



UNIVERSIDAD JUÁREZ AUTÓNOMA DE TABASCO
DIVISIÓN ACADÉMICA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



LABORATORIO DE ACUICULTURA TROPICAL

**EVALUACIÓN DE CARBOHIDRATOS SOBRE LA
FISIOLOGÍA DIGESTIVA DE LARVAS Y JUVENILES
DE PEJELAGARTO**
Atractosteus tropicus, Gill 1863

TESIS

Para obtener el grado de Doctor en Ciencias en Ecología y Manejo de
Sistemas Tropicales

PRESENTA

M.C. CARLOS ALFONSO FRÍAS QUINTANA

DIRECTOR

DR. CARLOS ALFONSO ÁLVAREZ GONZÁLEZ

CO-DIRECTOR

DR. DARIEL TOVAR RAMÍREZ (CIBNOR)

Villahermosa Tabasco, Agosto 2016



**UNIVERSIDAD JUÁREZ
AUTÓNOMA DE TABASCO**

"ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE"

**DIVISIÓN ACADÉMICA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIRECCIÓN**



JULIO 26 DE 2016

**C. CARLOS ALFONSO FRÍAS QUINTANA
PAS. DEL DOCTORADO EN ECOLOGÍA Y MANEJO DE
SISTEMAS TROPICALES
P R E S E N T E.**

En virtud de haber cumplido con lo establecido en los Arts. 80 al 85 del Cap. III del Reglamento de titulación de esta Universidad, tengo a bien comunicarle que se le autoriza la impresión de su Trabajo Recepcional, en la Modalidad de Tesis de Doctorado en Ecología y Manejo de Sistemas Tropicales titulado: **"EVALUACIÓN DE CARBOHIDRATOS SOBRE LA FISIOLOGÍA DIGESTIVA DE LARVAS Y JUVENILES DE PEJELAGARTO *Atractosteus tropicus*, Gill 1863"**, asesorado por el Dr. Carlos Alfonso Álvarez González y Dr. Dariel Tovar Ramírez sobre el cual sustentará su Examen de Grado, cuyo jurado está integrado por el Dr. Wilfrido Miguel Contreras Sánchez, Dr. Rafael Martínez García, Dr. Carlos Alfonso Álvarez González, Dr. Dariel Tovar Ramírez, Dra. Susana Camarillo Coop, Dr. Luis José Rangel Ruiz y Dra. Judith Andrea Rangel Mendoza.

Por lo cual puede proceder a concluir con los trámites finales para fijar la fecha de examen.

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**ATENTAMENTE
ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE**

**M. EN C. ROSA MARTHA PADRON LOPEZ
DIRECTORA**

**UJAT
DIVISIÓN ACADÉMICA
DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



DIRECCIÓN

C.c.p.- Expediente del Alumno.
C.c.p.- Archivo

Miembro CUMEX desde 2008

**Consortio de
Universidades
Mexicanas**
UNA ALIANZA DE CALIDAD POR LA EDUCACIÓN SUPERIOR

KM. 0.5 CARR. VILLAHERMOSA-CÁRDENAS ENTRONQUE A BOSQUES DE SALOYA
Tel. (993) 358-1500 Ext. 6400, Fax (993) 354-4308 y 358-1579 E-mail: dirección.dacbiol@ujat.mx



Usar papel reciclado economiza energía, evita contaminación y despilfarro de agua y ayuda a conservar los bosques

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco

CARTA AUTORIZACIÓN

El que suscribe, autoriza por medio del presente escrito a la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco para que utilice tanto física como digitalmente el Trabajo Recepcional en la modalidad de Tesis de doctorado denominado: **"EVALUACIÓN DE CARBOHIDRATOS SOBRE LA FISIOLÓGIA DIGESTIVA DE LARVAS Y JUVENILES DE PEJELAGARTO *Atractosteus tropicus*, Gill 1863"**, de la cual soy autor y titular de los Derechos de Autor.

La finalidad del uso por parte de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco el Trabajo Recepcional antes mencionada, será única y exclusivamente para difusión, educación y sin fines de lucro; autorización que se hace de manera enunciativa más no limitativa para subirla a la Red Abierta de Bibliotecas Digitales (RABID) y a cualquier otra red académica con las que la Universidad tenga relación institucional.

Por lo antes manifestado, libero a la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco de cualquier reclamación legal que pudiera ejercer respecto al uso y manipulación de la tesis mencionada y para los fines estipulados en éste documento.

Se firma la presente autorización en la ciudad de Villahermosa, Tabasco a los 26 Días del mes de Julio de 2016.

AUTORIZO



CARLOS ALFONSO FRÍAS QUINTANA

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco

INDICE

	PAG
1. INTRODUCCIÓN	2
2. ANTECEDENTES	6
2.1 Uso de carbohidratos en peces	8
2.2. Factores que influyen en la utilización de carbohidratos en peces	8
2.3. Estudios de Hormona del crecimiento (GH) en peces	8
2.4. Estudios de insulina en peces	10
3. JUSTIFICACION	12
4. OBJETIVOS	
4.1 Objetivo General	
4.2 Objetivos Específicos	13
5. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	14
5. CAPITULOS	
5.1. CAPITULO I: Using cornstarch in microparticulate diets for larvicultured tropical gar (<i>Atractosteus tropicus</i>)	21
5.2. CAPITULO II: Ahorro energético proteínico utilizando almidón de papa en larvas de pejelagarto (<i>Atractosteus tropicus</i>)	33
5.3. CAPITULO III: Expresión molecular de insulina y hormona del crecimiento (GH) durante la ontogenia inicial de larvas de pejelagarto (<i>Atractosteus tropicus</i>)	62
5.4 CAPITULO IV: Efecto de los carbohidratos sobre la fisiología digestiva, expresión molecular de Insulina y hormona del crecimiento (GH) y cambios morfológicos en juveniles de pejelagarto (<i>Atractosteus tropicus</i>)	89
5.5 CAPITULO V: Discusión general	124

1. INTRODUCCIÓN

La acuicultura, como disciplina científica y tecnológica ha tenido un desarrollo relativamente reciente y las investigaciones en particular con las especies nativas han estado dirigidas principalmente hacia el conocimiento del ambiente en el que viven los organismos acuáticos y hacia aspectos fundamentales como son la biología, fisiología y ecología. De esta manera, es una actividad muy importante por su capacidad de generar alimentos básicos para el consumo humano, empleos y divisas, por medio del cultivo de organismos acuáticos (peces, crustáceos moluscos, etc.) en condiciones controladas y en diversos ambientes (agua dulce, salobre o marina), aplicando tecnología con distintos niveles de complejidad (Márquez-Couturier *et al.*, 2006).

La piscicultura en México se ha sustentado desde hace muchos años en el cultivo de unas cuantas especies como las tilapias, bagres, carpas, truchas, entre otras las cuales son especies introducidas. Por este motivo, no se le ha dado el impulso necesario a los estudios para el desarrollo de la tecnología de cultivo de las especies nativas. En el caso del estado de Tabasco se cuenta con una gran variedad de especies nativas entre ellas la mojarra tenguayaca (*Petenia splendida*), la mojarra castarrica (*Cichlasoma uruphthalmus*), la mojarra paleta (*Vieja bifasciata*) y el pejelagarto (*Atractosteus tropicus*) siendo las especies con mayor tradición de consumo en la región sureste del país (Tello, 1998).

El pejelagarto pertenece a la familia Lepisosteidae, la cual fue descubierta en Sudamérica según Wiley (1976), las especies vivientes de los únicos dos géneros (*Lepisosteus* y *Atractosteus*) datan de hace 75 millones de años (Cretácico tardío). El pejelagarto habita en ríos, lagunas y pantanos del sureste de México. Ha sido reportado en la cuenca del río Coatzacoalcos en Veracruz, en las cuencas de los ríos Tonalá, Mezcalapa y Grijalva-Usumacinta para Tabasco, en el río Palizada del estado de Campeche y en dos cuencas más en Chiapas. Su distribución se extiende hacia Centroamérica: Guatemala, El Salvador, Nicaragua y Costa Rica (Reséndez y Salvadores, 1983).

El pejelagarto *Atractosteus tropicus* es considerada como una de las especies aptas para la realización de actividades de acuicultura, ya se ha observado que es resistente al manejo y que de forma natural habita en ambientes en los que otras especies de peces no pueden sobrevivir. Por otro lado, se ha notado una disminución de la población silvestre aparentemente debido a su sobreexplotación en las épocas de desove que es cuando estos organismos se congregan y son fáciles de capturar (Contreras et al., 1989). Esta especie es utilizada en la cocina tradicional tabasqueña, en artesanías y como pez de ornato tiene amplias posibilidades de ser incorporado en la acuicultura comercial (Gómez, 1989; Mendoza et al., 2005). Su carne es apreciada y consumida en el Estado, donde el comercio de alimentos para el turismo tiene una demanda permanente y por lo tanto requiere de un suministro seguro de este recurso.

La producción de pejelagarto por acuicultura es una alternativa que ayudaría a resolver el problema de la amenaza de extinción, para lograrlo se requiere generar conocimientos básicos sobre su biología y fisiología, así como su alimentación y nutrición respectivamente. Los estudios sobre la alimentación y nutrición de organismos acuáticos son necesarios ya que este rubro representa en ocasiones más del 60% del costo de producción, por lo que si se pretende lograr que la acuicultura sea rentable, se requiere profundizar en los aspectos fisiológicos básicos durante sus etapas de desarrollo (Tacon, 1993) y en la etapa juvenil (Alvarez et al., 2007).

Los conocimientos generados sobre alimentación y nutrición por varias generaciones de investigadores han permitido obtener importantes avances en la domesticación del pejelagarto para establecer su cultivo, sin embargo se requiere abarcar estudios más precisos con respecto a la fisiología digestiva desde el punto de vista nutricional y requerimientos energéticos que permitan maximizar su crecimiento en un menor tiempo promoviendo así su cultivo a una mayor escala y se establezca como una alternativa productiva que garantiza la rentabilidad de su cultivo y la conservación biológica de la especie *A. tropicus*.

Por lo que se ha implementado el diseño de alimentos con los requerimientos necesarios para cada etapa de vida de la especie, utilizando fuentes alternativas proteínicas que les aporten los nutrientes necesarios para su crecimiento y supervivencia (Frias-Quintana et al., 2010). A partir

de estudios en peces se ha demostrado que el mejor uso de la energía procedente de los carbohidratos del alimento depende de la composición de macronutrientes presentes en la dieta. Los peces carnívoros como los salmónidos, son alimentados con niveles altos de lípidos presentes en la dieta, ya que tienen un mejor efecto la proteína que los carbohidratos en un nivel similar sobre la ingesta de energía digerible (NRC, 2011). Sin embargo, las dietas altas en lípidos reducen la digestibilidad del almidón, de acuerdo con estudios realizados en el salmón del Atlántico (Grisdale-Helland y Helland, 1997) y esto puede ser debido al hecho de que los lípidos pueden influir en la velocidad de absorción de todos los nutrientes que pasan a través del tracto gastrointestinal.

En general, si la eficiencia de utilización de carbohidratos se estima estrictamente con base a la velocidad de suministro de glucosa a partir de la digestión y la eliminación de la glucosa de la sangre, los peces carnívoros principalmente, tienden a ser los menos beneficiados de las dietas que contienen carbohidratos (NRC, 2011). Sin embargo, cuando se hacen estudios de fisiología comparada con otros vertebrados, es importante tener en cuenta la naturaleza poiquilotérmica del pez, la baja tasa metabólica, la disponibilidad de hábitat de oxígeno y la adaptación de su metabolismo a la privación de alimentos a largo plazo (Polakof et al., 2012).

Sin embargo, para regular los niveles de glucosa en la sangre, producto de la ingesta de carbohidratos, es necesaria la intervención de dos principales hormonas endocrinas pancreáticas; la insulina y el glucagón que se encargan de regular los niveles ésta en la sangre y el metabolismo subyacente en los vertebrados superiores. En peces, aunque propensos a la hiperglucemia, definitivamente sí tienen estas hormonas con algunas similitudes funcionales y muchas otras características distintas (Moon, 2004). Los niveles de insulina en el plasma de los peces se encuentra en rangos de 0.2 a 5 nmol/l o incluso superior después de una comida y se secreta en respuesta a varios estímulos, principalmente nutricionales.

La insulina (INS) y los factores de crecimiento similares a la insulina (IGFs) son péptidos relacionados evolutivamente que se derivan de un gen ancestral común (Chan y Steiner, 2000). Un solo gen de INS ha sido descrito para casi todos los grupos existentes de los vertebrados estudiados hasta la fecha (Irwin et al., 2012). Sin embargo, estudios recientes revelan que ciertas

especies de peces (por ejemplo, el salmón, el fugu y el pez cebra) poseen múltiples copias del gen INS, posiblemente como resultado de una duplicación de genes asociados con la aparición de los teleósteos (Kavsan et al., 1993; Conlon, 2001; Irwin et al., 2012). La producción y procesamiento del precursor del INS, la preproinsulina, se llevan a cabo en las células de los islotes pancreáticos en respuesta a los cambios en los niveles de glucosa en la sangre a través de dos escisiones proteolíticas antes de formar un péptido funcional del INS que se libera de las glándulas secretoras en el torrente sanguíneo (Chan y Steiner, 2000). Sin embargo, el efecto de los carbohidratos presentes en las dietas sobre la fisiología de larvas y juveniles de *A. tropicus* aun no está claro, con respecto a la disponibilidad de los nutrientes y su efecto en el crecimiento y supervivencia.

La presente tesis tiene la finalidad de agrupar los estudios de fisiología digestiva, investigando el efecto de la inclusión de carbohidratos en la dieta de larvas y juveniles de *A. tropicus* sobre la actividad enzimática digestiva, también sobre el crecimiento y supervivencia, así como en aspectos morfofisiológicos y la expresión de insulina y hormona del crecimiento (GH) durante la ontogenia inicial. Por lo cual, la presente tesis está estructurada con capítulos que agrupan estas investigaciones en formato de artículos basados en las normas editoriales de la revista JCR “Fish Physiology and Biochemistry”.

2. ANTECEDENTES

2.1 Uso de carbohidratos en peces

Los carbohidratos son compuestos naturales orgánicos que contienen carbono, hidrógeno y oxígeno en proporciones que por lo general se representan con la fórmula empírica $(CH_2O)_n$. Entre las diferentes formas que son abundantes en la naturaleza, sólo azúcares y almidones tienen valor nutritivo para la alimentación de peces (Kaushik, 2001; Stone, 2003; NRC, 2011).

Los carbohidratos son una excelente fuente de energía y carbono, pero, en principio, como en otros vertebrados, los peces pueden sobrevivir y crecer cuando son alimentados con dietas sin carbohidratos quienes no tienen un requisito dietético de carbohidratos debido a su capacidad de sintetizar glucosa de manera eficiente a partir de precursores diferentes a los hidratos de carbono, como los aminoácidos (NRC, 2011), lactato y piruvato.

Sin embargo, la inclusión óptima de carbohidratos en la dieta de los peces de cultivo puede tener varias consecuencias fisiológicas posibilidades: 1) aumentar la retención de proteínas y lípidos mediante la prevención del catabolismo de estos nutrientes caros para las necesidades de energía (efecto de ahorro); 2) reducir la carga de nitrógeno en el desempeño agrícola (salvaguardia del medio ambiente); 3) proporcionar metabolitos para la síntesis biológicas. En cuanto a las formulaciones de alimentos de soporte que mantienen el crecimiento a un costo más bajo por unidad de ganancia; ayudar a sedimentar de unión, la estabilidad, flotabilidad; y facilitar la eliminación de las heces a través de sus propiedades de unión (Hemre et al., 2002; Stone, 2003; Hardy, 2010; Honorato et al., 2010). Por otra parte, es importante tener en cuenta que la capacidad de los peces de cultivo para utilizar carbohidratos de la dieta como fuente de energía es generalmente menor que en el ganado terrestre e inherentemente sigue siendo un tema complicado y controvertido por la diversidad extrema en los hábitos de alimentación, características anatómicas, fisiológicas y hábitats agrícolas (Kaushik, 2001; Moon, 2001; Polakof et al., 2012).

Diversas investigaciones apoyan la posibilidad de utilización de carbohidratos en los peces con la presencia de las principales enzimas que intervienen en la digestión del almidón, así como las de metabolismo de la glucosa (Enes et al., 2009; Krogdahl et al., 2005) y otras funciones como la presencia de transportadores de glucosa (Planas et al., 2000; Teerijoki et al., 2000; Krasnov et al., 2001), la glucoquinasa inducible y otros componentes de detección de glucosa (Panserat et al., 2000c), y tejidos periféricos (Polakof y Panserat, 2015).

El uso de glucosa como sustrato de carbono para los mismos fines que en otros animales, tiene la función de generar ATP a través de vías oxidativas y ribosa 5-fosfato / producción de NADPH a través de la vía fosfato pentosa (NRC, 2011) y, en particular, la utilización preferente de la glucosa en el cerebro de peces, el bazo, el riñón y branquias (Blasco et al., 2001; Soengas y Aldegunde, 2002); la capacidad de la glucosa para estimular la secreción de insulina (Caruso y Sheridan, 2011); y la sensibilidad de los niveles de glucosa en sangre para una variedad de condiciones fisiológicas, ambientales y farmacológicas que indican que los peces tienen un sistema homeostático activo de glucosa (Polakof et al., 2012).

Previos estudios resumen la capacidad funcional de las especies de peces de cultivo para utilizar los carbohidratos de la dieta como fuente de energía para mejorar los rendimientos en la producción (Kaushik, 2001; Moon, 2001; Hemre et al., 2002; Stone, 2003; Krogdahl et al., 2005; Enes et al., 2009; 2011a; NRC, 2011; Panserat et al., 2013; Polakof et al., 2012; Polakof y Panserat, 2015). Estos estudios han sido orientados hacia la acuicultura, basándose en diferentes aspectos o factores relacionados con el uso de carbohidratos digeribles, que influyen en la utilización de carbohidratos en peces, las limitaciones biológicas que conducen a su mal uso en los peces carnívoros y nuevas perspectivas que podrían desafiar las prácticas y normas actuales.

2.2. Factores que influyen en la utilización de carbohidratos en peces

La medida en que los carbohidratos de la dieta se pueden utilizar para satisfacer las necesidades de energía varía mucho, e incluso dentro de cada especie, dependiendo de una multitud de factores clasificadas en las relacionadas con la biología (hábitos alimenticios, el ejercicio, el genotipo), la dieta (origen botánico o fuente de carbohidratos, complejidad molecular, estado físico, nivel de inclusión y estrategias de alimentación; interacciones de nutrientes) y el medio ambiente (temperatura, salinidad, estrés, fotoperiodo).

La compleja interacción de todos estos factores juega un papel importante en la determinación de la capacidad de los peces para utilizar un alimento rico en carbohidratos. La fuente de nivel máximo y apropiado de inclusión en la dieta se decide generalmente con base en el efecto de los carbohidratos y el ahorro de proteína que no tenga ningún efecto adverso sobre el crecimiento y la fisiología de los peces. El conocimiento sobre el nivel trófico de los peces, la especificación de la dieta (que indiquen cualquier componente de la dieta ajustado o inerte utilizado) y las condiciones experimentales (tamaño de los peces, la duración de la alimentación y temperatura del agua) está prevista a una comprensión más general (NRC, 2011).

2.3. Estudios de la hormona del crecimiento (GH) en peces

La hormona del crecimiento (GH) es una hormona bien conservada y se expresa principalmente en la glándula pituitaria anterior de todos los vertebrados y es responsable del crecimiento exponencial. Aunque el efecto promotor del crecimiento por la GH está bien documentado, el crecimiento de los peces es multifactorial y GH podrá actuar a diferentes niveles (Mommsen, 2001). La hormona del crecimiento (GH) es el principal regulador de crecimiento somático y el metabolismo de los peces, como en otros vertebrados (Fuentes et al., 2013; Vélez et al., 2015). Hasta hace poco, se creía que el GH no tenía ningún papel en el crecimiento del embrión, pero en algunos estudios se ha detectado transcripción de GH en los embriones de trucha arco iris antes de la organogénesis de la pituitaria e incluso en ovocitos maduros (Yang et al., 1999). En los vertebrados tetrápodos, el crecimiento embrionario y fetal había sido considerado independiente del GH hipofisario, aunque se requiere para el crecimiento y el desarrollo

postnatal. Sin embargo, estudios recientes sugieren que GH extrapituitario juega un papel importante en el crecimiento temprano embrionario y la diferenciación (Sanders y Harvey, 2008). Estos datos llevaron a dar otra dimensión de la acción de la GH en los vertebrados en el desarrollo temprano. Aunque la expresión de GH se ha descrito ampliamente en euteleosteos, hasta ahora se conoce poco de GH en la fisiología de peces primitivos.

Diversas características sobre la fisiología del gen de la hormona de crecimiento (GH), junto con los aspectos moleculares se han estudiado en varias especies de peces. Preferiblemente, la tasa de crecimiento de los peces es un rasgo importante económicamente hablando, que necesita ser mejorado con la ayuda de las prácticas tradicionales de cría selectiva, así como las técnicas de manipulación genética para mitigar la creciente demanda de alimentos para peces. La tasa de crecimiento de los peces ha sido controlado por varios genes, tales como la hormona del crecimiento (GH), factor de crecimiento similar a la insulina I (IGF-I) y receptores de la hormona del crecimiento (GHRa / b), que se había explorado con la ayuda de técnicas moleculares (Sciara et al., 2006; Filby et al., 2007, Dibyashree et al., 2015). La hormona de crecimiento, regula principalmente el crecimiento y desarrollo, así como la osmorregulación, la producción de esteroides (esteroidogénesis), la proteína anticongelante (AFP), la reproducción en los peces (Degani et al., 2003; Sciara et al., 2006).

En los peces, el crecimiento se ha estudiado en relación a las transcripciones de genes que codifican GH, IGF-I, IGF-II, y sus receptores, junto con proteínas de unión de IGF (Gabillard et al., 2006; Filby et al., 2007). Además, el enfoque de expresión molecular de la hormona de crecimiento (GH) se ha utilizado en estudios fisiológicos en peces como *Ictalurus punctatus* (Small y Peterson, 2005) *Sparus aurata* (Jiao et al., 2006); *Oncorhynchus nerka* (Amano et al., 2006), *Protopterus dolloi* y *Huso dauricus* (Fukamachi y Meyer, 2007); *Oncorhynchus kisutch* (Kim et al., 2015); osmoregulación en peces teleósteos (Sakamoto y McCormick, 2006), influencia del medio ambiente (Reinecke, 2010), aspectos toxicológicos en *Oreochromis niloticus* (Shved et al., 2008) y ontogenia en *Monopterus albus* (Chen et al., 2015). Dichos estudios contribuyen en el conocimiento de aspectos productivos en peces a partir del manejo de rasgos como crecimiento, resistencia a enfermedades, desarrollo, así como factores ambientales y nutricionales.

2.4 Estudios de insulina en peces

La insulina regula una amplia gama de procesos en peces, incluyendo la regulación del apetito, crecimiento, desarrollo, y el metabolismo intermediario. Mientras que la mayoría de INS es producida por el páncreas endocrino de peces, también se produce en el cerebro, así como en diversas regiones del tejido intestinal y adiposo. El conocimiento de cómo el gen INS está regulado en tejidos extra-pancreáticos, proporciona una amplia comprensión general de los tejidos específicos donde se lleva a cabo la activación transcripcional del gen (Caruso et al., 2011).

En un estudio con trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) fueron examinados los efectos de la insulina y el glucagón en la lipólisis, demostrando que la lipólisis, tal como se mide en los adipocitos aislados de la trucha arco iris, se puede regular tanto por la insulina y el glucagón. Estos resultados indican que la insulina es una hormona importante en la deposición de lípidos a través de su efecto anti-lipolítica en los adipocitos de la trucha arco iris (Albalat et al., 2005). Por otro lado se han realizado también estudios de caracterización molecular de la familia de genes IGF en el salmón *Salmo salar* (Bower et al., 2008) que exhiben una expresión hepática robusta y estudios de respuestas al ayuno a través del sistema GH/IGF y hormonas tiroideas (Breves et al., 2016).

La secreción de INS se ve afectada por una variedad de macronutrientes, los cuales son absorbidos en el tracto gastrointestinal, sin embargo, se desconoce que patrones son los que intervienen en la secreción, dependiendo de la especie y el efecto de la dieta inicial con respecto a la capacidad de absorción de cada uno de los macronutrientes (NRC, 2011). Por otra parte, la utilización de la glucosa en los peces carnívoros todavía es desconocida. Estudios específicos nos proporcionan una comprensión general de la función de la INS y las respuestas de los moduladores de señalización de INS conocidos en peces y que establecen características específicas correlacionadas con el ciclo de vida de la especie (Caruso et al., 2011).

Los peces también poseen múltiples ARNm que codifican INS, cuya expresión varía durante el curso del desarrollo embrionario, así como entre los tejidos en juveniles y adultos. Mientras que estos patrones de expresión diferencial son sugestivos, se requieren investigaciones adicionales para evaluar las funciones fisiológicas de las distintas isoformas y así dilucidar los mecanismos reguladores que subyacen en su expresión. Una de esas isoformas presentes de la insulina es el factor de crecimiento de la insulina (IGF) que contribuye también al crecimiento de los peces.

Los resultados de crecimiento de los peces teleósteos, incluidos los salmónidos, es controlado principalmente por la acción de la hormona del crecimiento (GH) / sistema similar a la insulina factor de crecimiento (IGF) (Wood et al., 2005; Duan et al., 2010). El sistema GH / IGF dirige la asignación de nutrientes adquiridos hacia procesos anabólicos tales como el crecimiento somático y lineal. Por otra parte, en condiciones de restricción prolongado de nutrientes, la naturaleza de señalización de GH / IGF promueve la supervivencia de la especie al desplazar la energía lejos de los procesos anabólicos y dirigirla a los procesos fisiológicos esenciales (Wood et al., 2005). Al revelar los mecanismos moleculares por los que la señalización de GH / IGF se modula tanto en forma endocrina, paracrina y autocrina, los fisiólogos tienen una mayor precisión al inferir los patrones de crecimiento de las poblaciones de peces silvestres y optimizar las estrategias de cría de las poblaciones domesticadas (Picha et al, 2008; Beckman, 2011).

