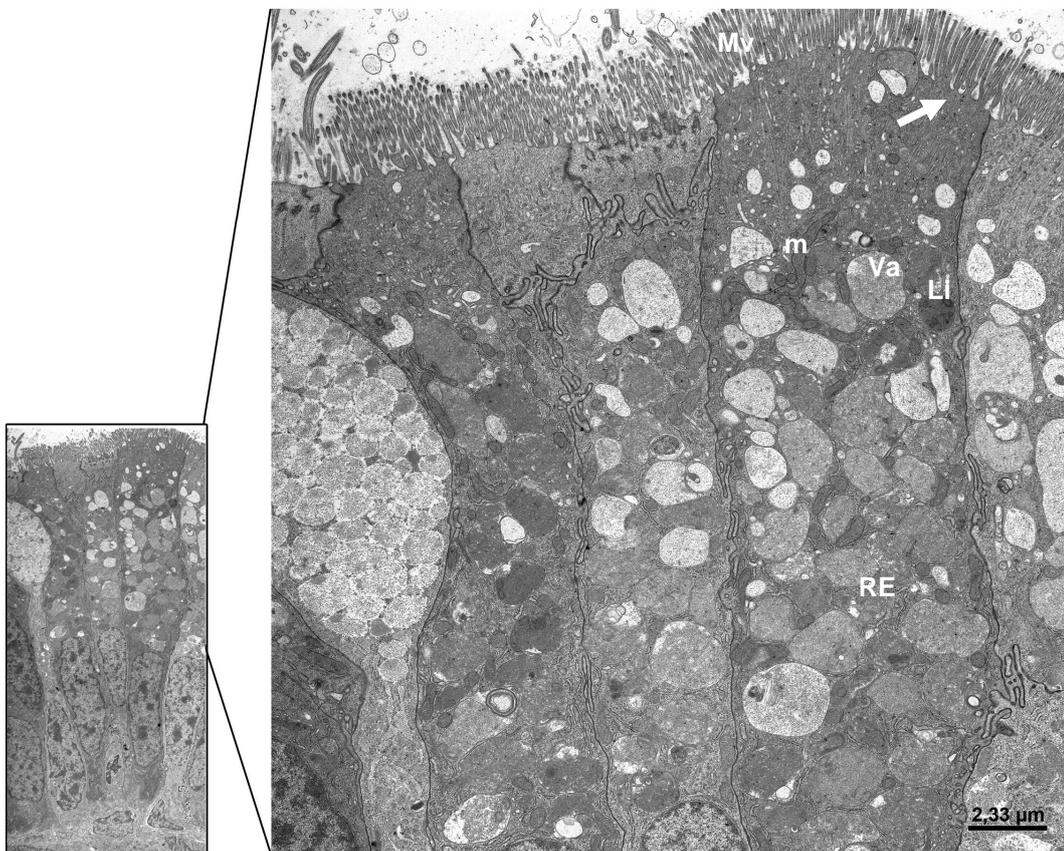


Figura 92 a: Detalle de la porción apical y citoplasma supranuclear de los enterocitos de la válvula espiral de un juvenil de *Acipenser naccarii* donde podemos observar microvellosidades (Mv) con profundas invaginaciones pinocíticas (flecha) y abundantes vesículas pinocíticas (Va). TEM. Li, lisosomas; m, mitocondrias; RE, retículo endoplásmico.

En las regiones infranucleares se observan algunos perfiles de REr junto a mitocondrias y ribosomas libres. La membrana plasmática a su nivel basal muestra un recorrido sinuoso emitiendo numerosas invaginaciones a las que acompaña la lámina basal (Figura 92b).

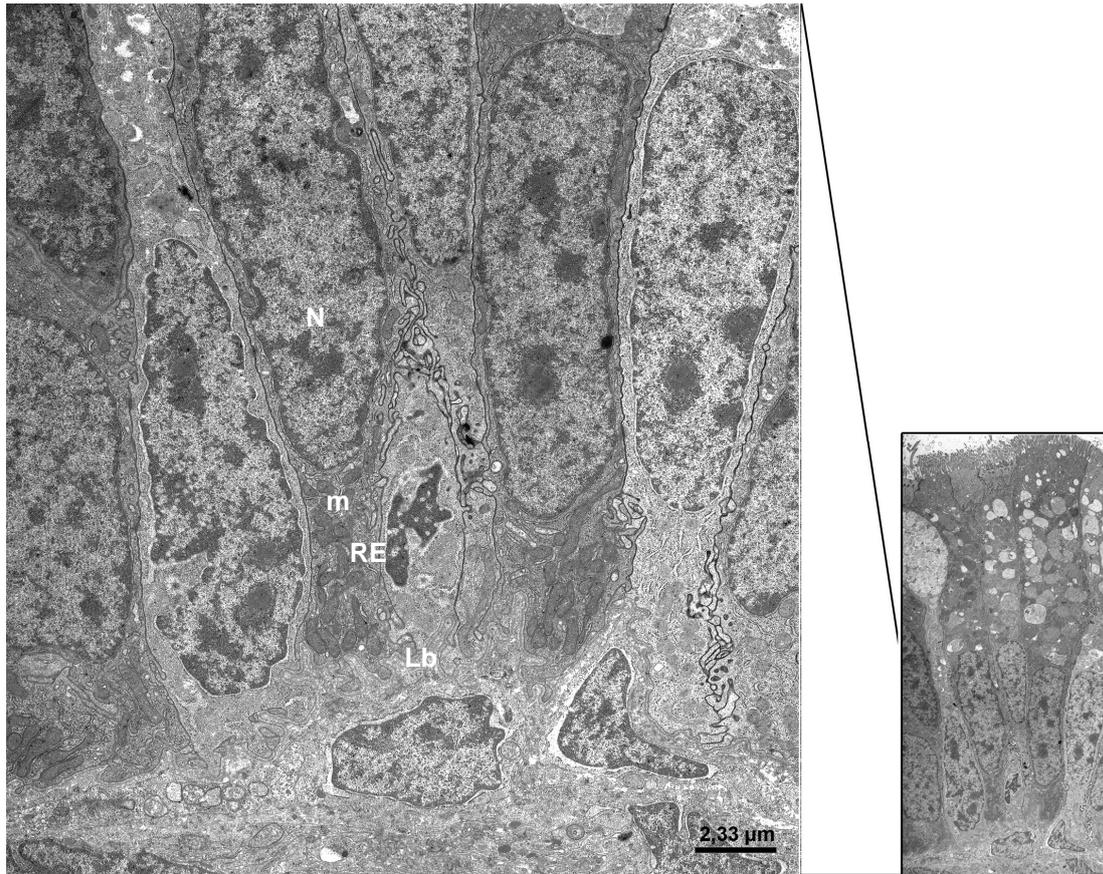


Figura 92 b: Detalle de la porción basal de los enterocitos de la válvula espiral de un juvenil de *Acipenser naccarii* donde podemos observar núcleos (N) alargados, algunos perfiles de Retículo endoplásmico (RE), mitocondrias (m). Obsérvese como la lámina basal (Lb) presenta un recorrido sinuoso. TEM.

Figura 93: Detalle del citoplasma apical de un enterocito de la válvula espiral de un juvenil de *Acipenser naccarii*, donde podemos observar el proceso de captación de proteínas por pinocitosis. TEM. Flecha, invaginación de la membrana plasmática; Va, vacuola; m, mitocondrias, RE, retículo endoplasmático.

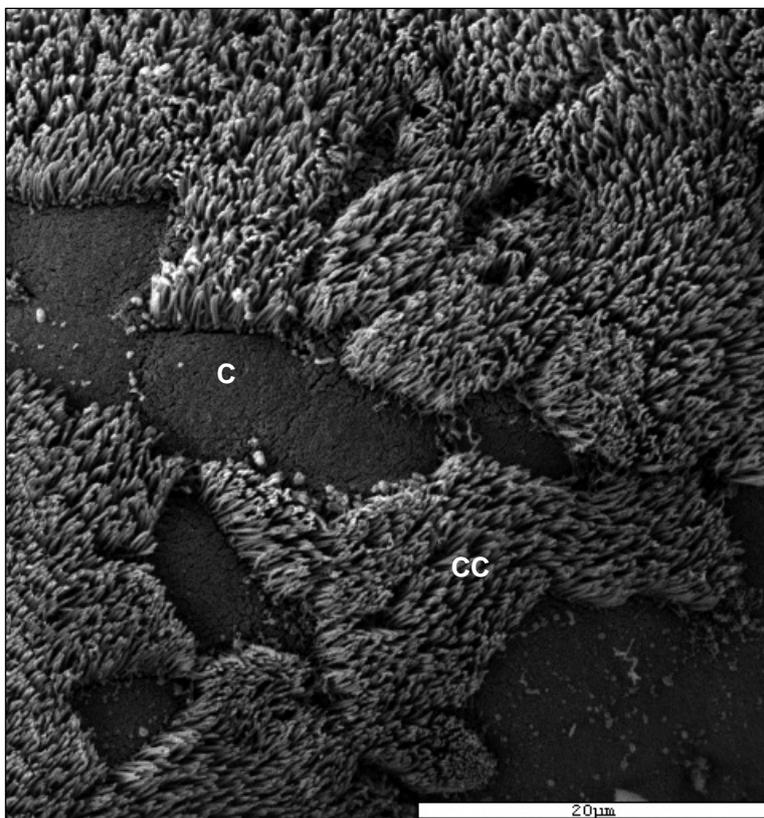
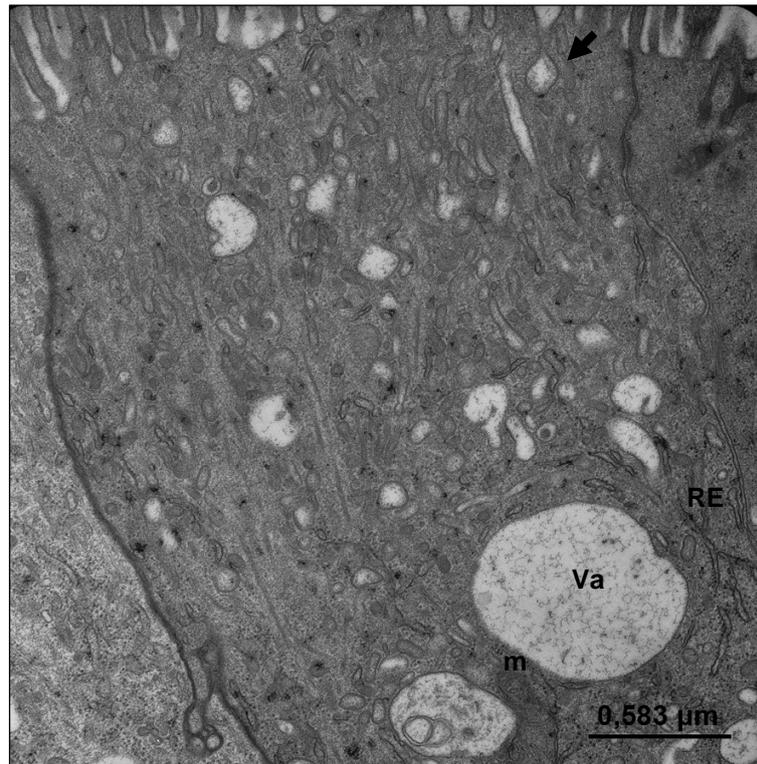


Figura 94: Imagen panorámica de la superficie del epitelio de la válvula espiral de un juvenil de *Acipenser naccarii* donde podemos observar como existe un mayor número de células ciliadas (CC) que de enterocitos (C).

➤ **Recto**

El recto continúa aumentando su longitud y el grosor de sus capas, incrementándose también el número de células ciliadas epiteliales. En esta zona puede observarse una concentración de caliciformes un poco más alta que en la válvula espiral. Estas células se tiñen de color púrpura con la técnica combinada del PAS-Azul alcian pH 2,5, por lo que producen mucopolisacáridos neutros y ácidos (Figura 95).

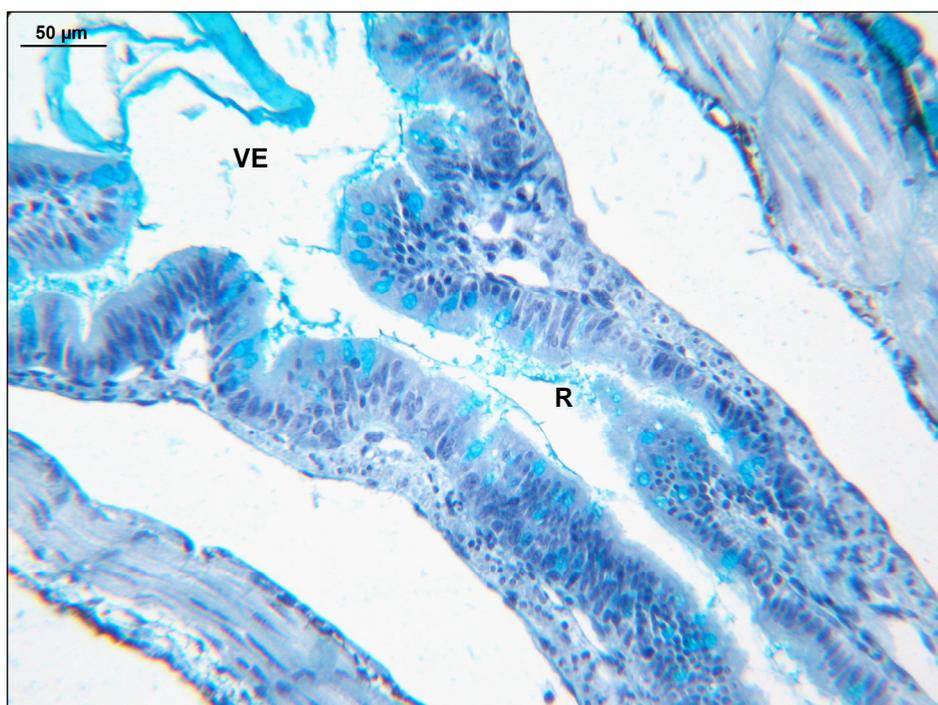


Figura 95: Imagen panorámica de la porción posterior de un juvenil de *Acipenser naccarii* de 36 dpe en sección dorso-ventral, donde podemos observar el final de la válvula espiral (VE) y el recto (R). AA pH 1. Obsérvese el incremento gradual en el número de células caliciformes hacia el ano.

En la tabla 12 se exponen, a modo de resumen, las características histoquímicas de cada uno de los segmentos del tracto gastrointestinal del

Acipenser naccarii, durante los diferentes periodos por los que atraviesa a lo largo de su desarrollo ontogénico.

	PERIODO LECITOTRÓFICO						PERIODO LECITO-EXOTRÓFICO			PERIODO EXOTRÓFICO					
	3 dpe		6 dpe		7 dpe										
	PAS	AA 2,5	AA 1	PAS	AA 2,5	AA 1	PAS	AA 2,5	AA 1	PAS	AA 2,5	AA 1			
Oro-farínge	+	-	-	++	+	-	++	+	-	+++	+	-	+++	+	-
Esófago	-	-	-	+	+	-	++	++	+	++	++	++	+++	+++	++
E. glandular				-	-	-	+	-	-	++	-	-	+++	-	-
E. pilórico	-	-	-	-	-	-	+	-	-	++	-	-	+++	-	-
I. Anterior	-	+	-	-	+	+	+	++	+	++	++	+	+++	+++	++
I. Medio	-	+	+	+	+	+	++	+	+	++	++	++	++	++	++
V. Espiral	-	+	+	+	+	+	++	++	+	+++	++	+	+++	++	++

Tabla 12: Distribución de los glicoconjugados neutros y ácidos producidos por las células caliciformes en diferentes momentos del desarrollo a lo largo de diferentes regiones del tracto digestivo de *Acipenser naccarii*. -, Negativo; +, Débilmente positivo; ++, Positivo; +++, Fuertemente positivo.

➤ Glándulas anejas

Desde el momento en el que se adopta la alimentación exógena ni el hígado ni el páncreas sufren cambios en su estructura histológica. En el hígado únicamente puede señalarse el aumento en el diámetro de la vesícula biliar y el leve descenso en la vacuolización de los hepatocitos (Figura 96).

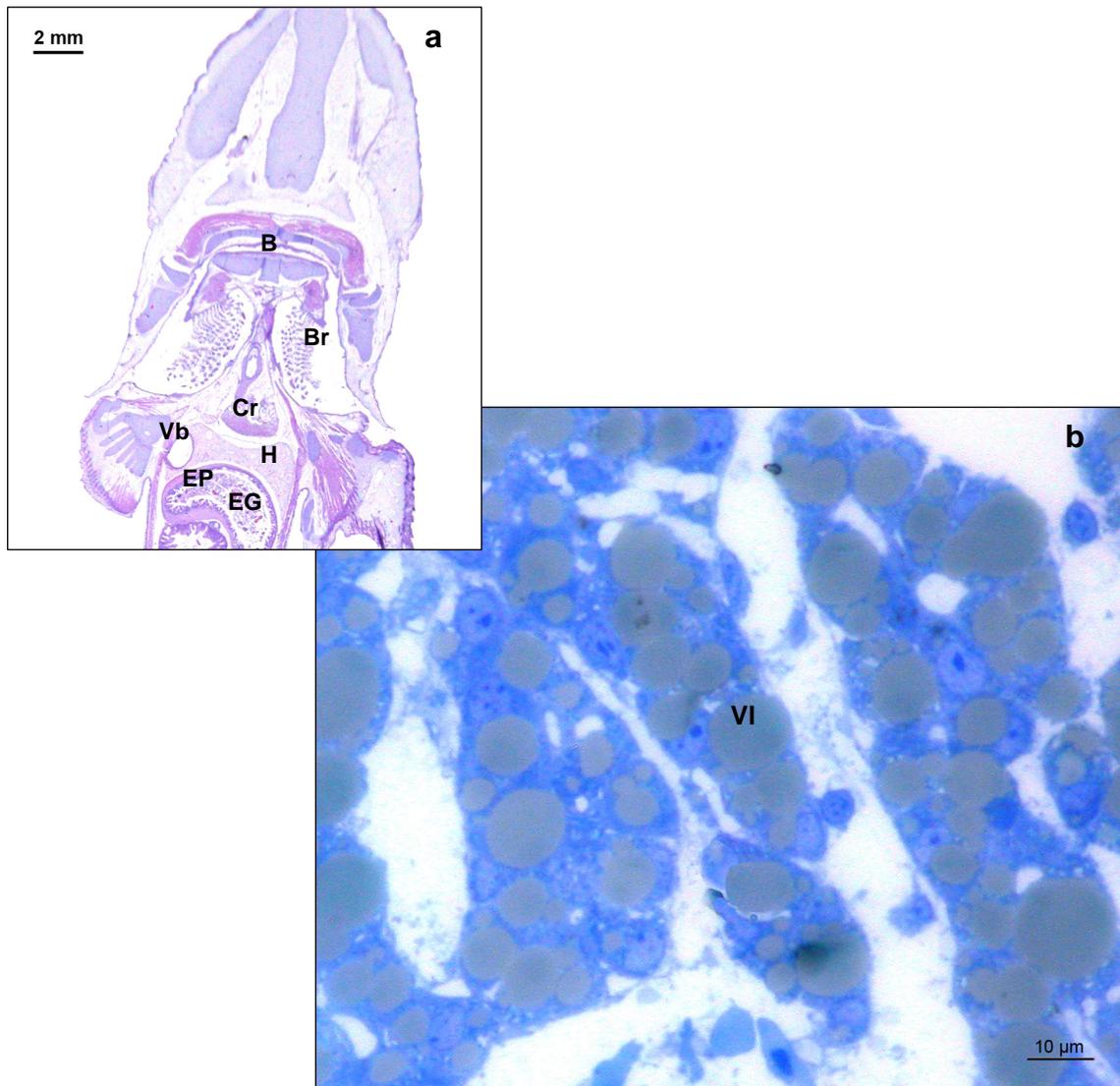


Figura 96: a - Imagen panorámica de la porción media de un juvenil de *Acipenser naccarii* de 36 dpe en sección dorso-ventral. H-E. B, Boca; Br, Branquias; Cr, corazón; EG, Estómago glandular; EP, Estómago pilórico; CP, Ciegos pilóricos; H, Hígado; Vb, Vesícula biliar. b – Detalle del hígado, donde podemos observar el alto grado de vacuolización lipídica de los hepatocitos. Azul de toluidina. VI, vacuola lipídica.

Con Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) los hepatocitos muestran un núcleo redondeado muy regular, con uno o dos nucleolos prominentes y posición excéntrica. El citoplasma es rico en retículo

endoplasmático rugoso formado por apilamientos de cisternas que se disponen, preferentemente, en posición perinuclear y en la zona periférica de la célula. Las abundantes mitocondrias presentan crestas tubulares y una matriz de moderada densidad electrónica, junto a ellas se observan abundantes cuerpos densos (lisosomas o peroxisomas). Además, junto a escasas regiones citoplasmáticas con glucógeno, encontramos grandes áreas ocupadas por gotas lipídicas de diámetro variable, responsables de la vacuolización descrita en microscopía óptica (Figura 97).

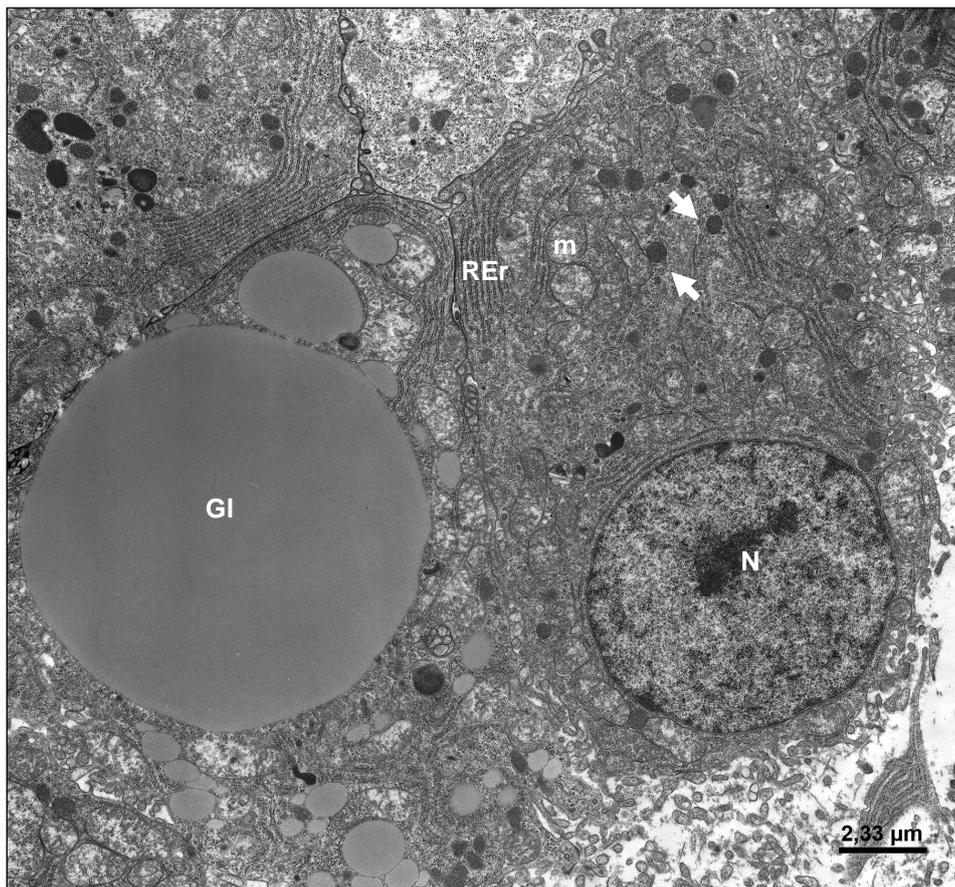


Figura 97: Imagen panorámica del tejido hepático de un juvenil de *Acipenser naccarii*, donde podemos observar hepatocitos con núcleo (N) excéntrico y un citoplasma rico en retículo endoplasmático rugoso (REr), mitocondrias (m), cuerpos densos (flechas) y grandes gotas lipídicas (Gl). TEM.

Desde las zonas laterales de los hepatocitos se observan microvellosidades tortuosas que se extienden en los canalículos biliares (Figura 98).

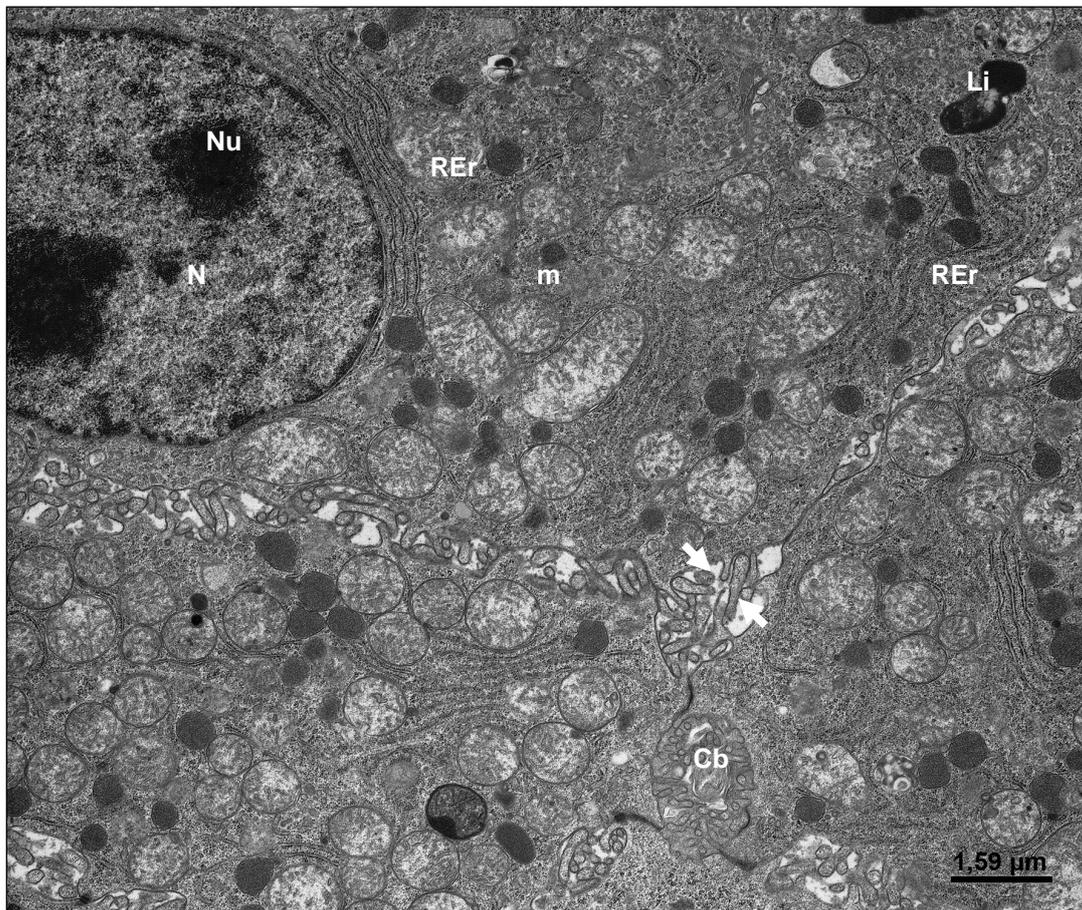


Figura 98: Imagen panorámica del tejido hepático de un juvenil de *Acipenser naccarii* donde podemos observar como los hepatocitos en sus caras laterales presentan microvellosidades tortuosas (flechas) que se extienden en los canalículos biliares (Cb). TEM. Li, lisosoma; N, núcleo; Nu, nucleolo; m, mitocondrias; REr, retículo endoplasmático rugoso.

El páncreas se localiza en las cercanías del intestino medio y se dispone como una “cuña” de tejido en el espacio existente entre el estómago glandular y el intestino anterior. Este órgano mantiene durante el periodo exotrófico la

misma estructura histológica que durante el periodo de alimentación mixta (Figura 99).

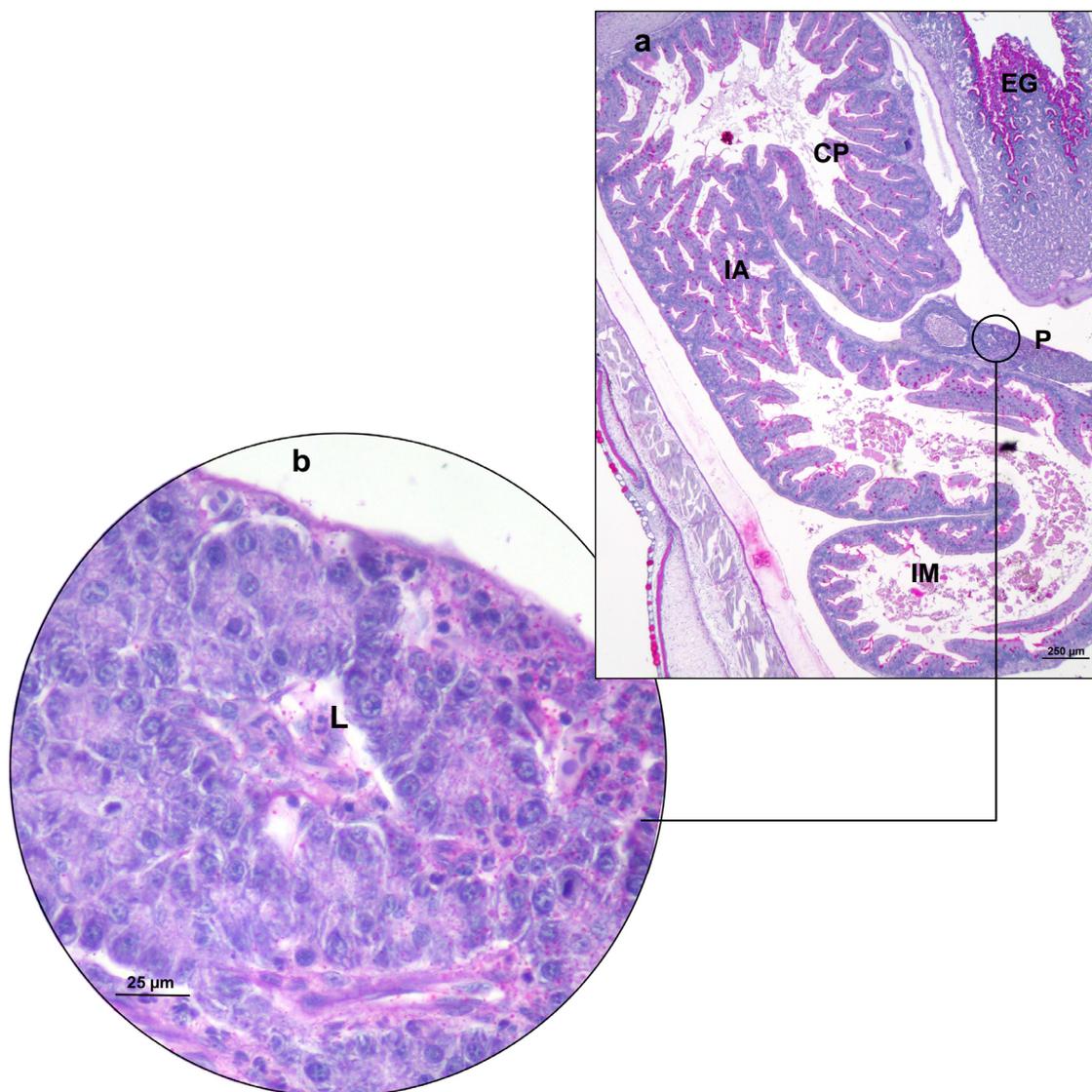


Figura 99: a – Imagen panorámica de la porción media de un juvenil de *Acipenser naccarii* de 36 dpe en sección dorso-ventral. PAS. EG: Estómago glandular; CP, Ciegos pilóricos; IA, Intestino anterior; IM, Intestino medio; P, Páncreas. b – Detalle del tejido pancreático. PAS. L, luz del acino.

En los análisis con TEM, las células pancreáticas exocrinas se unen a las vecinas mediante complejos de unión bien desarrollados, constituyendo los típicos acinos en cuya luz encontramos algunas microvellosidades procedentes de la membrana plasmática apical. A lo largo de las caras laterales las células se unen, además, mediante interdigitaciones. El núcleo, grande, redondeado, eucromático se sitúa en la parte basal de la célula y el citoplasma es particularmente abundante en REr, pero también es de señalar la presencia de mitocondrias y gránulos de secreción (Figura 100); éstos últimos se acumulan en el citoplasma apical para descargar su contenido en la luz mediante un proceso de exocitosis (Figura 101).

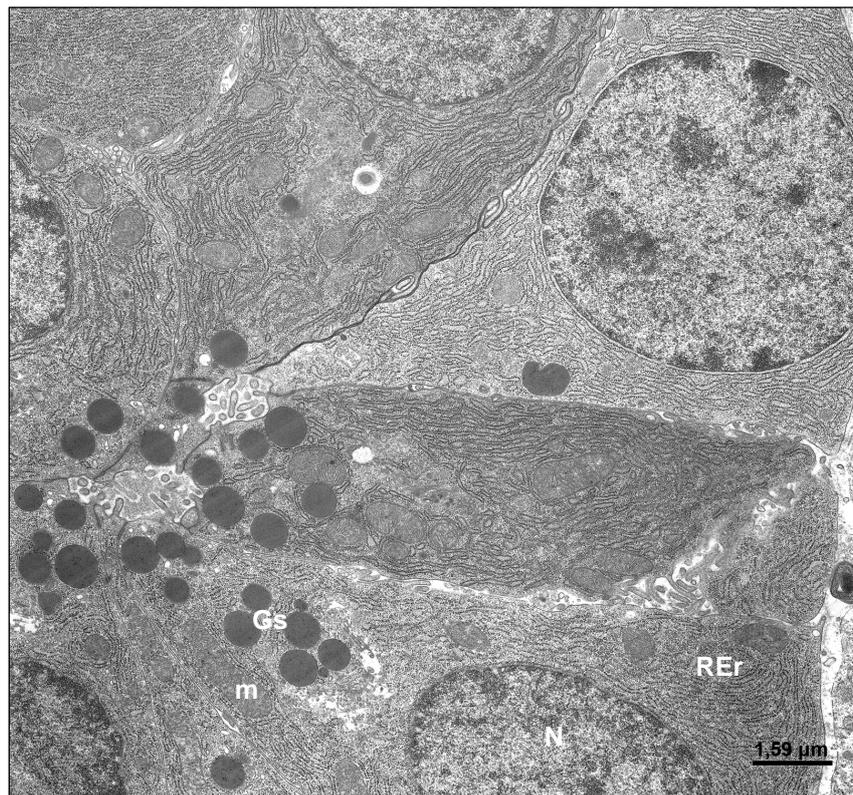


Figura 100: Imagen panorámica de un acino pancreático de un juvenil de *Acipenser naccarii* donde podemos observar células con un núcleo basal y un citoplasma rico en retículo endoplasmático rugoso (REr), mitocondrias (m) y gránulos de secreción (Gs). TEM.

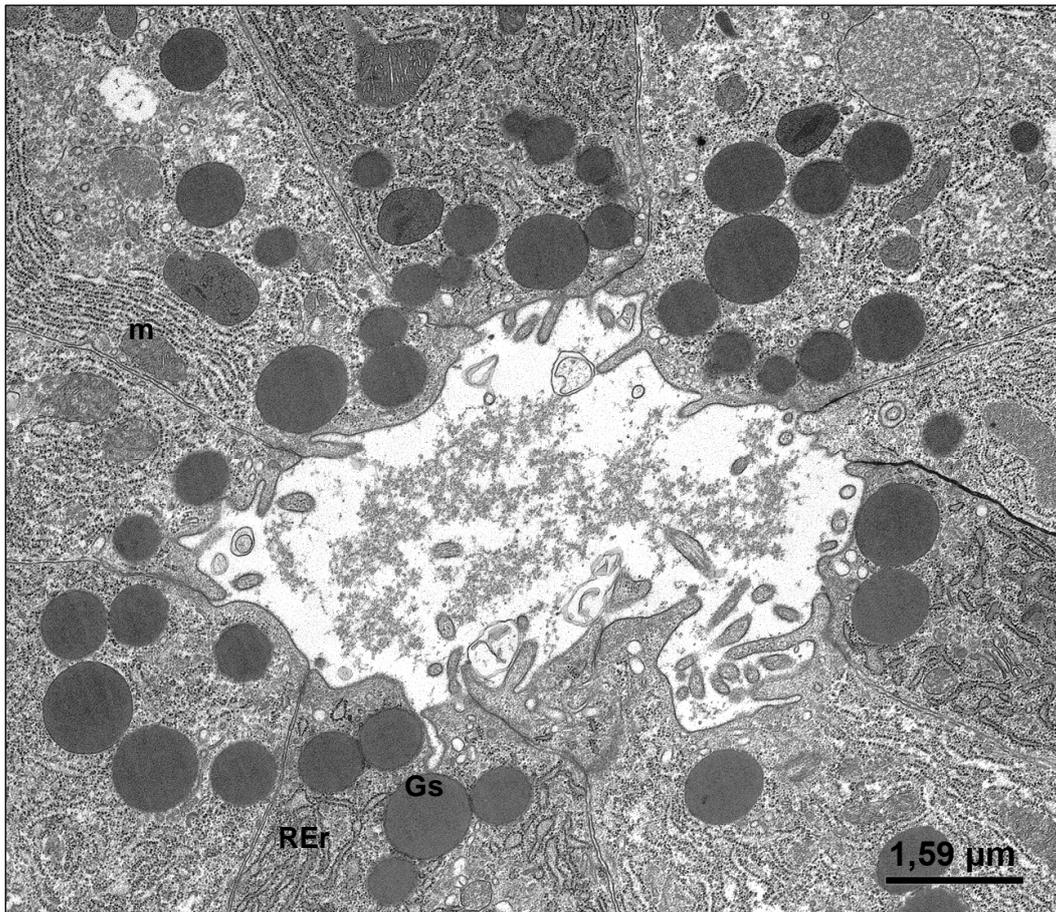


Figura 101: Imagen panorámica de la porción apical de un acino pancreático en un juvenil de *Acipenser naccarii* donde podemos observar el gran desarrollo del retículo endoplasmático rugoso (REr) y la acumulación de gránulos de secreción (Gs) que serán expulsados al exterior mediante exocitosis. TEM.

ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS

1. ACTIVIDAD ESPECÍFICA α -AMILÁSICA

La determinación de la actividad específica α -amilasa (mU/mg de proteína) en homogenados realizados con animales pertenecientes a distintas etapas del desarrollo ontogénico del esturión *Acipenser naccarii* (Tablas 13 y 14 y Gráfica 3), muestra que dicha actividad se manifiesta durante el desarrollo del embrión en los días que ha sido determinada (3 y 7 después de la fecundación) siendo mayor en el día 7 que en el 3 después de la fecundación. La actividad de la enzima no es detectada al final del periodo de alimentación endógena 13 y 14 días post-fecundación (6 y 7 días post-eclosión) y vuelve a mostrarse al inicio de la alimentación mixta (desde el día 14,5 al 17 post-fecundación) donde sufre un fuerte incremento. Tras este periodo, no se vuelve a detectar actividad hasta el mes después de la fecundación (23 días después de la eclosión). Los cambios observados en la actividad enzimática en función del peso de tejido siguen la misma pauta que los comentados para la actividad específica.

DÍAS POST-FECUNDACIÓN	CONTENIDO EN PROTEÍNA (mg/ml)	mU/mg PROTEÍNA	mU/g TEJIDO
3	2,75 \pm 0,13	4,62 \pm 0,70	63,61 \pm 10,58
7	0,96 \pm 0,07	22,72 \pm 8,54	105,33 \pm 33,94
ECLOSIÓN			
13	5,17 \pm 0,02	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
14	3,67 \pm 0,58	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
ALIMENTACIÓN EXÓGENA			
14, 5	5,37 \pm 0,48	34,27 \pm 5,38	302,45 \pm 20,72
15	6,66 \pm 0,18	11,74 \pm 11,74	126,78 \pm 126,78
16	3,40 \pm 0,15	17,29 \pm 3,12	93,60 \pm 53,57
17	3,42 \pm 0,08	21,94 \pm 1,74	125,14 \pm 11,11
20	4,28 \pm 0,13	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
21	1,38 \pm 0,24	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
24	1,37 \pm 0,14	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
31	4,58 \pm 0,27	15,29 \pm 3,77	117,43 \pm 32,51
35	4,40 \pm 0,24	22,31 \pm 7,54	156,12 \pm 27,86
38	4,48 \pm 0,06	4,00 \pm 0,0,57	22,01 \pm 8,65

Tabla 13: Evolución de la actividad α -amilasa durante las primeras fases de vida del esturión *Acipenser naccarii*.

FASE DE DESARROLLO EMBRIONARIO

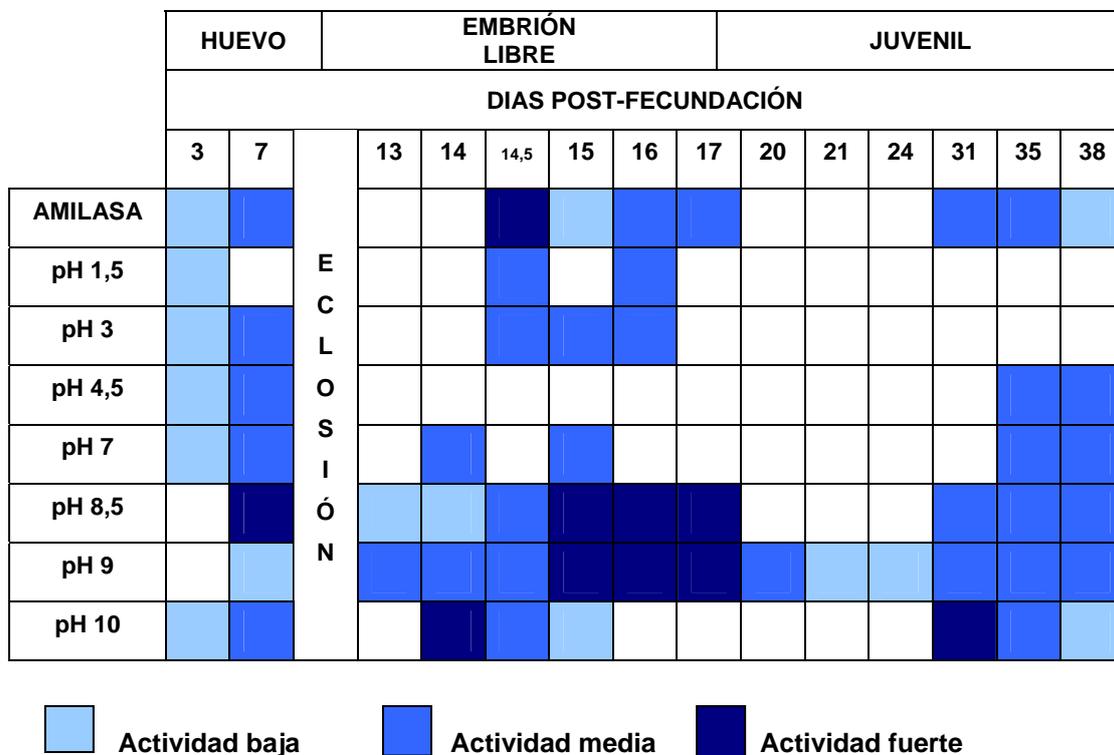
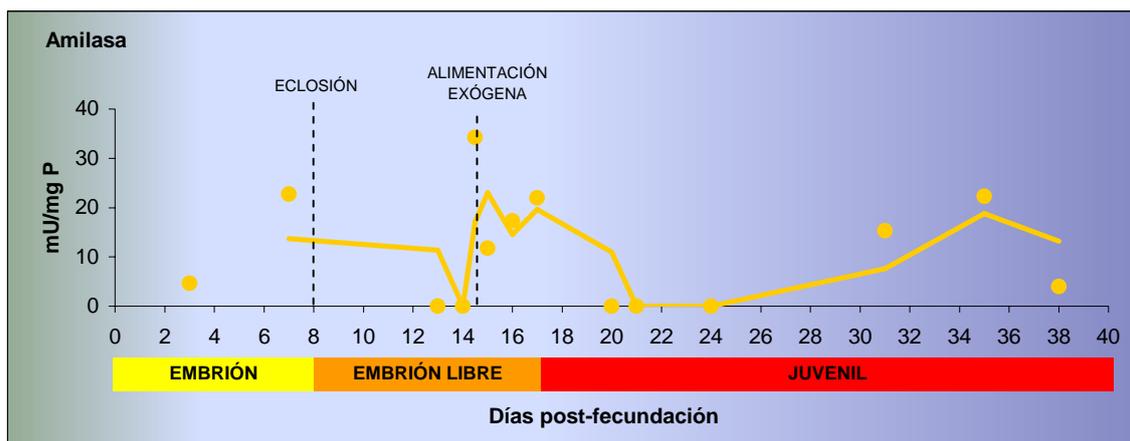


Tabla 14: Evolución cuantitativa del contenido enzimático durante las primeras fases del ciclo vital de *Acipenser naccarii*.



Gráfica 3: Evolución de la actividad α-amilásica (mU/mg P) en las primeras fases del ciclo biológico del esturión *Acipenser naccarii*.

2. ACTIVIDAD PROTEÁSICA

Por lo que respecta a la actividad proteásica encontrada en el esturión *Acipenser naccarii* en diferentes etapas del desarrollo ontogénico, hay que distinguir entre actividades proteásicas con pH óptimo de actuación ácido (1,5, 3 y 4,5) y proteasas con pH óptimo de actuación neutro-alkalino (7, 8,5, 9 y 10) (Tablas 15 y 16).