3. JUSTIFICACION

La acuicultura en México tienen un gran potencial, especialmente en las especies dulceacuícolas nativas. Existen una gran cantidad de especies de importancia comercial, ya sea a nivel local, regional o nacional, que sustentan en buena medida el consumo de proteínas de alta calidad para la población, pero que son capturadas a través de las pesquerías. El pejelagarto (*Atractosteus tropicus*) es un recurso pesquero que debido a la sobreexplotación local y a las modificaciones de su hábitat se considera deteriorada, ya que en los últimos años ha sido sometida a fuertes presiones de captura con lo que se ha provocado un agotamiento de los poblaciones silvestres.

En este sentido, el desarrollo del cultivo de esta especie ha permitido hasta el momento, lograr cerrar el ciclo de vida, con la consecuente posibilidad de producir larvas y juveniles para su engorda en diversos sistemas. Sin embargo, su producción a escala comercial se ha visto limitada por diversos factores, entre los que destacan la carencia de estudios respecto al desarrollo de alimentos específicos para la especie que cubran adecuadamente sus requerimientos nutricionales, particularmente durante la etapa larvaria, y por ende maximizar su crecimiento, disminuir el canibalismo y aumentar la supervivencia. De esta manera se espera incrementar la producción de esta especie en la región sureste de México y además cubrir la demanda de semilla de alta calidad para la engorda ya sea por empresas sociales o privadas.

Cabe mencionar que los estudios moleculares sirven para atender esa necesidad de información con referencia al funcionamiento de los genes y los aspectos fisiológicos involucrados en la expresión genética de acuerdo a la especie.

Hasta el momento, no se han realizado estudios sobre la expresión de genes para hormonas digestivas en esta especie, por lo que el objetivo de este estudio es generar información sobre la expresión de genes para insulina y hormona del crecimiento (GH) durante el periodo larvario y sus efectos en la alimentación en la etapa juvenil de *A. tropicus* que permitan comprender la respuesta en la relación crianza-alimento en esta especie. Es importante complementar los estudios ya realizados con los propuestos en este trabajo para su futura aplicación en el desarrollo de dietas, enfocados para larvas y adultos de *A. tropicus*.

OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

Evaluar el efecto de carbohidratos (almidones) en dietas balanceadas sobre la actividad enzimática digestiva, histología y expresión de Insulina y Hormona del crecimiento (GH) en larvas y juveniles de *A. tropicus*.

3.2 Objetivos Específicos

- Evaluar diferentes inclusiones de carbohidratos digeribles (almidón de maíz) en dietas balanceadas sobre la actividad de las principales enzimas digestivas, el crecimiento y supervivencia en larvas de *A. tropicus*.
- Evaluar la sustitución de energía proteínica utilizando almidón de papa en dietas balanceadas sobre la actividad enzimática digestiva, el crecimiento, canibalismo y supervivencia de larvas de *A. tropicus*.
- Cuantificar la expresión de Insulina y Hormona del crecimiento (GH) durante la ontogenia inicial en larvas de pejelagarto *Atractosteus tropicus*.
- Evaluar los cambios morfológicos y fisiológicos en juveniles de *A. tropicus*, utilizando dietas con diferentes inclusiones de almidón de maíz.

4. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Albalat A., Gutiérrez J., Navarro I., (2005). Regulation of lipolysis in isolated adipocytes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): The role of insulin and glucagon. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 142: 347–354.
- Amano M., Moriyama S., Iigo M., Kitamura S., Amiya N., Yamamori K., Ukena K., Tsutsui K., (2006) Novel fish hypothalamic neuropeptides stimulate the release of gonadotrophins and growth hormone from the pituitary of sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*). *Journal of Endocrinology* 188, 41–423.
- Azizi S., Nematollahi M., Mojazi B., Vélez E., Salmerón C., Chanc S., Navarro I., Capilla E., Gutiérrez J., (2016) IGF-I and IGF-II effects on local IGF system and signaling pathways in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) cultured myocytes. *General and Comparative Endocrinology* 232: 7–16.
- Beckman, B.R., (2011) Perspectives on concordant and discordant relations between insulin-like growth factor 1 (IGF1) and growth in fishes. *Gen. Comp. Endocrinol.* 170: 233–252.
- Blasco, J., Marimon, I., Viaplana, I., Fernández-Borrás, J., (2001) Fate of plasma glucose in tissues of brown trout in vivo: effects of fasting and glucose loading. *Fish Physiol. Biochem.* 24: 247–258.
- Bower N., Li X., Taylor R., Johnston I., (2008) Switching to fast growth: the insulin-like growth factor (IGF) system in skeletal muscle of *Atlantic salmon*. *Journal of Experimental Biology* 211: 3859-3870.
- Breves J., Phipps-Costin S., Fujimoto C., Einarsdottir I., Regish A., Björnsson B., McCormick S., (2016) Hepatic insulin-like growth-factor binding protein (igfbp) responses to food restriction in Atlantic salmon smolts. *General and Comparative Endocrinology* 233: 79–87.
- Caruso M. A., & Sheridan M., (2011) New insights into the signaling system and function of insulin in fish. *General and Comparative Endocrinology* 173: 227–247.
- Chan, S. J., & Steiner, D. F. (2000). Insulin through the ages: phylogeny of a growth promoting and metabolic regulatory hormone. *American Zoologist*, 40(2): 213-222.
- Chen D., Liu J., Chen W., Shi S., Zhang W., Zhang L., (2015) Expression and ontogeny of growth hormone (GH) in the protogynous hermaphroditic ricefield eel (*Monopterus albus*) *Fish Physiology and Biochemistry* Volume 41 (6): 1515-1525.

- Conlon J. M. (2001) Evolution of the insulin molecule: insights into structure-activity and phylogenetic relationships. *Peptides*, 22:1183-1193.
- Contreras W., Márquez G., y García J. L. (1989) Habilitación de zonas pantanosas para el semicultivo del pejelagarto *Lepisosteus tropicus* una propuesta para el manejo del ecosistema. En: Primer Seminario sobre Acuicultura PEMEX-UJAT en el estado de Tabasco. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Villahermosa, Tabasco, México. 15-19 pp.
- Degani G., Tzchori I., Yom-Din S., Goldberg D., Jackson K., (2003) Growth differences and growth hormone expression in male and female European eels [*Anguilla anguilla* (L.)]. *General and comparative endocrinology*; 134(1):88- 93.
- Dibyashree S., Kiran D., Pranati S., Prajna P., Jitendra K., Hirak K., Pallipuram J., (2015). Comparative and evolutionary analysis of Growth Hormone (GH) protein of Cyprinids using computational approach. *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*; 2(5): 191-197.
- Duan, C., Ren, H., Gao, S., (2010) Insulin-like growth factors (IGFs), IGF receptors, and IGF-binding proteins: roles in skeletal muscle growth and differentiation. *Gen. Comp. Endocrinol.* 167, 344–351.
- Enes, P., Panserat, S., Kaushik, S., Oliva-Teles, A., (2011a). Dietary carbohydrate utilization by European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) and gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) juveniles. *Rev. Fish. Sci.* 19, 201–215.
- Enes, P., Panserat, S., Kaushik, S., Oliva-Teles, A., (2009) Nutritional regulation of hepatic glucose metabolism in fish. *Fish Physiol. Biochem.* 35, 519–539
- Filby A., Tyler C., (2007). Cloning and characterization of cDNAs for hormones and/or receptors of growth hormone, insulin-like growth factor-I, thyroid hormone, and corticosteroid and the gender, tissue, and developmental-specific expression of their mRNA transcripts in fathead minnow (*Pimephales promelas*). *General and comparative endocrinology*; 150(1):151-63.
- Frías-Quintana, CA; Álvarez-González, CA; Márquez-Couturier, G (2010). Diseño de microdietas para el larvicultivo de pejelagarto *Atractosteus tropicus*, Gill 1863. *Universidad y Ciencia*, vol. 26, núm. 3, ISSN: 0186-2979, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, México. pp. 265-282.

- Fuentes E., Valdés J., Molina A., Björnsson B., (2013) Regulation of skeletal muscle growth in fish by the growth hormone – Insulin-like growth factor system. *General and Comparative Endocrinology*. 192: 136-148.
- Fukamachi S., Meyer A., (2007) Evolution of Receptors for Growth Hormone and Somatolactin in Fish and Land Vertebrates: Lessons from the Lungfish (*Protopterus dolloi*) and Sturgeon Orthologues (*Huso dauricus*). *Journal of Molecular Evolution* 65 (4): 359-372.
- Gabillard J.C., Kamangar B.B., Montserrat N., (2006) Coordinated regulation of the GH/IGF system genes during refeeding in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *The Journal of endocrinology*; 191(1):15-24.
- Gómez M. (1989). Reproducción del pejelagarto en estanquería rústica. En: Primer Seminario sobre Acuicultura PEMEX-UJAT en el estado de Tabasco. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Villahermosa, Tabasco, México. 13-14 pp.
- Grisdale-Helland, B., Helland, S., (1997) Replacement of protein by fat and carbohydrate in diets for atlantic salmon (*Salmo salar*) at the end of the freshwater stage. *Aquaculture* 152, 167–180.
- Hardy, R.W., (2010) Utilization of plant proteins in fish diets: effects of global demand and supplies of fishmeal. *Aquac. Res.* 41, 770–776.
- Hemre, G., Mommsen, T.P., Kroghdahl, A., (2002) Carbohydrates in fish nutrition: effects on growth, glucose metabolism and hepatic enzymes. *Aquac. Nutr.* 8, 175–194.
- Honorato, C.A., Almeida, L.C., Da Silva Nunes, C., Carneiro, D.J., Moraes, G., (2010) Effects of processing on physical characteristics of diets with distinct levels of carbohydrates and lipids: the outcomes on the growth of pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *Aquac. Nutr.* 16 (1), 91–99.
- Irwin D., Van Der Kraak G., (2012) Regulation and actions of insulin-like growth factors in the ovary of zebrafish (*Danio rerio*). *General and Comparative Endocrinology* 177: 187–194.
- Jiao B., Huang X., Chan Ch., Zhang L., Wang D., Cheng Ch., (2006) The co-existence of two growth hormone receptors in teleost fish and their differential signal transduction, tissue distribution and hormonal regulation of expression in seabream. *Journal of Molecular Endocrinology* 36: 23–40.

- Kaushik, S., (2001) Carbohydrate nutrition: importance and limits of carbohydrate supplies. In: Guillaume, J., Kaushik, S., Bergot, P., Metailler, R. (Eds.), Nutrition and Feeding of Fish and Crustaceans. Praxis Publishing Ltd., Chichester, pp. 131–144.
- Kavsan, V., Koval, A., Petrenko, O., Roberts, C.T., LeRoith, D., (1993) Two insulin genes are present in the salmon genome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 191, 1373–1378.
- Kim J., Leggatt R., Chan M., Volkoff H., Devlin R., (2015) Effects of chronic growth hormone overexpression on appetite-regulating brain gene expression in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Molecular and Cellular Endocrinology* Volume 413: 178–188.
- Krasnov, A., Teerijoki, H., Mölsä, H., (2001) Rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) hepatic glucose transporter. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Gene Struct. Expr.* 1520, 174–178.
- Krogdahl, Å., Hemre, G.I., Mommsen, T., (2005) Carbohydrates in fish nutrition: digestion and absorption in postlarval stages. *Aquac. Nutr.* 11, 103–122.
- Moon, T.W., (2001) Glucose intolerance in teleost fish: fact or fiction? *Comp. Biochem. Physiol. Part B: Biochem. Mol. Biol.* 129, 243–249.
- Márquez-Couturier G., Álvarez C., Contreras W., Hernández U., Hernández A., Mendoza R., Aguilera C., García T., Civera R., Goytortua E. (2006) Avances en la alimentación y nutrición de pejelagarto *Atractosteus tropicus*. pp. 446-523. En: Memorias del VIII Simposium Internacional de Nutrición Acuicola. UANL. Monterrey, Nuevo León, México. ISBN 970-694-333-5.
- Mendoza R., Aguilera C., Montemayor J., Cortes V., Santillán O., Hernández U. (2005). Domestication and culture of alligator gar *Atractosteus spatula* in Mexico. In: Memories of Aquaculture America. New Orleans, Louisiana, EUA. pp 272.
- Mommsen T. P. & Plisetskaya E. M. (2001). Insulin in fishes and agnathans: History, structure and metabolic regulations. *Rev. Aquat. Sci.* 4:225–259.
- Moon, T.W., (2004) Hormones and fish hepatocyte metabolism: “the good, the bad and the ugly!”. *Comp. Biochem. Physiol. Part B: Biochem. Mol. Biol.* 139, 335–345.
- Navarro I., Rojas P., Capilla E., Albalat A., Castillo J., Montserrat N., Codina M., Gutiérrez J. (2002). Insights into insulin and glucagon responses in fish. *Fish Physiology and Biochemistry* 27:205–216.
- NRC (2011) Carbohydrates and Fibre, in: Nutrient Requirements of Fish and Shrimp. The National Academies Press, Washington DC, pp. 135–162.

- Panserat, S., Kaushik, S., Médale, F., (2013) Rainbow trout as a model for nutrition and nutrient metabolism studies. In: Polakof, S., Moon, T.W. (Eds.), Trout: from Physiology to conservation. Nova Science Publishers, pp. 131–153.
- Panserat, S., Médale, F., Blin, C., Brèque, J., Vachot, C., Plagnes-Juan, E., Gomes, E., Krishnamoorthy, R., Kaushik, S., (2000c) Hepatic glucokinase is induced by dietary carbohydrates in rainbow trout, gilthead seabream, and common carp. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 278: R1164–R1170.
- Picha, M.E., Turano, M.J., Beckman, B.R., Borski, R.J., (2008) Endocrine biomarkers of growth and applications to aquaculture: a minireview of growth hormone, insulin-like growth factor (IGF)-I, and IGF-binding proteins as potential growth indicators in fish. *N. Am. J. Aquacult.* 70: 196–211.
- Planas, J.V., Capilla, E., Gutiérrez, J., (2000) Molecular identification of a glucose transporter from fish muscle. *FEBS Lett.* 481: 266–270.
- Plisetskaya E. M. and Mommsen T. P. (1996). Glucagon and glucagon-like peptides in fishes. *Int. Rev. Cytol.* 168:187–257.
- Polakof, S., Panserat, S., Soengas, J.L., Moon, T.W., (2012) Glucose metabolism in fish: a review. *J. Comp. Physiol. B.* 182: 1015–1045
- Polakof, S., Panserat, S., (2015) How Tom Moon's research highlighted the question of glucose tolerance in carnivorous fish. *Comp. Biochem. Physiol. Part B: Biochem. Mol. Biol.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpb.2015.11.001>.
- Reindl, K.M., Sheridan, M.A., (2012) Peripheral regulation of the growth hormone/insulin-like growth factor system in fish and other vertebrates. *Comp. Biochem. Physiol. A* 163: 231–245.
- Reinecke M. (2010) Influences of the environment on the endocrine and paracrine fish growth hormone–insulin-like growth factor-I system. *Journal of Fish Biology* 76: 1233–1254.
- Reséndez A. y Salvadores M. (1983) Contribución al conocimiento de la biología de pejelagarto *Atractosteus tropicus* (Gill) y la tenguayaca *Petenia splendida* (Günther) del estado de Tabasco. *Biótica* 8(4):413-426.
- Saera-Vila A., Caldach-Giner J., Perez-Sanchez J., (2005) Duplication of growth hormone receptor (GHR) in fish genome: gene organization and transcriptional regulation of GHR type I and II in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). General and comparative

- endocrinology; 142(1-2):193-203.
- Sakamoto T., McCormick S., (2006) Prolactin and growth hormone in fish osmoregulation. *General and Comparative Endocrinology* 147: 24-30.
- Sanders, E. J., & Harvey, S. (2008) Peptide hormones as developmental growth and differentiation factors. *Developmental Dynamics*, 237(6):, 1537-1552.
- Sciara A., Rubiolo J., Somoza G., Arranz S., (2006) Molecular cloning, expression and immunological characterization of pejerrey (*Odontesthes bonariensis*) growth hormone. *Comparative biochemistry and physiology Toxicology & pharmacology: CBP*; 142(3-4):284-92.
- Shved N., Berishvili G., Baroiller J. Segner H., Reinecke M., (2008) Environmentally Relevant Concentrations of 17 α -Ethinylestradiol (EE2) Interfere With the Growth Hormone (GH)/Insulin-Like Growth Factor (IGF)-I System in Developing Bony Fish (*Oreochromis niloticus*). *Toxicological sciences* 106(1), 93-102.
- Small B., & Peterson B., (2005) Establishment of a time-resolved fluoroimmunoassay for measuring plasma insulin-like growth factor I (IGF-I) in fish: effect of fasting on plasma concentrations and tissue mRNA expression of IGF-I and growth hormone (GH) in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Domestic Animal Endocrinology* 28 202–215
- Soengas, J.L., Aldegunde, M., (2002) Energy metabolism of fish brain. *Comp. Biochem. Physiol. Part B: Biochem. Mol. Biol.* 131, 271–296.
- Stone, D.A.J., (2003) Dietary carbohydrate utilization by fish. *Rev. Fish. Sci.* 11, 337–370.
- Tacon A. G. J. (1993) Feed ingredients for warm water fish: fish meal and other processed feedstuffs. *FAO Fisheries Circular*, 845: 64.
- Teerijoki, H., Krasnov, A., Pitkänen, T.I., Mölsä, H., (2000) Cloning and characterization of glucose transporter in teleost fish rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Gene Struct. Expr.* 149: 290–294.
- Tello (1988). *Las instituciones y la pesca en el Estado de Tabasco*. Villahermosa Tabasco. México. 77 pp.
- Vélez E., Azizi S., Millán-Cubillo A., Fernández-Borràs J., Blasco J., Chan S., Calduch-Giner J., Pérez-Sánchez J., Navarro I., Capilla E., Gutiérrez J., (2015) Effects of Sustained exercise on GH-IGFs axis in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *American Journal of*

- Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology,
DOI: 10.1152/ajpregu.00230.2015
- Wiley O. (1976) The phylogeny and biogeography of fossil and recent gars (Actinopterygii: Lepisosteidae). Univ. of Kansas Hist. Nat. Mus. Publ. 64:1-111.
- Wood, A.W., Duan, C., Bern, H.A., (2005) Insulin-like growth factor signaling in fish. Int. Rev. Cytol. 243, 215–285.
- Yang, B.Y., Greene, M., Chen, T.T. (1999) Early embryonic expression of the growth hormone family protein genes in the developing rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Molecular reproduction and development, 53(2): 127-134.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.



Using cornstarch in microparticulate diets for larvicultured tropical gar (*Atractosteus tropicus*)

C. A. Frías-Quintana · J. Domínguez-Lorenzo ·
C. A. Álvarez-González · D. Tovar-Ramírez ·
R. Martínez-García

Received: 20 February 2015 / Accepted: 28 October 2015 / Published online: 14 November 2015
© Springer Science+Business Media Dordrecht 2015

Abstract Aquaculture in Mexico has been developed by the cultivation of commercial species. In Tabasco, the cultivation of native species is mainly limited by the lack of nutrition studies to support its crop profitability. Among these species is the tropical gar (*Atractosteus tropicus*), which has great potential for cultivation. However, the nutritional value of carbohydrates in diets for this species which contribute to improved growth and survival, have not been evaluated. Thus, in the present investigation, isoprotein and isolipid diets have been designed based on the substitution of cellulose by corn starch (D1: 0 % starch–15 % cellulose, D2: 7.5 % starch–7.5 % cellulose and D3: 15 % starch–0 % cellulose) and compared with a commercial trout diet (45 % protein and 16 % lipids). A total of 1800 larvae (0.008 ± 0.002 g and $10.5 \pm$ LT 0.126 mm) were used, distributed in a recirculation system in order to evaluate growth and survival for 30 days. The results show higher growth and survival of 97 % of larvae fed

the D3 diet, while cannibalism in the species was mitigated. Major digestive enzyme activities occurred (acid protease, alkaline protease, trypsin, chymotrypsin, leucine aminopeptidase, carboxypeptidase A, lipase, α -glucosidase and amylase) for larvae fed D3. It is concluded that the contribution of corn starch (15 %) replacing cellulose in the diet improves growth and survival of this species.

Keywords Amylase · Carbohydrates · Glucosidase · Lipase · Proteases · Tropical gar

Introduction

The tropical gar (*Atractosteus tropicus*) is a native species with a high human consumption in the southeast region of Mexico. It is distributed from southern Mexico to Central America, including Guatemala, El Salvador, Nicaragua and Costa Rica (Miller 2009). This species has great potential for cultivation, and this has been studied for several years, including its life cycle in captivity through controlled reproduction using hormonal inducers (Hernández-Vidal et al. 2000) and juvenile nutritional requirements (protein, energy and fat) (Huerta-Ortiz 2008; Jesus-Contreras 2008). Commercial farms can now produce offspring and grow them in different systems (Alvarez-González et al. 2007; Gómez-Gómez 2009), in the larval stage by feeding them with live prey

C. A. Frías-Quintana (✉) · J. Domínguez-Lorenzo ·
C. A. Álvarez-González · R. Martínez-García
DACBIOL Laboratorio de Acuicultura, Universidad
Juárez Autónoma de Tabasco, Carretera Villahermosa-
Cárdenas km 0.5, C.P. 86150 Villahermosa, Tabasco,
Mexico
e-mail: cafq22@hotmail.com

D. Tovar-Ramírez
CIBNOR, Instituto Politécnico Nacional 195, Playa Palo
de Santa Rita Sur, C.P. 23096 La Paz, B.C.S., Mexico

Published online: 14 November 2015

Springer

(*Artemia* sp.) and commercial trout food (Márquez-Couturier et al. 2006), but in this period mortality can sometimes reach 60 %. However, like many species of local interest, research is required related to the biology and physiology of the species, so that there is a solid foundation to establish it as a viable resource for aquaculture. Many current studies have been on the nutrition of freshwater and marine species based on the formulation of diets, specific recommendations to improve growth and survival, and other physiological aspects of digestive enzyme activities related to the assimilation of specific nutrients which will contribute to a faster development with higher growth and survival, mainly during the larval stage (Frías-Quintana et al. 2010). Some related fish nutrition studies have evaluated the assimilation of proteins, carbohydrates and lipids in different proportions, and have thus established a range of acceptable assimilations for a particular species; however, little is known regarding the use and replacement of carbohydrates in the diets of fish, so that the effect of these nutrients on growth seems to depend on the source, the concentration in the diet, the digestibility, the level of food intake by the species and environmental conditions (Krogdahl et al. 2005). Starch, as a polysaccharide, is regarded as one of the most important ways to provide carbohydrate in the diets of fish (Guevara 2003).

Some studies on the use of alternative sources of carbohydrates in fish have been conducted in species such as common carp *Cyprinus carpio* (Keshavanath et al. 2002), grouper *Epinephelus malabaricus* (Shiau and Lin 2002), rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) (Krogdahl et al. 2004), pacú (*Piaractus mesopotamicus*) (Muñoz-Ramírez et al. 2005), *Labeo rohita* (Kumar et al. 2008), cobia (*Rachycentron canadum*) (Webb et al. 2010), catfish (*Mystus nemurus*) (Hamid et al. 2011), *Sebastes schlegeli* (Lee and Pham 2011), and gold *Megalobrama amblycephala* (Wu et al. 2013), in which the authors reported that many can use carbohydrates (starches) with excellent effects on both growth and survival; however, Morris (1997) suggested that carbohydrates should not exceed 15 % dry basis in the diets of fish, due to the fact that excess carbohydrates in the diet can result in stunting and reduced digestibility of nutrients. Thus far, some very digestible diets containing carbohydrates in amounts ranging from 10 to 20 % of the diet have been developed, without significantly affecting growth or survival (Lazo 2000). Thus, the present study aims to

evaluate the effect of balanced diets with different levels of carbohydrates (corn starch/cellulose) on the growth, survival and digestive enzyme activities in the larvae of *A. tropicus*.

Materials and methods

Obtaining larvae

For this study, a total of 1800 embryo *A. tropicus* were obtained from an induced spawning brood stock (1 female, average weight 3.5 kg, and 3 males, average weight 1.5 kg). The specimens used were obtained from a reproductive batch in the Tropical Aquaculture Laboratory (LAT) in the Academic Division of Biological Sciences (DACBIOL), Juarez Autonomous University of Tabasco (UJAT). The parents (three males and one female) were placed in a circular 2000-l pond. Earlier, the female was anesthetized with methanesulfonate tricaine MS-222® (Argent Chemical Laboratories™) at 200 mg l⁻¹ and was injected with 35 mg kg⁻¹ LHRHa (Hernández-Vidal 2002), after which the larvae (5 days post-hatching) were placed in circular plastic 70-l tanks connected to a recirculation system with a reservoir of 1500 l which functions for the sedimentation of solids and as a biological filter, and a water pump 1 HP (Jacuzzi, JWPA5D-230A; Delavan, WI, USA). The water quality of the system was monitored daily for the 30 days of larvae cultivation, recording the temperature (24.6 ± 2 °C) and dissolved oxygen (5.6 ± 0.3 mg l⁻¹) by an oximeter (YSI 85; OH, USA) and pH (7.1 ± 0.2) with a potentiometer (HANNA HI 991001; Romania). Partial water changes of 50 % every 2 days and 100% every 5 days were carried out. Food was provided to satiation 5 times a day (0800, 1100, 1300, 1500 and 1800 hours), the time distribution ensuring that the feed offered was consumed to the maximum. Separate groups of cannibal organisms were formed, which were isolated and given the same diet with the aim of adapting them to food and then returning them back to each treatment.

Experimental design

In this experiment, there was a control diet (DC) of commercial trout feed (Silver Cup™), with 45 %

protein and 16 % lipids, and three experimental diets. Isoprotein (45 %) and isolipids (15 %) were evaluated for the larval gar. The experimental diets (D1–D3) were designed by replacing the cellulose with cornstarch (D1: 0 % starch–15 % cellulose, D2: 7.5 % starch–7.5 % cellulose and D3: starch 15–0 % cellulose), allowing the increase of the calorie levels in experimental diets (4096 ± 0.37 ; 4162 ± 0.37 and 4226 ± 0.37 cal g⁻¹, respectively) (Table 1).