DIAS POST-FECUNDACION	mU/mg Proteína						
	pH						
	1,5	3	4,5	7	8,5	9	10
3	2,84 ±1,05	2,80 ±0,45	2,14 ±1,07	1,07 ±0,22	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	2,43 ±0,45
7	0,00 ±0,00	3,85 ±0,66	7,92 ±0,06	5,84 ±1,89	16,61 ±9,78	4,28 ±1,29	5,55 ±1,39
ECLOSIÓN							
13	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	4,64 ±2,50	8,25 ±0,54	0,00 ±0,00
14	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	4,08 ±2,43	2,96 ±1,32	18,64 ±2,76	17,04 ±0,17
INICIO ALIMENTACIÓN EXÓGENA							
14,5	5,81 ±1,35	1,95 ±0,22	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	7,87 ±1,84	9,15 ±0,43	5,47 ±1,09
15	0,00 ±0,00	7,32 ±1,46	0,00 ±0,00	3,57 ±0,40	6,67 ±0,81	8,65 ±1,24	4,21 ±0,60
16	4,14 ±0,07	3,52 ±2,70	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	14,60 ±5,62	32,96 ±1,64	0,00 ±0,00
27	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	11,45 ±6,18	8,87 ±4,03	0,00 ±0,00
20	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	1,86 ±0,37	0,00 ±0,00
21	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	13,29 ±2,66	0,00 ±0,00
24	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	4,54 ±0,50	0,00 ±0,00
31	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	4,85 ±0,35	7,81 ±3,50	14,13 ±2,75
35	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	4,84 ±0,59	9,89 ±1,42	6,51 ±1,51	7,54 ±2,07	6,24 ±1,46
38	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	5,87 ±0,66	10,53 ±1,84	3,87 ±0,52	10,72 ±5,04	1,51 ±0,40

Tabla 15: Evolución de la actividad proteásica digestiva durante las primeras fases del ciclo biológico del esturión *Acipenser naccarii*

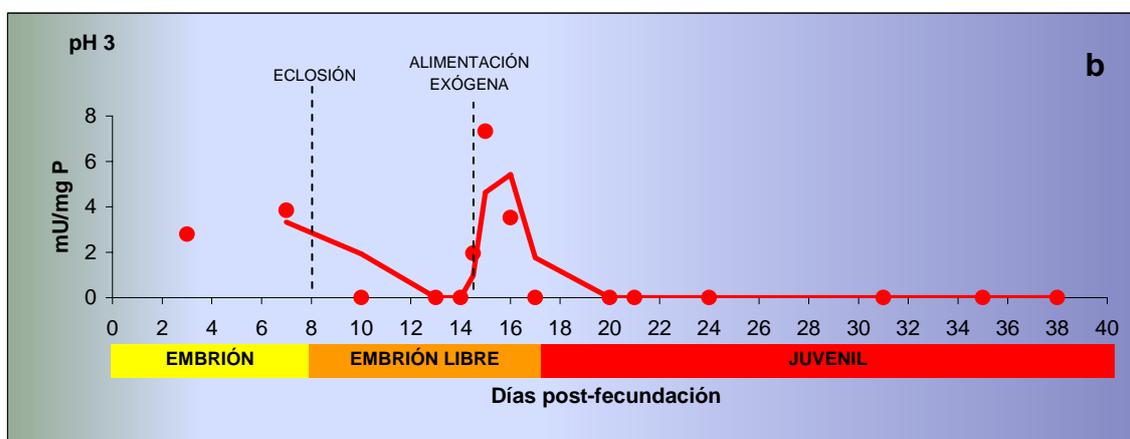
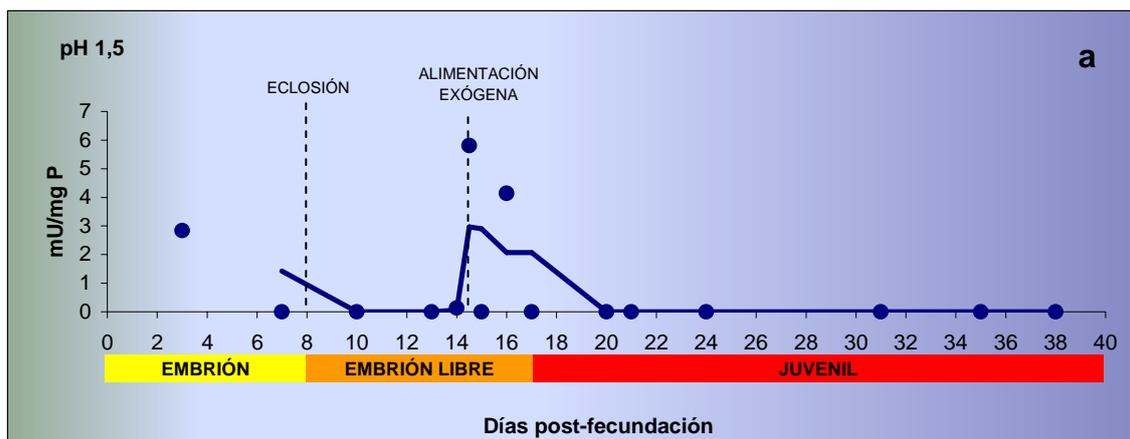
Los valores encontrados en las actividades enzimáticas, expresados en función del contenido en proteína (actividad específica) son en general extrapolables a los expresados en función del peso del tejido.

DIAS POST-FECUNDACION	mU/mg Proteína						
	pH						
	1,5	3	4,5	7	8,5	9	10
3	29,81 ±1,86	18,78 ±3,29	16,55 ±7,85	8,89 ±1,59	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	18,94 ±2,62
7	0,00 ±0,00	17,79 ±0,99	38,05 ±1,48	29,90 ±12,60	33,44 ±1,11	23,55 ±7,08	27,84 ±7,45
ECLOSIÓN							
13	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	120,08 ±65,23	212,74 ±12,60	0,00 ±0,00
14	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	57,82 ±25,20	64,49 ±31,87	315,03 ±42,25	299,46 ±80,05
INICIO ALIMENTACIÓN EXÓGENA							
14,5	152,70 ±22,24	5,21 ±1,04	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	206,81 ±30,39	244,61 ±10,38	7,31 ±1,04
15	0,00 ±0,00	17,38 ±2,49	0,00 ±0,00	8,25 ±1,65	223,85 ±34,10	20,53 ±2,28	9,99 ±1,11
16	70,42 ±6,67	65,23 ±50,40	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	166,04 ±17,79	606,33 ±23,72	0,00 ±0,00
27	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	179,38 ±90,43	160,60 ±73,48	0,00 ±0,00
20	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	3,17 ±0,45	0,00 ±0,00
21	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	107,61 ±21,54	0,00 ±0,00
24	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	1,76 ±0,25	0,00 ±0,00
31	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	117,59 ±9,64	187,94 ±86,59	321,51 ±91,20
35	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	103,77 ±2,96	214,46 ±21,32	141,33 ±29,90	161,59 ±35,98	140,84 ±38,00
38	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	131,20 ±11,01	232,75 ±40,03	85,98 ±11,23	237,69 ±110,67	33,60 ±8,62

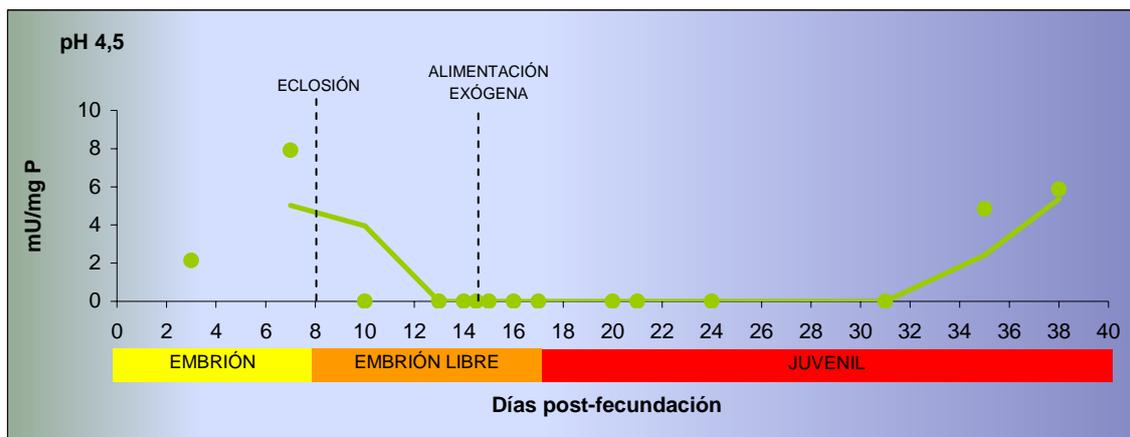
Tabla 16: Evolución de la actividad proteásica durante las primeras fases de vida del esturión *Acipenser naccarii*.

La actividad proteásica ácida correspondiente a los pH 1,5 y 3 sólo aparece durante el estado embrionario (días 3 y 7 post-fecundación) y posteriormente al comienzo del periodo de alimentación mixta (días 14,5, 15 y 16 post-

fecundación) (Gráfica 4). La actividad proteásica con pH óptimo de actuación a 4,5 también aparece en el periodo embrionario, pero no aparece al comienzo de la alimentación exógena y sólo se detecta al mes después de la fecundación (23 días después de la eclosión) (Gráfica 5).

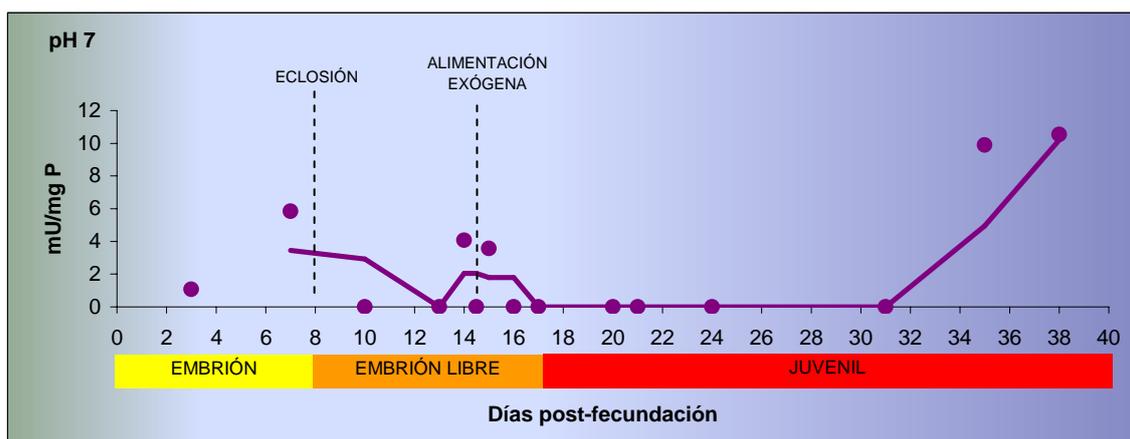


Gráfica 4 (a-b): Evolución de las actividades específicas proteásicas digestivas con pH óptimo de actuación 1,5 y 3 durante las primeras fases del ciclo biológico del esturión *Acipenser naccarii*.



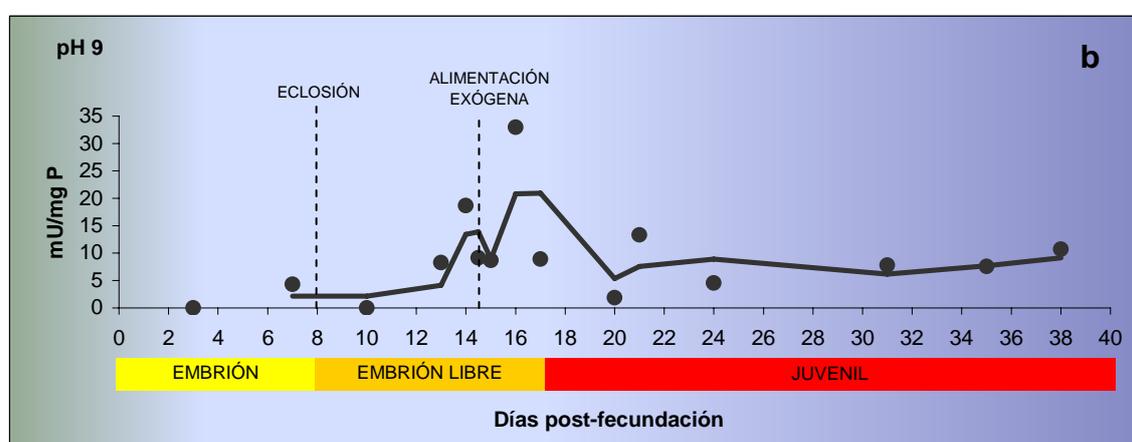
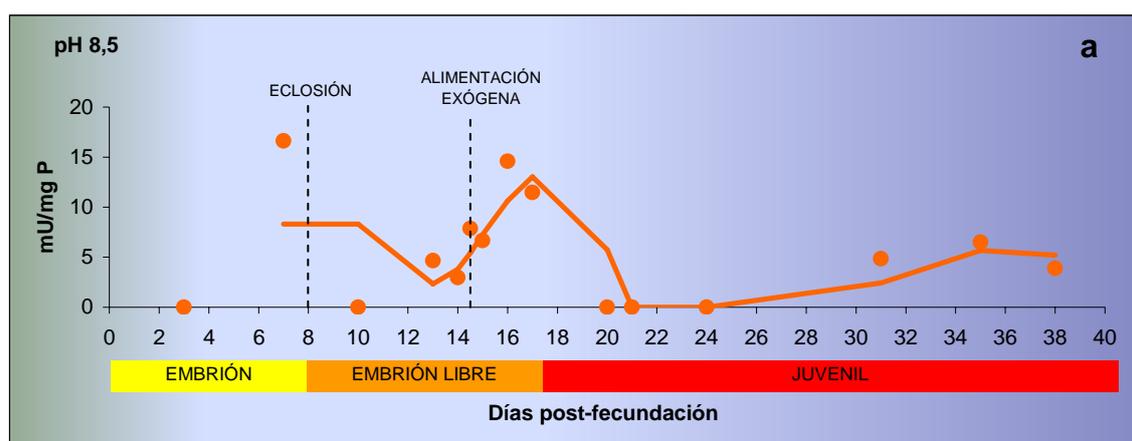
Gráfica 5: Evolución de la actividad específica proteásica digestiva con pH óptimo de actuación 4,5 durante las primeras fases del ciclo biológico del esturión *Acipenser naccarii*.

La proteasa con pH óptimo de actuación de 7 sigue una evolución muy parecida a la actividad α -amilasa, es decir, se detecta durante el periodo embrionario, al principio de la alimentación exógena y al mes después de la fecundación (23 días después de la eclosión) (Gráfica 6).

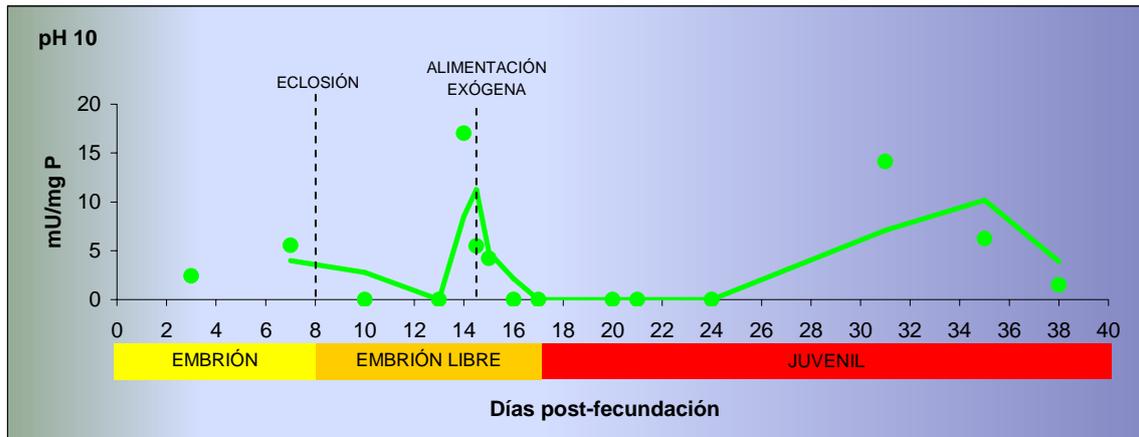


Gráfica 6: Evolución de las actividades específicas proteásicas digestivas con pH óptimo de actuación 7 durante las primeras fases del ciclo biológico del esturión *Acipenser naccarii*.

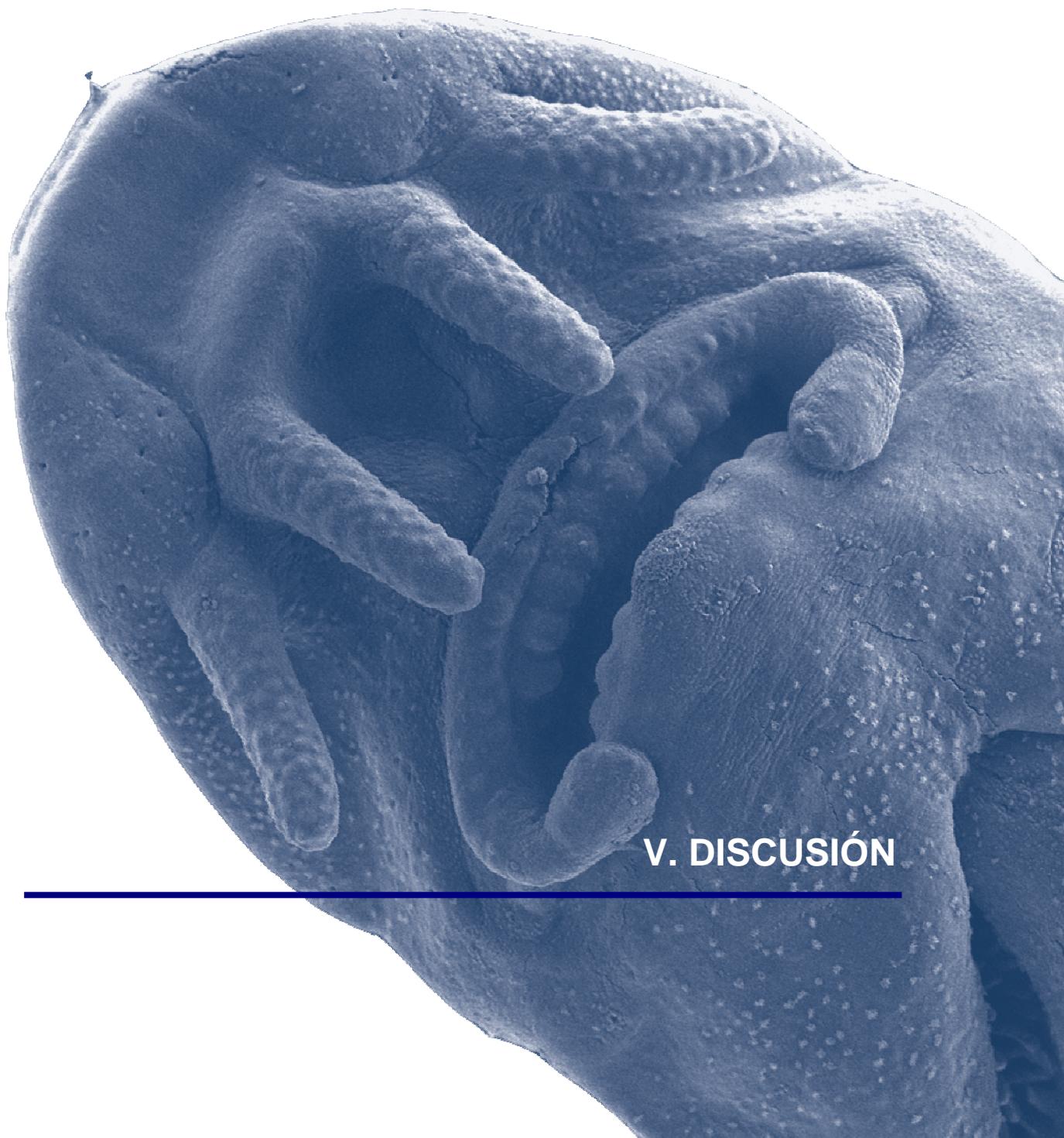
Las proteasas alcalinas experimentan un aumento tras el suministro de la primera comida. Posteriormente las actividades descienden en torno al mes después de la fecundación (23 días después de la eclosión). Hay que destacar que los valores en la actividad proteásica son mayores en el día 7 que en 3 días después de la fecundación (Gráficas 7 y 8).



Gráfica 7 (a-b): Evolución de las actividades específicas proteásicas digestivas con pH óptimo de actuación 8,5 y 9 durante las primeras fases del ciclo biológico de *Acipenser naccarii*.



Gráfica 8: Evolución de la actividad específica proteásica digestiva con pH óptimo de actuación 10 durante las primeras fases del ciclo biológico de *Acipenser naccarii*.



V. DISCUSIÓN

La creciente demanda de productos derivados del esturión a lo largo de los últimos años (caviar y carne principalmente), junto con el importante descenso en las capturas procedentes de la actividad extractiva, motivado por factores derivados de la presión antropogénica sobre el medio ambiente (tales como la contaminación de los cursos de agua, la construcción de presas, la sobrepesca, etc.), han generado un gran número de investigaciones por parte de la comunidad científica internacional encaminadas a la conservación de las poblaciones de este grupo de especies y de sus hábitats (Bemis *y col.*, 1997; Billard & Lecointre, 2001).

Diferentes características tales como la alta tasa de crecimiento, la resistencia a patógenos y la obtención de productos con alto valor económico condujeron a pensar que la acuicultura podía jugar un papel muy importante en la conservación de estas especies en peligro de extinción, mediante técnicas de producción bajo condiciones controladas. Aunque los intentos de cría en cautividad de Acipenseriformes se iniciaron con la entrada del siglo XX (Buddington & Christofferson, 1985), en la actualidad la producción de juveniles sigue siendo considerada como una de las etapas más determinantes y dificultosas en el cultivo intensivo de los esturiones ya que tras la eclosión y el consumo de las reservas vitelinas se produce una alta tasa de mortalidad, pues la supervivencia está relacionada no sólo con el sistema de producción utilizado sino también con el estado nutricional de los animales (Gisbert & Williot, 2002) .

El escaso conocimiento de las características digestivas de los esturiones desde los primeros días de vida ha llevado a diferentes grupos de investigación a centrar sus esfuerzos en la comprensión del desarrollo ontogénico del tracto gastrointestinal, bajo condiciones controladas (Buddington & Christofferson, 1985; Buddington & Doroshov, 1986; Gawlicka *y col.*, 1995; Gisbert *y col.*, 1998, 1999; Boglione *y col.*, 1999; Cataldi *y col.*, 2002; Gisbert & Doroshov,

2003). Boglione y col. en un trabajo publicado en 1999 estudiaron las etapas iniciales de desarrollo de *Acipenser naccarii*, aunque los propios autores confirman la parcialidad de su trabajo y apuntan a la necesidad de estudios más completos. Atendiendo a las descripciones realizadas por diferentes autores sobre el desarrollo ontogénico de distintas especies de esturión: el esturión del Danubio *Acipenser gueldenstaedti* (Dettlaff y col.,1993), el esturión blanco *Acipenser transmontanus* (Gawlicka y col.,1995), el esturión siberiano *Acipenser baerii* (Gisbert y col.,1998, 1999) y el esturión verde *Acipenser medirostris* (Deng y col.,2002); y a nuestros resultados en el esturión del Adriático *Acipenser naccarii*, podemos afirmar que el proceso de diferenciación del sistema digestivo es muy similar a lo largo de los Acipenséridos, aunque presenta variaciones de orden temporal. Estas diferencias, que también han sido observadas en varias especies de teleósteos como *Limanda ferruginea* (Howell, 1980) y *Epinephelus coioides* (Toledo y col.; 2004) entre otras, están relacionadas con la temperatura de incubación, que es directamente proporcional a la tasa de absorción de vitelo e inversamente proporcional a la eficiencia con que éste último es utilizado por los tejidos de los animales, de manera que las temperaturas más bajas generan periodos de incubación más largos y producen un descendencia de gran calidad (Hardy & Litvak, 2004).

En *Acipenser naccarii*, al igual que en el resto de representantes de la familia *Acipenseridae*, la histogénesis del tracto digestivo es asincrónica (Buddington & Doroshov, 1986) y procede desde la porción posterior a la anterior, siendo la válvula espiral la primera estructura en diferenciarse (1 dpe) y el estómago glandular la última (7 dpe), justo antes del inicio de la alimentación exógena).

En el momento de la eclosión, los embriones de *Acipenser naccarii*, al igual que en las otras especies de esturión estudiadas (Dettlaff y col., 1993; Gisbert y col., 1998, 1999; Gisbert & Doroshov, 2003) y diferentes especies de teleósteos

entre las que podemos citar *Gadus morhua* (Kjørsvik y col., 1991) y *Scophthalmus maximus* (Segner y col., 1994), presentan un tracto gastrointestinal parcialmente diferenciado, no comunicado con el exterior y representado por un gran saco vitelino y un esbozo de válvula espiral. Debido a este grado inicial de desarrollo, durante los primeros días de vida los embriones se alimentan exclusivamente de los nutrientes que aporta el vitelo, asimilando principalmente las proteínas y los carbohidratos mientras que los lípidos parecen ser almacenados mayoritariamente en el hígado y en el epitelio intestinal para ser utilizados cuando se inicia la alimentación exógena (Lazo, 2000).

En este momento de desarrollo, el epitelio que rodea al gran saco vitelino de los embriones de *Acipenser naccarii*, de origen endodérmico, está en proceso de diferenciación y presenta un gran número de vacuolas supranucleares que muestran diferente densidad electrónica en las imágenes de microscopía electrónica y que, al igual que en embriones de *Acipenser baerii* recién eclosionados, contienen gránulos de vitelo tanto de naturaleza proteica como lipídica (Gisbert y col.;1998). Dettlaff y col. en un libro publicado en 1993, relacionan la gran cantidad de inclusiones vitelinas en las células endodérmicas del saco vitelino de los esturiones con la participación de este epitelio en la diferenciación del tracto gastrointestinal.

Nuestros resultados ponen de manifiesto la acumulación de numerosas y grandes vacuolas lipídicas en las células del epitelio intestinal de los embriones recién eclosionados de *Acipenser naccarii*; este hecho en diferentes especies de teleósteos se considera como un indicador de la presencia de mecanismos de absorción lipídica incipientes (Segner y col., 1994; Sarasquete y col., 1995; Ribeiro y col., 1999) y consecuencia de la ausencia de lipólisis y una reducida capacidad para la movilización de sustancias lipídicas durante las primeras fases de desarrollo (Buddington & Christofferson, 1985).

La presencia de actividades enzimáticas durante el periodo embrionario de *Acipenser naccarii*, concretamente α -amilasa y proteasas ácidas y neutras, puede explicarse atendiendo a dos hechos fundamentales: la digestión de los componentes del vitelo y la preparación de la cubierta embrionaria para la eclosión. En embriones recién eclosionados de esturión siberiano, *Acipenser baeri*, Gisbert y col., (1999) relacionan la detección de actividades enzimáticas en el endodermo del saco vitelino con la captación del vitelo por medio de pinocitosis y su posterior digestión intracelular.

Detlaff y col., (1993), describen la presencia de la glándula de la eclosión en los Acipenseriformes situada en posición ventral debajo de la cabeza del embrión; dicha glándula secreta una sustancia que ablanda y disminuye el grosor de la envoltura embrionaria. Probablemente esta secreción esté constituida por un complejo multienzimático en el que figuren entre otras, actividades amilásicas y proteásicas. Nuestros resultados muestran un aumento de dichas actividades en los días más cercanos a la eclosión. Este complejo multienzimático ha sido descrito en otras especies de peces, como es el caso de *Oryzias latipes*, donde se conoce como corionasa (Yamagami, 1972) y está formado por dos enzimas proteolíticas que actúan de forma sincrónica hidrolizando el corion del huevo (Yasumasu & Yamagami, 2004).

1. Cavidad orofaríngea

En *Acipenser naccarii*, según nuestros resultados, la apertura de la boca se produce en torno al día 3 dpe, lo que concuerda con un estudio anterior realizado por Boglione y col., en 1999 en la misma especie y con las directrices propuestas por Buddington & Christofferson en 1985 para los Condrósteos. Inicialmente la cavidad orofaríngea de *Acipenser naccarii* está llena de vitelo y tapizada por un epitelio estratificado cúbico que posee algunas células ciliadas interpuestas.

En las células de este epitelio se produce la acumulación de una gran cantidad de gránulos de vitelo y melanina, lo que según Gisbert y col. (1998) en un estudio en *Acipenser baeri* puede relacionarse con la participación del endodermo del saco vitelino en la formación de las estructuras digestivas. Estas inclusiones de las células del epitelio bucofaríngeo desaparecen, al igual que en otras especies de esturión, alrededor del día 5 después de la eclosión (Gisbert y col., 1999)

Diferentes autores han relacionado la presencia de células ciliadas en el epitelio bucofaríngeo de los peces con la facilitación del paso del alimento hacia el estómago y señalan su importancia en los momentos en los que el ano aún no está abierto (Iwai & Rosenthal, 1981; Morrison, 1993).

Otra de las estructuras presentes en el epitelio bucofaríngeo de los Acipenseriformes son los botones gustativos, cuyos esbozos en *Acipenser naccarii* aparecen entre los 3 y 4 dpe en las barbillas, apareciendo un día después en los labios. Alrededor del día 6 dpe estas estructuras sensitivas son muy abundantes en el epitelio bucal y se distribuyen por toda la cavidad orofaríngea y la primera porción de la cámara branquial, organizándose en arcos regulares. En los esturiones existen diferencias funcionales entre los botones gustativos de las barbillas y los de la cavidad orofaríngea; mientras que los primeros estarían especializados en la recepción de sabores amargos y ácidos, los segundos serían capaces de identificar además los sabores salados (Kasumyan & Kazhalye, 1993). Teniendo en cuenta estas diferencias, puede afirmarse que los botones gustativos presentes en las barbillas de los Acipenséridos participarían en la selección y evaluación del alimento mientras que los que se distribuyen por la orofaringe discriminarían qué partículas alimentarias pasan al esófago. Apoyándose en lo anterior Boglione *et a.* (1999) observaron que el desarrollo de las zonas sensoriales gustativas en *Acipenser*

naccarii se producía de forma secuencial, primero en las región extraoral y en la faringe y posteriormente en el techo y en el suelo del paladar respectivamente. Esta secuencia de desarrollo también ha sido observada en *Acipenser nudiiventris*, mientras que en *Acipenser persicus* los botones gustativos del techo del paladar son los últimos en diferenciarse (Devitsina & Gazdhieva, 1996).

Aunque Reuter y col. (1973) relacionaron esta especialización funcional de los botones gustativos con cambios en su morfología entre las distintas regiones sensoriales de la cavidad orofaríngea de los peces, en *Acipenser naccarii* esta analogía no está aún muy clara y necesita de un estudio más específico.

Aunque los resultados histoquímicos confirman que la primera aparición de células mucosas en el epitelio bucofaríngeo de *Acipenser naccarii* se sitúa alrededor de los 5 dpe, su funcionalidad no es completa hasta el momento de la primera alimentación exógena. En el esturión siberiano *A. baeri* tiene lugar un suceso parecido y Gisbert y col. (1999) confirman que este hecho no concuerda con lo que sucede en otras especies de peces, en concreto la dorada (*Sparus aurata*) y el rodaballo (*Scophthalmus maximus*), donde las células mucosas no aparecen en la boca hasta tiempo después de iniciada la alimentación exógena (Cousin & Baudin-Laurencin, 1985; Sarasquete y col., 1995). Las técnicas histoquímicas utilizadas indican la presencia en las citadas células de mucosustancias neutras (PAS positividad) y ácidas (Alcianofilia +) en el momento de la primera alimentación exógena. Domeneghini y col. (1998) confirmaron la presencia de estos dos tipos de secreciones mucosas en el epitelio bucofaríngeo de embriones y juveniles de dorada y los relacionaron con un mecanismo que permite a los animales responder a los cambios ambientales mediante el mantenimiento del equilibrio osmótico.

Una de las principales características de los esturiones es la presencia de estructuras dentarias durante las primeras fases de desarrollo y su ausencia en los estadios adultos. Este fenómeno también ha sido descrito en otras especies como *Hoplosternum littorale* (Machado-Allison, 1986). Según Brannon y col. (1983), la presencia de dientes durante los primeros momentos de desarrollo del esturión blanco (*Acipenser transmontanus*) se relaciona con el tipo de dieta (invertebrados bentónicos) y además, ayudaría a que el alimento pasara de una forma más fragmentada a la porción gástrica.

En los esturiones no existe reemplazo dentario, por lo que como consecuencia del continuo crecimiento de las mandíbulas con el desarrollo, llega un momento en que los dientes se desprenden (Grande & Bemis, 1991). Este proceso mediante el cual los esturiones pierden sus dientes al alcanzar el estado adulto ha sido observado también en algunos siluriformes (Golubtsov y col., 2003) y diferentes especies de vertebrados no-mamíferos (Clemen & Greven, 1994; Huysseune & Sire, 1998).

2. Esófago

El esófago en los peces es una estructura tubular de poca longitud, limitado por epitelio un estratificado constituido por células con microvellosidades apicales, células mucosas y unas pocas células ciliadas interpuestas (Campbell, 2004). En los peces eurihalinos como la anguila europea *Anguilla anguilla*, el conducto esofágico juega un importante papel en la osmorregulación (Abaurrea-Equisoain & Ostos-Garrido, 1996). En los esturiones, como en otros peces de agua dulce, el patrón de plegamiento de la mucosa del esófago es más sencillo que en las especies de teleósteos marinos ((Yamamoto & Hirano, 1978; Simmoneaux y col., 1987; Grau y col., 1992; Buddington & Christofferson, 1985). Cataldi y col.. (1995) realizaron un estudio con juveniles de *Acipenser naccarii* en el que se compararon ejemplares

dulceacuículas e individuos aclimatados al agua marina, no encontrando diferencias en la estructura histológica esofágica entre los dos lotes experimentales. Como la mayor parte de los esturiones, excepto *Huso huso*, *Acipenser naccarii* es considerada una especie anádroma (Rochard y col., 1990) y, a pesar de las investigaciones recientes, aún no se ha demostrado ningún tipo de relación entre el esófago y las capacidades de osmorregulación (Martínez Álvarez, 2003).

En *Acipenser naccarii*, nuestros resultados indican que la estructura histológica del esófago es idéntica a la observada en otros esturiones y diferentes especies de teleósteos, con una porción anterior caracterizada por una gran cantidad de células mucosas y una porción posterior con abundantes células provistas de cilios de gran tamaño y un menor número de células mucosas. Esta disposición también ha sido descrita por Gisbert y col. (1998) en *Acipenser baeri* para fases de desarrollo equivalentes, quienes proponen funciones diferentes para cada una de los compartimentos esofágicos; mientras que la porción más anterior tendría una función secretora y las mucosustancias allí producidas participarían en la lubricación del bolo alimentario, el segundo segmento esofágico facilitaría el transporte de alimento gracias a la presencia de gran cantidad de células ciliadas.

Las características histoquímicas y ultraestructurales de las células mucosas (alcianofilia tanto a pH 2,5 como a 1 y PAS positividad), así como su patrón de distribución a lo largo del conducto esofágico de *Acipenser naccarii*, es idéntica a la descrita para diferentes especies de teleósteos (Hamlin y col., 2000; Gisbert y col., 2004). Sin embargo hemos de señalar que ni el gran número de células mucosas esofágicas en el momento de la primera alimentación exógena, ni su gran secreción mucosa pueden ser relacionadas únicamente con la lubricación del alimento. Diferentes autores (Reifel & Travill, 1977; Zimmer y col. en 1992; Scocco y col., 1997) han sugerido que en los

peces, la secreción de las células mucosas podría cumplir las mismas funciones que la saliva de mamíferos.

3. Estómago

Los esturiones, al igual que los Condríctios y distintas especies de peces teleósteos como *Clarias lazera* (Stroband & Kroon, 1981) y la trucha arco-iris *Oncorhynchus mykiss* (Ostos-Garrido y col., 1993), presentan un estómago con estructura cecal formado por dos zonas bien diferenciadas, una porción anterior o glandular donde la principal característica es la presencia de glándulas gástricas y una porción posterior o pilórica que presenta una túnica muscular muy desarrollada (Buddington & Christofferson, 1985). Esta disposición del compartimento gástrico denota un alto grado de especialización de manera que, como veremos mas adelante, el estómago glandular estaría implicado en el inicio de la digestión ácida del alimento mediante la secreción de HCl y pepsina mientras que el estómago pilórico facilitaría la fragmentación del bolo alimenticio mediante las contracciones de su pared muscular.

La diferenciación del estómago es un proceso similar a lo largo de los Acipenséridos, de manera que en *Acipenser naccarii* encontramos únicamente diferencias temporales en cuanto a la aparición del estómago pilórico que tiene lugar en torno a los 5 dpe según nuestros resultados y en el día 4 post-eclosión en el esturión siberiano *Acipenser baeri* (Gisbert y col., 1998). En ninguna de la especies de esturiones estudiadas puede observarse un compartimento gástrico diferenciado en el momento de la eclosión, sino que aparece un gran saco vitelino intraembrionario, delimitado por un epitelio endodérmico, que engloba una gran masa central de vitelo (Buddington & Christofferson, 1985). A partir de este momento, el estómago sufre un proceso de diferenciación que se inicia con la compartimentalización del saco vitelino (Buddington & Christofferson, 1985). Nuestros resultados indican que hacia el día 3 dpe,

aparece un pliegue en la pared del saco vitelino, concretamente en la región dorsal-posterior, que lo divide en dos porciones: esbozo gástrico y esbozo intestinal.

Durante los siguientes días, el compartimento gástrico adquiere una forma más tubular y, en torno al día 5 dpe, se produce su torsión (hasta la adopción de una estructura parecida a una U) y la diferenciación de las porciones pilórica (tramo ascendente) y glandular del estómago (tramo descendente). Este fenómeno de torsión de la cavidad gástrica también ocurre hacia el día 5 dpe en *Acipenser baerii* (Gisbert y col., 1998) y alrededor del día 6 dpe en *Acipenser medirostris* (Gisbert & Doroshov, 2003). En *Acipenser naccarii*, el proceso concluye alrededor de los 7 dpe con la adquisición de la estructura cecal típica de juveniles y adultos.

La estructura histológica del epitelio gástrico en los peces es muy parecida a la de reptiles y anfibios y mucho más sencilla que la descrita para mamíferos (Ferri y col. 1974). En su epitelio de tipo cilíndrico simple pueden distinguirse células superficiales productoras de mucus, células ciliadas, células endocrinas y células glandulares gástricas que se localizan en el corion (Estegondo y col., 1988). En la trucha arco-iris (*Oncorhynchus mykiss*) el citoplasma de las células productoras de mucosustancias está repleto de gránulos de diferente tamaño y densidad asociados con el retículo endoplásmico y el complejo de Golgi, siendo su contenido descargado al lumen celular por exocitosis (Ostos-Garrido y col., 1993). Las células mucosecretoras del epitelio gástrico de *Acipenser naccarii* presentan un aspecto cilíndrico, el núcleo de aspecto irregular se localiza en posición basal y la superficie apical presenta microvellosidades cortas y espaciadas provistas de un prominente glicocáliz. En su citoplasma se puede señalar la presencia de abundantes granulaciones electrodensas relacionadas con la PAS-positividad observada a microscopía óptica. Este hecho, al igual que en *Acipenser transmontanus*, (Domeneghini y

col., 1999), *Acipenser baerii* (Gisbert y *col.*, 1998, 1999), *Acipenser medirostris* (Gisbert & Doroshov, 2003) y diferentes especies de peces con hábitos alimentarios muy variados indica secreción de mucosustancias de carácter neutro (Reifel & Travill, 1978). Como comentamos anteriormente, autores como Grau y *col.* en 1992 relacionan la presencia de estos mucopolisacáridos con la absorción de disacáridos y ácidos grasos de cadena corta, sin embargo otros como Scocco y *col.* (1997), sugieren una relación con la estabilización del pH gástrico. Redundando en lo anterior, los estudios de Buddington & Doroshov (1986) pusieron de manifiesto la captura de aminoácidos y carbohidratos en el epitelio gástrico de los esturiones aunque determinaron que la mayor parte de la absorción se produce en el intestino y la válvula espiral. Gisbert y *col.*, (1998) proponen, además para estas mucosustancias, una función de protección local del epitelio gástrico frente a los posibles daños ocasionados como consecuencia del proceso de digestión.

Nuestras observaciones indican la presencia de un gran número de células ciliadas en el epitelio gástrico de *Acipenser naccarii* desde el momento en el que se inicia la alimentación exógena (7 dpe) tanto en su porción glandular como en la pilórica. Este hallazgo está de acuerdo con las observaciones previas de Domeneghini y *col.* (1999) y con los estudios realizados por Cataldi y *col.* (2002). Estos últimos autores sugieren que las células ciliadas del epitelio gástrico cooperarían en la distribución del mucus y en el paso de fluidos provenientes de la mucosa esofágica o secretados por las glándulas gástricas, generando una película mucosa que protegería al epitelio subyacente frente al daño químico o físico durante el proceso de digestión que se produce en el estómago (Buddington & Christofferson, 1985, Boglione y *col.*, 1999; Gisbert y *col.*, 1999). Vemos por tanto, que la presencia de células ciliadas en el epitelio gástrico de los esturiones, lejos de ser una característica primitiva, facilita los movimientos del alimento a lo largo del sistema digestivo (Radaelli y *col.* 2000).

En los Acipenseriformes y la mayor parte de los teleósteos, las glándulas gástricas se restringen a la región anterior del estómago (porción glandular) y están constituidas por un tipo celular único denominado célula oxíntico-péptica (Gawlicka y col., 1995). La red túbulo-vesicular apical de éstas células está involucrada en la producción de HCl (Western & Jennings, 1970) y el retículo endoplásmico rugoso junto con el aparato de Golgi generan gránulos de zimógeno que, posteriormente son descargados en la luz glandular mediante mecanismos de exocitosis, como fue puesto de manifiesto por Ostos-Garrido y col. (1993) en la trucha arco-iris (*Oncorhynchus mykiss*).

Radaelli y col. (2000), estudiando las células glandulares gástricas de ejemplares adultos de esturión blanco *Acipenser transmontanus*, encuentran una gran cantidad de gránulos de zimógeno junto a un moderado desarrollo de la red túbulo-vesicular apical. Apoyándose en los estudios previos de Buddington y Doroshov en 1986 (en los que se determinó que el pH gástrico en el esturión *Acipenser transmontanus* no es nunca menor de 4), sugirieron que el proceso de digestión se lleva a cabo en el intestino, donde el pH es alcalino, mas que en el estómago donde la secreción de HCl es débil y está menos desarrollada que en otros vertebrados.

Estudios recientes en *Acipenser naccarii* (Furné y col., 2005) describen la presencia de actividad del tipo pepsina y diferentes proteasas en el estómago de juveniles de más de un año de edad de *Acipenser naccarii*, con óptimos de actuación a valores de pH más ácidos que los descritos para la trucha arco-iris *Oncorhynchus mykiss* (pH 1,5 y 3); además, en este mismo estudio se señala que la actividad proteásica a pH ácido es mayor que a pH alcalino. En principio estos últimos datos podrían resultar contradictorios con los estudios de Buddington & Doroshov (1986) y Radaelli y col. (2000), pero si tenemos en cuenta que en el medio natural *Acipenser naccarii* es un animal omnívoro que ingiere restos de semillas y detritus de plantas, la presencia de actividad

enzimática proteásica a valores de pH muy ácidos (1, 5 y 3) podría constituir una adaptación digestiva para facilitar los procesos de hidrólisis del material vegetal presente en el alimento. Asimismo, diferentes características anatómicas e histológicas del tracto digestivo post-gástrico, como el alto grado de plegamiento de la mucosa intestinal, el grado desarrollo de los ciegos pilóricos y la presencia de válvula espiral, producen un aumento tanto en la superficie de contacto con el alimento como en su tiempo de tránsito por el sistema digestivo, compensando la relativa baja tasa de actividad enzimática en la válvula espiral y el intestino (Gisbert y col. 1998).

La aparición de las glándulas gástricas constituye uno de los principales eventos en la diferenciación del estómago en peces y según Kolkowski (2001) indica el momento en el que los animales abandonan el periodo embrionario y poseen un sistema digestivo funcional capaz de digerir y absorber el alimento exógeno.

En los esturiones, el momento de aparición de las glándulas gástricas muestra ligeras variaciones interespecíficas. Con respecto a *Acipenser naccarii* nosotros hemos observado glándulas gástricas a los 6 dpe pero Gisbert y col. (1998), señalan para *Acipenser baeri*, el día 9 dpe como el momento de su aparición, mientras que para *Acipenser medirostris*, Gisbert & Doroshov (2003), sugieren el día 10 dpe. No obstante, a pesar de estas discrepancias, en todos los casos las glándulas están presentes antes del comienzo de la alimentación exógena y al igual que Gisbert & Williot (2002), pensamos que las éstas variaciones deben estar ocasionadas por variaciones en la temperatura de mantenimiento de huevos y embriones.

Sin embargo, la presencia de glándulas no determina la funcionalidad completa del estómago, ya que la pepsina es secretada en forma de pepsinógeno, que gracias al ambiente ácido existente en el estómago se

transforma en la forma activa del enzima; por lo que en ausencia de una secreción capaz de disminuir el pH gástrico, el enzima no es funcional (Douglas y col. 1999). Buddington & Doroshov (1986) realizaron mediciones directas del pH del lumen gástrico en embriones libres de *Acipenser transmontanus*, poniendo de manifiesto que durante la fase de alimentación endógena se produce un descenso en el pH del estómago de 6,9 a 6,4 que, posteriormente durante el transcurso de la fase de alimentación mixta, vuelve a descender (pH 4,3) hasta situarse en torno a un valor similar al de los ejemplares juveniles y adultos (pH 4). Estos hechos determinan que a pesar de la presencia de glándulas gástricas antes del inicio de la alimentación exógena, la actividad péptica en el esturión blanco sólo pueda constatarse a partir del día 36 dpe.

En consonancia con estas observaciones, nuestros resultados indican que, a pesar de la presencia de glándulas gástricas a partir del día 6 dpe y de alimento de origen exógeno en el estómago desde el día 9 dpe, la actividad de la proteasa con pH óptimo de actuación 4,5 no aparece hasta el día 23 dpe. Además, nuestros estudios ultraestructurales ponen de manifiesto que, durante el periodo de embrión libre, aunque en el citoplasma de las células oxíntico-pépticas se ha iniciado el desarrollo de la red túbulo vesicular apical relacionada con la secreción de HCl, aún no existen gránulos de secreción. En cambio, en ejemplares juveniles de 19 dpe las células oxíntico-pépticas presentan una red túbulo-vesicular desarrollada y gran cantidad de gránulos de zimógeno (relacionados con la secreción de pepsina) que descargan en la luz glandular por exocitosis. Por lo tanto y teniendo en cuenta todo lo anterior, podemos sugerir que durante el periodo lecito-exotrófico y el inicio del periodo exotrófico, los ejemplares de *Acipenser naccari* no presentan capacidad digestiva en medio ácido, y la hidrólisis proteica se lleva a cabo mayoritariamente en el intestino, a semejanza de lo que ocurre en los peces agastos. Este último hecho también ha sido descrito en otras especies de

peces teleósteos, como *Symphysodon aequifasciata* (Chong y col. 2002) y *Sparus aurata* (Yúfera y col., 2004).

4. Intestino anterior y medio

Debido al tipo de desarrollo que sufren los embriones de esturión, el intestino es una de las primeras estructuras en formarse (Gisbert y col., 1998). Como comentamos anteriormente, en *Acipenser naccarii* el proceso de diferenciación del intestino comienza alrededor del día 3 dpe, momento en el que gracias a la aparición de un pliegue en la pared del saco vitelino, se puede distinguir un esbozo intestinal. El proceso continúa en los días siguientes hasta que en torno al día 5 dpe se produce un aumento generalizado de la longitud del intestino y se establece una distinción clara entre el intestino anterior y el intestino medio, en base a la orientación de sus pliegues mucosales (siendo transversal en el intestino anterior y oblicua en el intestino medio). En este momento del desarrollo, la organización histológica del intestino es básicamente igual en las diferentes regiones y consiste en un epitelio columnar simple que posee además de células cilíndricas con microvellosidades, células ciliadas y numerosas células caliciformes interpuestas que secretan tanto mucosustancias ácidas como neutras.

Los enterocitos de los embriones de *Acipenser naccarii* de 6 dpe presentan unas características ultraestructurales (microvellosidades apicales, núcleo basal, mitocondrias perinucleares y abundantes inclusiones supranucleares, típicas de aquellos epitelios en donde se produce absorción de nutrientes (Bisbal & Bengston, 1995) por lo que, probablemente, puede inferirse cierto grado de funcionalidad intestinal en este momento de desarrollo. En otras especies de peces, por ejemplo la lubina (*Dicentrarchus labrax*), Deplano y col. (1991) confirmaron que al final del periodo lecitotrófico los enterocitos son funcionales, aunque están poco desarrollados y muestran escasez de retículo

endoplásmico y aparato Golgi, hecho que junto con la presencia de baja cantidad de inclusiones lipídicas indica que la tasa de absorción lipídica es reducida.

Diferentes estudios han puesto de manifiesto que la principal función de los enterocitos de la porción anterior del intestino y los ciegos pilóricos en los peces es la de absorción del componente lipídico de la dieta (Iwai, 1969; Noaillac-Depeyre & Gas, 1974; Ostos- Garrido, y *col.*, 1993, entre otros). La absorción de lípidos en peces se asemeja a la de los mamíferos, ya que, tras la hidrólisis intraluminal de los triglicéridos (principal componente lipídico en las dietas) por el efecto combinado de las sales biliares y la lipasa pancreática, los productos de esta hidrólisis (monoglicéridos y ácidos grasos), son absorbidos por las células epiteliales del intestino mediante un proceso de difusión. Los ácidos grasos de cadena corta o de mediana longitud atraviesan el enterocito y son liberados al torrente sanguíneo; en cambio, los ácidos grasos de cadena larga son reesterificados a nivel del retículo endoplasmático y, posteriormente como pequeñas vacuolas, se liberan en los espacios intercelulares (Vernier & Sire, 1983; Sheridan, 1988).