The assignments of treatments in the tanks were randomly triplicated, planting 150 organisms per experimental unit, which consisted of plastic tubs of 70 l capacity adapted to a recirculating system.

Formulation and preparation of experimental diets

The formulations were made through the MIXITWIN v.5.0 program for designing diets which were isocaloric and isolipid. For the preparation of the

experimental diets, a protocol proposed by Alvarez-González et al. (2001) was followed. The ingredients were weighed according to the formulations shown in Table 1, using an analytical balance with a capacity of 2000 g (Ohaus CS2000, China), and the macronutrients were dry-mixed for 15 min using an industrial mixer (Bathamex, 178716; Mexico DF, Mexico). Similarly, the micronutrients (premix of vitamins, minerals, vitamin C) were weighed and were added to the mixture of the macronutrients, mixing for another 15 min. Next, the liquid ingredients (fish oil and soy lecithin) were added to the above mixture and mixed for another 15 min and weighed. Finally, water (about 400 ml per kg of diet) was added and mixed for another 15 min. The obtained mixture was placed in a mill of 1 HP (Torrey, M-22RI, Monterey CA, Mexico) to obtain pellets with a screen of 5 mm which were dried at 60 °C for 24–30 h in an oven (Coriat, HC-35-D; DF, Mexico). The experimental diets were refrigerated at –20 °C until further use.

Table 1 Preparation of the experimental microparticle diets used during the in vivo evaluation of *Atractosteus tropicus* larvae

Ingredients (g/100 g diet)	D1	D2	D3	Control diet
Fishmeal ^a	41.07	40.63	40.63	
Flour renderes ^a	30	30	30	
Alpha cellulose ^b	15	8	–	
Cornstarch ^c	–	7.4	15.4	
Fish oil ^d	6.9	6.9	6.9	
Soy lecithin ^e	4	4	4	
Grenetin ^f	2	2	2	
Vitamin C ^g	0.5	0.5	0.5	
Vitamin and mineral premix ^h	0.5	0.5	0.5	
Chemical composition (g kg ⁻¹ BS)				
Energy (cal g ⁻¹)	4096 ± 0.037	4162 ± 0.37	4226 ± 0.37	5667 ± 15.7
Protein	45 ± 0.02	45 ± 0.02	45 ± 0.02	51.5 ± 0.4
Lipids	15 ± 0.01	15 ± 0.01	15 ± 0.01	15.5 ± 0.4
Fiber	16.2 ± 0.37	9.2 ± 0.37	1.2 ± 0.37	1.04 ± 0.1
Ash	15.1 ± 0.037	15.1 ± 0.37	15.1 ± 0.37	10.3 ± 0.0

^a Proteínas marinas y agropecuarias, Guadalajara, Jalisco

^b Sigma-Aldrich, catalogue no. C8002

^c MSA Industrializadora de maíz, Guadalajara, Jalisco, México

^d GALMEX Comercializadora de Insumos Agrícolas, Villahermosa, Tabasco, México

^e Pronat Ultra, Mérida, Yucatán, México

^f D'gari Productos alimenticios y dietéticos relámpago, Tlalpan, México D.F.

^g ROVIMIX[®] C-EC (Roche) agente activo de 35 %

^h Pedregal (para trucha Silver Cup), Toluca, Edo. Mex., México

Evaluation of survival and growth

The experiment lasted 30 days from the onset of exogenous feeding, immediately after absorption of the yolk and opening of the mouth and anus (5 DDE). Biometry was performed every 10 days when the individual weights were recorded together with the total length of the entire population. Weights (g) were measured with a digital scale (Ohaus A5200, USA) and lengths (cm) with a vernier. At the end of the experiments, survival was calculated using the following formula:

$$S = (N_f/N_i) \times 100.$$

where N_i is the initial number of organisms and N_f the final number of organisms.

Biochemical analyzes

Enzyme activity assays were performed using enzyme extracts obtained by maceration of visceral package larvae, using 150 larvae per treatment (50 per replicate), when heads and tails were cut off and placed on ice, to prepare multi-enzymatic extracts. Each sample was homogenized in cold (4 °C) Tris-HCl 50 mmol l⁻¹, pH 7.5 (15 mg ml⁻¹) and centrifuged at 16,000g for 15 min at 4 °C. The supernatant was collected and stored at -20 °C before the biochemical analysis. The concentration of soluble protein in the samples was measured according to Bradford (1976), using bovine serum albumin as a standard (1 mg ml⁻¹). All enzyme assays were performed in triplicate.

Alkaline protease activity was measured following the method established by Walter (1984), using casein (0.5 %) as substrate in 50 mmol l⁻¹ Tris-HCl, pH 9. Acid protease (pepsin activity) was measured following the technique of Anson (1938) using hemoglobin (0.5 %) as substrate in 100 mmol l⁻¹ glycine-HCl, pH 2. The mixtures were incubated at 37 °C, the reaction was stopped by adding 0.5 ml 20 % TCA, and the absorbance of the reaction products was measured at 280 nm. The unit of enzymatic activity was defined as 1 µg of tyrosine liberated per minute, based on the molar extinction coefficient (MEC) of 0.005 at 280 nm. Trypsin activity was measured following Erlanger et al. (1961) at 25 °C using BAPNA (N-benzoyl-DL-arginine p-nitroanilide) as substrate in

50 mmol l⁻¹ Tris-HCl, pH 8.2 and 10 mmol l⁻¹ CaCl₂. Chymotrypsin activity was measured according to the DelMar et al. (1961) method at 25 °C using SAAPNA (N-succinyl-ala-ala-pro-phe p-nitroanilide) as substrate in 10 mmol l⁻¹ DMSO and 100 mmol l⁻¹ Tris-HCl, pH 7.8 and 10 mmol l⁻¹ CaCl₂. Carboxypeptidase A activity was measured using the method described by Folk and Schirmer (1963) with hippuryl-L-phenyl-alanine as substrate in 25 mmol l⁻¹ Tris-HCl and 500 mmol l⁻¹ NaCl at pH 7.5. Leucine aminopeptidase activity was measured with leucine p-nitroanilide in 0.1 DMSO and 50 mmol l⁻¹ sodium phosphate, pH 7.2 at 25 °C (Maraux et al. 1973). The reactions in all the above-described techniques were stopped with 30 % acetic acid. Enzymatic activity was defined as 1 µg of nitroanilide released per minute, using the molar extinction coefficient of 8.8 for trypsin, chymotrypsin and leucine aminopeptidase (8.2) at 410 nm.

The α-amylase activity was measured using starch (2 %) as substrate in 100 mmol l⁻¹ phosphate-citrate, 50 mmol l⁻¹ NaCl, pH 7.5, at 600 nm as described by Robyt and Whelan (1968). Lipase activity was quantified according to Versaw et al. (1989) using 2-naphthyl caprylate (200 mmol l⁻¹) as substrate in 50 mmol l⁻¹ Tris-HCl, pH 7.2 and sodium taurocholate (100 mmol l⁻¹). Incubation lasted 30 min after which the reaction was stopped with TCA (0.72 N); then, fast blue (100 mmol l⁻¹) was added plus ethanol/ethyl acetate (1:1 v/v) to clarify. The activity unit was defined as 1 µg of naphthol released per minute at 540 nm, with a molar extinction coefficient of 0.02. The activity of α-glucosidase was determined using the technique of Dahlqvist (1960a), using as substrate α-p-nitrophenol glucoside (10 mM) dissolved in a buffer solution (potassium phosphate 67 mM, pH 6.8) followed by 60 min incubation in the enzyme extract and stopping the substrate reaction with potassium carbonate (100 mM); the absorbance was measured at 420 nm using a standard calibration curve for p-nitrophenol α-glucoside (Sigma). The α-glucosidase activity was expressed as a unit of enzyme which liberates 1 mol of D-glucose, p-nitrophenyl α-D-glucoside per minute.

All assays were performed in triplicate. The specific individual activity of the extracts was determined using the following equations: (1) units ml⁻¹ = [AAbs × final reaction volume (ml)]

$[\text{CEM} \times \text{time (min)} \times \text{volume of extract (ml)}]^{-1}$; (2) $\text{units mg protein}^{-1} = [\text{Units per ml}] [\text{mg of soluble protein}]^{-1}$, in which AAbs is the increase in absorbance at a given wavelength, and EMC is the molar extinction coefficient for the reaction product ($\text{ml } \mu\text{g}^{-1} \text{cm}^{-1}$).

Statistical analyses

For evaluation of the growth in weight and length, data from the experiment were tested for normality (KS) and homoscedasticity (Levene), and analysis of variance (ANOVA) was applied. And to detect differences between treatments, the posteriori Tukey test was used. All tests were carried out using a 0.05 significance level with the software Statistica™ v.8.0 (Analytical Software, AZ, USA).

Results

Evaluation of growth and survival

The results obtained for further growth in tropical gar larvae showed that those which were fed the D3 diet (15 % starch–0 % cellulose) had an average weight of $4.17 \pm 0.42 \text{ g}$ and $70.02 \pm 9.18 \text{ mm}$ size, followed by individuals who consumed D2 (7.5 % starch–7.5 % cellulose) with $2.91 \pm 0.23 \text{ g}$ and $55.99 \pm 7.70 \text{ mm}$, then the control diet (commercial feed Silver Cup™ trout) with $0.318 \pm 0.13 \text{ g}$ and $43.79 \pm 5.22 \text{ mm}$, while D1 (0 % starch–100 % cellulose) had the lowest growth with $0.145 \pm 0.04 \text{ g}$ and $33.19 \pm 3.92 \text{ mm}$ size. From the statistical point of view, significant differences between the four groups ($P > 0.05$) (Fig. 1a, b) were observed. Also, at the end of the experiment, survival with one-way ANOVA was analyzed, and significant differences ($P < 0.0001$) were detected. The highest survival rate was obtained for larvae fed the D3 diet with 97.8 % survival, followed by D2 with 58.4 % survival, followed by the control diet (Silver Cup™) with a 7.3 % survival, with D1 scoring the lowest survival with 6.9 % (Fig. 2).

Enzyme activities

The specific activity of alkaline protease showed no significant difference ($P > 0.05$) between treatments,

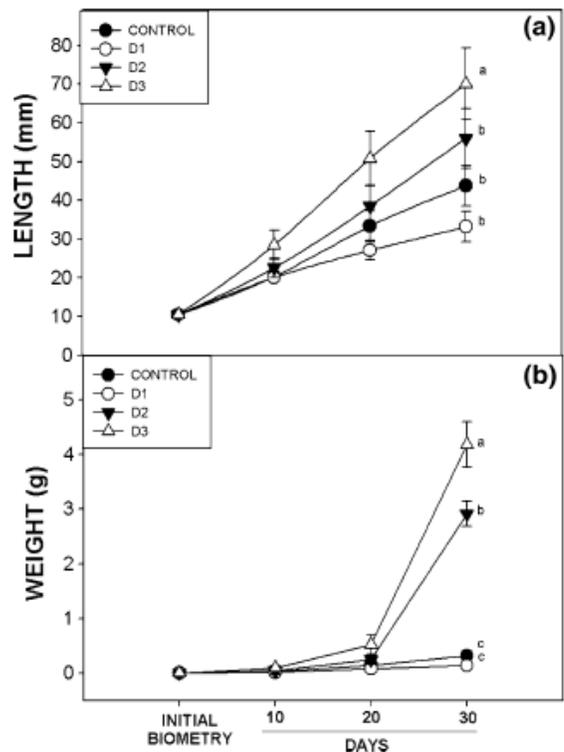


Fig. 1 a Total length ($\text{mm larvae}^{-1} \pm \text{SD}$, $n = 150$) and b mean wet weight ($\text{g larvae}^{-1} \pm \text{SD}$, $n = 150$), of *Atractosteus tropicus* larvae

although a slightly higher activity for larvae fed the D2 diet, followed by those fed D1, then those fed D3, with the control diet scoring the lowest enzyme activity. The enzymatic activity of acid protease (pepsin) was statistically higher ($P < 0.05$) for those fed the D3,

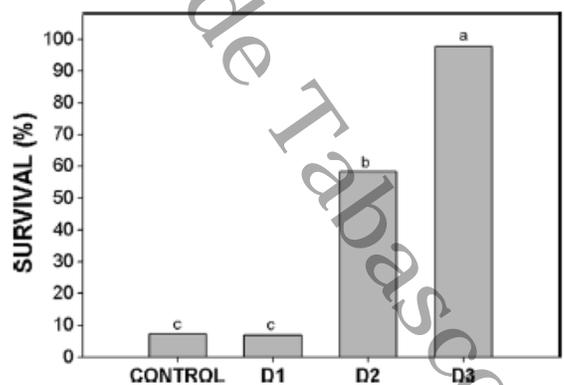


Fig. 2 Overall survival of larvae registered during feeding diet microparticulates (mean \pm SD, $n = 150$)

followed by larvae fed the D2, those fed the control diet, and finally the larvae fed the D1 which had the lowest enzyme activity (Fig. 3).

The trypsin activity showed significant differences among all treatments ($P < 0.05$) in which the larvae fed the D3 diet had the highest activity, followed by those fed D1, then D2 and finally those who ate the control diet had the lowest enzyme activity (Fig. 4a). The specific activity of chymotrypsin was statistically different ($P < 0.05$) among all treatments in which larvae fed the D3 diet had the highest activity, followed by those fed D2, then those fed the control diet while those who had the lowest activity were fed D1 (Fig. 4b). The specific activity of leucine aminopeptidase showed significant differences among all treatments ($P < 0.05$) in which activity was greater for larvae fed the D3 diet, followed by D2, then D1, and lower enzyme activity were fed the control diet (Fig. 4c). Carboxypeptidase A activity also showed statistical differences among all treatments ($P < 0.05$) which was presented the highest activity for larvae fed the D3 diet, followed by D1, then D2, while those that had the lowest activity were fed the control diet (Fig. 4d).

As to the specific activity of α -amylase enzyme, increased activity ($P < 0.05$) was detected in larvae fed the D3 diet, followed by those who used D1 and D2 which were statistically equal to each other, and finally the larvae that consumed the control diet recorded the lowest activity (Fig. 5a). With respect to the specific activity of α -glucosidase enzyme, increased activity was observed in treatment D3, being lower in the

control treatment (Fig. 5b). Finally, with respect to the specific activity of lipase, the maximum activity of larvae fed the D3 diet is statistically different from the other treatments ($P < 0.05$), followed by those who were fed with D2 and the control diet, which were statistically equal to each other, and finally, those that had the lowest activity were larvae that were fed with D1 (Fig. 5c).

Discussion

The results of this research indicate that the larvae fed the diet designed with 15 % corn starch–0 % cellulose outperformed in growth and survival (average weight 4.17 g, average total length 70.02 mm and 97.8 % survival) larvae fed on the other diets. This is mainly due to the presence of dietary digestible carbohydrates (starch), as these provide the energy required for growth and development, especially during the larval stage; however, the use of carbohydrates in formulations for fish depends on their type and concentration, and the species and cultivation conditions, which may promote greater digestibility, improving the level of food intake and consequently growth and larval survival (Krogdahl et al. 2005). In contrast, the results of other studies by various authors on the same species differ from the results obtained in this investigation including with regard to survival; for example, Huerta-Ortiz (2008) evaluated the lipid levels (5, 10, 15 and 20 %), obtaining better results with levels of 15 and 20 % fat, obtaining 34.66 % survival. Meanwhile, Jesus-Contreras (2008) evaluated the protein levels of pre-juvenile tropical gar fed 60 % protein and an energy level of 400 g diet Kcal/100 obtaining survival of 86 %, although this was done in juvenile fish.

In this sense, Márquez-Couturier et al. (2006) conducted experiments on substitution mainly of live food *Artemia nauplii* by artificial food, evaluating growth and survival, and obtained the lowest survival rate (67 %) with artificial food, while the supply of *A. nauplii* survival was significantly higher (90 %), similar to that obtained in our study. Additionally, Frías-Quintana et al. (2010), designed microparticulate diets for larval gar with different animal and plant protein sources, achieving greater growth and survival for larvae fed the diet Renderes (flour pork and chicken), an increase in length of 98 mm and a survival of 68 %, which is lower than that obtained in

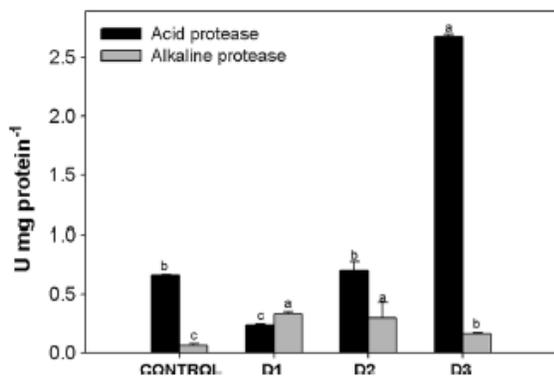


Fig. 3 Digestive enzyme activities during larviculture of *A. tropicus* (mean \pm SD, $n = 150$). Specific enzymatic activity of acid protease (black) and specific enzyme activity of alkaline protease (gray)

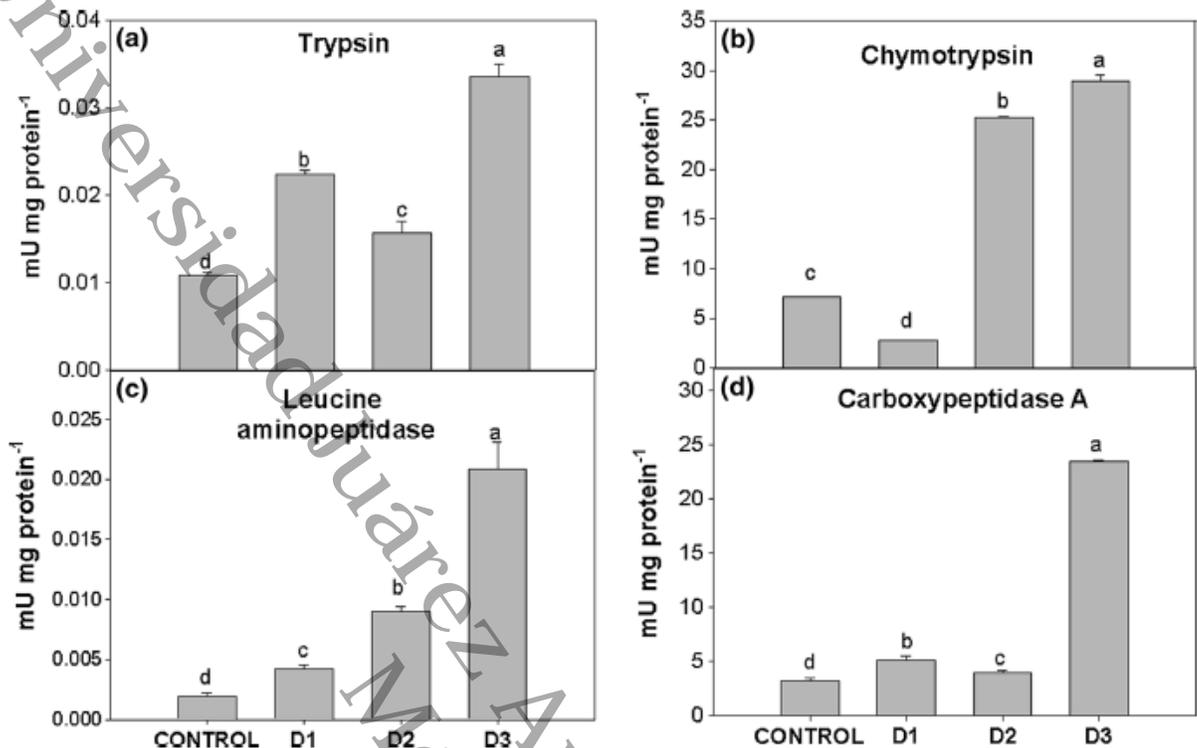


Fig. 4 Digestive enzyme activity during larval culture (mean \pm SD, $n = 150$). Specific enzymatic activities of trypsin (a), specific enzymatic activities of chymotrypsin (b), specific

enzymatic activities of leucine aminopeptidase activities (c) and specific enzymatic activities of carboxypeptidase A (d)

this study which included diets designed for this study based on those of Frías-Quintana et al. (2010) previously developed for *A. tropicus* larvae. Whereas previous studies have implemented the use of formulated food in cultivated larval in order to reduce production costs of live food, this has the advantage of introducing nutrients which are not available in live food (Cerecedo-Civera et al. 2004); Thus, it is important to note that, to date, such high growth and survival for *A. tropicus*, which is related to the inclusion of corn starch in the diet, has not achieved.

Thus, several studies have shown that the attachment of carbohydrates promotes better development, coinciding with that reported by Lazo (2000) who mentions that fish larvae seem to indicate a preference for the production of energy from carbohydrates, including in diets amounts ranging from 10 to 20 % without affecting growth or survival. In this respect, several studies support this principle as in the case of Yamamoto et al. (2001) with common carp and rainbow trout, Shiau and Lin (2002) with the grouper

Epinephelus malabaricus, Krogdahl et al. (2004) with rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* and Atlantic salmon *Salmo salar*, Muñoz-Ramírez (2005) *Piaractus mesopotamicus*, Tan et al. (2006) in the goldfish *Carassius auratus gibelio* and Chinese catfish *Leiocassis longirostris*, Kumar et al. (2008) *Labeo rohita*, Webb et al. (2010) with juvenile cobia *Rachycentron canadum*, Hamid et al. (2011) with catfish *Mystus nemurus*, and Lee and Pham (2011) with *Sebastes schlegeli*, and golden *Megalobrama amblycephala* (Wu et al. 2013; Li et al. (2013) where these authors reported that the use of carbohydrates allows for positive growth and survival in fish because it provides the nutrients needed for appropriate development.

Taking into account the above, carbohydrates are the main source of nutrients used for energy intake and energy reserve metabolism, stored as glycogen in the liver and muscles (Murray et al. 2007) During the larval stage, fish require more energy for growth and good development, and it is known that, before the fish use energy for growth, they must cover the energy

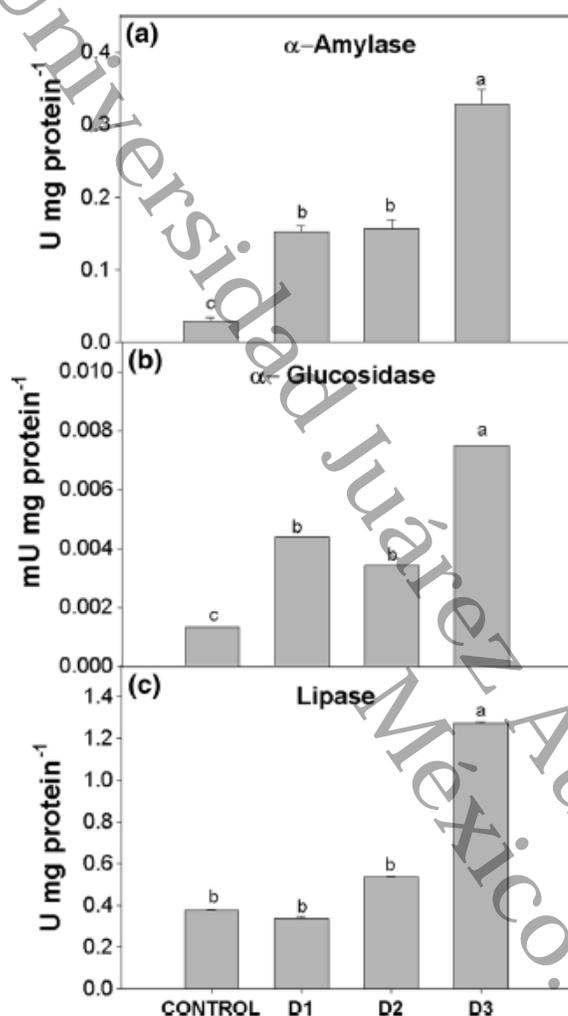


Fig. 5 Digestive enzyme activities during larviculture of *A. tropicus* (mean \pm SD, $n = 150$). Specific enzyme activity of lipase (a), α -glucosidase (b) and amylase (c)

demands for maintenance and voluntary movement (which represents 70 % of dietary energy) using a protein energy source. There are indications that carnivorous fish can compensate for this energy demand, increasing consumption of food to maintain growth (Stephan et al. 1996). In this case, starch is a major source of energy supply, and therefore is a better feed for utilization and retention of proteins (Muñoz-Ramirez et al. 2005). Good growth and saving proteins are related to the fact that glucose from a starch-digested oxidative substrate is preferred to the nerve tissue and blood cells, while the carbohydrate present in the diet of the fish can depress activity gluconeogenesis, thus diverting amino acids away from

oxidative pathways (Sanchez-Muros et al. 1996). Thus, glucose levels must be maintained constant to allow for adequate metabolism in this balance involving the secretion of insulin, glucagon, growth hormone and IGF (insulin-like growth factor) (Hemre et al. 2002). The stored glycogen is used efficiently during periods of food deprivation, including the synthesis of pentoses, thus supporting the synthesis of nucleic acids needed for overall growth phenomena (Hemre et al. 2002).