Comparados con otros peces de agua dulce, las pocas especies de esturión que han sido estudiadas muestran unos altos requerimientos lipídicos (Buddington & Christofferson, 1985) a lo largo de su vida y una composición única en ácidos grasos (Gershanovich, 1991) exhibiendo una actividad lipásica relativamente alta (Buddington & Doroshov, 1986) y una absorción lipídica eficiente (Gawlicka y *col.*, 1995; Gisbert y *col.*, 1999).

A pesar de que nuestras determinaciones enzimáticas sobre la actividad lipásica no son concluyentes, nuestras observaciones histológicas y ultraestructurales coinciden con las de otros autores, quienes correlacionan la masiva acumulación de lípidos en el citoplasma de los enterocitos del intestino

anterior y medio de los esturiones durante el periodo de embrión libre, con altos valores de la actividad lipasa, que a su vez sugieren altos requerimientos lipídicos durante el periodo de embrión libre.

Los lípidos se presentan en el citoplasma de los enterocitos de *Acipenser naccarii* bien como pequeñas partículas lipoproteicas, bien como grandes gotas lipídicas.

Las partículas lipoproteicas se encuentran asociadas con el retículo endoplásmico, el aparato de Golgi y en el interior de pequeñas vacuolas que las transportan hasta las proximidades de la membrana basolateral para su traslado a los espacios intercelulares. En los últimos años, varios autores (Kjorsvik y col.,1991; Segner y col.,1994) han defendido que estas pequeñas partículas pueden ser consideradas como lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) que constituyen las formas de exportación de los ácidos grasos absorbidos por los enterocitos de peces (Sheridan,1988).

Las grandes gotas lipídicas, fundamentalmente formadas por triglicéridos (Ribeiro y col., 1999), constituyen almacenes temporales de ácidos grasos reesterificados que se acumulan durante el periodo de alimentación endógena cuando la tasa de absorción de ácidos grasos excede a la de exportación (Bergot, 1981; Sheridan, 1988). Otros autores relacionan estas inclusiones lipídicas con la incapacidad de los enterocitos para metabolizar adecuadamente los lípidos (Loewe & Eckmann, 1988; Kjorsvik y col., 1991; Gisbert & Doroshov, 2003). En animales adultos, autores como Sire & Vernier (1981) y Deplano y col. (1991), consideran que la formación de las grandes gotas lipídicas en el epitelio intestinal de los embriones de peces está estrechamente relacionada con un exceso de grasa en los enterocitos como consecuencia de la alta concentración de ácidos grasos del alimento.

La abundancia de estas inclusiones lipídicas durante el periodo de alimentación endógena podría explicar la gran resistencia de los embriones libres de esturión frente a largos periodos de inanición (Gisbert y col., 1999).

En el medio natural la base de la dieta para los embriones libres de los Acipenseriformes está constituida por copépodos y cladóceros planctónicos (Baranova & Miroshnichenko, 1969), organismos que contienen unos niveles lipídicos superiores al 56% del peso total (Tessier & Goulden, 1982); la alta actividad lipolítica durante la fase inicial del periodo de alimentación mixta puede representar una adaptación a los altos niveles de lípidos en la dieta (Buddington & Doroshov, 1986).

Tras el establecimiento del estadio juvenil, los requerimientos lipídicos en los Acipenseriformes bajan, utilizándose principalmente la proteína para la obtención de energía (Kaushik y col., 1982). La transición de la alimentación zooplantívora a la bentónica en el esturión blanco durante el final del periodo lecito-exotrófico puede reflejar estos cambios en las necesidades nutricionales (Buddington & Doroshov, 1986). Los invertebrados *bentónicos* constituyen la fracción dominante de la dieta en los juveniles de esturión y poseen unos niveles lipídicos considerablemente inferiores a los observados en los cladóceros y copépodos (Beattie, 1978; González & Aguado, 1981). El descenso en la actividad lipásica parece ser paralelo a un declive en los requerimientos lipídicos y está acompañado por un aumento en el metabolismo proteico conforme los ejemplares de esturión crecen (Buddington & Doroshov 1986; Gawlicka y col., 1995; Gisbert y col., 1999). En *Acipenser naccarii*, alrededor del día 10 después de la eclosión, las inclusiones lipídicas de los enterocitos comienzan a disminuir, hecho que está de acuerdo con lo propuesto para el esturión siberiano, *Acipenser baeri*, (Gisbert y col., 1998) y el esturión verde, *Acipenser medirostris*, (Gisbert & Doroshov, 2003), donde los almacenes de grasa en el intestino desaparecen de forma gradual después de

la transición a la alimentación exclusivamente exógena, primero de los enterocitos y posteriormente de los hepatocitos.

De forma similar a lo que ocurre con la actividad lipásica, los niveles de actividad de la α -amilasa de los embriones libres de esturiones, exhiben un máximo en el momento de la introducción de la alimentación exógena, para posteriormente descender una vez que se adquiere el estadio juvenil (Buddington & Christofferson, 1985). El patrón de variación de la actividad específica de la α -amilasa en los embriones de *Acipenser naccarii* durante los periodos lecito-exotrófico y exotrófico, es idéntico al descrito para otras especies de peces (Zambonino Infante & Cahu, 1994). Antes de la eclosión se detecta un moderado y paulatino incremento de su actividad, pero después no se vuelve a manifestar hasta el día 8 dpe, momento en el que coincidiendo con la introducción de la alimentación exógena se produce un máximo de actividad. Unos días después, la actividad desaparece y no vuelve a mostrarse hasta el mes después de la fecundación (23 dpe), momento en el cual los valores obtenidos son menores a los iniciales.

Esta variación secuencial de los valores de actividad, es característica de los vertebrados en desarrollo y puede ser considerada como una consecuencia del proceso mediante el cual los embriones libres adquieren la estructura y funciones digestivas de los adultos (Buddington & Doroshov, 1986). Indudablemente el aporte de alimento ha tenido que influir en el pico de actividad del día 8 dpe, mediante la inducción de la secreción enzimática por parte del propio pez y mediante el aporte exógeno de enzimas provenientes de la *Artemia* suministrada como alimento. A este respecto existe controversia acerca de la posible contribución de las enzimas exógenos provenientes del alimento vivo a los procesos digestivos del pez. Gawlicka y col.. (2000) estiman aproximadamente la contribución enzimática amilásica por parte de *Artemia* al

total de la actividad en las larvas de Halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) en un 50%.

En los esturiones, al igual que en distintas especies de peces carnívoros, la alimentación en el medio natural suele tener muy bajas cantidades de carbohidratos, hecho que explica porqué los niveles del enzima α -amilasa en el tracto digestivo de los ejemplares adultos son significativamente inferiores a los de la lipasa o a los del conjunto de las proteasas (Buddington & Doroshov, 1986). Por lo tanto, el descenso observado en la actividad específica α -amilasa de *Acipenser naccarii* a partir del día 11 dpe, puede ser debido a la adquisición del estadio juvenil en el que comienza a iniciarse la introducción de la dieta inerte en donde la concentración de hidratos de carbono se adecua a las bajas necesidades nutricionales de los animales. La estabilización posterior de los niveles enzimáticos hacia el día 23 dpe en valores inferiores a los iniciales permite suponer que aunque la actividad amilásica de *Acipenser naccarii* en este momento es baja, es suficiente como para aprovechar la cantidad de carbohidratos disponibles en el alimento.

Como consecuencia del sentido postero-anterior del desarrollo del tracto gastrointestinal en los esturiones (Gisbert & Doroshov, 2003), las células caliciformes intestinales en *Acipenser naccarii* aparecen primero en el intestino medio (en torno al día 6 dpe) y después en el intestino anterior o pilórico (alrededor del día 7 dpe), especializándose en la secreción de mucosustancias neutras y ácidas tanto del tipo de las sialomucinas como de las sulfomucinas. Esta composición en mucopolisacáridos también ha sido observada en otros integrantes del grupo de los Acipenseriformes, como el esturión siberiano *Acipenser baeri* (Gisbert y col., 1998, 1999) y el esturión verde *Acipenser medirostris* (Gisbert & Doroshov, 2003) y está de acuerdo con lo propuesto por distintos autores como Murray y col. (1996) y Domeneghini y col. (1998) que,

para diferentes especies de teleósteos, describen la presencia de células caliciformes productoras tanto de mucosustancias neutras como ácidas.

Tibbetts en 1997 describió en el grupo de los Hemirrámidos un patrón de secreción de glicoconjugados similar al observado en *Acipenser naccarii* y sugirió que las mucosustancias intestinales neutras por un lado ofrecerían una protección local frente al ataque de enzimas digestivos y, por otro ayudarían al establecimiento de un flujo laminar en el intestino, para facilitar el paso de las sulfomucinas intestinales (y los nutrientes hidrosolubles que transportan en su seno) hacia las regiones posteriores, donde son absorbidos (Clamp, 1997).

5. Ciegos pilóricos

El desarrollo de los ciegos pilóricos constituye el último cambio importante en el proceso de diferenciación del intestino y marca el momento en el que los embriones entran en el estadio juvenil (Hamlin y col., 2000). En *Acipenser naccarii*, los ciegos pilóricos inician su formación hacia el día 6 dpe, a partir de una evaginación del intestino pilórico en la zona de unión con el estómago (esfínter pilórico) y alrededor del inicio del periodo lecito-exotrófico están completamente formados. De lo anterior puede inferirse un alto grado de especialización y funcionalidad del sistema digestivo en los embriones de esturión, en el momento del inicio de la alimentación exógena (Buddington & Doroshov, 1985).

La compleja estructura interna de los ciegos pilóricos de los peces, llevó a diferentes autores a sugerir que su presencia supone un aumento de la superficie intestinal que conlleva un incremento del tiempo de tránsito para algunos sustratos alimentarios (Kapoor y col., 1975; Fange & Grove, 1978). Además, teniendo en cuenta que el conducto biliar desemboca en las proximidades de este compartimento digestivo y el alto grado de plegamiento

de la mucosa intestinal a este nivel, Gawlicka y col. (1995) sugirieron que los ciegos pilóricos pueden facilitar la mezcla del quimo tanto con las secreciones hepáticas y pancreáticas como con el mucus secretado por las células mucosas.

En los esturiones las tasas de absorción de nutrientes más altas se dan en el intestino anterior y la válvula espiral (Buddington & Diamond, 1985), no existiendo datos concretos para los ciegos pilóricos. A pesar de lo anterior, las características ultraestructurales de los enterocitos de *Acipenser naccarii* a este nivel, los relacionan con la absorción de lípidos y carbohidratos, aunque su papel concreto no es claro y necesita para su esclarecimiento de un mayor número de investigaciones.

Velandia-Romero (1997), constató la absorción de prolina y glucosa (por mg o cm²) en la membrana de las microvellosidades de los enterocitos a nivel de los ciegos pilóricos de cuatro especies de teleósteos con diferentes hábitos alimentarios, poniendo de manifiesto la relación de este compartimento digestivo con la absorción de carbohidratos. Gawlicka y col. (1995) analizan las características histo-enzimáticas del esturión blanco *Acipenser transmontanus* durante su desarrollo, observando en el intestino pilórico alta actividad enzimática para la α y β galactosidasas, enzimas asociados a la membrana apical de los enterocitos.

6. Intestino Posterior o Válvula espiral

Los Condríctios, Condrósteos, Holósteos y algunos Teleósteos presentan en su intestino una estructura denominada válvula espiral que constituye una adaptación anatómica para aumentar la superficie de absorción.

En *Acipenser naccarii*, al igual que en el resto de representantes de los Acipenseriformes (Buddington & Doroshov, 1985, Gawlicka y col., 1995, Gisbert y col., 1998, 1999, Gisbert & Doroshov, 2003), la válvula espiral es la primera estructura digestiva en desarrollarse, debido a que durante el periodo de alimentación endógena, el proceso de diferenciación intestinal progresa en dirección postero-anterior (Detlaff y col., 1993). La diferenciación de la válvula espiral es completa hacia el día 2-3 dpe, momento en el que las características histológicas, histoquímicas y ultraestructurales de los enterocitos sugieren un alto grado de funcionalidad (Gisbert y col., 1998).

En *Acipenser naccarii* las células caliciformes, que pueden ser observadas en el epitelio de la válvula espiral por primera vez hacia el día 3 dpe, se caracterizan inicialmente por la producción de mucosustancias ácidas, tanto carboxiladas como sulfatadas, pero al final del periodo de embrión libre, secretan una mezcla de mucosustancias neutro-ácidas. Esta variación en la producción de mucosustancias puede ser atribuida a cambios en los requerimientos nutritivos o en los hábitos alimentarios de los embriones libres (Domeneghini y col., 1998).

Durante la primera parte del periodo lecitotrófico, el interior de la válvula espiral de *Acipenser naccarii* está lleno de gran cantidad de vitelo, que irá siendo consumido conforme el animal se desarrolla. Gisbert y col., (1998) determinaron que en el esturión siberiano y como consecuencia de la utilización de las reservas vitelinas, se produce la acumulación de un subproducto, la melanina, en la luz de la porción final de la válvula espiral, hecho que fue posteriormente ratificado por Gisbert & Sarasquete (2000). El depósito continuado de gránulos de melanina conlleva la formación de una masa (denominada tapón de melanina), que termina por ocupar toda la luz de la porción posterior de la válvula espiral. En *Acipenser naccarii* el tapón de melanina aparece hacia el día 5 dpe y se mantiene hasta el día 9 dpe.

Uno de los más importantes aspectos en la cría comercial de peces para la acuicultura es la determinación del momento exacto para iniciar la alimentación exógena. Se considera este periodo como uno de los momentos más críticos durante el desarrollo de los peces, ya que retrasos en la disponibilidad de alimento pueden conducir a un descenso en la tasa de crecimiento y de supervivencia. Gisbert & Williot (1997) apuntaron que el momento de la primera alimentación exógena para los embriones libres de esturión siberiano *Acipenser baeri*, está relacionado con la expulsión del tapón de melanina. Nuestros estudios histológicos ponen de manifiesto la presencia simultánea de partículas de alimento de origen exógeno y del tapón de melanina en el canal alimentario, confirmándose que la expulsión del tapón se produce justo después de la alimentación exógena. De acuerdo con lo anterior, la expulsión del tapón de melanina no parece ser un criterio visual adecuado para seleccionar el momento adecuado de introducción de la alimentación exógena en el esturión del Adriático (*Acipenser naccarii*).

En la región porción posterior del intestino de los peces se produce la absorción de las proteínas de los peces (Deplano y col., 1991). Estos mismos autores señalan que esta región recibe diferentes nombres (intestino medio o intestino distal) dependiendo del autor o de los criterios morfológicos específicos que se utilicen (número de segmentos intestinales y presencia o no de válvula). En el esturión *Acipenser naccarii* se denomina válvula espiral (Boglione y col., 1999).

Nuestros resultados concuerdan con las observaciones de Gawlicka y col. (1995), quienes afirmaron que una de las principales características de los enterocitos de la válvula espiral en el esturión blanco durante el proceso de desarrollo, es la aparición de una gran cantidad de gránulos acidófilos debidos a la acumulación de proteínas que se asimilan por procesos de pinocitosis. Esta absorción de proteínas por pinocitosis, también ha sido observada en

otras especies de esturión: *Acipenser transmontanus* (Buddington & Christofferson, 1985; Buddington & Doroshov, 1986; Gawlicka y col., 1995), *Acipenser baerii* (Gisbert y col., 1998; 1999) y *Acipenser medirostris* (Gisbert & Doroshov, 2003), y en teleósteos como por ejemplo *Clarias lacera* (Stroband & Kroon, 1981), *Barbus conchoniensis* (Rombout y col., 1984) y *Hypomesus transpacificus nipponensis* (Watanabe, 1984). Nuestras observaciones ultraestructurales están en consonancia con lo propuesto por Sire & Vernier (1981), quienes destacaron la presencia de profundas invaginaciones entre las microvellosidades apicales de los enterocitos del intestino distal en peces, así como gran número de vesículas y vacuolas en su citoplasma apical. La implicación de estas estructuras en la captura y posterior degradación de proteínas intactas ha sido puesta de manifiesto a través de diferentes estudios histoquímicos (Watanabe 1982, 1984 a; Bogé y col. 1982; Ferraris & Ahearn 1984; Storelli y col. 1989; Balocco y col. 1993; Buddington & Diamond, 1987; Collie & Ferraris 1995;).

El proceso de absorción de proteínas nativas en el intestino posterior de los peces se inicia con la adsorción de las proteínas al borde en cepillo de los enterocitos del intestino distal. Posteriormente, se produce una invaginación de la membrana plasmática y la consiguiente formación de una vesícula pinocítica que, a nivel del citoplasma apical, puede fusionarse con otras vesículas pinocíticas (Govoni y col. 1986). La fusión continuada de diferentes vesículas pinocíticas ocasiona la formación de una o más vacuolas supranucleares (Noaillac-Depeyre & Gas, 1979; Stroband & Kroon 1981). Las vesículas pinocíticas pueden también combinarse con lisosomas primarios y formar lisosomas secundarios, compartimento en el cual las proteínas son degradadas (Watanabe 1981, 1982, 1984 a, 1984 b).

Georgopoulou & Vernier (1986) en la trucha arco-iris *Oncorhynchus mykiss* e Iida & Yamamoto (1986) en *Carassius sp.*, demostraron la presencia de

actividad para la fosfatasa ácida y otros enzimas en el sistema vacuolar de los enterocitos. Las principales proteasas lisosomales descritas en peces son dos, catepsina D y catepsina B.

La catepsina D es una endopeptidasa cuya acción es comparable a la de la tripsina, que juega un importante papel en la degradación preliminar de las proteínas exógenas absorbidas. Ha sido localizada por inmunofluorescencia e inmunohistoquímica, no sólo en el sistema vacuolar, sino también en los lisosomas primarios.

El papel esencial de la catepsina B es el de una dipeptidil-carboxipeptidasa, aunque también puede actuar como una endopeptidasa. Este enzima puede ser localizado por fluorescencia en el sistema vacuolar. Vemos así que las dos catepsinas tienen funciones complementarias, la catepsina B termina la hidrólisis iniciada por la catepsina D.

La detección de la actividad de la fosfatasa ácida en la vacuolas donde las proteínas exógenas son segregadas, en diferentes especies de esturiones (Buddington & Doroshov, 1986; Gawlicka y col., 1995; Gisbert y col., 1999) y peces teleósteos (Díaz y col., 1997; Baglolle y col., 1998; Ribeiro y col., 1999; Kim y col., 2001; Cara y col., 2003) así como la localización de las dos catepsinas B y D en las mismas estructuras, lleva a la conclusión que las características vacuolas de los enterocitos de la válvula espiral de los embriones de *Acipenser naccarii* son fago-lisosomas, ya que contienen tanto el substrato exógeno como los enzimas líticos encargados de degradarlo.

Como acabamos de comentar, es clara la presencia de un mecanismo de absorción de proteínas no hidrolizadas en el intestino posterior de *Acipenser naccarii*, sin embargo, el significado fisiológico de esta absorción en el metabolismo del animal sigue sin estar demasiado claro. En una revisión

realizada por McLean & Ash (1987), se proponen varias hipótesis para explicar el posible papel de este mecanismo de absorción.

Una de ellas supone que la absorción de proteínas intactas puede tener importancia cuando la secreción de enzimas digestivos es insuficiente para cubrir las necesidades energéticas (Stroband & van der Veen, 1981). Este hecho es de vital importancia durante las primeras fases del desarrollo de los peces, donde debido al insuficiente desarrollo del sistema digestivo, la capacidad de secreción enzimática es limitada y el metabolismo proteico se lleva a cabo de forma mayoritaria en el interior de los enterocitos de la porción intestinal más caudal. Nuestros resultados ultraestructurales y las medidas de actividad enzimática ponen de manifiesto la baja capacidad de digestión luminal del alimento en los embriones libres de *Acipenser naccarii* durante el periodo lecito-exotrófico. Por lo tanto, la observación de vesículas supranucleares con contenido proteico en el epitelio de la válvula espiral durante el final de la fase de alimentación mixta podría tener una clara relación con la digestión intracelular de proteínas. Ezeasor & Stokoe (1981) sugirieron que la habilidad de absorber proteínas intactas en el estadio adulto de los peces, puede proveer de un mecanismo que asegure una máxima absorción de proteínas en el intestino; así, la digestión intracelular de las proteínas absorbidas podría incrementar la capacidad normal de digestión del canal alimentario. Sin embargo, recientes evidencias cuantitativas sugieren que aunque lo anterior puede ser importante a nivel nutricional para el enterocito, la cantidad total de proteínas intactas absorbidas no tiene gran importancia en los peces adultos con estómago (McLean & Ash, 1987).

Otros autores como Hofer & Schiemer (1981) proponen que la capacidad de absorber proteínas intactas desde el intestino, debe estar relacionada con la reabsorción de proteasas endógenas. Aunque esta otra hipótesis se apoya en estudios que demuestran la absorción de tripsina en los enterocitos y su

posterior paso al torrente sanguíneo (McLean & Ash, 1987), evidencias experimentales más recientes indican que en realidad, los enzimas digestivos endógenos se unen de manera reversible al glicocálix de los enterocitos donde vuelven a ejercer su función (Pedersen & Hjelmeland, 1988).

Finalmente, Davina *y col.* (1982) atribuyen a los mecanismos de pinocitosis observados en los enterocitos de la porción intestinal distal, un carácter inmunológico.

7. HÍGADO

Según Buddington & Diamond (1985), en los acipenséridos el hígado es una de las primeras estructuras en desarrollarse, ya que está implicado en el proceso de reabsorción del saco vitelino. En *Acipenser naccarii*, el rudimento hepático aparece inmediatamente después de la eclosión y se sitúa dorsalmente al saco vitelino en cambio, en los estudios previos realizados por Boglione *y col.* (1999) en esta misma especie, las primeras células hepáticas aparecen en el momento de la eclosión.

En *Acipenser naccarii*, inicialmente las células hepáticas presentan un aspecto indiferenciado y poseen una organización espacial irregular. En el momento de la primera alimentación exógena, las células hepáticas adoptan de forma paulatina la típica morfología poligonal observada en los ejemplares juveniles y adultos, con el núcleo localizado en posición central y el citoplasma ocupado por abundantes inclusiones de gran tamaño entre las que se disponen las partículas de glucógeno. Tanto la vacuolización lipídica como la densidad de los gránulos de glucógeno en los hepatocitos, aumenta con el desarrollo, especialmente durante la fase de alimentación exógena. Gisbert & Doroshov (2003) observaron que estas vacuolas desaparecían en ejemplares de esturión verde sometidos a ayuno en los mismos estadios de desarrollo, por

lo que concluyeron que el contenido de estas vacuolas es principalmente lipídico.

8. PÁNCREAS

El páncreas de los Condrósteos es un órgano difuso constituido por diferentes islas de tejido secretor que se distribuyen en distintos órganos de la cavidad corporal, pero particularmente en el hígado y en el bazo (Buddington & Christofferson, 1985). Las secreciones enzimáticas procedentes del tejido pancreático son recogidas en un conducto común que se une al conducto biliar para desembocar en las proximidades de los ciegos pilóricos (Gisbert & Doroshov, 2003).

Aunque existe cierta variabilidad entre las distintas especies de esturión en el momento de aparición de las primeras células con características pancreáticas, 2 para *Acipenser baeri* (Gisbert y col., 1998) y 3 para *Acipenser medirostris* (Gisbert & Doroshov, 2003), el páncreas exocrino, como hemos observado en *Acipenser nacarii*, es claramente visible hasta el final del periodo de alimentación endógena. En este momento del desarrollo, sus células poseen las características citológicas, citoquímicas y ultraestructurales descritas para los ejemplares juveniles y adultos.

En los esturiones, como en el resto de las especies de peces, el páncreas es la principal fuente de enzimas digestivos, por lo que su grado de funcionalidad durante la ontogenia determinará la capacidad de hidrólisis del alimento a lo largo de los diferentes periodos del desarrollo.

A lo largo del desarrollo ontogénico de los esturiones el complemento enzimático exhibe una serie de cambios relacionados tanto con la edad de los animales, como con sus hábitos alimentarios (Buddington & Christofferson,

1985). Por lo tanto, podemos definir tres etapas en el desarrollo de las capacidades digestivas de *Acipenser naccarii* que, al igual que en las demás especies de esturión, se corresponden con los diferentes acontecimientos que tienen lugar a lo largo de la ontogenia (Detlaff y col., 1993).

En *Acipenser naccarii* durante el periodo lecitotrófico, cuando aún existe una gran cantidad de vitelo, sólo se detectan actividades enzimáticas digestivas proteásicas neutras y alcalinas, poniendo de manifiesto la importancia de los segmentos intestinales en la digestión durante dicho periodo. Gisbert y col. (1999) apuntaron un hecho similar en el esturión siberiano *Acipenser baeri* y señalaron la importancia de los enzimas de membrana del endodermo del saco vitelino y de los enterocitos de la válvula espiral en la digestión del vitelo. Además en ninguna de las especies de esturión estudiadas (incluida *Acipenser naccarii*), existe función gástrica ni pancreática, ya que ni el estómago ni el páncreas están aún diferenciados. Lo anterior junto con la observación de gránulos de vitelo en el interior de vacuolas de las células epiteliales que componen el sistema digestivo en el esturión blanco (Buddington, 1983) y otros Acipenséridos (Gisbert y col., 1998, 1999; Gisbert & Doroshov, 2003), indica que los animales utilizan la pinocitosis y los procesos de digestión intracelular como procesos digestivos prioritarios.

Quando se inicia la alimentación exógena (periodo lecito-exotrófico), el tejido pancreático exocrino en *Acipenser naccarii* está completamente diferenciado y en el interior de sus células podemos observar gránulos de zimógeno, dato que al igual que en el resto de las especies de esturión estudiadas (Buddington & Doroshov, 1986; Gawlicka y col., 1995; Gisbert y col., 1999), coincide con un aumento generalizado tanto en el grado de actividad como en la diversidad de enzimas digestivos. Otros autores señalan la influencia del aporte enzimático que supone el alimento exógeno, en torno al 8,4% para las larvas de Halibut (Gawlicka y col., 2000); por lo que no podemos

desdeñar que, al igual que en el caso de la α -amilasa, el aporte de alimento exógeno intervenga en el incremento de los valores de actividad proteásica de *Acipenser naccarii* al inicio del periodo Lecito-Exotrófico.

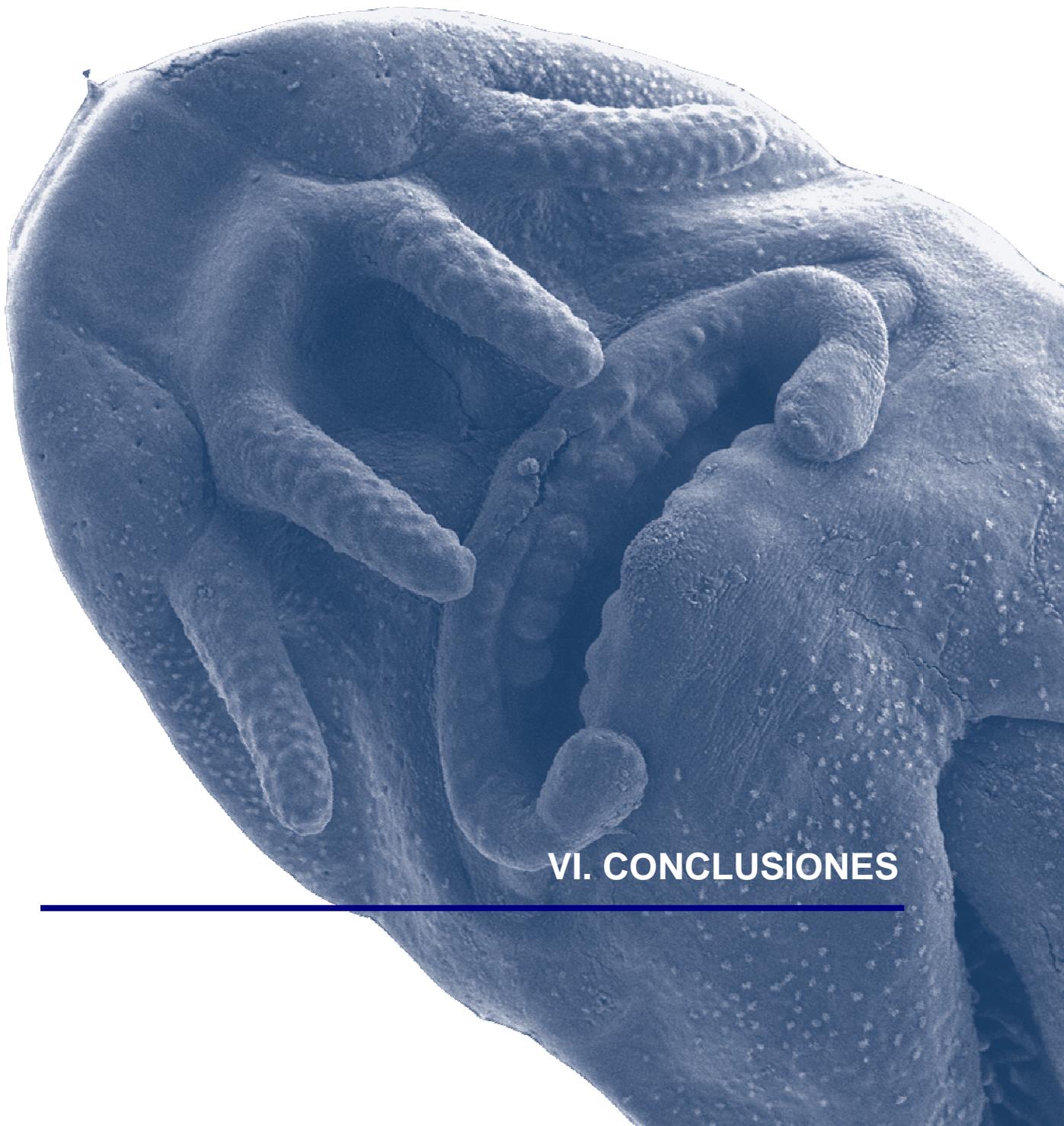
El patrón de evolución de las actividades enzimáticas digestivas en el esturión *Acipenser naccarii* tras la reabsorción del saco vitelino, ha sido también descrito por otros autores en diferentes especies de esturiones (Buddington & Doroshov, 1986; Gawlicka y col., 1995; Gisbert y col., 1999) y teleósteos (Zambonino Infante & Cahu, 1994; Martínez y col., 1999; Moyano y col., 1996; Cuvier-Péres & Kestemont, 2002). Nuestros resultados indican que una vez iniciada la alimentación exógena, se pone de manifiesto una disminución en los valores de las actividades enzimáticas digestivas que incluso llegan a no ser detectables en los días posteriores para, posteriormente, en nuestro caso hacia el día 23 dpe, volver a aumentar manteniéndose en unos valores inferiores más estables. Algunos autores atribuyen este hecho a un aumento de la proteína total en el animal como consecuencia del desarrollo, debido a que la actividad enzimática específica se expresa en relación de la cantidad de proteína (Moyano y col. 1996).

La actividad específica de las proteasas alcalinas muestra una tendencia clara de disminución desde unos valores altos antes del inicio de la alimentación exógena a otros menores en los ejemplares juveniles. Este hecho puede ser debido al desarrollo completo de la función gástrica en los juveniles representa un cambio en el mecanismo de digestión proteica, que ve suplementada la acción de la tripsina y la quimiotripsina por la de la pepsina (Gawlicka y col. 1995).

El tercer intervalo (periodo exotrófico) se inicia en el momento en el cual se produce un descenso de las actividades α -amilásicas y lipasa, mientras que las proteasas mantienen su grado de actividad (Buddington & Christofferson,

1985). Nuestros resultados indican que a partir de los 23 días después de la eclosión, se produce una estabilización de las actividades enzimáticas digestivas amilásicas y proteásicas, indicando la presencia de una maquinaria digestiva desarrollada. La secreción de proteasas alcalinas y su estabilización en los días que siguen al mes post-fecundación, indicaría una función digestiva pancreática e intestinal estable. Según Detlaff *y col.* (1993) y Gawlicka *y col.* (1995), en este momento las diferentes especies de esturión presentan complementos enzimáticos muy similares a los de los ejemplares adultos. .

El predominio de las actividades proteásicas frente a la α -amilásica durante el proceso de diferenciación del tracto digestivo en el esturión *Acipenser naccarii*, así como en el esturión blanco (Buddington & Doroshov, 1986) y otras especies omnívoras (Fish, 1955) e incluso herbívoras (Nagase, 1964), sugiere una adaptación a los altos niveles proteicos y los bajos niveles de carbohidratos en la dieta. Los resultados de este estudio junto con las observaciones en otros esturiones durante fases de desarrollo similares (Buddington & Doroshov, 1986; Gawlicka *y col.*, 1995), indican una alta actividad digestiva en el canal alimentario post-gástrico, particularmente en la válvula espiral, donde la baja tasa de movimiento del quimo puede, además, permitir un alto grado de hidrólisis enzimática, con la consiguiente liberación de nutrientes.



VI. CONCLUSIONES

- 1- Desde el punto de vista anatómico e histológico, el desarrollo del sistema digestivo en *Acipenser naccarii* tiene lugar de forma asincrónica y procede desde la porción distal a la proximal, siendo la válvula espiral la primera estructura en desarrollarse y el estómago glandular la última.
- 2- Las actividades enzimáticas digestivas investigadas (α -Amilasa y proteásicas), antes de la eclosión, se relacionan con la ruptura de la cubierta embrionaria, mientras que durante el resto del periodo lecitotrófico, actúan en la digestión de los componentes del vitelo.
- 3- Durante el periodo de alimentación endógena, la digestión del componente lipídico del vitelo se produce tanto en el intestino anterior como en la válvula espiral, mientras que en fases posteriores del desarrollo es el intestino el que asume dicha función.
- 4- La válvula espiral constituye una adaptación del tracto intestinal que permite aumentar la superficie de absorción y, durante las fases finales del desarrollo, se especializa en la captación de proteínas por pinocitosis.
- 5- Las células caliciformes presentes en el epitelio de la válvula espiral producen inicialmente mucosustancias ácidas pero, anticipándose al completo desarrollo morfo-funcional del órgano, que se produce con la expulsión del tapón de melanina, segregan igualmente mucosustancias neutras, que juegan un importante papel de protección y lubricación.

- 6- Al final del periodo de alimentación endógena, coincidiendo con la aparición de la red túbulo-vesicular en las células oxíntico-pépticas, las células mucosas del epitelio gástrico se especializan en la producción de mucosustancias neutras.

- 7- La observación de gránulos de zimógeno únicamente en las células glandulares gástricas de individuos de *Acipenser naccarii* de más de 19 días post-eclosión, indica que la digestión ácida del alimento no está asegurada en los individuos que inician la alimentación exógena. El patrón de actividad de la proteasa con pH óptimo de actuación 4'5 corrobora esta afirmación.

- 8- La transición a la alimentación exógena coincide con un aumento en la capacidad digestiva total de los embriones libres de *Acipenser naccarii*. Debido a la ausencia de gránulos de secreción de zimógeno en las glándulas gástricas, el incremento de actividad proteásica ácida detectado en este momento del desarrollo, debe tener un origen exógeno. El aumento en las actividades α -Amilasa y proteásicas, se relaciona con la presencia de un páncreas funcional aunque no podemos descartar la influencia del alimento exógeno.

- 9- Transcurrido un mes desde de la fecundación, en *Acipenser naccarii*, los valores de las actividades enzimáticas digestivas α -amilásica y proteásicas se estabilizan, hecho que junto con las características histológicas, histoquímicas y ultraestructurales del tracto gastrointestinal, indica la adquisición de un sistema digestivo funcionalmente desarrollado, propio del estadio juvenil.



VII. BIBLIOGRAFÍA

1. Abaurrea-Equisoain, M.A. & Ostos-Garrido, M.V.; 1996. Cell types in the Esophageal Epithelium of *Anguilla anguilla* (Pisces, Teleostei). Cytochemical and Ultrastructural Characteristics. *Microm.* **Vol. 27**, No. 6, pp. 419-429.
2. Abellán, E.; 2000. Reproducción en peces teleósteos. Estrategias reproductivas e influencias de los factores ambientales en los ciclos reproductivos. En *Acuicultura I: Biología marina. Reproducción y desarrollo*. Eds. Zamora, S.; Agulleiro, B. y García Hernández, M. Servicio de Publicaciones de la Universidad de Murcia. Universidad Internacional del Mar. 447 pp.
3. Abelli, L., Picchiatti, S., Romano, N., Mastrolia, L. and Scapigliati, G.; 1997. Immunohistochemistry of gut-associated lymphoid tissue of the sea bass *Dicentrarchus labrax* (L.). *Fish & Shellfish Immunology* (1997) **7**, 235–245.
4. Ahearn, G.A., Behnke, R.D., Zonno, V. & Storelli, C.; 1992. Kinetic heterogeneity of Na-D-glucose cotransport in teleost gastrointestinal tract. *Am. J. Physiol.*, **263**, R1018–R1023.
5. Alarcón, F.J., Díaz, M., Moyano, F.J. and Abellán, E.; 1998. Characterization and functional properties of digestive proteases in two sparids; gilthead seabream (*Sparus aurata*) and common dentex (*Dentex dentex*). *Fish Physiology and Biochemistry* **19**: 257–267, 1998.
6. Alarcón, F.J., Martínez, T.F., Díaz, M. & Moyano, F.J., (2001). Characterization of digestive carbohydrase activity in the gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Hydrobiologia*, **445**, 199-204.
7. Albrecht, M. P.; Ferreira, M. F.; Caramaschi, E. P.; 2001. Anatomical features and histology of the digestive tract of two related neotropical omnivorous fishes (Characiformes; Anostomidae). *Journal of Fish Biology*, Vol. **58**(2), pp. 419-430.

8. Aldman, G. & Holmgren, S.; 1987. Control of glabular motility in the rainbow trout *Salmo gairdneri*. *Fish Physiology and Biochemistry*. **4**: 143-55.
9. Alev, Yu. G., 1963. *Function and Gross Morphology in Fish*. Moscow: Academy of Science USSR. (Translation: IPST, Jerusalem 1969.)
10. Anderson, T. F.; 1951. Techniques for the preservation of threedimensional structure in preparing specimens for the electron microscope. *Tran. N.Y. Acad. Sci.* **13**:130-133.
11. Andrews, P.L.R. & Young, J.Z.; 1993. Gastric-motility patterns for digestion and vomiting evoked by sympathetic nerve stimulation a 5-hydroxytryptamine in the dogfish *Scyliorhinus canicula*. *Philosophical transactions of the Royal Society of London, Series B* **342**, 363-380.
12. Aquatic Pathobiology Center, Virginia-Maryland Regional College of Veterinary Medicine. <http://aquaticpath.umd.edu>.
13. Arellano, J.M.; 1995. Contribución a la histología, histoquímica e histopatología de la dorada (*Sparus aurata*, L.). Tesis de Licenciatura. Univ. Cádiz.
14. Arnason, U.; Gullberg, A & Janke, A.; 2001. Molecular phylogenetics of gnathostomous (jawed) fishes: old bones, new cartilage. *Zoologica Scripta*, **30**, 4, pp.249–255.
15. Baglolle, C.J.; Murray, H.M.; Goff, G.P. y Wright, G.M.; 1997. Ontogeny of the digestive tract during development of yellow flounder: a light and microscopic and mucous histochemical study. *Journal of Fish Biology* **51**, 120-134.
16. Balinski, B.I.; 1983. Introducción a la embriología. Editorial Omega. 727 pp.
17. Balocco, C., Bogé, G. and Roche, H. 1993. Neutral amino acid transport by marine fish intestine: role of the side chain. *J. Comp. Physiol. B* **163**: 340–347.

18. Balon, E. K.; 1975). Terminology of intervals in fish development. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* **32**, 1663–1670.
19. Balon, E.K.; 1999. Alternative ways to become a juvenile or a definitive phenotype (and on some persisting linguistic offenses). *Environmental Biology of Fishes* **56**:17-38.
20. Baranova, V.P. & Miroshnichenko, M.P.; 1969. Conditions and prospects for culturing sturgeon fry in the Volgograd sturgeon nursery. *Hydrobiol. J.* **5**: 63-67.
21. Barka, T. & Anderson, P.J.; 1962. Histochemical methods for acid phosphatase using hexazonium pararosanalin as coupler. *J. Histochem. Cytochem.* **10**:741-53, 1962.
22. Beattie, D.M.; 1978. Life-cycle and changes in carbohydrates, proteins and lipids of *Pentapedilum uncinatum* Goet. (Diptera: Chironomidae). *Freshwater Biol.* **8**, 109-113.
23. Bemis, W.E.; Findeis, E.K. & Grande, L.; 1997. An overview of Acipenseriformes. *Env. Biol. Fish.* **48**: 25-71.
24. Benton, 2004. *Vertebrate Palaeontology* (Third edition). University of Bristol.
25. Bergot, P. & Fléchon, J.E.; 1970. Forme et voie d'absorption intestinale des acides gras chez la truite arc-en-ciel (*Salmo gairdneri* Rich.). I. Lipides en particules. *Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys.* **10**: 459–472.
26. Billard, R. & Lecointre, G.; 2001. Biology and conservation of sturgeon and paddlefish. *Reviews in fish Biology and Fisheries*, **10**: 355-392.
27. Bisbal, G.A. & Bengston, D.A.; 1995. Development of the digestive tract in larval summer flounder. *Journal of Fish Biology.*, **47**, 227-291.
28. Bogé, G; Rigal, A. & Péres, G. The use of intestinal brush border membrane vesicles for comparative studies of glucose and 2-amino isobutyric acid transport by four species of marine teleost. *Comparative Biochemical and physiology* Vol. **72A**, (1982); p. 85-89.

29. Boglione, C.; Bronzi, P.; Cataldi, E.; Serra, S.; Gagliardi, F. and Cataudella, S.; 1999. Aspects of early development in the Adriatic sturgeon, *Acipenser naccarii*. *J. Appl. Ichthyol.* **15**: 207-213.
30. Boulhic, M. & Gabaudan, J.; 1992. Histological study of the organogenesis of the digestive system and swim bladder of the Dover Sole, *Solea solea* L. *Aquaculture* **102**, 373-396.
31. Brannon, E., Brewer, S., Melby, C.; 1983. "Columbia River White Sturgeon (*Acipenser transmontanus*) Enhancement", Project No. 1983-31600, 52 electronic pages, (BPA Report DOE/BP-363).
32. Bruno, S. & Maugeri, S. *Peces de agua dulce de Europa*. Barcelona: Ediciones Omega, 1995.
33. Buddington & Christofferson, 1985. Digestive and feeding characteristics of the chondrosteans. *Environmental Biology of Fishes*, Vol. **14**, No.1 pp.31-41.
34. Buddington, R.K. & Diamond, J.M.; 1987. Pyloric ceca of fish: a "new" absorptive organ. *American Journal of Physiology* **252**, 665-676.
35. Buddington, R.K.; 1991. Ontogenic development of sturgeons: selected physiological examples. Pp. 53-62. En *Acipenser*, P. Williot (ed), CEMAGREF Publ.
36. Buddington, R.K.; Krogdahl, A. & Bakke-McKellep, A.M.; 1997. The intestines of carnivorous fish: structure and functions and the relations with diet. *Acta Physiologica Scandinavica* **161**, 67-80.
37. Buddington, Randal K. and Doroshov, Serge I., 1986. Structural and functional relations of the white sturgeon alimentary canal (*Acipenser transmontanus*). *Journal of morphology*, **190**: 201-213.
38. Caceci, T. Scanning electron microscopy of goldfish *Carassius auratus* intestinal mucosa. *Journal of Fish Biology*. Vol. **25**, (1984); p. 1-12.
39. Cahu, C. & Zambonino Infante, J.; 2001. Substitution of live food by formulated diets in marine fish larvae. *Aquaculture* **200**:161–180.

-
40. Calzada, A.; Medina, A.; González de Canales, M.L.; 1998. Fine structure of the intestine development in cultured sea bream larvae. *Journal of Fish Biology*, **53**: 340-365.
 41. Campbell, J.A.; 2004. Comparative Vertebrate Anatomy. Digestive System. <http://www.uta.edu/biology/restricted/3452dig.htm> .
 42. Cara, J.B.; Moyano, F.J.; Cárdenas, S.; Fernández-Díaz, C.; Yúfera, M.; 2003. Assessment of digestive enzyme activities during larval development of white bream. *Journal of Fish Biology* **63**, 48–58.
 43. Carrato, A. & Fernández, B.; 1987. Organografía microscópica animal. Editorial Alhambra, 253 pp.
 44. Cataldi, E., Albano, C., Boglione, C., Dini, L., Monaco, P. and Cataudella, S.; 2002. *Acipenser naccarii*: fine structure of the alimentary canal with references to its ontogenesis. *J. Appl. Ichthyol.* **18** (2002), 329-337.
 45. Cataldi, E., Ciccotti, E., Di Marco, P., Di Santo, O. y Cataudella, S., 1995. Acclimation trials of juvenile Italian sturgeon to different salinities: morpho-physiological descriptors. *Journal of Fish Biology*, **47**, 609-618.
 46. Chong, A., Hasim, R., Lee, L.C., Ali, A.; 2002. Characterization of protease activity in developing discus *Symphysodon aequifasciata* larva. *Aquaculture research* 2002, **33**, 663-672.
 47. Clamp, J.; 1977. Mucus in health and disease. In *Mucus in Health and Disease* (Elstein, M. & Parke, D. V., eds), pp. 1–15. New York: Plenum Press.
 48. Clemen, G. & Greven, H.; 1994. The buccal cavity of larval and metamorphosed *Salamandra salamandra*: structural and developmental aspects. *Mertensiella* **4**, 83–109.
 49. Collie, N.L. & Ferraris, R.P. 1995. Nutrient fluxes and regulation in fish intestine. In: *Metabolic Biochemistry*. pp. 221–239. Edited by P.W. Hochachka and T.P. Mommsen. Elsevier Science B.V., Amsterdam.