The knowledge of the digestive physiology of a species to cultivate is very important in determining the type and amount of nutrients that the body is able to leverage (Álvarez-González et al. 2008a, b); in this case, the digestive and absorptive capacities play an important role in the growth of the fish (Hakim et al. 2006). The activities of digestive enzymes largely determine the ability of an animal to obtain a source of nutrients for a particular food (Furne et al. 2005). In the present study, the dietary inclusion of corn starch significantly increased the activities of digestive enzymes (acid proteases, trypsin, chymotrypsin, leucine aminopeptidase, carboxypeptidase A, amylase and lipase) of larval *A. tropicus* fed with the D3 diet compared with those supplied with D2 and trout diet. Moreover, digestion and absorption of carbohydrates seem to take place along the same general routes in herbivores, omnivores and carnivores (Krogdahl et al. 2005). In this regard, one of the most important enzymes in the degradation of starch is amylase, which acts on polysaccharides by hydrolyzing the links α - and β -amylase (endoglucosidases), while disaccharides and oligosaccharides are hydrolyzed into constituent monosaccharides by various enzymes in the side of the bowel. Thus, digestion continues intracellularly by enterocytes possessing disaccharidases enzymes. The enzyme α -amylase ($\alpha(1 \rightarrow 4)$ -D-glucan glucanohydrolase, catalyzes the endohydrolysis $\alpha(1 \rightarrow 4)$ -glycosidic starch and similar molecules of shorter oligosaccharides, including maltotriose and maltose (Murray et al. 2007). In contrast to mammals, where the amylase is produced in the salivary and pancreatic cells, the only source of α -amylase in fish seems the exocrine pancreas (Krogdahl et al. 2005), which has been observed in carp such as *Cyprinus carpio* and *Carassius auratus* (Fernández et al. 2001). Also, there are no conclusive results where the authors affirm the capacity of fish to utilize carbohydrates: including Xu et al. (2009) with carp *Carassius auratus*

using prebiotic oligosaccharide; Wu et al. (2013) with the gold *Megalobrama amblycephala* supplementing the diet of fructo-oligosaccharides; Li et al. (2013) with *Megalobrama amblycephala* testing proportions of carbohydrate/lipid and evaluating all the growth, body composition, enzyme activities finding positive results; and the high level of carbohydrates in the diet promotes glycolysis and lipogenesis in these species, but does not induce hyperglycemia which is an important factor in fish health.

Enzymes that enable the proper functioning of the digestive system including stomach acid protease activity (pepsin) were also evaluated, which was very high compared to intestinal alkaline proteases, consistent with other authors, such as Essed et al. (2002) who evaluated the digestive proteases in the bluefin tunnus (*Thunnus thynnus*) and found high activities of acid proteases in the stomach compared with the alkaline activity detected in the intestine. Meanwhile, Moyano et al. (1996) and Frías-Quintana et al. (2010) in order to determine enzyme activity in *Sparus aurata* and *A. tropicus* mentioned that the presence of increased acid activity is indicative of the presence of a well-developed functional stomach and gastric glands, which characterize monogastric fish, and this has also been observed in species such as *Scleropages formosus* (Natalia et al. 2004) and *Scleropages maximus* (Wang et al. 2006). Thus, the results obtained in this study show that tropical gar larvae fed a diet hydrolysis of protein and carbohydrates, whereas in the intestinal part of their structure hydrolysis terminates monomers being absorbed by the enterocytes (Infante and Cahu 2001; Ming-Ji and Ching-Feng 2006; Frías et al. 2010), as has been reported in *Symphysodon aequifasciata* (Chong et al. 2002), blue tunnus *Thunnus thynnus* (Essed et al. 2002) and *Atractosteus tristoechus* (Comabella et al. 2006).

For alkaline proteases, a pattern similar to the acid protease is shown, being the diet with the greater amount of starch, which promotes greater activity of alkalines such as trypsin and chymotrypsin endoproteases as well as exopeptidases such as leucine aminopeptidase and carboxypeptidase A, which are present from hatching (before yolk absorption) and throughout the larval period as has also been reported

for species such as stickleback, *Anoplarchus purpureus* and walleye *Sander lucioperca* (Chan et al. 2004; Hamza et al. 2007). Also, the enzyme activity of leucine aminopeptidase has been used as another indicator of the nutritional quality by decreasing its activity, or increasing it indicating that maturation of microvilli of enterocytes was detected in larvae of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*), tilapia (*Oreochromis niloticus*), mayan cichlid *Cichlasoma urophthalmus* (López-Ramírez et al. 2011) and bay snook *Petenia splendida* (Uscanga-Martinez et al. 2011), where the increase of these activities have been correlated with the maturation of the enterocytes, but the activity varies according to the diet provided (Hakim et al. 2007).

Similar cases have presented the specific activity of the lipase, which exhibits greater activity in relation to diet corn starch (D3), so that the presence of carbohydrates in the diet not only activates the main proteolytic enzymes but also promotes activation of lipid, glycosides and amylase enzymes, which together with the proteases, allow complete digestion of nutrients and the absorption of the hydrolysis products to be used in various metabolic processes, as reported for perch *Perca fluviatilis* (Cuvier-Pérez and Kestemont 2002), hake *Melanogrammus aeglefinus* (Perez-Casanova et al. 2006), grouper *Epinephelus colloidis* (Eusebio et al. 2004), *Labeo rohita* (Chakrabarti et al. 2006), *A. tristoechus* (Comabella et al. 2006), *Paralichthys californicus* (Álvarez-González 2008a), and which in turn relate to morphophysiological changes during larval development and feeding habits (Horn et al. 1986).

Additionally, studies have been conducted on *A. tropicus*, as reported by Frías-Quintana et al. (2010) and Guerrero-Zárate et al. (2013), who determined the proteolytic enzyme activities, amylase and lipase in larval and juvenile tropical gar, who argue that this species has a high digestive capacity from 15 days after hatching (DDE) and throughout its development as juvenile and adult. Additionally, Cahu et al. (2004) mention that the detection of amylase indicates not only the maturation of enterocytes but also the possibility of including some carbohydrates to supplement energy intake during larval feeding by carnivorous fish but this is limited.

Conclusion

The results obtained in this study support the conclusion that the diet formulated with the inclusion of 15 % of digestible carbohydrates (corn starch) in place of indigestible fiber (cellulose) for larvae of *A. tropicus* can get more growth and survival, and in turn decrease cannibalism which means that increased digestive enzyme activity is promoted, which is an indicator of hydrolysis of food and assimilation of biomolecules from the diet provided, where corn starch may be the main source of energy supply. It should also be noted that the inclusion of starch can be eliminated by using 100 % *Artemia*, which is costly and obtains high yields of juveniles for fattening at later stages.

Acknowledgments The author is grateful to the Tropical Aquaculture Laboratory of the Academic Division of Biological Sciences, University Juárez Autonomous of Tabasco, for technical support in conducting this experiment, and the National Counsel of Science and Technology (CONACYT) for the scholarship provided in conducting this research.

References

- Alvarez-González CA, Ortiz-Galindo JL, Dumas S, Martínez-Díaz SF, Hernández-Ceballos DE, Grayeb del Alamo T, Moreno-Legorreta M, Peña-Martínez R, Civera-Cerecedo R (2001) Effect of stocking density on the growth and survival of spotted sand bass *Paralabrax maculatofasciatus* larvae in a closed recirculating system. *J World Aquacult Soc* 32:130–137
- Alvarez-González CA, Márquez-Couturier G, Contreras-Sánchez WM, Rodríguez-Valencia W (2007) A strategy for the sustainable use of fisheries resources in Boca Chilapa, Wetlands Reserve Biosphere Centla, Tabasco: establishment of a plant production of native fish, alligator gar, Snook and Mayan cichlid. In: Halfter G, Guevara S, Melic A (eds) Towards a culture of conservation of biological diversity. Monographs of the third millennium. Zaragoza, Spain, vol VI, pp 197–205
- Álvarez-González CA, Cervantes-Trujano M, Tovar-Ramírez D, Conklin D, Nolasco H, Gisbert E, Piedahita R (2006) Development of digestive enzymes in California habit *Paralichthys californicus* larvae. *Fish Physiol Biochem* 31:83–93
- Álvarez-González CA, Márquez-Couturier G, Arias-Rodríguez L, Contreras-Sánchez WM, Uscanga-Martínez A, Perales-García N, Moyano-López FJ, Hernández-Jiménez R, Civera-Cerecedo R, Goytortua-Bores E, Isidro-Olán L, Almeida-Madrigal JA, Tovar-Ramírez D, Gutiérrez-Ribera JN, Arévalo-Galán LM, Eric G, Treviño L, Morales-Sánchez B (2008) Advances in digestive physiology and nutrition mojarra snook *Petenia splendida*. In: Cruz SE, Ricque MD, Tapia SM, Nieto LMG, Villarreal CDA, Lazo JP, Viana TV (eds) Memory advances in aquaculture nutrition IX and IX international symposium on aquatic nutrition. Autonomous University of Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, pp 135–235, 24–27 November 2008
- Álvarez-González CA, Moyano-López FJ, Civera-Cerecedo R, Carrasco-Chávez V, Ortiz-Galindo J, Dumas S (2008b) Development of digestive enzyme activity in larvae of spotted sand bass (*Palabrax maculatofasciatus*). *Fish Physiol Biochem* 34:373–384
- Anson ML (1938) The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin. *J Gen Physiol* 22:79–89
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254
- Cahu C, Rønnestad I, Grangier V, Zambonino Infante JL (2004) Expression and activities of pancreatic enzymes in developing sea bass larvae (*Dicentrarchus labrax*) in relation to intact and hydrolyzed dietary protein; involvement of cholecystokinin. *Aquaculture* 238:295–308
- Cerecedo-Civera R, Alvarez-Gonzalez CA, Moyano-López FJ (2004) Nutrition and feeding of marine fish larvae. In: Cruz-Suárez, LE, Ricque-Marie D, Nieto-López MG, Villarreal D, Scholz U, González M (eds) Advances in aquaculture nutrition VII Proceedings of the VII International Symposium on Aquaculture Nutrition, Hermosillo, Sonora
- Chakrabarti R, Rathore RM, Kumar S (2006) Study of digestive enzyme activities and partial characterization of digestive proteases in a freshwater teleost, *Labeo rohita*, during early ontogeny. *Aquacult Nutr* 12:35–43
- Chan AS, Hom MH, Dickson KA, Gawlicka A (2004) Digestive enzyme activities in carnivores y herbivores: comparisons among four closely related prickleback fishes (Teleostei: Stichaeidae) from a California rocky intertidal habitat. *J Fish Biol* 65:848–858
- Chong ASC, Hashim R, Chow-Yang L, Ali AB (2002) Partial characterization and activities of proteases from the digestive tract of discus fish (*Symphysodon aequifasciata*). *Aquaculture* 203:321–333
- Comabella Y, Mendoza R, Aguilera C, Carrillo O, Hurtado A, García-Galano T (2006) Digestive enzyme activity Turing early larval development of the cuban gar *Atractosteus tristoechus*. *Fish Physiol Biochem* 32:147–157
- Cuvier-Pérez A, Kestemont P (2002) Development of some digestive enzymes in Eurasian perch larvae *Perca fluviatilis*. *Fish Physiol Biochem* 24:279–285
- Dahlqvist A (1960a) Hog Intestinal α -glucosidases. Dissertation, University of Lund
- DelMar EG, Largman C, Brodrick J, Geokas M (1961) A sensitive new substrate for chymotrypsin. *Anal Biochem* 99:316–320
- Erlanger B, Kokowsky N, Cohen W (1961) The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Arch Biochem Biophys* 95:271–278
- Essed Z, Fernandez I, Alarcón FJ, Moyano FJ (2002) Characterization of digestive protease activity of bluefin tuna *Thunnus thynnus* (Linnaeus, 1758). *Bull Inst Esp Oceanogr* 18(1–4):99–107

- Eusebio PS, Toledo JD, Mamaug REP, Bernas MJG (2004) Digestive enzyme activity in developing grouper (*Epinephelus coioides*) larvae. In: Rimmer MA, McBride S, Williams KC (eds) Advances in grouper aquaculture. CIAR Monograph
- Fernández I, Moyano FJ, Diaz M, Martínez T (2001) Characterization of alpha-amylase activity in five species of Mediterranean sparid fishes (Sparidae, Teleostei). J Exp Mar Biol Ecol 262:1–12
- Folk J, Schirmer E (1963) The porcine pancreatic Carboxypeptidase A System. I. Three forms of the active enzyme. J Biol Chem 238:38–84
- Frias-Quintana CA, Alvarez-Gonzalez A, Márquez-Couturier G (2010) Design the microdiets for larviculture alligator gar *Atractosteus tropicus*. Univ Sci 26(2):265–282
- Fume M, Hidalgo M, Lopez A, Garcia-Gallego M, Morales A, Domezain A, Domezaine J, Sanz A (2005) Digestive enzyme activities in Adriatic sturgeon *Acipenser naccarii* and rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* A comparative study. Aquaculture 250:391–398
- Gómez-Gómez MA (2009) Design and operation of a laboratory production of juvenile alligator gar (*Atractosteus tropicus*) in Tuxtla Gutierrez, Chiapas, Mexico. Dissertation, University of Science and Arts of Chiapas, Mexico
- Guerrero-Zarate R, Alvarez-González CA, Perales-García N, Olvera-Novoa M, Frias-Quintana C, Martínez-García R, Contreras-Sánchez W (2013) Partial characterization of digestive proteases in Tropical gar *Atractosteus tropicus* juveniles. Fish Physiol Biochem. doi:10.1007/s10695-013-9902-7
- Guevara NW (2003) Formulation and preparation of diets for fish and crustaceans. Jorge Basadre Grohmann National University, Tacna-Peru
- Hakim Y, Uni Z, Hulata G, Harpaz S (2006) Relationship between intestinal brush border enzymatic activity and growth rate in tilapias fed diets containing 30 % or 48 % protein. Aquaculture 257:420–428
- Hakim Y, Rowland SJ, Guy JA, Mifsud C, Uni Z, Harpaz S (2007) Effects of genetic strain and holding facility on the enzymes in silver perch (*Bidyanus bidyanus*). Aquacult Res 38:361–372
- Hamid NK, Mahayat M, Hashim R (2011) Utilization of different carbohydrate sources and starch forms by bagrid catfish (*Mystus nemurus*) (Cuv & Val). Aquac Nutr 17:10–18
- Hamza N, Mhetli M, Kestemont P (2007) Effects of weaning age and diets on ontogeny of digestive activities and structures of pikeperch (*Sander lucioperca*) larvae. Fish Physiol Biochem 33:121–133
- Hemre GI, Mommsen TP, Krogdahl A (2002) Carbohydrates in fish nutrition: effects on growth, glucose metabolism and hepatic enzymes. Aquacult Nutr 8:175–194
- Hernández-Vidal U (2002) Identification and evaluation of sex hormone induction into the alligator gar (*Atractosteus tropicus*). Dissertation, Autonomous University of Nuevo León. Monterrey, Nuevo León, México
- Hernández-Vidal U, Márquez CG, McDonald VA, Morales LG (2000) Phases larvae feed alligator gar *Atractosteus tropicus*. In: Memory of the week video outreach and scientific Juarez Autonomous University of Tabasco. pp 288–292
- Hom MH, Neighbors MA, Murray SN (1986) Herbivore responses to a seasonally fluctuating food supply: growth potential of two temperate intertidal fishes based on the protein and energy assimilated from their macroalgal diets. J Exp Mar Biol Ecol 103:217–234
- Huerta-Ortiz M (2008) Lipid requirements in larval and juvenile alligator gar (*Atractosteus tropicus*). Dissertation, University Juarez Autonomous of Tabasco, Mexico
- Infante JZ, Cahu CL (2001) Ontogeny of the gastrointestinal tract of marine fish larvae. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol 130(4):477–487
- Jesus-Contreras R (2008) Protein/energy ratio in juvenile alligator gar (*Atractosteus tropicus*) using semi-purified diets. Dissertation, DACBIOL, UJAT, Villahermosa Tabasco, Mexico
- Keshavanath P, Manjappa K, Gangadhara B (2002) Evaluation of carbohydrate rich diets through common carp culture in manured tanks. Aquac Nutr 8:169–174
- Krogdahl A, Sundby A, Olli JJ (2004) Atlantic salmon (*Salmo salar*, L) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) digest and metabolize nutrients differently depending on water salinity and dietary starch level. Aquaculture 229:335–360
- Krogdahl AG, Hemre I, Mommsen TP (2005) Carbohydrates in fish nutrition: digestion and absorption in postlarval stages. Aquac Nutr 11:103–122
- Kumar V, Sahu NP, Pal AK, Kumar S, Gupta SK (2008) Gelatinized to non-gelatinized starch ratio in the diet of *Labeo rohita*: effect on digestive and metabolic response and on growth (Online Early Articles). J Anim Physiol Anim Nutr 92:492–501
- Lazo J (2000) Current and new perspectives in the development of diets for marine fish larvae Knowledge. In: Suárez Cruz LE, Ricque-Marie D, Tapia-Salazar M, Olvera-Novoa MA, Civera-Cerecedo R (eds) Advances in aquaculture nutrition. Proceedings of the V international symposium on aquaculture nutrition. Merida, Yucatan, Mexico, pp 300–311, 19–22 November 2000
- Lee S-M, Pham MA (2011) Effects of carbohydrate and water temperature on nutrient and energy digestibility of juvenile and grower rockfish, *Sebastes schlegelii*. Asian Aust J Anim
- Li XF, Wang Y, Liu WB, Jiang GZ, Zhu J (2013) Effects of dietary carbohydrate/lipid ratios on growth performance, body composition and glucose metabolism of fingerling blunt snout bream *Megalobrama amblycephala*. Aquac Nutr 19(5):701–708
- López-Ramírez G, Cuenca-Soria CA, Alvarez-Gonzalez CA, Tovar-Ramirez D, Ortiz-Galindo JL, Perales-García N, Márquez-Couturier G, Arias-Rodriguez L, Indy JR, Contreras-Sanchez WM, Gisbert E (2011) Development of digestive enzymes in larvae of Mayan cichlid *Cichlasoma urophthalmus*. Fish Physiol Biochem 37:197–208
- Maraux S, Louvard D, Baratti J (1973) The aminopeptidase from hog-intestinal brush border. Acta Biochim Biophys 321:282–295
- Márquez-Couturier G, Álvarez-González CA, Contreras-Sánchez WM, Hernández-Vidal U, Hernández-Franjutti AA, Mendoza-Alfaro RE, Aguilera-Gonzalez C, García-Galano T, Civera-Cerecedo R, Goytortúa-Bores E (2006) Advances in food and nutrition alligator gar *Atractosteus tropicus*. Advances in aquaculture nutrition. Autonomous University of Nuevo León, Monterrey, Nuevo Leon, Mexico, November 15–17

- Miller R (2009) Freshwater fishes of Mexico. Conabio, Mexico, pp 93–94
- Ming-Ji L, Ching-Feng W (2006) Developmental regulation of gastric pepsin and pancreatic serine protease in larvae of the euryhaline *Oreochromis mossambicus*. *Aquaculture* 261:1403–1412
- Morris PC (1997) Nutritional needs of bass and bream. *Fish Farmer International File*. November/December 28–31
- Moyano FJ, Díaz M, Alarcón FJ, Sarasquete MC (1996) Characterization of digestive enzyme activity during larval development of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Fish Physiol Biochem* 15:121–130
- Muñoz-Ramírez A, Cameiro D, Fávero G, Teixeira A (2005) Growth of juvenile pacu (*Piaractus mesopotamicus*) fed different sources of digestible carbohydrates. *Cienc Col Pec Rev* 18(4):332
- Murray RK, Grannr DK, Rodwell YW (2007) *Biochemistry Harper illustrated*. Ed.'s Modern manual, Mexico
- Natalia Y, Hashim R, Ali A, Chong A (2004) Characterization of digestive enzymes in a carnivorous ornamental fish, the Asian bony tongue *Scleropages formosus* (Osteoglossidae). *Aquaculture* 233:305–320
- Pérez-Casanova JC, Murray HM, Gallant JW, Ross NW, Douglas SE, Johnson SC (2006) Development of the digestive capacity in larvae of haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) and Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Aquaculture* 251:377–401
- Robyt JF, Whelan W (1968) Starch and its derivatives. In: Radley JA (ed) *Starch and Its Derivatives*. Chapman and Hall, London
- Sanchez-Muros MJ, Garcia-Rejon L, Lupianez JA, De la Higuera M (1996) Long-term nutritional effects on the primary liver and kidney metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). 2. Adaptive response of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity to high carbohydrate/low-protein and high-fat/non-carbohydrate diets. *Aquacult Nutr* 2:193–200
- Shiau SY, Lin YH (2002) Utilization of glucose and starch by the grouper *Epinephelus malabaricus* at 23 C. *Fish Sci* 68:991–995
- Stephan G, Dreanno C, Guiollaume J, Arzel J (1996) Incidence of different amounts of proteins, lipids and carbohydrates in diets on the muscle lipid composition in the turbot (*Scophthalmus maximus*). *Ichthyophysiol Acta* 19:11–30
- Tan Q, Xie S, Zhu X, Lei W, Yang Y (2006) Effect of dietary carbohydrate sources on growth performance and utilization for gibel carp (*Carassius auratus gibelio*) and Chinese longsnout catfish (*Leiocassis longirostris Günther*). *Aquac Nutr* 12:61–70
- Uscanga-Martinez A, Moyano-Lopez FJ, Alvarez-Gonzalez CA, Perales-García N (2011) Applications to improved nutritive food utilization cichlid grown in Mexico. In: Cruz-Suárez LE, Ricque-Marie D, Tapia-Salazar M, Nieto-López MG, Villarreal-Cavazos DA, Gamboa-Delgado J, Hernández-Hernández L (eds), *Advances in aquaculture nutrition XI—proceedings of the tenth first international symposium on aquaculture nutrition*, San Nicolas de los Garza, NL, Mexico. Autonomous University of Nuevo Leon, Monterrey, Mexico, pp 46–104, 23–25 November 2011, ISBN 978-607-433-775-4
- Versaw W, Cuppett SL, Winters DD, Williams LE (1989) An improved colorimetric assay for bacterial lipase in nonfat dry milk. *J Food Sci* 54:232–254
- Wang HY, Wang YJ, Wang QY, Xue CH, Sun M (2006) Purification and characterization of stomach protease from the turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Fish Physiol Biochem* 32:179–188
- Walter HE (1984) Proteinases: methods with hemoglobin, casein and azocoll as substrates. In: Bergmeyer HU (ed) *Methods of enzymatic analysis*, vol V. Chemic, Weinham, pp 270–277
- Webb KA, Rawlinson LT, Holt GJ (2010) Effects of dietary starches and the protein to energy ratio on grown and feed efficiency of juvenile cobia, *Rachycentron canadum*. *Aquac Nutr* 16:447–456
- Wu T, Liu W-B, Li H-Y, Xu W-N, He J-X, Li X-F, Jiang G-Z (2013) Effects of dietary supplementation of fructooligosaccharide on growth performance, body composition, intestinal enzymes activities and histology of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) fingerlings. *Aquac Nutr* 19:886–894
- Xu B, Wang Y, Li J, Lin Q (2009) Effect of prebiotic xylooligosaccharides on growth performances and digestive enzyme activities of allogynogenetic crucian carp (*Carassius auratus eibelio*). *Fish Physiol Biochem* 35:351–357
- Yamamoto T, Shima T, Furuita H, Suzuki N, Shiraishi M (2001) Nutrient digestibility values of a test diet determined by manual feeding and self-feeding in rainbow trout and common carp. *Fish Sci* 67:355–357

CAPITULO II

Ahorro energético proteínico utilizando almidón de papa en larvas de pejelagarto

(*Atractosteus tropicus*)

C.A. Frías-Quintana¹, C.A. Álvarez-González^{1*}, D. Tovar-Ramírez², S. Camarillo-Coop¹, R. Martínez-García¹, M.A. Galaviz³

¹DACBIOL Laboratorio de Acuicultura Tropical, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Carretera Villahermosa-Cárdenas km 0.5, 86139, Villahermosa, Tabasco, México. *autor de correspondencia: alvarez_alfonso@hotmail.com

²CIBNOR, Instituto Politécnico Nacional 195, Playa Palo de Santa Rita Sur, C.P. 23096 La Paz, B.C.S., México

³Facultad de Ciencias Marinas, Universidad Autónoma de Baja California (UABC), PO Box 76, 22860, Ensenada, BC, México

Resumen

En esta investigación se diseñaron dietas con diferentes niveles de carbohidratos para larvas de *Atractosteus tropicus*, basándose en la sustitución parcial de proteína por potato starch (0%S: 0% de almidón-100% celulosa, 16%S: 16% almidón-44% proteína; 22%S: 22% almidón-40% proteína; 28%S: 28% almidón-36% proteína) y se compararon con la dieta comercial de trucha (TD: 45% de proteína y 16% lípidos). Se utilizaron 2000 larvas (0.008 ± 0.002 g y una LT de 10.5 ± 0.126 mm) distribuidas en un sistema de recirculación, evaluándose el crecimiento, supervivencia, canibalismo y actividad de enzimas digestivas durante 30 días. Los resultados obtenidos muestran un mayor crecimiento y supervivencia, así como un menor índice de canibalismo en larvas alimentadas con la Dieta 28%S, y su vez se presentaron las mayores actividades enzimáticas digestivas lipídicas, amilásicas y glucosidasas, mientras que en proteasas (proteasa alcalina, tripsina, quimotripsina, leucina aminopeptidasa) variaron en relación con las dietas de 16%S y 22%S. Por lo que se concluye que el aporte de almidón de papa (28%S), mejora el crecimiento, la supervivencia y disminuye el canibalismo e incrementa la actividad enzimática digestiva, cubriendo el requerimiento de energía y disminuyendo la cantidad de proteína en la dieta.

Palabras clave: Amilasa, Almidón de papa, Carbohidratos, Glucosidasa, Larva, Lipasa, Proteasas

Introducción

La acuicultura en México específicamente en el Sureste, tienen un gran potencial, especialmente en las especies dulceacuícolas nativas entre las que se encuentra el tropical gar (*Atractosteus tropicus*), donde su producción a escala comercial se ha visto limitado por diversos factores, entre los cuales destacan la carencia de estudios respecto al desarrollo de alimentos específicos para la especie, principalmente durante la etapa larvaria, que permitan maximizar su crecimiento y supervivencia, e incrementar la producción de crías a escala masiva para la engorda ya sea por empresas sociales o privadas (Márquez-Couturier et al., 2006).

En el ámbito de la alimentación y nutrición de *A. tropicus*, se han realizado una gran cantidad de estudios sobre la utilización de presas vivas, principalmente nauplios de Artemia, así como la adaptación al consumo de alimento artificial para trucha (Silver Cup), evaluando su crecimiento y supervivencia (Hernández, 1999; López et al., 2005; Álvarez-González et al., 2007). En este aspecto, los avances han permitido mejorar la supervivencia (50 %) de las larvas al usar presas vivas a pesar de que se ha detectado un alto índice de canibalismo durante los primeros 15 días post-absorción de vitelo, tras utilizar el alimento artificial para trucha. Por este motivo, se requiere un manejo selectivo de las larvas para el canibalismo, puesto que puede ocasionar hasta un 95% de mortalidad (Márquez-Couturier et al., 2006). Si se busca mejorar el proceso de producción de semilla, es fundamental desarrollar alimentos específicos para las larvas al utilizar la información sobre su capacidad digestiva y determinar el potencial de los diversos ingredientes.

Con respecto a los estudios de nutrición en larvas de peces, se han evaluado la asimilación de proteínas, carbohidratos y lípidos en diferentes proporciones, y se ha establecido un intervalo aceptable para una especie en particular dependiendo del tipo de desarrollo ontogenético inicial que presenta (Balon, 1984); sin embargo, se conoce muy poco con referencia al uso y sustitución de carbohidratos en la dietas de peces, por lo que el efecto de

estos nutrientes sobre el crecimiento parece depender del ingrediente utilizado, concentración en la dieta, digestibilidad de nutrientes, nivel de la ingesta alimentaria, especies, condiciones ambientales, entre otros (Krogdahl et al., 2005). Al ser el almidón un polisacárido relativamente complejo, se ha observado que los niveles de inclusión es variable, aunque es factible su utilización en dietas de los peces, especialmente aquellos con hábitos omnívoros (Guevara, 2003).

Los trabajos desarrollados sobre el uso de carbohidratos como fuentes alternativas en peces se han realizado en especies como the common carp *Cyprinus carpio* (Keshavanath et al., 2002), grouper *Epinephelus malabaricus* (Shiau y Lin 2002), rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) (Krogdahl et al., 2004), pacu *Piaractus mesopotamicus* (Muñoz-Ramírez et al., 2005), roho labeo *Labeo rohita* (Kumar et al., 2008), cobia *Rachycentron canadum* (Webb et al., 2010), Asian redtail catfish *Mystus nemurus* (Hamid et al., 2011), Korean rockfish *Sebastes schlegeli* (Lee y Pham, 2011), Wuchang bream *Megalobrama amblycephala* (Wu et al., 2013), donde los diversos autores reportaron que es posible utilizar carbohidratos (almidones) con excelentes resultados sobre el crecimiento y supervivencia. Por otro lado, Morris (1997), sugirió que los carbohidratos no debe exceder al 15% en base seca en las dietas de los peces, debido a que el exceso de este tipo de nutrientes en la dieta da como resultados el retraso del crecimiento y reducción de la digestibilidad de los nutrientes en el organismo. Existen reportes donde se han logrado incluir en las dietas algunas formas muy digeribles de carbohidratos como la maltodextrina, en cantidades que van del 10 al 20% de la dieta sin llegar a afectar el crecimiento ni la supervivencia de manera significativa (Lazo, 2000). De esta manera, el presente trabajo, tiene como objetivo evaluar el efecto de dietas balanceadas con diferentes niveles de carbohidratos (almidón de papa/celulosa) sobre el crecimiento, supervivencia, canibalismo y actividades enzimáticas digestivas en larvas de *A. tropicus*.

Materiales y métodos

Obtención de larvas

Para este estudio se obtuvo un total de 2000 embriones de *A. tropicus*, a partir de un desove inducido de reproductores (1 hembra 3.5 Kg de peso promedio y 3 machos 1.5 Kg de peso promedio) mantenidos en el Laboratorio de Acuicultura Tropical (LAT) en la División Académica de Ciencias Biológicas (DACBIOL) de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco (UJAT). Los progenitores se colocaron en un estanque circular de 2,000 L de capacidad en proporción 1:3 (una hembra y tres machos). Previamente la hembra se anestesió con metasulfonato de tricaina MS-222® (Argent Chemical Laboratories™) a razón de 200 mg/L y fue inyectada con LHRHa, en dosis de 35 µg/kg (Hernández 1999), posteriormente las larvas (5 días post-eclosión) fueron colocadas en tanques de plástico circulares de 70 L, las cuales están conectadas a un sistema de recirculación con un reservorio de 1500 L que funciona como sedimentador de sólidos y filtro biológico, además de una bomba de agua 1 HP (Jacuzzi, JWPA5D-230A, Delavan WI, USA).

La calidad del agua del sistema fue monitoreada diariamente durante los 30 días de larvicultivo, registrando la temperatura ($24.6 \pm 2^{\circ}\text{C}$), el oxígeno disuelto (5.6 ± 0.3 mg/L) mediante un oxímetro (YSI 85, Ohio, USA) y el pH (7.1 ± 0.2) con un potenciómetro (HANNA HI 991001, Romania, Europa). Se realizaron recambios de agua parciales de 50% cada dos días y recambios totales cada 5 días, la alimentación fue proporcionada a saciedad 5 veces al día (8:00, 11:00, 13:00, 15:00 y 18:00 horas), distribuidas en el tiempo suficiente para asegurar que el alimento ofrecido fuera ingerido al máximo, a la vez que se realizaban separaciones de organismos que presentaban canibalismo, los cuales eran aislados y se les proporcionaba la misma alimentación con la finalidad de que se adaptaran al alimento y se reintegraban nuevamente a cada tratamiento.

Diseño experimental

En este experimento se evaluó el crecimiento de las larvas utilizando como dieta control (TD) el alimento comercial para trucha (Silver Cup™), con 45 % de proteína y 16 % de lípidos y cuatro dietas experimentales isolipídicas (15%) y con variaciones en los niveles calóricos, modificando los porcentajes de proteínas y carbohidratos para larvas de pejelagarto. Estos alimentos se diseñaron sustituyendo la celulosa por almidón de papa (S) incluyendo los siguientes tratamientos: T1: 0%S (0% de almidón-100% celulosa), T2: 16%S (44% proteína-16% almidón); T3: 22%S (40% proteína-22% almidón); T4: 28%S (37% proteína-28% almidón), lo que permitió reducir los niveles calóricos de las dietas experimentales (4024.32 ± 0.037 , 4239.43 ± 0.37 , 3984.37 ± 0.37 , 3719.28 ± 0.37 calorías/g respectivamente) (Tabla 1). Las asignaciones de los tratamientos en los tanques fueron de manera aleatoria y por triplicado, sembrando 150 organismos por unidad experimental.

Formulaciones y preparación de las dietas experimentales

La formulación se realizó por medio del programa MIXITWIN V. 5.0, diseñando las dietas para que fueran isolipídicas y manipulando los niveles calóricos de las dietas, adicionando un mayor porcentaje de carbohidratos (almidón de papa) en relación con el porcentaje proteínico. Para la elaboración de las dietas experimentales se siguió el protocolo propuesto por Álvarez-González et al., (2006), los ingredientes se pesaron según las formulaciones como se muestra en la tabla 1, con una balanza analítica con capacidad 2000 g (Ohaus mod. CS2000, China), se mezclaron los macronutrientes en seco durante 15 minutos (min) utilizando una batidora industrial (Bathamex, 178716, México D.F, México). De la misma manera, se pesaron los micronutrientes (premezclas de vitaminas, minerales, vitamina C) y fueron agregados a la mezcla de los macronutrientes, mezclando por otros 15 minutos. Se pesaron los ingredientes líquidos (aceite de pescado y lecitina de soya) se añadieron a la mezcla anterior y se mezclaron por otros 15 minutos. Por último, se agregó el agua (aproximadamente 400 ml por Kg de dieta) y realizando el mezclado final durante otros 15 minutos. La mezcla obtenida se colocó en un molino para carne 1 HP (Torrey, M-22RI, Monterrey N.L, México) para obtener pellets con una criba de 5 mm y fueron secados a 60°C entre 24 y 30 horas en un horno (Coriat, HC-35-D, D.F, México). Las dietas experimentales fueron refrigeradas a -20°C hasta su posterior utilización.

Evaluación de crecimiento, supervivencia y canibalismo

La duración del experimento fue de 30 días a partir del inicio de la alimentación exógena, inmediatamente después de la absorción del vitelo y apertura de boca y ano (5 DDE), se realizaron biometrías cada 10 días para registrar el peso individual y la longitud total de toda la población. Para medir el peso (g) se utilizó una balanza digital (Ohaus A5200, U.S.A.) y la longitud (cm) con un vernier. Al final de los experimentos se calculó la supervivencia usando la siguiente formula: $S = (Nf/Ni) * 100$. Donde Ni= numero inicial de organismos, Nf = número final de organismos. Para la evaluación del canibalismo se calculó utilizando la siguiente formula: $C = ((SO-SR)/NT) * 100$. Donde SO = supervivencia observada por tratamiento, SR= supervivencia actual, NT= número total de organismos por tratamiento (Kestemont et al., 2003).

Análisis bioquímicos

Los extractos enzimáticos se obtuvieron por medio de la maceración del paquete visceral de las larvas, para lo cual fueron disectadas en frío cortando cola y cabeza, fueron homogenizados en HCl-Tris 50 mmol l⁻¹, CaCl₂ 20 mmol l⁻¹, pH 8 a una concentración de (30 mg ml⁻¹), por medio de un homogenizador de tejidos y se centrifugaron a 14,000 rpm por 30 min a 4 °C. Se recobró la fracción soluble y se distribuyeron en alícuotas de 1 ml y se almacenaron a -20 °C hasta la realización de los análisis enzimáticos. Para el cálculo de la concentración de proteínas soluble de cada muestra, se utilizó la técnica de Bradford (Bradford, 1976), usando una solución estándar de albúmina bovina (1 mg ml⁻¹).

La actividad de proteasa ácida (pepsina) fue estimada por el método de Anson (1938) usando como sustrato hemoglobina (0.5%) en una solución tampón Glicina-HCl 100 mmol l⁻¹ a pH 2. La proteasa alcalina fue medida con la técnica de Walter (1984) usando como sustrato caseína al 0.5 % en tampón Tris-HCl 50 mmol l⁻¹, CaCl₂ 10 mmol l⁻¹ a pH 9. Las mezclas fueron incubadas a 37 °C durante 30 minutos, la reacción se detuvo por adición de 0.5 ml de ácido tricloroacético (TCA, 20 %), se centrifugó a 16,000 g durante 15 minutos y la absorbancia de los productos de reacción fue medida a 280 nm. La unidad de actividad enzimática fue definida como 1 µg de tirosina liberada por minuto, esto con base en el coeficiente de extinción molar (0.005).

La actividad de tripsina se realizó por el método de Erlanger et al., (1961) incubando la muestra con el sustrato BAPNA (N α -Benzoil-DL-Arginina-P-nitroAnilida) a 37 °C, disuelta en el tampón Tris-HCl 50 mmol l⁻¹, CaCl₂ 10 mmol l⁻¹ a pH 8.2, y fue medida a 410 nm. La actividad quimotripsina fue determinada por el método de DelMar et al. (1979), a 37 °C con SAAPNA (N- α -benzoil-DL-arginine p-nitroanilide) como sustrato disuelta en dimetyl sulfóxido (DMSO 5 mmol l⁻¹) y tampón Tris-HCl 100 mmol l⁻¹, CaCl₂ 100 mmol l⁻¹ a pH 7.8 y una absorbancia de 405 nm. La actividad leucina aminopeptidasa fue determinada por el método de Maraux et al., (1973) utilizando como sustrato leucina p-nitroanilida (0.1 mmol l⁻¹) en DMSO usando tampón fosfato sodico 50 mmol l⁻¹ a pH 7.2 a 37 °C, medida a 410 nm. La actividad Carboxipeptidasa A fue determinada a 25 °C usando como sustrato Hyppuryl-L-phenyl-alanine (25 mmol l⁻¹) en una solución tampón de Tris-HCl 5 mmol l⁻¹, NaCl 500 mmol l⁻¹, a pH 7.5 y medido a 254 nm (Folk y Schirmer 1963). Las reacciones de estas técnicas fueron detenidas con ácido acético al 30%; siendo definida la actividad enzimática como 1 μ mol de nitroanilida liberada por minuto, usando como coeficiente de extinción molar de tripsina (8.8), de quimotripsina y leucina aminopeptidasa (8.2).

La actividad α -amilasa se realizó usando como sustrato almidón al 2% en el tampón citrato-fosfato 100 mmol l⁻¹, NaCl 50 mmol l⁻¹, pH 7.5 con una incubación de 30 min., se midió los azúcares reductores a 600 nm, definiendo una unidad como la cantidad de enzima que libera 1 μ g de maltosa por minuto (Robyt y Whelan 1968). La actividad lipasa fue determinada con la técnica de Versaw et al. (1989), usando como sustrato β -naftil caprilato (200 mmol l⁻¹) disuelto en una solución tampón Tris-HCl 50 mmol l⁻¹ a pH 7.2 con una solución de tauracolato de sodio (100 mmol l⁻¹), donde se incubó el extracto enzimático y el sustrato por 30 min y deteniendo la reacción con TCA 0.72N, adicionando una solución de Fast blue (100 mmol l⁻¹), y clarificando la reacción con una mezcla de etanol: acetato de etilo (1:1 v/v), leyendo la absorbancia a 540 nm. La actividad lipolítica fue definida como 1 μ g de naftol liberado por minuto. La actividad de α -glucosidasa fue determinada con la técnica de Dahlqvist (1960a), usando como sustrato α -p-nitrofenol glucosido (10 mM) disuelto en una solución buffer (fosfato de potasio 67 mM pH 6.8), para lo cual se realizó una incubación de 60 min del extracto enzimático en el sustrato y deteniendo la reacción con carbonato de potasio (100 mM) y la absorbancia fue medida a 420 nm, utilizando una curva de calibración estándar para p-nitrofenol α -glucosido (Sigma). La

actividad de α -glucosidasa se expresó como una unidad de enzima que libera 1 μmol de D-glucosa del p-nitrofenil α -D-glucosido por minuto.

Todos los ensayos se realizaron por triplicado. Para el cálculo de la actividad específica e individual de los extractos se determinó utilizando las siguientes ecuaciones: 1) Unidades. $\text{ml}^{-1} = [\Delta\text{abs} \times \text{volumen final de reacción (ml)}] \cdot [\text{CEM} \times \text{tiempo (min)} \times \text{volumen del extracto (ml)}]^{-1}$; 2) Unidades $\text{mg de proteína}^{-1} = [\text{Unidades por ml}] \cdot [\text{mg de proteína soluble}]^{-1}$. Donde: Δabs es el incremento de absorbancia a una determinada longitud de onda, CEM es el coeficiente de extinción molar para el producto de reacción ($\text{ml } \mu\text{g}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Análisis estadístico

Para la evaluación del crecimiento en peso y longitud, los datos obtenidos del experimento se sometieron a pruebas de normalidad (K-S) y homoscedasticidad (Levene), y se aplicó un análisis de varianza de una vía (ANOVA), para detectar las diferencias entre los tratamientos se utilizó la prueba posteriori de Tukey. Los datos de supervivencia, canibalismo y actividad enzimática se analizaron por medio de una prueba de Kruskal-Wallis y pruebas a posteriori de Nemenyi. Todas las pruebas se realizaron utilizando un valor de significancia de 0.05. Asimismo, para realizar los estadísticos se utilizó el programa estadístico STATISTICA v. 7.0.

Resultados

Evaluación de crecimiento, supervivencia y canibalismo

Los resultados obtenidos en relación al crecimiento de las larvas de *A. tropicus* mostraron diferencias significativas ($P < 0.05$) entre todos los tratamientos, donde las larvas alimentadas con la dieta 28%S tuvieron el mayor peso promedio de 0.62 ± 0.19 g y una talla de 48.7 ± 7.8 mm, seguidos por los ejemplares que consumieron la dieta 22%S con 0.60 ± 0.20 g, y 48.5 ± 8.9 mm, después la dieta 16%S, la TD (alimento comercial para trucha Silver Cup™) con 0.24 ± 0.10 g, y 34.5 ± 6.4 mm, siendo la dieta 0%S la que obtuvo el menor crecimiento con 0.20 ± 0.06 g y una talla de 32.5 ± 4.4 mm (Fig. 1a y b).

Por otra parte, al final del experimento se analizó la supervivencia donde se detectaron diferencias significativas ($P < 0.05$) obteniendo la mayor supervivencia las larvas alimentadas con la dieta 28%S con un 22.8%, seguida de la dieta 22%S con un 21.2%, la dieta 16%S con 14.5%, la TD con un 1.7%, y finalmente la dieta 0%S con 0.7%. Por su parte, los porcentajes de canibalismo no mostraron diferencias significativas entre los tratamientos; sin embargo, las larvas alimentadas con la TD, presentaron el mayor porcentaje de canibalismo con 56.3%, seguido de la dieta 28%S con 39.2%, la dieta 16%S con 38.5%, la dieta 22%S con 37.8%, y finalmente la dieta 0%S la cual presentó 33.3% de canibalismo. Cabe mencionar que de los tratamientos con diferentes inclusión de almidón de papa (16%S, 22%S y 28%S) disminuyeron el canibalismo a un 20% en relación con la TD (Fig. 2).

Actividades enzimáticas

La actividad específica de proteasas alcalinas mostró diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los tratamientos, con la actividad proteolítica más alta para las larvas que consumieron la dieta 22%S, seguida de las que se alimentaron con la dieta 16%S, la TD y las de la dieta 28%S, siendo la dieta celulosa la que obtuvo menor actividad enzimática digestiva. Por otra parte, la actividad enzimática de las proteasa ácidas (pepsina) fue estadísticamente mayor ($P < 0.05$) para las larvas alimentadas con la dieta 0%S, seguidas de la que consumieron la TD, las alimentadas con la dieta 16%S, seguida de la dieta 28%S, y finalmente las larvas alimentadas con la dieta 22%S las cuales obtuvieron la menor actividad enzimática (Fig. 3).

La actividad tripsina mostró diferencias significativas entre todos los tratamientos ($P < 0.05$) donde las larvas alimentadas con la dieta 16%S tuvieron la mayor actividad, mientras que las alimentadas con las dietas 22%S, 16%S y la TD no mostraron diferencias significativas entre ellas, mientras que la dieta 0%S registró una menor actividad tripsica (Fig. 4a). La actividad específica de quimotripsina registró una mayor actividad con la dieta 22%S, seguidas de las alimentadas con la dieta 16%S, las alimentadas con la dieta 28%S, la dieta control y las que tuvieron la menor actividad fueron las que consumieron la dieta 0%S (Fig. 4b). La actividad específica de leucina-aminopeptidasa mostró una mayor actividad para las larvas alimentadas con la dieta 16%S, seguida por las dietas 22%S, TD y 0%S, las cuales no presentaron diferencias significativas, siendo la dieta 28%S las de menor actividad enzimática (Fig. 4c).

Finalmente, la actividad carboxipeptidasa A, también mostró diferencias estadísticas entre todos los tratamientos ($P < 0.05$) donde se presentó la mayor actividad para las larvas alimentadas con la TD y 0%S, seguidas de las dietas 16%S, 22%S y 28%S, las cuales no mostraron diferencias significativas entre ellas (Fig. 4d).

En cuanto a la actividad específica de la α -amilasa se detectó la mayor actividad enzimática ($P < 0.05$) en las larvas alimentadas con la dieta 28%S, seguidas de las que consumieron las dietas 16%S, 22%S, TD y 0%S, las cuales fueron estadísticamente iguales entre ellas (Fig. 5a). Finalmente, en la actividad enzimática tipo lipasa, se observó una máxima actividad para las larvas que consumieron la dieta 28%S siendo estadísticamente diferente al resto de los tratamientos ($P < 0.05$), y la dieta 0%S, la cual presentó la menor actividad enzimática (Fig. 5c).

Discusión

Los resultados encontrados en esta investigación muestran que las larvas alimentadas con la dieta diseñada con 28% almidón de papa obtuvo mejores resultados de crecimiento y supervivencia (0.615g de peso promedio, 48.66 mm de longitud total promedio y 28% de supervivencia). Esto se debe principalmente a la presencia de carbohidratos digeribles en la dieta (almidón de papa), ya que estos proporcionan la energía necesaria para el crecimiento y desarrollo, principalmente durante la etapa larvaria; sin embargo, el uso de carbohidratos en formulaciones para peces, depende del tipo y concentración que se incluye, la especie y las condiciones de cultivo, lo que puede promover una mayor digestibilidad, mejorando el nivel de la ingesta alimentaria y por consecuencia el crecimiento y supervivencia larvaria (Krogdahl *et al.*, 2005). En comparación con otros estudios realizados por diversos autores en esta misma especie los resultados difieren a los obtenidos en esta investigación entre ellos con relación a la supervivencia; por Frías-Quintana *et al.* (2010, 2016), quienes diseñaron y evaluaron dietas microparticuladas con ingredientes proteínicos de origen animal (pollo y cerdo) obtuvieron mayores crecimientos (98 mm) y supervivencia (68%) al final del cultivo larvario de esta especie. Sin embargo este mismo autor en otra investigación implementó el uso de carbohidratos (almidón de maíz) en dietas microparticuladas, las cuales fueron evaluadas en larvas a los 3

DDE, sustituyendo completamente el alimento vivo, los resultados obtenidos muestran que la mayor sustitución (15%) presentaron mejores crecimientos (4.17 g y 70.02 mm) y supervivencias del 98 %, minimizando el canibalismo durante esta etapa larvaria. En otro estudio realizado utilizando alimento microencapsulado en larvas, se observó retrasos evidentes en el crecimiento en las larvas, las cuales mostraron bajos porcentajes de supervivencia y valores de crecimiento en relación con la dieta control (Aguilar-Téllez 2013), donde el autor recomienda mayores estudios respecto al desarrollo de dietas que sean asimilables completamente por los organismos durante esta etapa.

Considerando lo anterior, diversos estudios han implementado el uso de alimento formulado en cultivos larvarios con la finalidad de reducir costos de producción de alimento vivo, donde se tiene ventaja de introducir nutrientes que no estén disponibles en el alimento vivo (Civera-Cerecedo et al., 2004); De esta manera, es importante resaltar que hasta la fecha no se había logrado un crecimiento y supervivencia tan altos para *A. tropicus*, lo cual está relacionado con la inclusión del almidón de maíz en la dieta.

En diversos estudios se ha observado que el implemento de carbohidratos favorece un mejor desarrollo, coincidiendo con lo reportado por Lazo (2000) quien hace mención que las larvas de peces parecen mostrar una mayor preferencia por la obtención de energía a partir de carbohidratos, logrando incluir en las dietas cantidades que van del 10 al 20% sin llegar a afectar el crecimiento ni la supervivencia. En este sentido, existen diversos trabajos que avalan este principio como es el caso de Yamamoto et al. (2001), con la *C. idella* y *O. mykiss*, Shiau y Lin (2002), con *E. malabaricus*, Krogdahl et al. (2004), con *O. mykiss* y el salmón del Atlántico (*Salmo salar*), Muñoz-Ramírez (2005), en *P. mesopotamicus*, Tan et al. (2006), en la carpa dorada (*Carassius auratus gibelio*) y bagre Chino (*Leiocassis longirostris*), Kumar et al. (2008), con *L. rohita*, Webb et al. (2010), con *R. canadum*, Hamid et al. (2011), con *M. nemurus*, y Sang-Min et al. (2011), en *S. schlegeli* y *Megalobrama amblycephala* (Wu et al., 2013; Li et al., 2013), donde estos autores informaron que el uso de carbohidratos permite obtener crecimientos y supervivencias positivas en los peces, debido a que les proporciona los nutrientes necesarios para su adecuado desarrollo.

Considerando lo anterior, los carbohidratos son los nutrientes con mayor fuente de aportación energética utilizada para el metabolismo como reserva energética, almacenada en forma de glucógeno en el hígado y en los músculos (Murray 2007), durante la etapa larval los peces requieren una mayor cantidad de energía para su crecimiento y buen desarrollo, se sabe que antes de que los peces utilicen la energía para su crecimiento, cubren las demandas energéticas para el mantenimiento y el movimiento voluntario (que representa el 70% de la energía dietética) usando como fuente de energía la proteína, hay indicios de que los peces carnívoros pueden compensar esta demanda energética, con un mayor consumo de alimento para mantener el crecimiento (Stephan et al., 1996). En este caso el almidón de papa es una fuente importante de suministro de energía, por lo tanto, hay una mejor utilización del alimento y retención de proteínas (Muñoz-Ramírez, 2005). El buen crecimiento y ahorro de proteínas están relacionados con el hecho de que la glucosa digerida a partir del almidón es el sustrato oxidativo preferido para el tejido nervioso y células de la sangre, el carbohidrato presente en las dieta de los peces pueden deprimir la actividad de la gluconeogénesis, desviando así los aminoácidos lejos de vías oxidativas (Sánchez-Muros et al., 1996); de esta forma, los niveles de la glucosa se deben mantener constantes para permitir un metabolismo adecuado, en este equilibrio intervienen la secreción de insulina, el glucagón, las hormonas de crecimiento y de IGF (factor de crecimiento de insulina) (Hemre et al., 2002).

Desde el punto de vista de la fisiología digestiva de una especie, es de gran importancia para determinar el tipo y cantidad de nutrientes que el organismo es capaz de aprovechar (Álvarez-González et al., 2008), en este caso las capacidades digestivas y de absorción juegan un papel importante en el crecimiento de los peces (Hakim et al., 2006). Las actividades de las enzimas digestivas determinan en gran medida la capacidad de un animal para obtener nutrientes de una fuente de alimento en particular (Furne et al., 2005). En el presente estudio, la inclusión en la dieta del almidón de papa aumentó significativamente las actividades de las enzimas digestivas como α -amilasa, α -glucosidasa y lipasa, sin embargo para las actividades enzimáticas como proteasas ácida, tripsina, quimotripsina, leucina-aminopeptidasa, carboxipeptidasa A, presentaron variaciones dependiendo del porcentaje de inclusión de almidón de papa, donde no se contempla una relación directa con el mayor porcentaje de inclusión de almidón, donde Frías-Quintana et al., (2016) al evaluar dietas con porcentajes de carbohidratos, encontró una relación

directa del mayor porcentaje de inclusión con las actividades enzimáticas, las cuales fueron mayores en relación a la dieta con mayor cantidad de almidón de maíz (15%) en las larvas de *A. tropicus*, esta relación se deba posiblemente a que el almidón de maíz posee en su estructura enlaces peptídicos que son fácilmente hidrolizables por las enzimas digestivas, principalmente proteasas, amilasas, lipasas y glucosidasas. En este sentido, una de las enzimas más importantes en la degradación del almidón es la amilasa, la cual actúa sobre los polisacáridos hidrolizando los enlaces α - y β - amilasa (endoglucosidasas) mientras que los disacáridos y oligosacáridos son hidrolizados en sus monosacáridos constituyentes por diversas enzimas en el borde del intestino. De esta forma, la digestión continúa intracelularmente por los enterocitos que poseen enzimas disacaridasas. La enzima α -amilasa α (1 \rightarrow 4) -D-glucano glucanohidrolasa, cataliza la endohidrólisis α (1 \rightarrow 4)-glucosídico del almidón y moléculas similares a oligosacáridos más cortos, incluyendo maltotriosa y maltosa (Murray, 2007). En este aspecto, existen resultados donde autores afirman la capacidad de los peces en utilizar los carbohidratos, entre ellos; Xu et al. (2009), con *C. auratus*, usando prebióticos de oligosacáridos, Wu et al. (2013), con *M. amblycephala* suplementando en la dieta fructo-oligosacáridos; por su parte Li et al. (2013), utilizando la misma especie evaluaron proporciones de hidratos de carbono/lípidos sobre el crecimiento, la composición corporal, las actividades de las enzimas, encontrando resultados positivos, además el nivel alto de carbohidratos en la dieta promueve la glucólisis y la lipogénesis en estas especies, pero no induce a la hiperglucemia lo que es un factor importante en la salud de los peces.