50. Collie, N.L. 1985. Intestinal nutrient transport in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) and the effects of development, starvation, and seawater adaption. *J. Comp. Physiol. B* **156**: 163–174.
51. Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Flora and Fauna, 2005. www.cites.org.
52. Cousin, J. C. B. & Baudin-Laurencin, F.; 1985. Morphogenese de l'appareil digestif et de la vessie gazeuse du turbot, *Scophthalmus maximus* L. *Aquaculture* **47**, 305–319.
53. Creac'h, P.V.; 1963. Les enzymes protéolytiques des poissons. *Ann. Nutr. Aliment.*, **17**: A375-A471.
54. Crespo, S.; Marín de Mateo, M.; Santamaría, C.A.; Sala, R.; Grau, A.; 2001. Histopathological observations during larval rearing of common dentex *Dentex dentex* L. (Sparidae). *Aquaculture* **192**, 121-132.
55. Cuvier-Péres, A. & Kestemont, P.; 2001. Development of some digestive enzymes in Eurasian perch larvae *Perca fluviatilis* *Fish Physiology and Biochemistry* **24**: 279–285, 2002.
56. Dabrowski K. (1982) Proteolytic enzyme activity decline in starving fish. *Enviromental Biology of Fishes* **7**, 73 -76.
57. Dabrowski, K., 1984. The feeding of fish larvae: Present "state of the art" and perspectives. *Reprod. Nutr. Dev.*, **24**:807- 833.
58. Danulat, E. & Kausch, h.; 1984. Chitinase activity in the dioogestive tract of cod (*Gadus morhua* L.). *Journal of Fish Biology*, **24**: 125-133. Timmermans, L. P. M.; 1982. Effect of oral administration of vibrio bacterin on the intestine of cyprinid fish. *Dev. Comp. Immun. Suppl.* **2**, 157-166.
59. Davidson, G.A., Ellis, A.E. y Secombes, C.J. (1991) Cellular responses of leucocytes isolated from the gut of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *J. Fish Dis.*, **14**: 651-659
60. Davina. J. H. M.; Parmentier, H. K.;

-
61. Dellmann, H. D. 1993. Textbook of Veterinary Histology. 3rd edition. Lea and Febiger. Philadelphia, USA.
 62. Deng, X., Van Eenennaam, J.P., Doroshov, S.I.; 2002. Comparison of early life stages and growth of green and white sturgeon. *Am. Fish. Soc. Symp.* **28**, 237–247.
 63. Deplano, M., Connes, R., Diaz, J.P. and Paris, J. 1989. Intestinal steatosis in the farm-reared sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Dis. Aquat. Org.* **6**: 121–130.
 64. Deplano, M., Connes, R., Diaz, J.P., Barnabé, G.; 1991. Variation in the absorption of macromolecular proteins in larvae of the sea bass *Dicentrarchus labrax* during transition to the exotrophic phase. *Mar Biol* **110**:29–36.
 65. Dettlaff, T.A.; Ginsburg, A.S.; Schamalhausen, O.I.; 1993. Sturgeon Fishes. Developmental Biology and aquaculture. 299 pp. Springer-Verlag.
 66. Devitsina, G. & Gadzhieva, A. R.; 1996. Dynamics of Morphological Development of Gustatory System during the early Ontogenesis of two representatives of Acipenserids *Acipenser nudiiventris* and *Acipenser perisus*. *J. Ichthyol.*, vol. **36**, **8**, 642-653.
 67. Díaz, J.P., Mani-Ponset, L., Blasco, C., Connes, R., 2002. Cytological detection of the main phases of lipid metabolism during early post-embryonic development in three teleost species: *Dicentrarchus labrax*, *Sparus aurata* and *Stizostedion lucioperca*. *Aquat. Living Resour.* **15** (2002) 169–178.
 68. Díaz, J.P.; Guyot, E.; Vigier, S. & Connes, R.; 1997. First event in lipid absorption during post-embryonic development of the anterior intestine in gilt-head sea bream. *Journal of Fish Biology*, **51**, 180-192.
 69. Domeneghini, C.; Pannelli Straini, R. y Beggetti, A.; 1998. Gut glycoconjugates in *Sparus aurata*, L. (Piosces, Teleostei). A comparative histochemical study in larval and adult ages. *Histopathol.* **13**, 359-372.

70. Domezáin Fau, A.; 2003. La acuicultura como herramienta para la recuperación de especies. El esturión autóctono de la Península Ibérica *Acipenser naccarii* B. 1836. Tesis Doctoral, Universidad de Granada.
71. Dorin, D D., Sire, MF. y Vernier, J M., 1993. Endocytosis and intracellular degradation of heterologous protein by eosinophilic granulocytes isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) posterior intestine. *Biology of the Cell* (1993) **79**, (219–224)
72. Douglas, S.E., Gawlicka, A., Mandla, S., Gallant, J.W.: 1999. Ontogeny of the stomach in winter flounder: characterization and expression of the pepsinogen and proton pump genes and determination of pepsin activity. *Journal of Fish Biology*, **55**:897–915.
73. Drewe, K. E., Horn, M. H., Dickson, K. A. y Gawlicka, A., 2004. Insectivore to frugivore: ontogenetic changes in gut morphology and digestive enzyme activity in the characid fish *Brycon guatemalensis* from Costa Rican rain forest streams. *Journal of Fish Biology* Vol **64** Issue 4 Pp 890.
74. Eastman, J.T. & DeVries, A.L.; 1997. Morphology of the digestive system of Antarctic nototheniid fishes. *Polar Biol* (1997) **17**: 1.13
75. Elbal, M.T. & Agulleiro, B., 1986. An immunocytochemical and ultrastructural study of endocrine cells in the gut of a teleost fish, *Sparus auratus* L. *General and Comparative Endocrinology* 1986 Dec; **64**(3):339-54.
76. Elbal, M.T. & Agulleiro, B.; 1988. The endocrine cells in the gut of *Mugil saliens* Risso, 1810 (Teleostei): an immunocytochemical and ultrastructural study. *General and Comparative Endocrinology*, **70**:231-246.
77. Elbal, M.T., García Ayala, A. and Agulleiro, B.; 1991. Light and electron microscopic immunocytochemical demonstration of the coexistence of somatostatin 14 – and somatostatin 25- like peptides in endocrine cells of the stomach of *Sparus aurata* (Teleost). *General and Comparative Endocrinology*, **84**:36-43.

-
78. Elbal, M.T., García Hernández, M.P., Lozano, M.T. and Agulleiro, B.; 2004. Development of the digestive tract of gilt head sea bream (*Sparus aurata*). Light and electron microscopic studies. *Aquaculture* **234**: 215-238.
79. Elbal, M.T.; 2000. Desarrollo larvario de Teleósteos: Caracterización histológica de las distintas fases en el desarrollo del tracto digestivo. En *Acuicultura I: Reproducción y desarrollo*. Eds. Zamora, S., Agulleiro, B. y García Hernández, P. Servicio de publicaciones de la Universidad de Murcia. 447 pp.
80. Estegondo, S.; Godon, S. M.; Galíndez, E. J.; 1988. Estudio Anatómo-Histológico del tracto digestivo de *Mustelus Schmitti* (Chondrichthyes, Triakidae). *Physis (Buenos Aires)*, Secc. A, **461**(110): 31-41.
81. Ezeasor, D. N. & Sotokoe, W. M.; 1981. Light and electron microscopic studies on the absorptive cells of the intestine, caeca and rectum of adult rainbow trout, *Salmo gairdneri*, Rich. *J. Fish Biol.* **18**, 527-544.
82. Fange, R. & Grove, D.; 1978. Digestion. En "Fish Physiology" (Eds. Hoar, W.S.; Randall, D.J. y Brett, J.R.), pp. 178-189. Academic Press. Nueva York.
83. Fänge, R.; Lundblad, G.; Lind, J. y Slettengren, K. (1979). Chitinolytic enzymes in the digestive system of marine fishes. *Marine Biology*. Vol **53**, Number 4, pp.1432-1793.
84. Fernández, A., de Blas, I. y Ruiz, I.; 2002. El sistema inmune de los teleósteos. *Aquatic*, nº **16**, Abril.
85. Fernández, I., Moyano, F.J., Díaz, M. & Martínez, T. (2001). Characterization of alpha-amylase activity in five species of Mediterranean sparid fishes (Sparidae, Teleostei). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **263**, 1-12.
86. Ferraris R.P. & Ahearn G.A.; 1984. Sugar and amino acid transport in fish intestine. *Comparative Biochemistry and Physiology A* **77A**, 397-413.
87. Ferri, S.; Gremski, W.; Medeiros, L.O.; 1974. Ultraestructure of the gastric epithelial cells of *Xenodon merrenii* Wagler, 1824 (Ophidia). *Gegenbaurs Morphol. Jahrb. Leipzig*, **120**: 905-916.

88. Fish, G. R.; 1955. The comparative activity of some digestive enzymes in the alimentary canal of Tilapia and perch. *Hydrobiologia* **15**, 161-178.
89. Fishelson, L. & Becker, K.; 2001. Development and aging of the liver and pancreas in the domestic carp, *Cyprinus carpio*: from embryogenesis to 15-year-old fish. *Environmental Biology of Fishes* **61**: 85–97, 2001.
90. Fishelson, L., Delarea, Y. and Zverdling, A.; 2004. Taste Bud Form and Distribution on Lips and in the Oropharyngeal Cavity of Cardinal Fish Species (Apogonidae, Teleostei), With Remarks on Their Dentition. *Journal of Morphology* **259**:316–327.
91. Fraisse, M.; Woo, N.Y.S.; Noaillac, J. y Murat, J.C.; 1981. Distribution pattern of digestive enzymes activities in the intestine of cat-fish (*Ameiurus nebulosus* L.) and the carp (*Cyprinus carpio* L.). *Comp. Biochem. A*, **70** (3): 443-446.
92. Furné, M., Hidalgo, M.C., López, A., García-Gallego, M., Morales, A.E., Domezain, A., Domezain, J., Sanz, A.; 2005. Digestive enzyme activities in Adriatic sturgeon *Acipenser naccarii* and rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. A comparative study. *Aquaculture* **250**, 391-398.
93. Gallagher, M.L.; Luczkovich, J.J. and Stellwag E.; 2001. Characterization of the ultrastructures of the gastrointestinal tract mucosa, stomach contents and liver enzyme activity of the pinfish during development. *Journal of Fish Biology* (2001) **58**, 1704-1713.
94. García Alcázar, A.; 2000. Desarrollo larvario de peces: Alimentación de larvas. En *Acuicultura I: Biología marina. Reproducción y desarrollo*. Eds. Zamora, S.; Agulleiro, B. y García Hernández, M. Servicio de Publicaciones de la Universidad de Murcia. Universidad Internacional del Mar. 447 pp.
95. García Hernández, M.P., Lozano, M.T., Elbal, M.T. and Agulleiro, B.; 2001. Development of the digestive tract of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L). Light and electron microscopic studies. *Anat Embryol* (2001) **204**:39–57.

-
96. Gardiner, B.J.; 1984. The relationships of the paleoniscid fishes: a review based on new specimens of *Mimia* and *Moythomasia* from the upper Devonian of Western Australia. *Bull. Brit. Mus. Nat. Hist., Geol. Serv.*, **37**: 173-248.
 97. Garrido-Ramos, M.A.; Soriguier, M.C.; De La Herran, R.; Jamilena, M.; Ruiz Rejón, C.; Domezain, A.; Hernando, J.A. And Ruiz Rejón, M.; 1997. Morphometrics and genetic analysis as proof of the existence of two sturgeon species in the Guadalquivir river. *Marine Biology* **129**, 33-39.
 98. Gawlicka, A.; The, S.J.; Hung, S.S.O.; Hinton, D.E. y De La Noüe, J.; 1995. Histological and histochemical changes in the intestine tract of white sturgeon larvae during ontogeny. *Fish Physiol. Biochem.* **14**, 357-371.
 99. Gawlicka, A.; Parent, B.; Horn, M.H.; Ross, N.; Opstad, I.; Torrissen, O.J.; 2000. Activity of enzymes in yolk-sac larvae of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *Aquaculture* **184**: 303-314.
 100. Georgopoulou, U. & Vernier, J.M.; 1986. Local immunological response in the posterior intestinal segment of the rainbow trout after oral administration of macromolecules. *Dev. Comp. Immunol.*, **10**: 529-537.
 101. Gershanovich, A. D., 1991. Lipid mobilization during early development of sturgeons. In: Proceedings of the 1st International Symposium Sturgeon. P. Williot (Ed.). CEMAGREF, France, pp. 41–52.
 102. Gisbert, E. & Doroshov, S.I.; 2003. Histology of the developing digestive system and the effect of food deprivation in larval green sturgeon (*Acipenser medirostris*). *Aquatic Living Resources* **16**, 77-89.
 103. Gisbert, E. & Ruban, I.; 2003. Ontogenetic behavior of Siberian sturgeon, *Acipenser baerii*: A synthesis between laboratory tests and field data *Environmental Biology of Fishes* **67**: 311–319, 2003.
 104. Gisbert, E. and Williot, P.; 2002. Advances in larval rearing of Siberian sturgeon. *Journal of Fish Biology* **60**, 1071-1092.
 105. Gisbert, E., Piedrahita, R. and Conklin, D.E.; 2004. Ontogenetic development of the digestive system in California halibut (*Paralichthys*

- californicus*) with notes on feeding practices. *Aquaculture* **232** (2004) 455–470.
106. Gisbert, E.; Rodriguez, A.; Castelló-Orvay, F. And Williot, P.; 1998. A histological study of the development of the digesative tract of siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) during early ontogeny. *Aquaculture* **167**, 3-4: 195-209.
107. Gisbert, E.; Sarasquete, C.; 2000. Histochemical identification of the black-brown pigment granules found in the alimentary canal of Siberian sturgeon (*Acipenser baeri*) during early ontogeny. *Aquaculture* **167**, 195-209.
108. Gisbert, E.; Sarasquete, M.C.; Williot, P. and Castelló-Orvay, F.; 1999. Histochemistry of the development of the digestive system of Siberian sturgeon during early ontogeny. *Journal of Fish Biology* **55**: 596-616.
109. Goel, K.A.; Sastry, K.V.; 1973. Distribution of alkaline phosphatase in the digestive system of a few teleost fishes. *Acta Histochem.*, **47**: 8-14.
110. Golubtsov, A. S., Moots, K. A. and Dzerjinskii, K. F.; 2003. Dentition in the African catfishes *Andersonia* (*Amphiliidae*) and *Siluranodon* (*Schilbeidae*) previously considered toothless. *Journal of Fish Biology* (2004) **64**, 146–158.
111. González de Canales, M.L.& Sarasquete, M.C.; 1987. Estudio histoenzimológico de fosfatasas en el aparato digestivo de *Mugil auratus* (Risso) (OSTEICHTHYES, Mugilidae). *Bol. Fisiol. anim., S. Paulo*, **11**:101–111 1987.
112. González, J.B. & Aguado, J.F.K.; 1981. Comparative study if the lipid composition of flesh and carapace in *Arist aeomorpha foliacea* and *Heterocarpus dorsalis*. *Comp. Biochem. Physiol.* **69B**, 819-827.
113. Govoni, J.J., G.W. Boehlert; Watanabe, Y.; 1986. The physiology of digestion in fish larvae. *Env. Biol. Fish.* **16**: 59–77.
114. Graham, S. y Secombes, C.J. (1990) Cellular requirements for lymphokine secretion by rainbow trout *Salmo gairdneri* leucocytes. *Dev. Comp. Immunol.*, **14**: 59-68.

-
115. Grande, L. & Bemis, W. E.; 1991. Osteology and phylogenetic relationships of fossil and recent paddlefishes (Polyodontidae) with comments on the interrelationships of Acipenseriformes. *Journal of Vertebrate Paleontology* **11** (Suppl. to No. 1), 1–121.
116. Grasse, P.P., Devillers, C., Clairambault, P., 1977. Zoología. Vertebrados, anatomía comparada. Toray-Masson, Barcelona.
117. Grau, A.; Crespo, S.; Sarasquete, M.C. & González de Canales, M.L.; 1992. The digestive system of the amberjack *Seriola dumerili*, Risso: a light and scanning microscopic study. *Journal of Fish Biology*, **41**, 287-303.
118. Guizani, N., Rolle R. S., Marshall M. R. and C. I. Wei. 1991. Isolation, purification and characterization of a trypsin from the pyloric caeca of mullet (*Mugil cephalus*). *Comp. Biochem. Physiol.* **98B**: 517-521.
119. Gutiérrez, M.; Sarasquete, C. y González de Canales, M.L.; 1986. Distribución histoquímica de carbohidratos y proteínas en estómago e intestino de *Anguilla anguilla* L., 1758. *Inv. Pesq.*, **54** (4): 553-564.
120. Halver, J.; 1989. Fish Nutrition. Ed. San Diego, California: Academic Press, 1989. 798 p.
121. Hamlin, H.J., Hunt von Herbing, I., Kling, L.J., 2000. Histological and morphological evaluations of the digestive tract and associated organs of haddock throughout post-hatching ontogeny. *Journal of Fish Biology*, **57**, 716– 732.
122. Hardy, R. & Litvak, M.; 2004. Effects of temperature on the early development, growth, and survival of shortnose sturgeon, *Acipenser brevirostrum*, and Atlantic sturgeon, *Acipenser oxyrinchus*, yolk-sac larvae. *Environmental Biology of Fishes* **70**: 145–154, 2004.
123. Henderson, R.J. and Tocher, D.R. 1987. The lipid composition and biochemistry of freshwater fish. *Progr. Lipid Res.* **26**: 281–347.
124. Hendry, P. E.; Hensleigh, J. E.; Reisenbichler, R. R.; 1998. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **55**: 1387-1394.

125. Hephher, b., 1988. Nutrition of pond fishes. Cambridge Univ. Press. Pp. 388.
126. Hernando, J.A.; Vasil´Eva, E.D.; Arlati, J.; Vasil´Ev, V.P.; Santiago, J.A.; Belysheva-Polyakova, L.; Domezain, A.; Soriguer, M.C.; 1999. New evidence for a Wider Historical Area of two Species of European Sturgeons: *Acipenser naccarii* and *Huso huso* (Acipenseridae). *Journal of Ichthyology*, Vol. **39**, N° 9, pp. 803-806.
127. Hidalgo, F. y Alliot, E.; 1987. La digestión en peces. En nutrición en Acuicultura. Plan de formación de Técnicos Superiores en Acuicultura (FEUGA). J. Espinosa de los Monteros y U. Labarta (eds). 303 pp.
128. Hidalgo, M.C., Urea, E., Sanz, A., 1999. Comparative study of digestive enzymes in fish with different nutritional habits. Proteolytic and amylase activities. *Aquaculture* **170** (1999) 267–283
129. Holmgren, S., Vaillant, C. and Dimaline, R.; 1982. VIP-, Substance P-, Gaastrin/CCK-, Bombesin-, Somatostain-, and Glucagon-like immunoreactivity in the gut of the Rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Cell and Tissue Research*, **223**: 141-43.
130. Howell, W.H. 1980. Temperature effects on growth and yolk utilization in yellowtail flounder (*Limanda ferruginea*) yolk sac larvae. *Fish. Bull.* 78: 731–739.
131. Hsu, Y. L. & Wu, J. L. (1979). The relationship between feeding habits and digestive proteases of some freshwater fishes. *Bulletin of the Institute of Zoology, Academia Sinica* **18**, 45–53.
132. Huysseune A., Van der heyden, C., Verreijdt, L., Wautier, K., and Van Damme, N., 2002. Fish Dentitions as Paradigms for Odontogenic Questions. *Connective Tissue Research*, **43**: 98–102, 2002
133. Huysseune, A. & Sire, J.-Y. ; 1998. Evolution of patterns and processes in teeth and tooth-related tissues in non-mammalian vertebrates. *European Journal of Oral Sciences* **106** (Suppl. 1), 437–481.

-
134. Iida, H. & Yamamoto, T.; 1986. The endosome-lysosome system in the absorptive cells of the goldfish hindgut. *Cell and Tissue Res* **243**: 449-452.
135. Ito, S., 1967. Anatomic structure of the gastric mucosa. In: C.F. Code and W. Heidel (Editors), *Handbook of Physiology, Section 6, Alimentary Canal*. American Physiological Society, Washington, DC, pp. 705-741.
136. Iwai, T. & Rosenthal, J.; 1981. Ciliary movements in guts of early clupeoid and salangid larvae. *Marine Ecology Progress Series* **4**, 365–367.
137. Iwai, T. 1969. Fine structure of gut epithelial cells of larval and juvenile carp during absorption of fat and protein. *Arch. Hist. Jap.* **30**: 183–199.
138. Jakubowski, M. & Whitear, M. 1990 Comparative morphology and cytology of taste buds in teleosts. *Z. Mikrosk.-Anat. Forsch.* **104**, 529-560.
139. Jancarik, A.; 1964. Die verdauung der hauptnährstoffe beim karpfen. *Z. Fischerie Hilfswiss.*, NF **12**, 601-665.
140. Kakizawa, Y. & Meenakarn, W.; 2003. Histogenesis and disappearance of the teeth of the Mekong giant catfish, *Pangasianodon gigas* (Teleostei). *Journal of Oral Science*, Vol. **45**, No. 4, 213-221, 2003
141. Kamacı, O. K.; Saka, Ş.; Fırat, K.; 2005. The Cleavage and Embryonic Phase of Gilthead Sea Bream (*Sparus aurata* Linnaeus, 1758) Eggs. *E.U. Journal of Fisheries & Aquatic Sciences*, Volume **22**, Issue (1-2): 205–209.
142. Kapoor, B.G.; Smit, M. y Verighina, I.A.; 1975. The alimentary canal and digestion in Teleost. *Adv. Mar. Biol.*; **13**: 109-239.
143. Karasov, W. H. & Diamond, J. M. A single: method for measuring intestinal solute uptake in vitro. En: *Journal Comparative of Physiology*. Vol. **152**, (1983); p. 105-116.
144. Kasumyan, A.O.; Sidorov, S.S.; 1993. Behavioral Responses of Early Juveniles of Siberian Sturgeon, *Acipenser baeri*, and Stellate Sturgeon, *A. stellatus* (Acipenseridae), to gustatory Stimulating Substances. *Journ. Ichth.*, **33** (9), 85-97.

145. Kaushik, S.J.; Dabrowski, K. and Luquet, P.; 1982. Patterns of nitrogen excretion and oxygen consumption during ontogenesis of common carp (*Cyprinus carpio*). *Can. J. Fish. Aquatic. Sci.* **39**, 1095-1105.
146. Kim, B.G.; Divakaran, S.; Brown, C.L.; Ostrowski, A.C.; 2001. Comparative digestive enzyme ontogeny in two larval fishes: Pacific threadfin (*Polydactilus sexfilis*) and bluefin trevally (*Caranx melampygus*). *Fish Physiology and Biochemistry* **24**: 225-241.
147. Kim, J. B., Gadsbøll, V., Whittaker, J., Barton, B.A. and Conlon, J.M.; 2000. Gastroenteropancreatic Hormones (Insulin, Glucagon, Somatostatin, and Multiple Forms of PYY) from the Pallid Sturgeon, *Scaphirhynchus albus* (Acipenseriformes). *General and Comparative Endocrinology* **120**, 353–363 (2000).
148. Kjørsvik, E., van Der Meeren, T., Kryvi, H. Arnfinnson, J. and Kvenseth, P.G.; 1991. Early development of the digestive tract of cod larvae, *Gadus morhua* L., during start-feeding and starvation. *Journal of fish Biology* (1991) **38**, 1-15.
149. Kolkowski, S., Tandler, A. and Izquierdo, M.S.; 1997. Effects of live food and dietary digestive enzymes on the efficiency of microdiets for seabass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Aquaculture* **148** (1997) 313-322.
150. Kolkowski, S.; 2001. Digestive enzymes in fish larvae and juveniles-implications and applications to formulated diets. *Aquaculture* **200** (2001)181–201
151. Kolkowski, S.; Tandler, A.; Kissil, G.W.; Gertler, A.; 1993. The effect of dietary exogenous digestive enzymes on digestion, assimilation, growth and survival of gilthead seabream larvae. *Fish Physiol. Biochem.* **12**, 203-209.
152. Krogdahl, A., Hemre, G.I. & Mommsen, T.P., 2005. Carbohydrates in fish nutrition: digestion and absorption in postlarval stages. *Aquaculture nutrition*, Volume **11** Issue 2 Page 103 – Abril 2005.

153. Kunitz, M.; 1947. Crystalline soybean trypsin inhibitor II - General properties. *J. Gen. Physiol.* **30**:291-310.
154. Lauf, M., Hoffer, R., 1984. Proteolytic enzymes in fish development and the importance of dietary enzymes. *Aquaculture*, **37**, 335-346.
155. Lazo, J., 2000. Conocimiento actual y nuevas perspectivas en el desarrollo de dietas para larvas de peces marinos. In: Cruz -Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Olvera-Novoa, M.A. y Civera-Cerecedo, R., (Eds.). Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 19-22 Noviembre, 2000. Mérida, Yucatán, Mexico.
156. Lelek, A.; 1987. The freshwater fishes of Europe, vol. 9. Threatened fishes of Europe. Wlesbaden Aula-Verlag pp. 43-57.
157. Lev, R. & Spicer S. S.; 1964. Specific staining of sulfate groups with alcian blue at low pH. *J. Histochem. Cytochem.*, **12**:309, 1964.
158. Linsay, G.J.H.; 1984. Distribution and function of digestive chitinolytic enzymes in fish. *Journal of Fish Biology*, **24**: 529-536.
159. Loewe, H.; Eckmann, R.; 1988. The ontogeny of the alimentary tract of coregonid larvae: normal development. *Journal of Fish Biology*, **33**: 841-850.
160. Machado-Allison A.; 1986. Aspectos sobre la historia natural del "Curito" *Hoplosternum littorale* (Hancock, 1828) (Siluriformes-Callichthyidae) en el bajo llano de Venezuela: Desarrollo, alimentacion y distribution espacial. *Acta Cient. Venez.* **37**:72-78.
161. Maffia, M., Verri, T., Danieli, A., Thamocharan, M., Pastore, M., Ahearn, G. A. and Storelli, C. (1997). H⁺/glycyl-L-proline cotransport in brush border membrane vesicles of eel (*Anguilla anguilla*) intestine. *Am. J. Physiol.* **272**, R217-R225.
162. Mallory, F. B.; 1938. *Pathological technique*. Philadelphia, Sauders, 1938. pp 152-153.

163. Martínez Álvarez, 2003. Aclimatación del esturión *Acipenser naccarii* al agua salada como una posibilidad de ampliación de su cultivo. Aspectos fisiológicos. Tesis Doctoral, Universidad de Granada.
164. Martínez, A., Olsen R. L, and J. L. Serra. 1988. Purification and characterization of two trypsin- like enzymes from the digestive tract of anchovy, *Engraulis encrancholus*. *Comp. Biochem. Physiol.* **91** B: 677-684.
165. Martínez, I.; Moyano, F.J.; Fernández Díaz, C.; Yúfera, M.; 1999. Digestive enzyme activity during larval development of the Senegal sole (*Solea senegalensis*). *Fish Physiology and Biochemistry*, **21**: 317-323.
166. Martínez, S.; Tomás, A.; Pérez, L.; Jover, M.; 2003. Alternativas de diseño de una granja de truchas: volumen de producción y número de lotes anuales con dos perfiles de temperaturas. *Revista AquaTIC*, nº 19, pp. 35-40.
167. Mattisson, A. & Holstein, B.; 1980. The ultrastructure of the gastric glands and its relation to induced secretory activity of cod, *Gadus morhua* (Day). *Acta Physiology Escand.* Vol. **109**, (1980); pp. 51-60
168. McLean, E. & Ash, R.; 1987. The time-course of appearance and net accumulation of horseradish peroxidase (HRP) orally to rainbow trout *Salmo gairdnerii* (Richardson). *Comp. Biochem. Physiol.* **88A**, 507-510.
169. McManus, J. F. A.; 1948. Histological and histochemical uses of periodic acid. *Stain Technol.*, **23**:99.
170. Moog, F. & Wenger, E.L., 1952. The occurrence of a neutral mucopolysaccharide at sites of high alkaline phosphatase activity. *Am. J Anat.* 1952 May; **90**(3):339-77.
171. Morrison, C. M., and J. R. Wright Jr, 1999: A study of the histology of the digestive tract of the Nile tilapia. *Journal of Fish Biology*, **54**, 597–606.
172. Morrison, C. M.; 1993. Histology of the Atlantic cod, *Gadus morhua*: An atlas. Part four. Eleutheroembryo and larva. *Canadian Special Publication of Fisheries and Aquatic Sciences* **119**, 1–504.

173. Mowry, R.W.; 1963. The special value of methods that color both acidic and vicinal hydroxyl groups in the histochemical study of mucins. *Ann. N.Y. Acad. Sci.***106**: 402-423.
174. Moya, M.S.; 2003. Vertebrate dentitions at the origin of jaws: when and how pattern evolved. *Evolution and Development* **5**:4, 394-413.
175. Moyano, F.J.; Díaz, M.; Alarcón, F.J.; Sarasquete, M.C.; 1996. Characterization of digestive enzyme activity during larval development of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Fish Physiology and Biochemistry*, **15**: 121-130.
176. Murray, H. M.; Wright, G. M. and Goff, G. P.; 1996. A comparative histological and histochemical study of the post-gastric alimentary canal from three species of pleuronectid, the Atlantic halibut, the yellowtail flounder and winter flounder. *J. Fish Biol.* **48**: 187–206.
177. Nagase, G.; 1984. Contribution to the physiology of digestion in *Tilapia mossambicus* Peters: Digestive enzymes and the effects of diets on their activities. *Z. vergl. Physiol.* **49**, 270-284.
178. Noaillac-Depeyre J & Gas N., 1974. Fat absorption by the enterocytes of the carp (*Cyprinus carpio* L.). *Cell Tissue Res.* 1974;**155**(3):353-65.
179. Noaillac-Depeyre J & Gas N., 1976. Electron microscopic study on gut epithelium of the tench (*Tinca tinca* L.) with respect to its absorptive functions. *Tissue Cell.* 1976;**8**(3):511-30.
180. Noaillac-Depeyre, J. & Gas, N.;1979. Structure and function of the intestinal epithelial cells in the perch (*Perca fluviatilis*). *Anat. Rec.* **195**, 621-640.
181. Noaillac-Depeyre, J. & Gas, N.,1973. Absorption of protein macromolecules by the enterocytes of the carp (*Cyprinus carpio* L.). Ultrastructural and cytochemical study. *Z Zellforsch Mikrosk Anat.* 1973; **146**(4):525-41.

182. Nose, T. Protein and Aminoacid Nutrition in Fish. Roche Research Prize for Animal Nutrition, 1989 to Takeshi Nose. November 9th, 1989. Switzerland : F. Hoffmann-La Roche, 1989. p. 51-69.
183. Olsen, R.E. and Ringø, E. 1997. Lipid digestibility in fish: A review. *Recent Res. Devl. Lipid Res.* **1**: 199–265.
184. Olson, C. & Holmgren, S.; 2000. The control of gut motility. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* **128** (2001) 481-503.
185. Ostos-Garrido, M.V.; Nuñez Torres, M.I. y Abaurrea Equisoain, M.A.; 1993. Histological, histochemical and ultrastructural analysis of the gastric mucosa in *Oncorhynchus myiss*. *Aquaculture* **115**: 121-132.
186. Paniagua, R. & Nistal, M.; 1983. Introducción a la Histología animal comparada. Atlas-libro de la estructura microscópica de los animales. Editorial Labor, 438 pp.
187. Pedersen, B.H. & Hjelmeland, K.; 1988. Fate of trypsin and assimilation efficiency in larval herring *Clupea harengus* following digestion of copepods. *Mar. Biol.* **97**, 467-476.
188. Pereyra, L.A., Domitrovic, H.A., Roux, J.P., Sampietro, J. C., 2000. Microscopía electrónica de barrido (MEB) del aparato digestivo del pacú (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887) (Pisces, Serrasalmidae). Comunicaciones Científicas y Tecnológicas 2000. Universidad Nacional del Nordeste (Argentina). www.unne.edu.ar.
189. Petrie-Hanson, L. & Peterman, A.E.; 2005. American paddlefish leukocytes demonstrate mammalian-like cytochemical staining characteristics in lymphoid tissues. *Journal of Fish Biology* (2005) **66**, 1101–1115.
190. Radaelli, G.; Domeneghini, C.; Arrighi, S.; Francolín, M. y Mascarello, F.; 2000. Ultrastructural features of the gut in the white sturgeon, *Acipenser transmontanus*. *Histol. Histopathol.*, **15**: 429-439.

-
191. Redding, J. M. and Patino, R.; 1993. Reproductive Physiology. In Fishes Physiology. Ed. Evans, D. H. 1940- . **11**. Series. CRC Press. Inc.. 2000 Corporate Blvd., N.W., Boca Raton. Florida.
192. Reifel, C.W. & Travill, A.A.; 1978. Structure and carbohydrate histochemistry of the stomach in eight species of Teleost. *Journal of Morphology* **158**, 155-168.
193. Reutter K, Boudriot F, Witt M. 2000. Heterogeneity of fish taste bud ultrastructure as demonstrated in the holosteans *Amia calva* and *Lepisosteus oculatus*. *Philos Trans R Soc Lond B* **355**:1225–1228.
194. Reutter K, Witt M. 1993. Morphology of vertebrate taste organs and their nerve supply. In: Simon SA, Roper SD, editors. Mechanisms of taste transduction. Boca Raton, FL: CRC Press. P 29–82.
195. Reutter K, Witt M. 1996. Ultrastructure of the taste buds in the spotted gar, *Lepisosteus oculatus* (Holostei). *Chem Senses* **21**: 663–664.
196. Reutter, K., 1973. Typisierung der Geschmacksknospen von Fischen. I: Morphologische und neurohistochemische Untersuchungen an *Xiphophorus helleri* Heckel (poecilidae, Cyprinodontiformes, Teleostei). *Z. Zellforsch.,* **143**, 409-423.
197. Reynolds, E.S.; 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain electron microscopy. *J. Cell. Biol.* **17**: 208.
198. Ribeiro, L.; Sarasquete, C. y Dinis, M.T.; 1999. Histological and histochemical development of the digestive system of *Solea senegalensis* (Kaup, 1858) larvae. *Aquaculture* **171**: 293-308.
199. Robles, F., de la Herrán, R., Ludwig, A., Ruiz Rejón, C, Ruiz Rejón, m., Garrido Ramos, M.A., (2004). Evolution of ancient satellite DNAs in sturgeon genomes. *Gene* **338** (2004) 133-142.
200. Robyt, J. F. & Whelan, W. J.; 1968. Starch and its Derivates. In: Radley, J. A. (Ed.). Chapman and Hall, London.
201. Rocha, E., Monteiro, R.A. and Pereira, C.A.; 1997. Liver of the Brown Trout, *Salmo trutta* (Teleostei, Salmonidae): A Stereological Study at Light

- and Electron Microscopic Levels. *The Anatomical Record* **247**:317–328 (1997).
202. Rochard, E., Castelnaud, G. and Lepage, M.; 1990. Sturgeon (Pisces: Acipenseridae); threats and prospects. *J. Fish Biol.*, **37A**, 123-132.
203. Rombout, J. H.; Stroband, H. W. J.; Taverne-Thiele, J.J.; 1984. Proliferation of intestinal cells during development of *Barbus conchoni* (Teleostei, Cyprinidae). *Cell Tissue Res* **236**: 207-216.
204. Ronnestad, I.; Rojas-García. C.R. y Skadal, J.; 2000. Retrograde peristalsis; a possible mechanism for filling the pyloric caeca?. *Journal of Fish Biology*, **56**, 216-218.
205. Rossi, R.; Grandi, G.; Trisolini, R.; Franzoi, P. ; Dezfuli, B.S. and Veccietti, H. ; 1991. Obsevizioni sulla biologica e la pesca dello storione cobice, *Acipenser naccarii* Bonaparte nella parte terminale del fuimo Pô. *Atti. Soc. Ital. Sci. Nat.* **132**, 1251-142.
206. Sarasquete, M.C.; Gonzales de Canales, M.L.; Arellano, J.; Munoz-Cueto, J.A.; Ribeiro, L.; Dinis, M.T.;1998. Histochemical study of skin and gill of Senegal sole, *Solea senegalensis* larvae and adults. *Histology and Histopathology* **13**: 727-735.
207. Sarasquete, M.C.; Polo, A. y Yúfera, M.; 1995. Histology and histochemistry of the development of the digestive and metaboli organs in turbot, *Scophthalmus maximus*. *Mar. Biol.*, **119**: 471-486.
208. Sasagawa I. 1995. Evidence of two types of odontoblasts during dentinogenesis in elasmobranchs. *Connect Tissue Res* **33**:223–229.
209. Scocco, P., Menghi, G. and Ceccarelli, P. ; 1997. Histochemical differentiation of glycoconjugates occurring in the tilapine intestine. *Journal of Fish Biology* (1997) **51**, 848–857
210. Segner, H., Rosch, R., Schmidt, H., Von Poeppinghausen, K.J., 1989. Digestive enzymes in larval *Coregonus laáretus*. L. *Journal of Fish Biology* **35**, 249–263.

-
211. Segner, H., Storch, V., Reinecke, M., Kloas, W., Hanke, W.; 1994. The development and functional digestive and metabolic organs in turbot, *Scophthalmus maximus*. *Mar. Biol.* **119**, 471– 486.
212. Seip, K.L. & C.S. Reynolds. 1990. Phytoplankton functional attributes along trophic gradient and season. *Limnol. Oceanogr.* **40**: 589–597.
213. Sheridan, M.A.; 1988. Lipid dynamics in fish: aspects of absorption, deposition and mobilization. *Comp. Biochem. Physiol.*, **90B**, 629-690.
214. Simmonneaux, V.; Barra, J.A.; Humbert, W; Kirsch, R.; 1987. The role of mucus in ion absorption by the oesophagus of the sea-water eel (*Anguilla anguilla* L.). *J. Comp. Physiol.*, **157**, 187-199.
215. Sire, J.Y., Davit-Beal, D., Delgado, S., Van Der Heyden, C. and Huysseune, A.; 2002. First-Generation Teeth in Nonmammalian Lineages: Evidence for a Conserved Ancestral Character?. *Microscopy Research and Technique* **59**:408–434 (2002).
216. Sire, M.F.; Lutton, C. & Vernier, J.M.; 1981. New views on intestinal absorption of lipids in teleostean fishes: an ultrastructural and biochemical study in the rainbow trout. *Journal of Lipid Research*, Vol. **22**: 81-94.
217. Smith, H.; 1961. Gastric secretion of lower vertebrates and birds. Pp. 2791-2805. In: C.F. Code (ed.) *Handbook of Physiology*. Section 6. Alimentary Canal. Vol. **6** Chapter 135. American Physiological Soc. Washigton D.C.
218. Smith, L.S.,; 1980. Digestion in Teleost Fishes. In *FAO/UNDP Training Course in Fish Feed Technology*, held at the College of Fisheries, University of Washington, Seattle, Washington, U.S.A., **9** October-15 December 1978.
219. Somogyi, M.; 1952. Notes on sugar determination. *J. Biol. Chem.*, **195**, 19–23.
220. Soriguer, M. C., Domezain, A., Aragonés J., Domezain, J. y Hernando J. A., 2002. Feeding preference in juveniles of *Acipenser naccarii* Bonaparte

1836. *Journal of Applied Ichthyology* Volume **18** Issue 4-6 Pp 691 - December 2002.
221. Spicer, S.S. y Schulte, B.A.; 1992. Detection and differentiation on glycoconjugates in various cell types by lectin histochemistry. *Basic Appl. Histochem.* **32**, 307-320.
222. Storelli, Carlo; Vilella, Sebastiano; Romano, Pa.; Maffia, M.; Casano, G.; 1989. Brush-border amino acid transport mechanisms in carnivorous eel intestine. *American Journal of Physiology.* Vol. **257**; p. R506-R510.
223. Stroband, H.W.J. & Dabrowski, K.R. 1979. Morphological and physiological aspects of the digestive system and feeding in fresh-water fish larvae. In: *Nutrition des Poissons.* pp. 335– 374. Edited by M. Fontaine. Centre National de la Recherche Scientifique, Paris. (Act. Colloque CNERNA).
224. Stroband, H.W.J. & Kroon, A.G. ; 1981. The development of the stomach in *Clarias lacera* and the intestinal absorption of protein macromolecules. *Cell Tissue Res.*, **215** : 397-415.
225. Stroband, H.W.J. & van der Veen, F. H. ; 1981. Localization of protein absorption during transport of food in the intestine of grasscarp *Ctenopharyngodon idella*. *J. Exp. Zool.* **218**, 149-156.
226. Tengjaroenkul, Bundit; Smith, Bonnie J.; Caceci, Thomas; Smith, Stephen A.; 2000. Distribution of intestinal enzyme activities along the intestinal tract of cultured Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L. *Aquaculture* **182** (2000) 317–327.
227. Tessier, A.J. & Goulden, L.E.; 1982. Estimating food limitations in cladoceran populations. *Limnol. Oceanogra.* **27**, 707-717.
228. Thomson, A.B.R., Schoeller, C., Keelan, M., Smith, L. and Clandinin, M.T. 1993. Lipid absorption: passing through the unstirred layers, brush-border membrane, and beyond. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **71**: 531–555.
229. Thurman, H.V. and H.H. Webber (1984). *Marine Biology.* Charles E. Merrill Publishing C.A. Bell and Howell Co. Columbus, Ohio.

230. Tibbetts, I.R.; 1997. The distribution and function of mucous cells and their secretions in the alimentary tract of *Arrhamphus sclerolepis krefftii*. *Journal of Fish Biology* , **50**, 809-820.
231. Toledo, J.D.; Caberoy, N.B.; Quinitio, G.F.; 2004. Environmental Factors Affecting Embryonic Development, Hatching and Survival of Early Stage Larvae of the Grouper (*Epinephelus coioides*). In Advances In Grouper Aquaculture. Australian Centre for International Agricultural Research Canberra. Eds: M.A. Rimmer, S. McBride and K.C. Williams. ACIAR Monograph 110.
232. Tortonese, E.; 1989. *Acipenser naccarii* Bonaparte, 1836, The freshwater fishes of Europe, Holcik, J., Ed., Wiesbaden: Aula-Verlag, pp.285-293.
233. Training Course in Fish Feed Technology. Food and Agriculture Organization of the United Nations - FAO - , 1980.
234. Tso, P. and Fujimoto, K. 1991. The absorption and transport of lipids by the small intestine. *Brain Res. Bull.* **27**: 477–482.
235. UICN, 1996. Red list of Threatened Animals. UICN Gland Switzerland 228 pp.
236. Ünal, G.; 2001. Histological Study of the Organogenesis of the Digestive System and Swim Bladder of the *Chalcalburnus tarichi* Pallas, 1811 (Cyprinidae). *Turk. J. Zool.* **25** (2001) 217-228.
237. Urea Ramos, E.; 1996. Estudio Comparativo de las actividades digestivas proteásicas y amilásicas en especies de peces con distintos hábitos alimentarios. Tesis de Licenciatura, Universidad de Granada.
238. Vegas-Vélez, M.; 1972. Contribution à l'étude de l'appareil digestif des téléostéens Rapports avec l'éthologie alimentaire. Thèse Doctorat, Univ. d'Aix-Marsella. 206 pp.
239. Velandia Romero, I.D.; 1997. Absorción de nutrientes en intestino anterior y ciegos pilóricos de peces. Tesis de pregrado Universidad Nacional de Colombia.

240. Vernier, J.M. & Sire, M.F.; 1983. Lábsorption intestinale des lipides chez la truite arc-en-ciel (*Salmo gairdneri*). In: Bases Biologiques de l'Áquaculture. Montpellier, Actes de Colloques, 1. IFREMER, París, pp. 393-428.
241. Vieira, L.; 2000. Histología e histoquímica do tubo digestivo e órgãos anexos de pós-larvas e juvenis de *Solea senegalensis* (Kaup, 1858) alimentados com diferentes dietas. Relatório de estágio do curso de Licenciatura em Biología Marinha e Pescas. Univ. Do Algarbe. Faro. Portugal.
242. Virginia-Maryland Regional College of Veterinary Medicine www.vetmed.vt.edu.
243. Walter, H. E.; 1984. Proteinases: methods with hemoglobin, casein and azocoll as substrates. In: Methods of Enzymatic Analysis. Vol. V, Edited by H.J. Bergmeyer. Verlag Chemie. Weinham. pp. 270-277.
244. Watanabe, Y. & Sawada, N. 1985. Larval development of digestive organs and intestinal absorptive functions in the freshwater goby, *Chaenogobius annularis*. *Bull. Tokoku Reg. Fish. Res. Lab.* **47**: 1–10.
245. Watanabe, Y.; 1981. Ingestion of horseradish peroxidase by the intestinal cells in larvar or juveniles of some teleost. *Bull. Jap. Soc. Scient.* **47**:1299-1307.
246. Watanabe, Y.; 1982. Intracellular digestion of horseradish peroxidase by the intestinal cells in larvar or juveniles of some teleost. *Bull. Jap. Soc. Scient.* **48**:37-42.
247. Watanabe, Y.; 1984a. Morphological and functional changes in rectal epithelium cells of pond smelt during post-embryonic development. *Bull. Jap. Soc. Scient.* **50**:805-814.
248. Watanabe, Y.; 1984b. An ultrastructural study of the intracellular digestion of horseradish peroxidase by the rectal epithelium cells in larvae of a freshwater cottid fish *Cottus nozawae*. *Bull. Jap. Soc. Scient.* **50**:409-416.

249. Weinreb, E. L. & Bilstad, N. M. (1995). Histology of the digestive tract and adjacent structures of the rainbow trout, *Salmo gairdneri irideus*. *Copeia* 1995, 194–204.
250. Weisel, G.F.; 1973. Anatomy and histology of the digestive organs of the paddlefish (*Polyodon spathula*). *J. Morphol.* **140**: 243-256.
251. Weisel, G.F.; 1979. Histology of the feeding and digestive organs of the shovelnose sturgeon, *Scaphyrhynchus platorhynchus*. *Copeia* 1979: 518-525.
252. Western, J.R.H. & Jennings, J.B.; 1970. Histochemical demonstration of the hydrochloric acid in the gastric tubules of teleost using in vivo Prussian blue technique. *Comp. Biochem. Physiol.*, **35**: 879-884.
253. World Conservation Union, 1996. www.iucn.org.
254. Yamagami K.; 1972. Some enzymological properties of a hatching enzyme (chorionase) isolated from the fresh-water teleost, *Oryzias latipes*. *Comp Biochem Physiol B*. 1973 Nov **15**; 46(3):603-16.
255. Yamamoto, M. & Hirano, T.; 1978. Morphological changes in the esophageal epithelium of the eel, *Anguilla japonoca*, during adaptation to sea water. *Cell Tissue Res.*, **192**, 25-38.
256. Yardley, D.G. & Wild, S.E., 1991. Effects of diet amylase expression in the mosquitofish. *Fish Physiol. Biochem.*, **9**, 31-37.
257. Yasumasu, S. & Yamagami, K.; 2004. Choriolysin H. In *Handbook of Proteolytic Enzymes*, 2 edn (Barrett, A.J., Rawlings, N.D. & Woessner, J.F. Eds), p.625-627, Elsevier, London.
258. Yasutake, W.T. y J.H. Wales. 1983. Microscopic anatomy of salmonids: an atlas. U.S. Fish Wildlife Serv., Res. Publ. 150: 190 p.
259. Yoshinaka, R., Tanaka, H., Sato, M., and Ikeda, S. (1982). Purification and some properties of elastase from the pancreas of catfish. *Bull Jpn Soc Sci Fish* **48**:573–579.
260. Youson, J. H., Al-Mahrouki, A.A., Naumovski, D. and Conlon, J.M.; 2001. The Endocrine Cells in the Gastroenteropancreatic System of the Bowfin,

- Amia calva* L.: An Immunohistochemical, Ultrastructural, and Immunocytochemical Analysis. *Journal of Morphology* **250**:208–224.
261. Youson, J.H. & Al-Mahrouki, A.A.; 1999. Ontogenetic and phylogenetic development of the endocrine pancreas (islet organ) in fishes. *Gen. Comp. Endocrinol.* **116**:303–335.
262. Yúfera, M.; Fernández-Díaz, C.; Vidaurreta, A.; Cara, J.B.; Moyano, F.J.; 2004. Gastrointestinal pH and development of the acid digestion in larvae and early juveniles of *Sparus aurata* (Pisces: Teleostei). *Marine Biology* (2004) **144**, 863–869
263. Zambonino Infante, J.L.; Cahu, C.; 1994. Development and response to a diet change of some digestive enzymes in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Fish Physiology and Biochemistry* **12** (5); 399-408.
264. Zimmer, G., Reuter, G. & Schauer, R.; 1992. Use of influenza c-virus for detection of 9-o-acetylated sialic acids on immobilised conjugates by esterase activity. *European Journal of Biochemistry* **204**, 209–215.
265. Zuwala K, Jakubowski M.; 1993. Light and electron (SEM, TEM) microscopy of taste buds in the tench *Tinca tinca* (Pisces: Cyprinidae). *Acta Zool Copenh* **74**:277–282.