Asimismo se evaluaron las enzimas que hacen posible el buen funcionamiento del aparato digestivo entre ellos la actividad de proteasa ácida estomacal (pepsina), la cual fue muy alta comparada con las proteasas alcalinas intestinales, lo que concuerda con otros autores como Essed et al. (2002), quienes evaluaron las proteasas digestivas en Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus*) y encuentran altas actividades de proteasas ácidas en el estómago en comparación con la actividad alcalina detectada en el intestino; por su parte, Moyano et al. (1996), y Frías-Quintana et al. (2010), al determinar actividad enzimática en *S. aurata* y *A. tropicus* mencionan que la presencia de mayor actividad ácida es un indicativo de la presencia de un estómago funcional y glándulas gástricas bien desarrolladas, que caracteriza a peces monogástricos, y esto también se ha observado en especies como *Scleropages formosus* (Natalia et al., 2004) y

Scophthalmus maximus (Hai-Ying et al., 2006). Es así que los resultados obtenidos en este estudio muestran que en las larvas de *A. tropicus* alimentadas con la dieta que contiene 100% de celulosa presentó una mayor digestión ácida en el estómago, por lo que representa lo contrario o lo reportado en el disco azul (*Symphysodon aequifasciata*) (Chong et al., 2002); *T. thynnus* (Essed et al., 2002); manjuari (*Atractosteus tristoechus*) (Comabella et al., 2006) y *A. tropicus* (Frías-Quintana et al., 2016), lo que muestra que las larvas intentan compensar a través de una mayor secreción de enzimas digestivas estomacales, la deficiencia nutricional particularmente en relación a los carbohidratos y las proteínas (Cahu et al., 2004).

En el caso de las proteasas alcalinas, se muestra una mayor actividad con la dieta de 22%S de inclusión de almidón de papa, siendo esta dieta la que promueve una mayor actividad de las endoproteasas alcalinas como la quimotripsina, y en el caso de tripsina y las exopeptidasas como leucina aminopeptidasa la dieta de 16%S presentaron mayores actividades enzimáticas, considerando que estas enzimas están presentes desde la eclosión (antes de la absorción del vitelo) y durante todo el periodo larvario, además se ha reportado para especies como *Anoplarchus purpureus* y *Sander lucioperca* (Chan et al., 2004; Hamza et al., 2007); asimismo, la actividad enzimática de la leucina aminopeptidasa ha sido utilizada como otro indicador de la calidad nutricional al disminuir su actividad o incrementarse, lo que indica la maduración de las microvellosidades de los enterocitos como ha sido detectada en larvas de lubina Europea (*Dicentrarchus labrax*); tilapia (*Oreochromis niloticus*); castarrica *Cichlasoma urophthalmus* (López-Ramírez et al., 2011) y tenguayaca (*Petenia splendida*) (Uscanga et al., 2011), donde el incremento de estas actividades se han correlacionado con la maduración de los enterocitos, pero que su actividad varía en relación a la dieta proporcionada (Hakim et al., 2007).

En el caso de la actividad específica de la lipasa, se presentó una mayor actividad en relación con la dieta con mayor porcentaje de almidón de papa (28%S), por lo que la presencia de carbohidratos en las dietas promueve la activación de las enzimas amilásicas, lipídicas y glucosidasas, que en conjunto con las proteasas, permiten la digestión total de los nutrientes y la absorción de los productos de hidrólisis para ser utilizados en los diversos procesos metabólicos como lo reportan para *P. fluvialitis* (Cuvier-Péres y Kestemont 2002), bacalao *Melanogrammus*

aeglefinus (Pérez-Casanova et al., 2004), mero *Epinephelus coioides* (Eusebio et al., 2004), *L. rohita* (Chakrabarti et al., 2006), *A. tristoechus* (Comabella et al. 2006), lenguado de California *Paralichthys californicus* (Álvarez-González et al., 2006), *S. lucioperca* (Hamza et al., 2007) y cabrilla arenera *Palabrax maculatofasciatus* (Álvarez-González et al., 2008), y que a su vez se relacionan con los cambios morfofisiológicos a lo largo del desarrollo larvario y los hábitos de alimentación (Civera-Cerecedo et al., 2004).

Adicionalmente, se han realizado estudios en *A. tropicus* reportados por Frías-Quintana et al. (2010; 2016), y Guerrero-Zarate et al. (2013), quienes determinaron las actividades enzimáticas proteolíticas, amilásicas y lipídicas en larvas y juveniles, quienes argumentan que esta especie tiene una alta capacidad digestiva a partir de los 15 días después de la eclosión (DDE) y a lo largo de su desarrollo como juvenil y adulto. Adicionalmente, Cahu et al. (2004), mencionan que la detección de la amilasa indica no solo la maduración de los enterocitos, sino también la posibilidad de incluir cierta cantidad de carbohidratos que completen el aporte energético durante la alimentación de la larva, aunque para peces carnívoros esta capacidad es limitada.

Los resultados obtenidos en este trabajo permiten concluir que con la dieta formulada con una inclusión de 28% de almidón de papa (28%S) para larvas de *A. tropicus* se pueden obtener un mayor crecimiento y supervivencia; asimismo, se promueve un incremento en las actividades enzimáticas digestivas lipídicas y amilásicas, lo cual es un indicador de la hidrólisis de los alimentos y asimilación de las biomoléculas a partir de la dieta proporcionada, donde el almidón de papa puede ser la fuente principal de aporte de energía requerida para su adecuado crecimiento disminuyendo las fuentes proteínicas en la dieta (36%S), disminuyendo costos de insumos proteínicos.

Agradecimientos

El autor agradece al CONACYT y al Programa Institucional de Superación Académica de la UJAT por las becas otorgadas durante el desarrollo de esta tesis. Así como al laboratorio de Bioquímica CICART, UJAT por el apoyo técnico para la realización de los estudios.

Referencias

- Aguilar-Tellez FV (2013) Diseño de dietas microencapsuladas para la alimentación en larvas de pejelagarto *Atractosteus tropicus*. Tesis de maestría. División Académica de Ciencias Biológicas, UJAT, Villahermosa Tabasco, México. 76 pp.
- Álvarez-González CA, Márquez-Couturier G, Contreras-Sánchez WM, Rodríguez-Valencia W, (2007) Estrategia para el uso sustentable de los recursos pesqueros en Boca de Chilapa, reserva de la biosfera Pantanos de Centla, Tabasco: establecimiento de una planta de producción de peces nativos, pejelagarto, tenguayaca y castarrica. In: Halffter G, Guevara S, Melic A (eds) Hacia una cultura de conservación de la diversidad biológica. Monografías del tercer milenio Vol. VI. Zaragoza, España, pp 197-205.
- Alvarez-González CA, Cervantes-Trujano M, Tovar-Ramírez D, Conklin D, Nolasco H, Gisbert E, Piedahita R (2006) Development of digestive enzymes in California halibut *Paralichthys californicus* larvae. *Fish Physiol Biochem* 31:83–93.
- Alvarez-González CA, Moyano-López FJ, Civera-Cerecedo R, Carrasco-Chávez V, Ortiz-Galindo JL, Dumas S (2008) Development of digestive enzyme activity in larvae of spotted sand bass *Paralabrax maculatofasciatus*. 1. Biochemical analysis. *Fish physiology and biochemistry*, 34(4), 373-384.
- Anson ML (1938) The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin. *J Gen Physiol* 22:79–89
- Balon EK (1984) Reflections on some decisive events in the early life of fishes. *Trans. Am. Fish. Soc.* 113: 178-185.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248–254
- Cahu C, Rønnestad I, Grangier V, Zambonino-Infante J (2004) Expression and activities of pancreatic enzymes in developing sea bass larvae (*Dicentrarchus labrax*) in relation to intact and hydrolyzed dietary protein; involvement of cholecystokinin. *Aquaculture* 238:295–308
- Civera-Cerecedo R, Álvarez-González CA, Moyano-López FJ (2004) Nutrición y alimentación de larvas de peces marinos. En: Cruz-Suárez, LE, Ricque-Marie D, Nieto-López MG, Villarreal, Scholz U, González M (2004) Avances en nutrición acuícola VII. Memorias del VII Simposium Internacional de nutrición Acuícola, Hermosillo, Sonora, México, 87 pp.

- Comabella Y, Mendoza R, Aguilera C, Carrillo O, Hurtado A, García-Galano T (2006) Digestive enzyme activity during early larval development of the Cuban gar *Atractosteus tristoechus*. *Fish Physiol Biochem* 32:147–157.
- Cuvier-Pérez A, Kestemont P (2002) Development of some digestive enzymes in Eurasian perch larvae *Perca fluviatilis*. *Fish Physiol Biochem* 24:279–285.
- Chakrabarti R, Rathore R, Kumar S (2006) Study of digestive enzyme activities and partial characterization of digestive proteases in a freshwater teleost, *Labeo rohita*, during early ontogeny. *Aquac Nutr* 12:35–43.
- Chan AS, Horn M, Dickson K, Gawlicka A (2004) Digestive enzyme activities in carnivores and herbivores: comparisons among four closely related prickleback fishes (Teleostei: Stichaeidae) from a California rocky intertidal habitat. *J Fish Biol* 65:848–858.
- Chong AS, Hashim R, Lee L, Ali A (2002) Characterization of protease activity in developing discus (*Symphysodon aequifasciatus*) larvae. *Aquac Res* 33:663–672.
- Dahlqvist A (1960a) Hog Intestinal α -glucosidases. Dissertation, University of Lund
- Del Mar EG, Largman C, Brodrick J, Geokas M (1979) A sensitive new substrate for chymotrypsin. *Anal Biochem* 99:316–320.
- Erlanger FE, Kokoswky N, Cohen W, (1961) The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Arch Biochem Biophys* 95:271–278.
- Essed Z, Fernández I, Alarcón FJ, Moyano FJ, (2002) Caracterización de la actividad proteasa digestiva de atún rojo *Thunnus thynnus* (Linnaeus, 1758). *Bol. Inst. Esp. Oceanogr.* 18 (1-4):99-107.
- Eusebio PS, Toledo J, Mamauag R, Bernas M, (2004) Digestive enzyme activity in developing grouper (*Epinephelus coioides*) larvae. In: Rimmer MA, McBride S, Williams KC (eds) *Advances in grouper aquaculture*. Melbourne, CIAR Monograph Series, pp 35–40.
- Folk J, Schirmer E (1963) The porcine pancreatic carboxypeptidase A System. I. Three forms of the active enzyme. *J Biol Chem* 238:38–84.
- Frías-Quintana CA, Álvarez-González A, Márquez-Couturier G (2010) Diseño de microdietas para el larvicultivo de pejelagarto. *Universidad y Ciencia*, 26(2):265-282.
- Frías-Quintana CA, Domínguez-Lorenzo J, Álvarez-González A, Tovar-Ramírez D, Martínez-García R (2016) Using cornstarch in microparticulate diets for larvicultured tropical gar (*Atractosteus tropicus*). *Fish Physiology and Biochemistry* 41(6): 1-12.

- Furne M, Hidalgo M, Lopez A, Garcia-Gallego M, Morales A, Domezain A, Domezaine J, Sanz A (2005) Digestive enzyme activities in Adriatic sturgeon *Acipenser naccarii* and rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* A comparative study. *Aquaculture* 250:391–398.
- Guerrero-Zárate R, Álvarez-González CA, Perales-García N, Olvera-Novoa M, Frías-Quintana C, Martínez-García R, Contreras-Sánchez W (2013) Partial characterization of digestive proteases in Tropical gar *Atractosteus tropicus* juveniles. *Fish Physiol Biochem.* doi:10.1007/s10695-013-9902-7
- Guevara W (2003) Formulación y elaboración de dietas para peces y crustáceos. Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann. Tacna-Perú.
- Hai-Ying W, Wang, YJ, Wang, QY, Xue CH & Sun M (2006). Purification and characterization of stomach protease from the turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Fish Physiology and Biochemistry*, 32(2): 179-188.
- Hakim Y, Rowland S, Guy J, Mifsud C, Uni Z, Harpaz S (2007) Effects of genetic strain and holding facility on the characteristics of alkaline phosphatase and brush border enzymes in silver perch (*Bidyanus bidyanus*). *Aquac Res* 38:361–372.
- Hakim Y, Uni Z, Hulata G, Harpaz S (2006) Relationship between intestinal brush border enzymatic activity and growth rate in tilapias fed diets containing 30 % or 48 % protein. *Aquaculture* 257:420–428.
- Hamid NK, Mahayat M, Hashim R (2011) Utilization of different carbohydrate sources and starch forms by bagrid catfish (*Mystus nemurus*) (Cuv & Val). *Aquac Nutr* 17:10–18.
- Hamza N, Mhetli M, Kestemont P (2007) Effects of weaning age and diets on ontogeny of digestive activities and structures of pikeperch (*Sander lucioperca*) larvae. *Fish Physiol Biochem* 33:121–133.
- Hemre GI, Mommsen TP, Krogdahl A (2002) Carbohydrates in fish nutrition: effects on growth, glucose metabolism and hepatic enzymes. *Aquacult Nutr* 8:175–194.
- Hernández VU (1999) Punto critico de no retorno en larvas de pejelagarto *A. tropicus* (Gill 1823). Tesis de licenciatura. División Académica de Ciencias Biológicas, UJAT, Villahermosa Tabasco, México. 46 pp.
- Keshavanath P, Manjappa K, Gangadhara B (2002) Evaluation of carbohydrate rich diets through common carp culture in manured tanks. *Aquac Nutr* 8:169–174.

- Krogdahl A, Sundby A, Olli JJ (2004) Atlantic salmon (*Salmo salar*, L) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) digest and metabolize nutrients differently depending on water salinity and dietary starch level. *Aquaculture* 229:335–360.
- Krogdahl AG, Hemre I, Mommsen TP (2005) Carbohydrates in fish nutrition: digestion and absorption in postlarval stages. *Aquac Nutr* 11:103–122.
- Kumar V, Sahu NP, Pal AK, Kumar S, Gupta SK (2008) Gelatinized to non-gelatinized starch ratio in the diet of *Labeo rohita*: effect on digestive and metabolic response and on growth (Online Early Articles). *J Anim Physiol Anim Nutr* 92:492–501
- Lazo J (2000) Conocimiento actual y nuevas perspectivas en el desarrollo de dietas para larvas de peces marinos. In: Cruz -Suárez LE, Ricque-Marie D, Tapia-Salazar M, Olvera-Novoa MA, Civera-Cerecedo R, (Eds.). *Avances en Nutrición Acuícola. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 19-22 Noviembre, 2000. Mérida, Yucatán, México*, pp 300-311.
- Li XF, Wang Y, Liu WB, Jiang GZ, Zhu J (2013) Effects of dietary carbohydrate/lipid ratios on growth performance, body composition and glucose metabolism of fingerling blunt snout bream *Megalobrama amblycephala*. *Aquac Nutr* 19(5):701–708.
- López-Ramírez G, Cuenca-Soria CA, Álvarez-González CA, Tovar-Ramírez D, Ortiz-Galindo JL, Perales- García N, Márquez-Couturier G, Arias- Rodríguez L, Indy JR, Contreras-Sánchez WM, Gisbert E (2011) Development of digestive enzymes in larvae of Mayan cichlid *Cichlasoma urophthalmus*. *Fish Physiol Biochem* 37:197–208.
- Maraux S, Louvard D, Baratti J (1973) The aminopeptidase from hog-intestinal brush border. *Acta Biochim Biophys* 321:282–295.
- Márquez-Couturier G, Álvarez-González CA, Contreras-Sanchez WM, Hernández-Vidal U, Hernández-Franyutti AA, Mendoza R, Aguilera C, García T, Civera R, Goytortúa E, (2006) Avances en la alimentación y nutrición del pejelagarto *Atractosteus tropicus*. *Avances en nutrición acuícola. 15-17 Noviembre. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, México*.
- Maraux S, Louvard D, Baratti J (1973) The aminopeptidase from hog-intestinal brush border. *Acta Biochim Biophys Sin* 321:282–295.

- Moyano FJ, Diaz M, Alarcon FJ, Sarasquete MC (1996) Characterization of digestive enzyme activity during larval development of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Fish Physiol Biochem* 15:121–130.
- Muñoz-Ramírez A, Carneiro D, Fávero G, Teixeira A (2005) Crecimiento de juveniles de Pacu (*Piaractus mesopotamicus*) alimentados con diferentes fuentes de carbohidratos digestibles. *Rev Col Cienc Pec Vol.* 18 (4): 332.
- Murray K, Grann K, Rodwell W (2007) *Harper Bioquímica ilustrada*. Ed. El manual moderno. Mexico.
- Natalia Y, Hashim R, Ali A, Chong A (2004) Characterization of digestive enzymes in a carnivorous ornamental fish, the Asian bony tongue *Scleropages formosus* (Osteoglossidae). *Aquaculture* 233:305–320.
- Pérez-Casanova JC, Murray H, Gallant J, Ross N, Douglas S, Johnson S (2006) Development of the digestive capacity in larvae of haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) and Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Aquaculture* 251:377–401.
- Robyt JF, Whelan W (1968) Amylases. In: Radley JA (ed) *Starch and its Derivates*. Chapman and Hall, England, pp 430–476.
- Sanchez-Muros MJ, Garcia-Rejon L, Lupianez JA, De la Higuera M (1996) Long-term nutritional effects on the primary liver and kidney metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). 2. Adaptive response of glucose- 6-phosphate dehydrogenase activity to high carbohydrate/low-protein and high-fat/non-carbohydrate diets. *Aquacult Nutr* 2:193–200.
- Lee SM, & Pham MA (2011). Effects of carbohydrate and water temperature on nutrient and energy digestibility of juvenile and grower rockfish, *Sebastes schlegeli*. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 24(11), 1615-1622.
- Shiau SY, Lin YH (2002) Utilization of glucose and starch by the grouper *Epinephelus malabaricus* at 23 C. *Fish Sci* 68:991–995.
- Stephan G, Dreanno C, Guiollaume J, Arzel J (1996) Incidence of different amounts of proteins, lipids and carbohydrates in diets on the muscle lipid composition in the turbot (*Scophthalmus maximus*). *Ichthyophysiol Acta* 19:11–30.

- Tan Q, Xie S, Zhu X, Lei W, Yang Y (2006) Effect of dietary carbohydrate sources on growth performance and utilization for gibel carp (*Carassius auratus gibelio*) and Chinese longsnout catfish (*Leiocassis longirostris* Günther). *Aquac Nutr* 12:61–70.
- Uscanga-Martínez A, Moyano-López FJ, Álvarez-González CA, Perales-García N (2011) Aplicaciones a la mejora de la utilización nutritiva del alimento en cíclidos cultivados en México. En: Cruz-Suárez, LE, Ricque-Marie D, Tapia-Salazar M, Nieto-López MG, Villarreal-Cavazos DA, Gamboa-Delgado J, Hernández-Hernández L, (Eds) Avances en Nutrición Acuícola XI - Memorias del Décimo Primer Simposio Internacional de Nutrición Acuícola, 23-25 de Noviembre, San Nicolás de los Garza, N. L., México. ISBN 978-607-433-775-4. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México, pp. 46-104.
- Versaw WS, Cuppett D, Winters L (1989) An improved colorimetric assay for bacterial lipase in nonfat dry milk. *J Food Sci* 54:232–254.
- Walter HE (1984) Proteinases: methods with hemoglobin, casein and azocoll as substrates. In: Bergmeyer HU (ed) *Methods of enzymatic analysis*, vol V. Chemic Weinham, Germany, pp 270–277.
- Webb KA, Rawlinson LT, Holt GJ (2010) Effects of dietary starches and the protein to energy ratio on growth and feed efficiency of juvenile cobia, *Rachycentron canadum*. *Aquac Nutr* 16:447–456.
- Wu T, Liu WB, Li HY, Xu WN, He JX, Li XF, Jiang GZ (2013) Effects of dietary supplementation of fructooligosaccharide on growth performance, body composition, intestinal enzymes activities and histology of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) fingerlings. *Aquac Nutr* 19:886–894.
- Xu B, Wang Y, Li J, Lin Q (2009) Effect of prebiotic xylooligosaccharides on growth performances and digestive enzyme activities of allogynogenetic crucian carp (*Carassius auratus gibelio*). *Fish Physiol Biochem* 35:351–357.
- Yamamoto T, Shima T, Furuita H, Suzuki N, Shiraishi M (2001) Nutrient digestibility values of a test diet determined by manual feeding and self-feeding in rainbow trout and common carp. *Fish Sci* 67:355–357.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Crecimiento en larvas de pejelagarto: a) longitud total ($\text{mm larva}^{-1} \pm \text{SD}$, $n=150$) y peso (b) ($\text{g larva}^{-1} \pm \text{SD}$, $n=150$).

Figura 2. Supervivencia y canibalismo de larvas registradas durante la alimentación con dietas microparticuladas ($\text{media} \pm \text{SD}$, $n = 150$).

Figura 3. Actividades enzimáticas digestivas durante en larvas de *A. tropicus* ($\text{media} \pm \text{SD}$, $n=150$). Actividad enzimática específica de proteasa ácida (negro) y actividad enzimática específica de proteasa alcalina (gris).

Figura 4. Actividades enzimáticas digestivas durante en larvas de *A. tropicus* ($\text{media} \pm \text{SD}$, $n=150$). Actividad enzimática específica de tripsina (a), actividad enzimática específica de quimotripsina (b), actividad enzimática específica de leucina aminopeptidasa (c) y actividad enzimática específica de carboxipeptidasa A (d).

Figura 5. Actividades enzimáticas digestivas durante en larvas de *A. tropicus* ($\text{media} \pm \text{SD}$, $n=150$). Actividad enzimática específica de lipasa (a); α -glucosidasa (b) y amilasa (c).

Tabla 1. Preparation of the experimental microparticle diets used during the in vivo evaluation of *A. tropicus* larvae.

Proteínas marinas y agropecuarias, Guadalajara, Jalisco

Ingredients	0%S	16%S	22%S	28%S	TD
Fish meal ^a	40.00	40.00	38.50	36.60	
Pork meal ^a	10.00	10.00	10.00	5.00	
Poultry-by product ^a	20.00	20.00	15.00	15.00	
Alfa Celullose ^b	19.00				
Potato starch ^c	0	16.00	22.09	28.90	
Fish oil ^d	6.98	6.97	7.41	7.50	
Soybean Lecitin ^e	4.00	4.00	4.00	4.00	
Grenetin ^f	2.00	2.00	2.00	2.00	
Vitamin C ^g	0.50	0.50	0.50	0.50	
Vitamin Premix ^h	0.30	0.30	0.30	0.30	
Mineral Premix ^h	0.20	0.20	0.20	0.20	
Nutrient (g/ 100 g dry matter)					
Carbohydrates	0.00	15.90	22.09	28.90	
Energy (cal / g)	4024.32	4239.43	3984.37	3719.28	
Protein	43.60	43.68	39.92	35.98	52
Fat	15.00	15.00	15.00	14.64	16
Fiber	17.23	1.21	1.06	0.91	
Ash	15.02	15.04	13.45	11.82	

^a Proteínas marinas y agropecuarias, Guadalajara, Jalisco

^b Sigma-Aldrich, catalogue no. C8002

^c MSA Industrializadora de maíz, Guadalajara, Jalisco, México

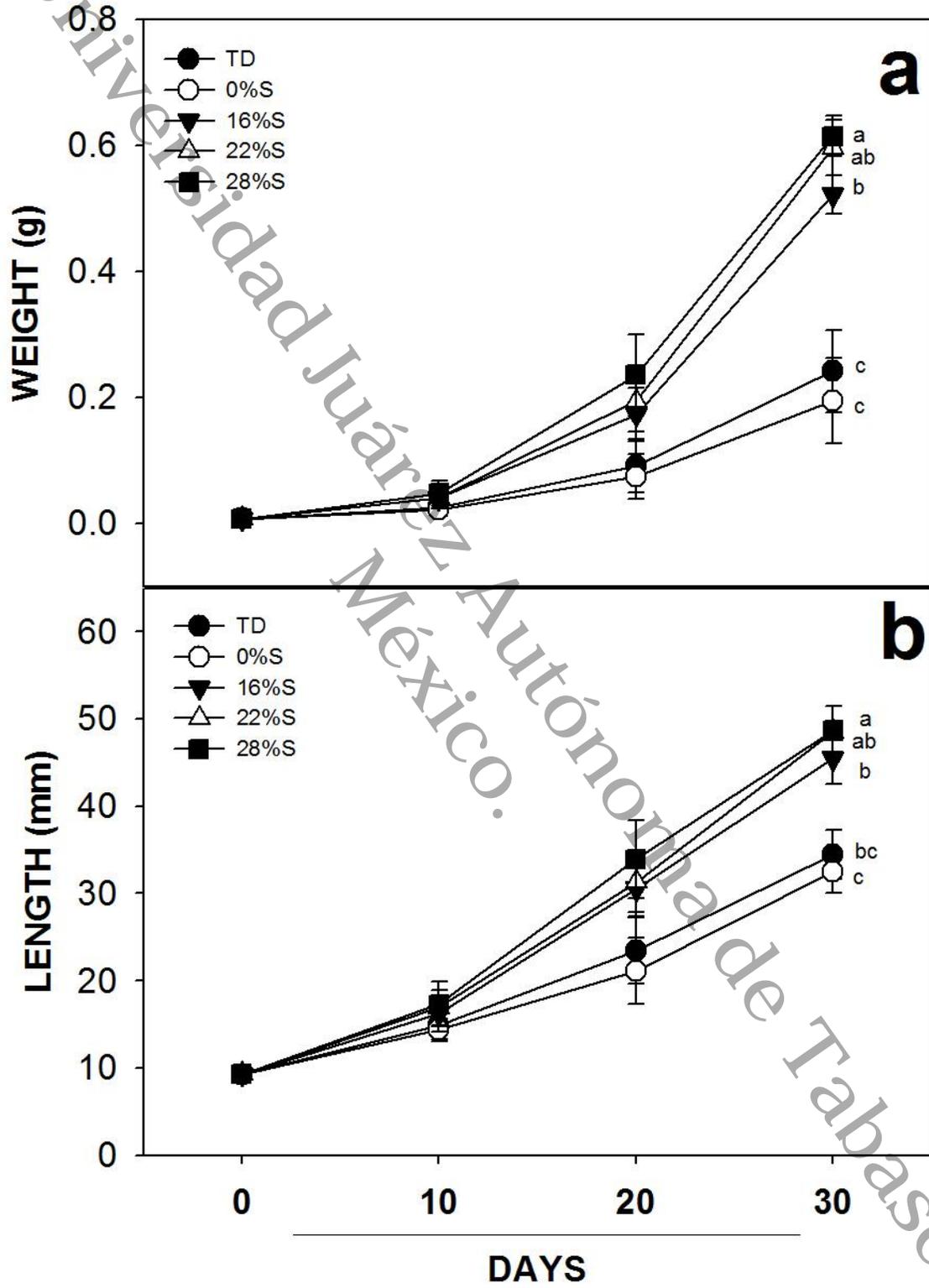
^d GALMEX Comercializadora de Insumos Agrícolas, Villahermosa, Tabasco, México

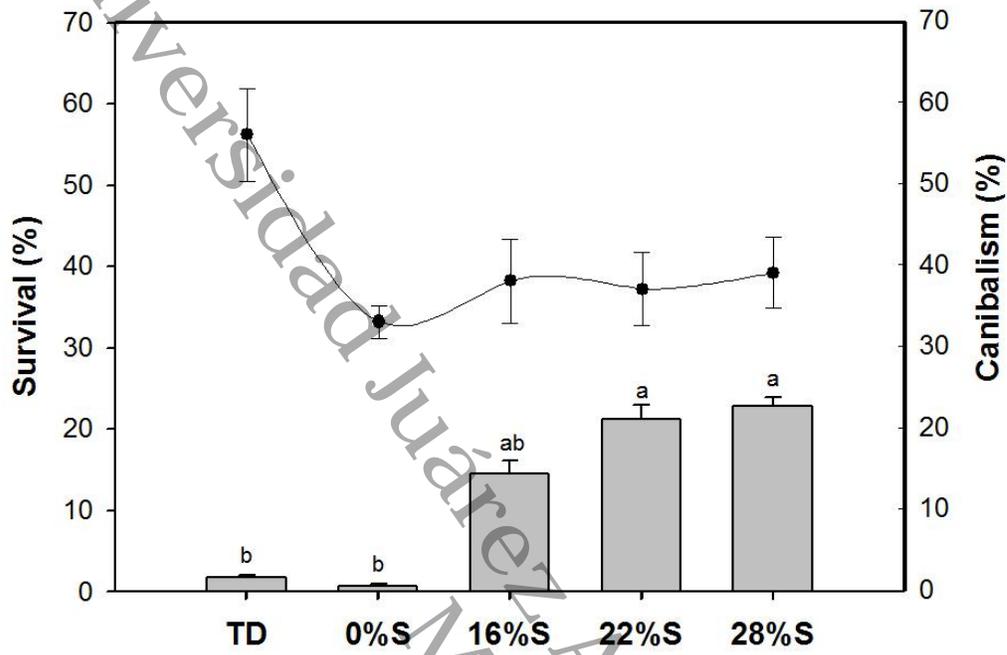
^e Pronat Ultra, Mérida, Yucatán, México

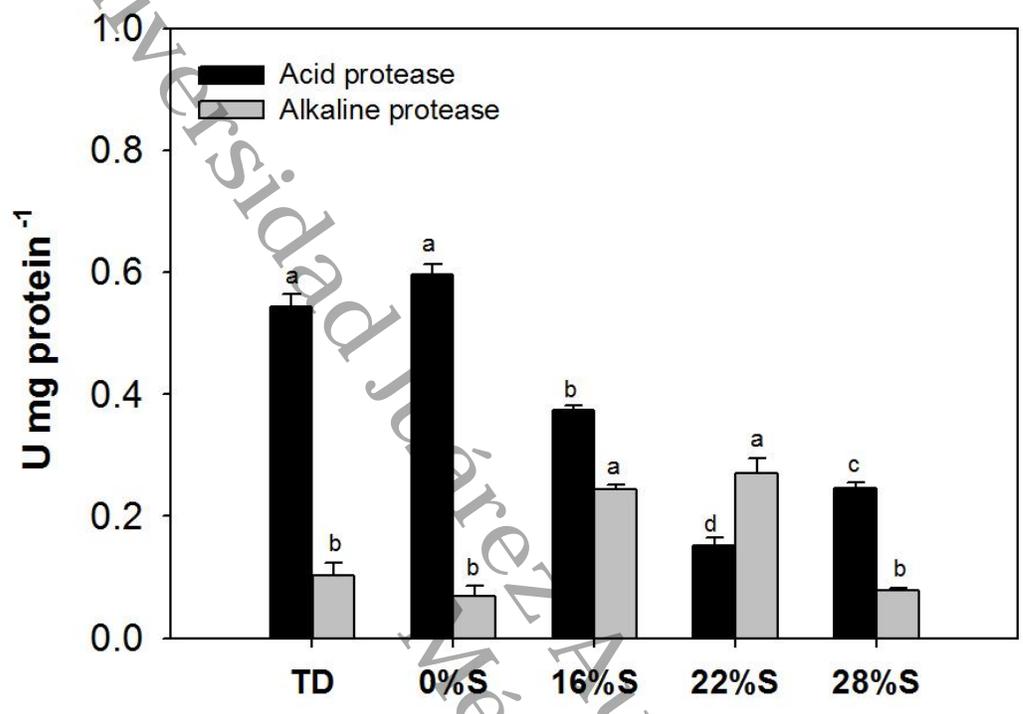
^f D'gari Productos alimenticios y dietéticos relámpago, Tlalpan, México D.F.

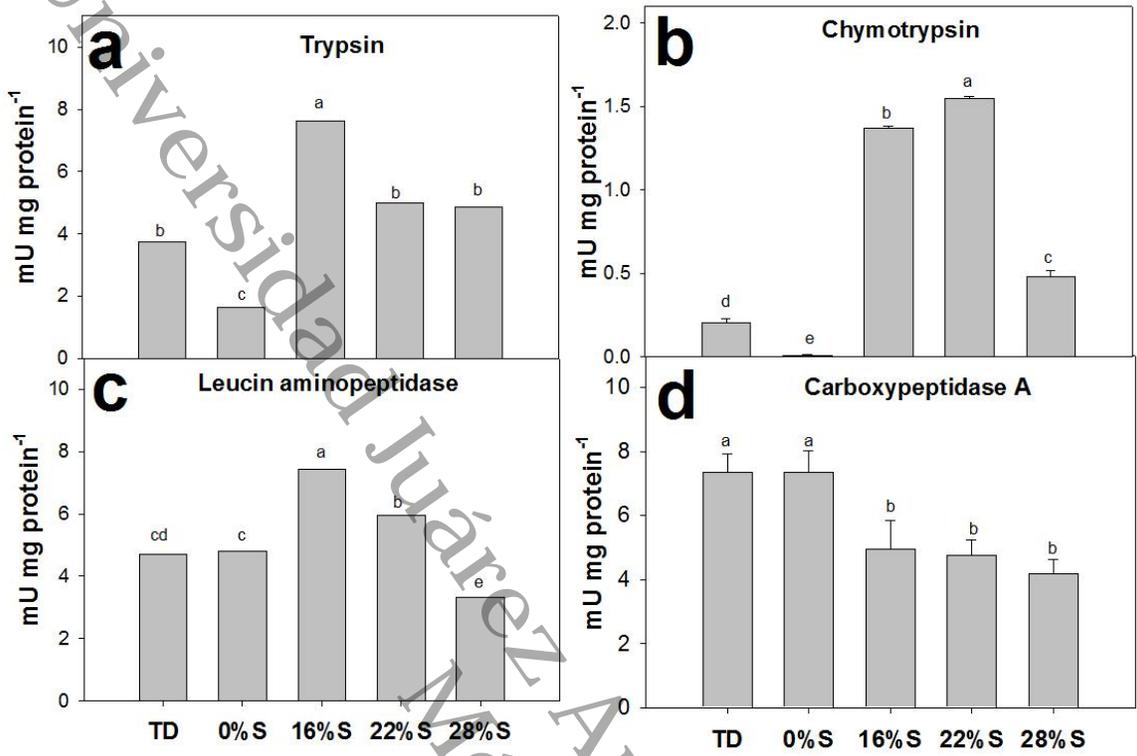
^g ROVIMIX_C-EC (Roche) agente activo de 35 %

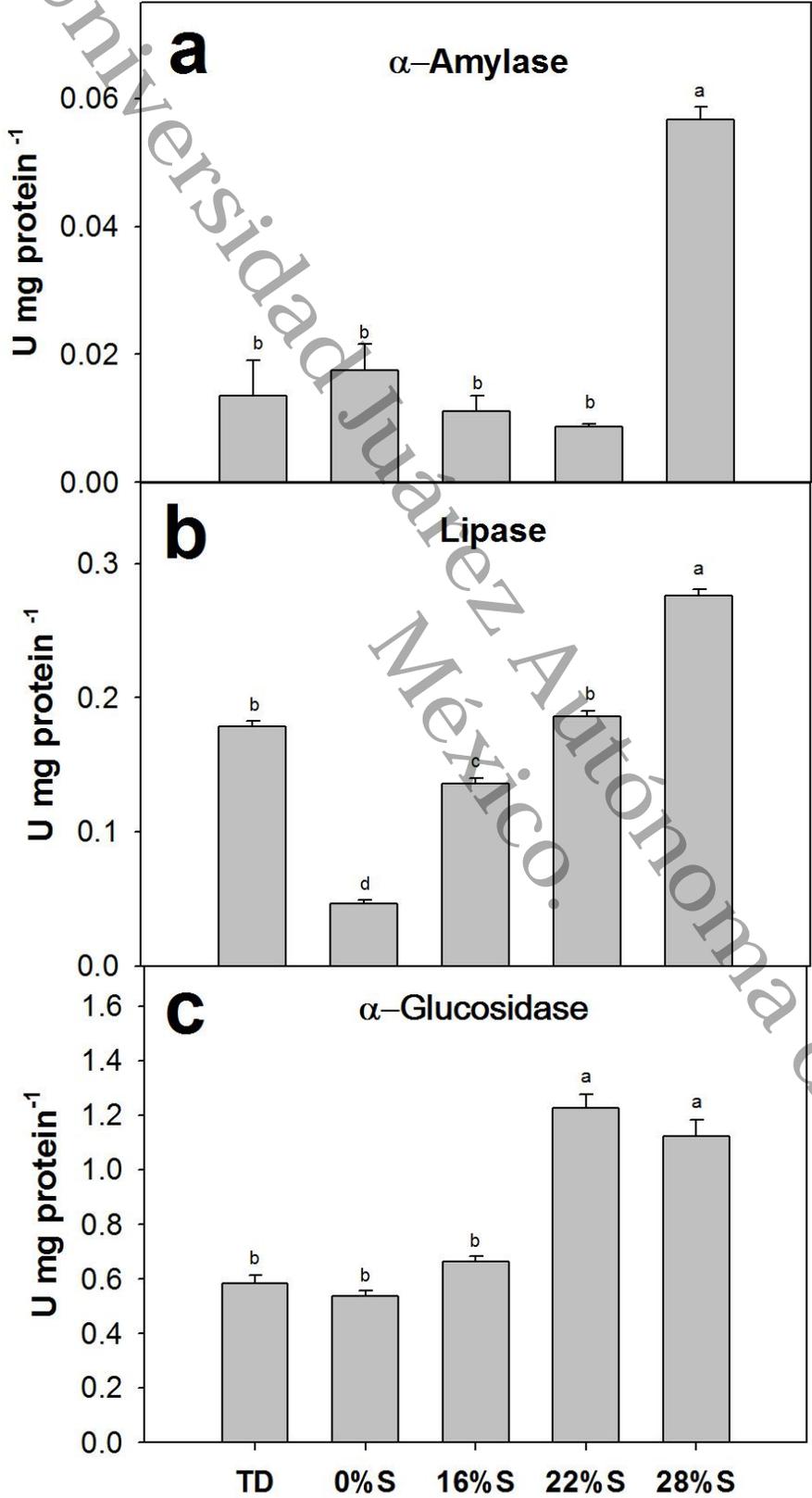
^h Pedregal (para trucha Silver Cup), Toluca, Edo. Mex., México











CAPITULO III

Expresión molecular de insulina y hormona del crecimiento (GH) durante la ontogenia inicial de larvas de pejelagarto (*Atractosteus tropicus*)

C.A. Frías-Quintana¹, C.A. Álvarez-González^{1*}, D. Tovar-Ramírez² L.D. Jiménez-Martínez¹. S. Camarillo-Coop¹, R. Martínez-García¹,

¹DACBIOL Laboratorio de Acuicultura Tropical, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Carretera Villahermosa-Cárdenas km 0.5, 86139, Villahermosa, Tabasco, México. *autor de correspondencia: alvarez_alfonso@hotmail.com

²CIBNOR, Instituto Politécnico Nacional 195, Playa Palo de Santa Rita Sur, C.P. 23096 La Paz, B.C.S., México

RESUMEN

El pejelagarto (*Atractosteus tropicus*) es una de las especies comerciales más importantes en el sureste de México, pero por la sobreexplotación se han disminuido las poblaciones naturales. Debido a esto, esta especie ha sido ampliamente estudiada por más de 20 años, lográndose su reproducción en cautiverio; sin embargo, se desconoce los aspectos relacionados con el sistema endócrino, principalmente la expresión de hormonas durante su desarrollo larvario. En este estudio se investigó la expresión del gen de insulina (INS) y hormona de crecimiento (GH), durante el período embrionario (huevo), eleuteroembrion (3 DAH) hasta el 25 de DAH utilizando el enfoque RTQ-PCR, normalizado con el gen de factor de elongación 1- α (EF1- α). De acuerdo con nuestros resultados obtenidos, la expresión génica de INS mostró cuatro picos a los 3, 7, 11 y 19 DAH, que corresponden a los cambios de alimentación (rotíferos y nauplios de *Artemia*) y alimento artificial. La expresión de GH se detectó baja desde el huevo y la eclosión en adelante, mostrando un ligero pico a las 11 DAH, cuando se hace el cambio de alimento vivo por artificial incrementándose del día 15 al 25 DDE, llegando a la conclusión de que las larvas de *A. tropicus* mostraron expresiones tempranas y altas de estas hormonas, que indican una relación directa con los cambios en la alimentación y el metabolismo de la especie las cuales incrementan su función de acuerdo a los nutrientes presentes en el alimento y el incremento en el crecimiento durante la ontogenia de *A. tropicus*.

Palabras clave: Expresión génica, Hormona del crecimiento Insulina, Larvicultura, RT-qPCR, pejelagarto.

INTRODUCCION

El pejelagarto (*Atractosteus tropicus*) es una especie que habita en cuerpos de agua con abundante vegetación acuática (Reséndez-Medina y Salvadores-Baledón 1983, Bussing 1998, Miller et al., 2005, Nelson 2006) y debido a las consecuencias de la sobreexplotación, poco conocimiento de su biología, la ignorancia sobre su importancia ecológica, las alteraciones de su hábitat y distribución actual, las poblaciones naturales han disminuido considerablemente (Bussing 1998, Aguilera et al., 2002). Esta especie ha sido ampliamente estudiada desde hace más de 20 años, lográndose su reproducción en cautiverio, su larvicultivo utilizando presas vivas y alimentos balanceados (Gómez 1989; Rodríguez et al., 1997; García et al., 1997; Hernández et al., 1997; Hernández 1999; Mendoza et al., 2005; Márquez et al., 2006), al grado que actualmente existen granjas comerciales para la producción de crías y engorda en diversos sistemas (González-Arévalo 2006; Álvarez-González et al., 2007; Gómez-Gómez 2009). Sin embargo, se desconoce los aspectos relacionados con la expresión de hormonas tipo insulina y de crecimiento que contribuyan al conocimiento de su funcionamiento y su importancia durante su desarrollo larvario.

Considerando lo anterior, los avances científicos y tecnológicos muestran a la biología molecular como un área de investigación que no ha sido explorada completamente, principalmente en estudios para esta especie y se han enfocado principalmente en ciprinidos y en su mayoría en especies marinas como *Centropomus undecimalis* (Martínez-Burguete 2010), *Lutjanus guttatus* (Galaviz et al. 2011), *Lates calcarifer* (Srichanun et al. 2013), *Totoaba macdonaldi* (Galaviz et al. 2015), *Centropomus parallelus* (Teles et al. 2015), *Salmo salar* (Sahlmann et al. 2015), *Sparus aurata* (Mata-Sotres et al. 2015), donde se denota fluctuaciones de la expresión de diversos genes relacionados a los cambios morfofisiológicos, en particular para enzimas y hormonas asociadas a la fisiología digestiva. Por lo anterior, se denota muchas posibilidades de investigación que aun no han sido exploradas, principalmente para el conocimiento de la fisiología y expresión génica de las especies de interés acuícola, de los

cuales no se tiene un estudio enfocado a hormonas tipo insulina y de crecimiento reportado para larvas de *A. tropicus*.

De esta manera, la insulina (INS) y factores de crecimiento similares a la insulina (IGFs) son péptidos relacionados evolutivamente que se derivan de un gen ancestral común (Chan y Steiner 2000). Un solo gen INS se ha descrito para casi todos los grupos existentes de los vertebrados estudiados hasta la fecha (Irwin 2004). Sin embargo, estudios recientes revelan que ciertas especies de peces (por ejemplo, el salmón, el fugu y pez cebra) poseen múltiples copias del gen INS, posiblemente como resultado de un evento de duplicación de genes asociados con la aparición de los teleósteos (Kavsan et al. 1993; Conlon 2001; Irwin 2004). La INS ha demostrado ser un fuerte agente promotor del crecimiento en los peces, sólo ligeramente menos eficaz que la acción del factor de crecimiento de insulina IGF-I (Planas et al. 2000).

Por otro lado, la hormona del crecimiento (GH) es una hormona bien conservada y se expresa principalmente en la glándula pituitaria anterior de todos los vertebrados y es responsable del crecimiento exponencial (Agnés et al. 2005). Aunque el efecto promotor del crecimiento de la GH está bien documentado, el crecimiento de los peces es multifactorial y GH podrá actuar a diferentes niveles (Mommsen 2001). La hormona del crecimiento (GH) es el principal regulador de crecimiento somático y el metabolismo de los peces, como en otros vertebrados (Björnsson 1997). Hasta hace poco, se creía que el GH no tenía ningún papel en el crecimiento del embrión, pero en estudios se han detectado transcripciones de GH en los embriones de trucha arco iris antes de la organogénesis de la pituitaria e incluso en ovocitos maduros (Yang et al. 1999).

En los vertebrados tetrápodos, el crecimiento embrionario y fetal había sido considerado para ser independiente del GH hipofisario, aunque se requiere para el crecimiento y el desarrollo postnatal. Sin embargo, estudios recientes sugieren que GH extrapituitario juegan un papel importante en el crecimiento temprano embrionario y la diferenciación (Sanders y Harvey 2008), estos datos llevaron a dar otra dimensión de la acción de la GH en los vertebrados en el desarrollo temprano. Aunque la expresión de GH se ha descrito ampliamente en euteleosteos, hasta ahora se conoce poco de GH en la fisiología peces primitivos (Fukamachi y Meyer 2007).

Sin embargo, se sabe poco sobre la regulación del crecimiento en teleósteos durante el desarrollo temprano, a pesar de la implicación del sistema endocrino es obvia. La presencia de GH en el embrión y las primeras etapas de larvas ha sido confirmado en peces como el mero (*Epinephelus coloides*) (Li et al. 2005; 2006), la anguilla japónica (*Anguilla japonica*) (Yuichi et al. 2006) y varias especies de peces teleósteos (Fukamachi y Meyer 2007). Asimismo, la expresión de GH en las primeras etapas de desarrollo sugiere que juega un papel importante en el crecimiento y la supervivencia de las larvas, lo que ha sido comprobado por los efectos estimulantes del crecimiento al utilizar GH exógena, y la transferencia y la sobre-expresión del gen GH demostrado en las larvas de teleósteos (Haishen et al. 2015). Aunque GH se ha detectado en muchos grupos, puede encontrarse limitado funcionalmente dentro de un gran número de taxones, la comparación de secuencias de GH ha sido informativo en una variedad de análisis filogenéticos. Dada la posición filogenética de los catanes relativos a los peces condrósteos como la amia (*Amia calva*) y los teleósteos, la caracterización de GH e insulina, como en el caso de *Lepisosteus osseus* (Rubin et al., 1996), debe ser útil para la interpretación de las tendencias evolutivas en la estructura de la GH en el grupo de Neopterygii y entre los Actinopterygii. En este contexto, el objetivo de esta investigación es determinar la expresión insulina y GH a través del desarrollo larval del pejelagarto (*Atractosteus tropicus*) y las tendencias evolutivas de estos genes en relación con otras especies.

Materiales y métodos

Toma de muestras de larvas

Para este estudio se obtuvo un total de 2000 embriones de *A. tropicus*, a partir de un desove inducido de reproductores (1 hembra 3.5 Kg de peso promedio y 3 machos 1.5 Kg de peso promedio) utilizando la hormona LHRHa (35 ug/kg de pez⁻¹) los cuales se mantuvieron en tanques circulares de 2000 l (0.6 m de alto por 2 m de diámetro) obtenidos del Laboratorio de Acuicultura Tropical en la División Académica de Ciencias Biológicas de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco (DACBIOL-UJAT). Una vez realizado el desove (16 horas post-inducción), se retiraron los reproductores manteniendo los huevos hasta su eclosión (día 3 post-fertilización, 0 días después de la eclosión, DDE), momento en el cual los eleuteroembriones fueron colocados en tres tanques de plástico circulares de 70 L acoplado a un sistema de

recirculación que consta de un reservorio de 1500 L que funciona como sedimentador de sólidos y filtro biológico, además de una bomba centrífuga de ¾ HP (Jacuzzi, JWPA5D-230A, Delavan WI, USA), un filtro de arena sílica (STA-RITE, S166T, Delavan WI, USA), y dos termostatos de titanio (PSA, R9CE371, Delavan WI, USA). La calidad del agua del sistema se monitoreó diariamente durante los 31 días de larvicultivo registrando la temperatura (29°C), el oxígeno disuelto (6.43 mg l⁻¹) y el pH (6.7) mediante un oxímetro (YSI 85, Ohio, USA) y un potenciómetro (HANNA HI 991001, Romania, Europa) respectivamente. Los organismos permanecieron en este sistema hasta que absorbieron el vitelo (2 DDE) iniciando la fase de alimentación, la cual se realizó cinco veces al día (8:00, 11:00, 13:00, 15:00 y 18:00 h) iniciando con nauplios de Artemia (AN, 2-5 nauplios/ml) desde el momento de la apertura de la boca hasta los 17 DDE, y posteriormente con alimento artificial para trucha (TD, Silver Cup, 45 % proteína y 16% lípidos) hasta el 31 DDE, para lo cual el alimento fue quebrado y tamizado (250-500, 500-750 y >750 µm) en relación al tamaño de la boca de las larvas.

El muestreo de larvas comenzó a partir del huevo, eleuteroembriones (1-3 DDE), hasta el 4 DDE, y luego el muestreo se llevó a cabo cada dos días (días 7, 9, 11, 15, 19 y 25 DDE), recolectando 5 larvas por día por triplicado, hasta una cantidad total de 270 larvas que se almacenaron en tubos Eppendorf de 1.5 µl con solución RNAlater® (Ambion USA) y se mantuvo en ultra-congelación a -80 °C (Thermo Scientific, Ohio, USA) hasta su posterior procesamiento.

Diseño de oligos

El diseño de oligonucleótidos se realizó utilizando el software Primer acceso libre 3 Plus (http://primer3plus.com/web_3.0.0/primer3web_input.htm) de una región específica de la secuencia de hormona de crecimiento (GH) e insulina obtenida de la especie *Lepisosteus oculatus* cuya secuencia de genes fueron obtenidas a partir de la base de datos GenBank. Los oligos fueron diseñados con las siguientes características: de 20 a 22 nucleótidos de largo, una temperatura de alineamiento de 50 a 60 ° C, CG (guanina-citosina) contenido de 40 y 60% y, finalmente, la formación de estructura secundaria se evaluó utilizando el software Oligo Calculator versión 3.27 de acceso libre (<http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>) (Tabla 1).

Extracción de ARN y síntesis de ADNc mediante RT-PCR en larvas de A. tropicus

La extracción total de ARN se realizó mediante el uso de un homogeneizado de larvas (0 a 25 días después de la eclosión). El proceso se llevó a cabo con un kit comercial de extracción de ARN Purelink™ RNA Mini Kit (Ambion CA US), finalmente, la muestra se resuspendió en agua libre de ARNasas. La concentración de ARN extraído y purificado se comprobó con el espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Ohio USA) utilizando 1 ul por muestra.

La síntesis de ADNc se realizó utilizando el kit iScript™ Reverse Transcription Supermix for RT-qPCR (Bio-Rad, USA) de acuerdo con las indicaciones establecidas por el fabricante utilizando 1 ug de ARN total, utilizando el iCycler TERMOCICLADOR (Bio-Rad, Berkeley, CA, EE.UU.). Una vez obtenida la amplificación de los productos obtenidos se corrieron en un gel de agarosa al 1.5% para determinar la presencia de bandas con su respectivo peso molecular, utilizado un marcador de pesos moleculares 50 pb (Invitrogen Tech-Line NY, USA), posteriormente una vez localizado el gen, se purificó los productos obtenidos de la PCR con el kit PureLink™ Quick PCR purification Kit® (Life technologies Germany) para posteriormente enviarlos a secuenciar.

Secuenciación y análisis de genes INS, GH Y EGF1

Los fragmentos de PCR obtenidos para cada gen fueron enviados a GENEWIZ Inc. (MD, EE.UU.) para la secuenciación directa. Las secuencias de nucleótidos fueron analizadas con el software Chromas (<http://www.technelysium.com.au/>). Las secuencias de nucleótidos, así como las de los aminoácidos se compararon con las herramientas BLASTn y BLASTp el fin de evaluar la identidad de cada uno.

Análisis qPCR

Una vez obtenida la secuencia para cada gen se diseñaron oligos para qPCR para evaluar la expresión del gen en las muestras de larvas. Para la cuantificación de la expresión de hormonas digestivas en larvas de *A. tropicus*, se construyó una curva estándar para observar el rango dinámico de detección de cebadores y verificar la eficacia de la amplificación y elegir una dilución a la que deben cuantificarse las muestras teniendo en cuenta que el 100% de la

eficiencia corresponde a una pendiente -3.32. Una vez que la dilución se fijó, se procedió a cuantificar el nivel de expresión de las enzimas digestivas a lo largo de la ontogenia usando el SsoAdvanced™ SYBR Green Supermix (BioRad, CA USA), teniendo como referencia el factor de elongación (EF1- α) de genes para normalizar los valores de Ct obtenidos a partir de la diferentes genes analizados de acuerdo con los algoritmos en el software CFX-Manager (BioRad).

Inferencia filogenética

Se construyó una aproximación filogenética con secuencias de aminoácidos de INS y GH, comparándolos con otras secuencias de aminoácidos de otras especies, usando el software libre Clustal Omega® <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>, posteriormente se utilizó el software BLAST® de National Center for Biotechnology Information (NCBI) para realizar una alineación de aminoácidos de INS y GH comparándolos con otras especies. <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

Resultados

Determinación de fragmentos amplificados para INS y GH

Los fragmentos amplificados obtenidos del corrimiento de los oligonucleótidos degenerados, muestran la presencia de una banda específica de Insulina (INS) con un peso molecular de 339 Pb, mientras que para el gen de GH se muestra una banda con un peso aproximado de 450 Pb, seguido de una banda específica del factor de Elongación 1- α con 392 Pb, este último usado como referencia y comparados con un marcador de pesos moleculares de 50 Pb (Invitrogen Tech-Line NY, USA) (Fig. 1).

La expresión de genes de insulina y GH en A. tropicus

Posteriormente se confirmó la especificidad de los oligos a través de la RT-qPCR, debido a la ausencia de estructuras secundarias, los dímeros de cebadores o fragmentos de amplificación no específicos mediante el análisis de picos de fusión, utilizando para ello el software CFX (BioRad). Después de este análisis, se determinó la cuantificación relativa de la insulina y la hormona del crecimiento (GH) utilizando EF1 como gen de referencia y se observó lo siguiente:

La expresión de INS fue bajo durante los primeros días presentando un pico en el día 7 DAH y posteriormente presentó variaciones a lo largo del desarrollo de la larva. (Fig. 2a). La expresión de GH se detecta a partir de los primeros días de cultivo de las larvas, presentando un pico de expresión a los 11 DAH, para ir incrementándose a partir del día 15 DAH hasta el día 25 DAH consecutivamente (Fig. 2b).

Secuenciación y análisis de aminoácidos de los genes de insulina, GH y EF1

Las secuencias mostraron fragmentos de 450 pb para la hormona del crecimiento (GH), 392bp, Factor de Elongación 1- α (EF1) y 339 bp para insulina respectivamente. El análisis de aminoácidos de insulina (Fig. 4) mostró el porcentaje de identidad más alta (80%) contra la secuencia de *Parus major* (XP_015485235.1) mientras que el siguiente valor porcentual (73%) fue con *Stegastes partitus* (XP_008296936.1) y 72% con especies como *Latimeria chalumnae* (XP_006008147.1), *Pseudopodoces humilis* (XP_005522396.1) y *Lepisosteus oculatus* (XM_006631713.2), siendo este último el pariente más próximo de esta especie, presentando un porcentaje de identidad del 72%, lo que indica que la secuencia de aminoácidos pertenece a la hormona insulina (Fig. 3), donde se muestra una alineación donde se muestran las zonas con mayor homología o conservadas entre las especies.

El gen de la hormona del crecimiento (GH) mostró el porcentaje más alto de identidad de aminoácidos (99%) contra la secuencia informada de GH en *Lepisosteus oculatus* (XP_006638350.1), *Acipenser sinensis* (ABV23493.1), *Huso huso* (BAH97324.1) *Chelonia mydas* (XP_007069102.1) y *Sus scrofa* (ACH99991.1), mientras que el siguiente valor más alto porcentual (98%) estaba con *Fukomys damarensis* (XP_010615051.1), *Heterocephalus glaber* (XP_004868690.1) y *Vulpes lagopus* (ABW36992.1) con 95% (Fig. 4).

En el caso del gen de referencia EF1- α , se usó la secuencia ya establecida del factor de elongación 1- α , ref (ALV85597.1) obtenida del genbank, donde al obtener los porcentajes de identidad de aminoácidos, se obtuvieron porcentajes del 100% de similitud para las especies de *Lepisosteus oculatus* (XP_006631264.1); *Brachymystax lenok* (ANA74990.1); *Hucho taimen* (AMZ00507.1); *Salmo marmoratus* (ACF75913.1); *Auchenipterichthys thoracatus* (AAQ62532.1) y *Acipenser baerii* (AGF89849.1) respectivamente (Fig. 5).

Inferencia filogenética

La inferencia filogenética de INS mostró que la secuencia de aminoácidos obtenida que se agrupa con el único ejemplar adicionales del género *Lepisosteus* (Fig. 6). El resto de la disposición filogenético mostró especímenes de diferentes clases. Del mismo modo, la inferencia filogenética de GH (Fig. 7) y EF1 (ALV85597.1) (Fig. 8) mostró un grupo con dos especies emparentadas: *Atractosteus tropicus* y *Lepisosteus oculatus* ambos miembros del orden Lepisosteiformes, siendo este un indicativo de que estas especies se encuentran emparentadas y proceden de un ancestro común.

Discusión

La expresión de hormonas representan una de las herramientas fundamentales para la comprensión de la fisiología digestiva, especialmente en larvas de peces dulceacuicolas (Ronnestad et al., 2013); en este sentido, durante el desarrollo de las larvas de *A. tropicus*, el nivel de expresión de hormonas digestivas se determinó sobre la ontogenia inicial, utilizando el esquema basado en alimento vivo (rotíferos y *Artemia*). De acuerdo con nuestros resultados la expresión de insulina (INS) está presente en pequeñas unidades desde el desarrollo del embrión (huevo), incrementándose en el día 3 DDE cuando se encuentra en la etapa de eleuteroembrión, y presenta variaciones en la expresión durante el desarrollo, incrementándose considerablemente a los 19 DDE, cuando ya es considerado un juvenil, con todo el sistema digestivo completamente desarrollado, incluyendo la formación completa de un páncreas funcional (Frias-Quintana et al. 2015), donde permanece activa la hormona INS como ha sido detectado en rodaballo (*Scophthalmus maximus*) (Hu et al. 2012; Haishen et al. 2015), trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) (Mennigen et al. 2013), la platija estrellada (*Platichthys stellatus*) (Yongjiang et al. 2015), la expresión en órganos específicos en *Solea senegalensis*, *Dicentrarchus labrax*, *Oreochromis hornorum*, (Funes et al., 2006; Patruno et al., 2008; Gao et al., 2012) y en relación con otros estudios de función y regulación de la insulina en peces (Irwin 2004; Li et al. 2006; Reindl y Sherian 2012) y otros vertebrados en general (Chan y Steiner 2000; Rodgers et al. 2008). Sin embargo, estudios recientes revelan que ciertas especies de peces (por ejemplo, el fugu y pez cebra) poseen múltiples copias del gen INS, posiblemente como resultado de un evento de duplicación de genes asociados con la aparición de los

teleósteos (Conlon 2001; Irwin 2004; Duan y Xu 2005). La INS ha demostrado ser un fuerte agente promotor del crecimiento en los peces, sólo ligeramente menos eficaz que la acción del factor de crecimiento de insulina IGF-I (Reindl y Sheridan 2012).

En cuanto a la expresión de GH, los resultados muestran la presencia de esta hormona se detecta a tiempo en la eclosión, post-eclosión, y larvas, una vez absorbido el vitelo, incrementándose a partir del día 9 DDE. Sin embargo en especies como la dorada, la expresión de GH en larvas se ha detectado por primera vez en el día 3 después de la eclosión (Funkenstein y Cohen 1996), en el lenguado japonés, el porcentaje de GH aumentó de forma continua desde la primera alimentación (aproximadamente 9 DAH), similar al obtenido en este estudio, al parecer el mayor porcentaje de GH a través de las etapas tempranas de la vida de las especies presentes sería un enfoque fisiológico de alto potencial de crecimiento en el período larvario, ya que la GH tiene efectos promotores del crecimiento en los teleósteos, a través del factor de crecimiento insulínico tipo I (IGF) (Haishen et al. 2015).

Estos estudios sugieren que la expresión de GH es esencial para el crecimiento de las larvas, y que durante la ontogenia inicial, dicha expresión es muy variable entre las especies de peces. Por ejemplo en la anguilla japónica (*Anguilla japonica*) la transcripción de proteína GH y producción de GH en la pituitaria comenzó entre los días 3 y 6 después de la eclosión, lo que sugiere que la GH es esencial para el crecimiento de larvas para acelerar el crecimiento somático y con ello alcanzar la etapa juvenil (Yuichi et al. 2006). Otro estudio reciente sugiere que la GH extrapituitaria se expresa en embriones tempranos en la trucha arco iris, así como en otros vertebrados tetrápodos, la transcripción de GH observados en el mero pinto (*Epinephelus coloides*) comenzó en el día 1 después de la eclosión, y en el día 2 después de la eclosión en larvas de (Li et al. 2005; 2006). Estos resultados corroboran con los observados en la trucha, aunque esta especie no presenta un desarrollo larvario a diferencia de las otras especies.

De hecho, en el caso del catán (*Atractosteus spatula*), la eclosión ocurre sólo dos días después de la fecundación de los huevos y las larvas crecen utilizando sus reservas de vitelo hasta el 5 DDE cuando comienzan a alimentarse, aunque las reservas de vitelo todavía están presentes hasta el 8 DEE. El desarrollo durante esta primera semana se caracteriza por la organogénesis y

el crecimiento a una velocidad de 1 mm/día. Después del 10 DEE, cuando se ha completado la metamorfosis, las larvas alcanzan su mayor tasa de crecimiento en 5-6 mm/día (Mendoza et al., 2002b). La expresión relativa de GH a través de etapas de larvas indica la existencia de la expresión sustancial de esta hormona en los huevos fertilizados, aumentando la expresión el día 11 DAH para disminuir en los siguientes días, esto es consistente con la formación de la glándula pituitaria. En la actualidad, no es posible atribuir esta tasa de crecimiento increíble solamente al eje receptor GH-GH, ya que las hormonas de la tiroides (T3) también se han evidenciado en las primeras etapas con una concentración creciente hasta el día 10 (Mendoza et al. 2001).

El hecho de que la GH puede actuar como un factor autocrino-paracrino durante la embriogénesis temprana de *A. tropicus*, así como en otras especies de peces sugiere que esta función puede haber aparecido temprano durante la evolución vertebrados y que la GH desempeña un papel importante durante la embriogénesis temprana en el pez. De esta forma, la expresión molecular de GH y la insulina y su papel que desempeña durante las etapas larvales sin duda contribuirá a una mejor comprensión de la fisiología de las larvas. Por otro lado, la tecnología de genes proporciona los medios para un suministro comercial de la GH recombinante en grandes cantidades (Moriyama y Kawauchi 1990), que podría ser utilizado para mejorar el crecimiento de una especie relacionada con un valor de la acuicultura importante como *A. tropicus*.

Agradecimientos

El autor agradece al CONACYT y al Programa Institucional de Superación Académica de la UJAT por las becas otorgadas durante el desarrollo de esta tesis. Así como al laboratorio de Bioquímica CICART, UJAT por el apoyo técnico para la realización de los estudios.

Referencias

- Agnés R, Garza-Rodríguez M, Hernández Montenegro V, Aguilera C, Barrera-Saldaña H, Mendoza R (2005) Cloning of the growth hormone cDNA of alligator gar *Atractosteus spatula* and its expression through larval development. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 140, 423-429
- Aguilera C, Mendoza R, Rodríguez G, Márquez G (2002) Morphological description of Alligator Gar and Tropical Gar larvae, with emphasis on growth indicators. *Trans. Am. Fish. Soc.* 131, 899– 909.
- Álvarez-González CA, Contreras W, Castillo K, Santana O, Gallegos R (2007) Evaluation of commercial diets on tropical gar *Atractosteus tropicus* growth. In: *Memories of Aquaculture America 2007*. San Antonio, Texas, EUA. 835 p.
- Björnsson BT (1997) The biology of salmon growth hormone: from daylight to dominance. *Fish Physiol. Biochem.* 17, 9–24.
- Bussing WA (1998) *Peces de las aguas continentales de Costa Rica*. Ed. Univ. Costa Rica. 271 p.
- Camacho, J.P.M., T.F. Sharbel & L.W. Beukeboom. 2000. B-chromosome evolution. *Phil Trans. R. Soc. Lond. B.* 355: 163-178.
- Chan SJ, Steiner DF (2000) Insulin through the ages: phylogeny of a growth promoting and metabolic regulatory hormone. *Am. Zool.* 40: 213–222.
- Conlon JM (2001). Evolution of the insulin molecule: insights into structure-activity and phylogenetic relationships. *Peptides*, 22:1183-1193.
- De Jesus EGT, Ayson FG, Amemiya Y, Moriyama S, Hyodo S, Hirano T, Kawauchi H (2002) Milkfish (*Chanos chanos*) growth hormone cDNA cloning and mRNA expression in embryos and early larval stages. *Aquaculture* 208, 177–188.
- Funes V, Asensio E, Ponce M, Infante C, Cañavate JP, Manchado M (2006) Insulin-like growth factors I and II in the sole *Solea senegalensis*: cDNA cloning and quantitation of gene expression in tissues and during larval development. *General and Comparative Endocrinology*, 149 (2): 166-172.
- Fukamachi S & Meyer A (2007) Evolution of Receptors for Growth Hormone and Somatolactin in Fish and Land Vertebrates: Lessons from the Lungfish and Sturgeon Orthologues. First publ. in: *Journal of Molecular Evolution* 65 (4): 359-372.

- Funkenstein B, Cohen I (1996) Ontogeny of growth hormone protein and mRNA in the gilthead sea bream *Sparus aurata*. *Growth Regul.* 6, 16–21.
- Galaviz M, López L, García-Casca A, Álvarez-González CA, True C., Gisbert E (2015) Digestive system development and study of acid and alkaline protease digestive capacities using biochemical and molecular approaches in totoaba (*Totoaba macdonaldi*) larvae. *Fish Physiol Biochem* 41, 1117-1130
- Galaviz MA, García-Gasca A, Drawbridge M, Álvarez-González CA, López LM (2011) Ontogeny of the digestive tract and enzymatic activity in white sea bass, *Atractoscion nobilis*, larvae. *Aquaculture* 138, 162-168. doi:10.1016/j. aquaculture.2011.05.014
- Gao FY, Lu MX, Huang ZH, Ping ZH, Li KX (2012) Cloning and sequence of two cDNAs encoding insulin- like growth factors I and II genes (IGF-I and IGF-II) of Zanzibar tilapia (*Oreochromis hornorum*) and their tissue distribution. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 20 (2): 171-180.
- García J, Márquez G, Páramo S (1997) Utilización de alimento fresco y artificial en la sustitución de alimento vivo para la cría de larvas y postlarvas de pejelagarto *Atractosteus tropicus*. En: Memorias de la Semana de Investigación y Divulgación Científica de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Villahermosa Tabasco, México. 61-64 p.
- Gómez M (1989) Reproducción del pejelagarto en estanquería rústica. En: Primer Seminario sobre Acuicultura PEMEX-UJAT en el estado de Tabasco. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Villahermosa, Tabasco, México. 13-14 pp.
- Gómez-Gómez MA (2009) Diseño y operación de un laboratorio de producción de juveniles de pejelagarto (*Atractosteus tropicus* gill, 1863) en tuxtla gutierrez, chiapas, México. Tesis profesional. DACBiol. UJAT. 60 p.
- González-Arévalo E (2006) Diseño y operación de un laboratorio de Producción de alevines de pejelagarto *Atractosteus tropicus* (Gill, 1863) en el municipio de Comalcalco, Tabasco, México. Tesis profesional. DACBiol. UJAT. 132 p.
- Haishen W, Qian QI, Jian HU, Yufeng SI, Feng HE, Jifang LI (2015) Expression Analysis of the Insulin-Like Growth Factors I and II During Embryonic and Early Larval Development of Turbot (*Scophthalmus maximus*). *J. Ocean Univ. China Oceanic and Coastal Sea Research*) 14 (2): 309-316.

- Hernández V U, Márquez G, Páramo S, Félix S, Hernández S (1997) Valor nutritivo de nauplios de *Artemia* spp y su uso en la larvicultura del pejelagarto *Atractosteus tropicus*. En: Memoria, semana de divulgación y video científico de la UJAT 1997. División Académica de Ciencias Biológicas. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Villahermosa, Tabasco, México. Pp 65-67.
- Hernández VU, (1999) Punto crítico de no retorno en larvas de pejelagarto *A. tropicus* (Gill 1863). Tesis profesional. DACBiol. UJAT. 46 p.
- Hu J, Wen HS, Guan J, Guan SG, He F, Li JF, Shi D, Ma RQ, Liu M, Mu WJ, Zhang YQ (2012) Cloning of IGFBP-1,2 and expression analysis during adult and early developmental stages in *Scophthalmus maximus*. *Acta Oceanologica Sinica*, 34: 139-146 (in Chinese with English abstract).
- Irwin DM (2004) A second insulin gene in fish genomes. *Gen. Comp. Endocrinol.* 135, 150–158.
- Kavsan V, Koval A, Petrenko O, Roberts CT, LeRoith D (1993) Two insulin genes are present in the salmon genome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 191: 1373–1378.
- Li M, Greenaway J, Raine J, Petrik J, Hahnel A, Leatherland J (2006) Growth hormone and insulin-like growth factor gene expression prior to the development of the pituitary gland in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) embryos reared at two temperatures. *Comp. Biochem. Physiol., B* 143, 514–522.
- Li WS, Chen D, Wong AOL, Lin HR (2005) Molecular cloning, tissue distribution, and ontogeny of mRNA expression of growth hormone in orange-spotted grouper (*Epinephelus coloides*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 144, 78–89.
- Márquez-Couturier G, Álvarez C, Contreras W, Hernández U, Hernández A, Mendoza R, Aguilera C, García T, Civera R, Goytortua E (2006). Avances en la alimentación y nutrición de pejelagarto *Atractosteus tropicus*. pp. 446-523. En: Memorias del VIII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. UANL. Monterrey, Nuevo León, México. ISBN 970-694-333-5.
- Martínez-Burguete T (2010) Expresión de enzimas digestivas durante la ontogenia inicial del robalo blanco (*Centropomus undecimalis*). Dissertation, Univesidad Autónoma de Chiapas, Centro de Biociencias campus IV

- Mata-Sotres JA, Astola A, Yúfera M, Martínez-Rodríguez G (2016) Cloning and molecular ontogeny of digestive enzymes in fed and food-deprived developing gilthead seabream (*Sparus aurata*) larvae, *Comp Biochem Physiol B*, vol 191: 53-65, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpb.2015.09.006>
- Mendoza R, Aguilera C, Montemayor J (2001) Effects of thyroid hormones and glucocorticoids on alligator gar *Atractosteus spatula* larval development. World Aquaculture Society, Orlando, Florida, USA.
- Mendoza R, Aguilera C, Montemayor J, Revol A, Holt J (2002b) Studies on the physiology of *Atractosteus spatula* larval development and its applications to early weaning onto artificial diets. In: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Gaxiola-Cortés, M.G., Simoes, N. (Eds.), *Avances en Nutrición Acuícola VI*. Cancún, Quintana Roo, México *Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*.
- Mommsen, T.P., 2001. Paradigms of growth in fish. *Comp. Biochem. Physiol.*, B 129, 207– 219.
- Mendoza R., Aguilera C., Montemayor J., Cortes V., Santillán O., Hernández U. (2005). Domestication and culture of alligator gar *Atractosteus spatula* in Mexico. In: *Memories of Aquaculture America*. New Orleans, Louisiana, EUA. pp 272.
- Mennigen J, Skiba-Cassy S, Panserat S (2013) Ontogenetic expression of metabolic genes and microRNAs in rainbow trout alevins during the transition from the endogenous to the exogenous feeding period. *The Journal of Experimental Biology* 216: 1597-1608.
- Miller RR, Minckley WL, Norris SM (2005) *Freshwater fishes of Mexico*. University of Chicago press, Chicago and London. 490 p.
- Mommsen TP (2001) Paradigms of growth in fish. *Comp. Biochem. Physiol.*, B 129, 207– 219.
- Moriyama S, Kawauchi H (1990) Growth stimulation by immersion in recombinant salmon growth hormone. *Nippon Suisan Gakkaishi* 56, 31– 34.
- Nelson SJ (2006) *Fishes of the World*. 4th Edition. A Wiley-Interscience publication. Estados Unidos. 601 p.
- Patruno M, Sivieri S, Poltronieri C, Sacchetto R, Maccatrozzo L, Martinello T, Funkenstein B, Radaelli G (2008) Real-time polymerase chain reaction, in situ hybridization and immunohistochemical localization of insulin-like growth factor-I and myostatin during

- development of *Dicentrarchus labrax* (Pisces: Osteichthyes). Cell Tissue Research, 331: 643-658.
- Pérez-Sánchez J, Smal J, Le Bail PY (1991) Location and characterization of growth hormone binding sites in the central nervous system of a teleost fish (*Oncorhynchus mykiss*). Growth Regul. 1: 145– 152.
- Reindl KM & Sheridan M (2012) Peripheral regulation of the growth hormone-insulin-like growth factor system in fish and other vertebrates. Comparative Biochemistry and Physiology, Part A 163: 231–245.
- Reséndez-Medina A. & Salvadores-Baledón ML (1983) Contribución al conocimiento de la biología del pejelagarto *Lepisosteus tropicus* (Gill) y la tenguayaca *Petenia splendida* Günther, del estado de Tabasco. Biótica 8: 413-426.
- Rodgers BD, Roalson EH, Thompson C (2008) Phylogenetic analysis of the insulinlike growth factor binding protein (IGFBP) and IGFBP-related protein gene families. Gen. Comp. Endocrinol. 155, 201–207.
- Rodríguez F, Márquez G, Páramo S (1997) Utilización del uso de cladóceros y nauplios de *Artemia* en la alimentación de larvas de pejelagarto *Atractosteus tropicus*. En: Memorias de la Semana de Investigación y Divulgación Científica de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Villahermosa Tabasco, México. 72 -77 p.
- Rubin DA, Youson JH, Marra LE, Dores RM (1996) Cloning of a gar (*Lepisosteus osseus*) GH cDNA: trends in actinopterygian GH structure. Journal of molecular endocrinology, 16(1), 73-80.
- Sahlmann C, Gu J, Kortner TM, Lein I, Krogdahl Å, Bakke AM (2015) Ontogeny of the digestive system of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and effects of soybean meal from start-feeding. PLoS One 10, 1371/0124179.
- Sakamoto T, Hirano T (1991) Growth hormone receptors in the liver and osmoregulatory organs of rainbow trout: characterization and dynamics during adaptation to seawater. J. Endocrinol. 130, 425–433.
- Sanders EJ, Harvey S (2004) Growth hormone as an early embryonic growth and differentiation factor. Anat. Embryol. 209, 1–9.

- Srichanun M, Tantikitti C, Utarabhand P, Kortner T (2013) Gene expression and activity of digestive enzymes during the larval development of Asian seabass (*Lates calcarifer*). *Comp Biochem Physiol* 165B, 1-9
- Teles A, Melo W, Ammar D, Rauh Y, Nazari E, Ronzani V (2015) Ontogeny of the digestive tract of *Centropomus parallelus* larvae. *Fish Physiol Biochem* 41, 549-559 DOI 10.1007/s10695-015-0028-y.
- Yongjiang X, Kun Z, Xuezhou L, Bao S, Cunyu L, Xueying S (2015) Insulin-like growth factors I and II in starry flounder (*Platichthys stellatus*): molecular cloning and differential expression during embryonic development. *Fish Physiology and Biochemistry*, Volume 41(1): 139-152.
- Yuichi O, Haruhisa F, Hideki T, Hirohiko K, Hiromi O, Shinji A, Akihiko H, Kohei Y (2006) Expression of growth hormone family and growth hormone receptor during early development in the Japanese eel (*Anguilla japonica*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B* 145 (2006) 27-34.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fragmentos amplificados utilizando primers degenerados mediante RT-PCR y visualizados en gel de agarosa al 1.5% con bromuro de etidio utilizando un marcador de pesos moleculares (MM) de 50 Pb (invitrogen). Las muestras (de izquierda a derecha): Insulina (INS) 339 Pb, Hormona del crecimiento (GH) 450 Pb y Factor de Elongación 1- α (EF1) 392 Pb.

Figura 2. Niveles de expression relativa de INS(a) y GH (b) comparadas con Ef1 durante la ontogenia inicial de *A. tropicus*.

Figura 3. Alineamiento de secuencia de aminoácidos de INS en *A. tropicus* en comparación con otras especies de peces (número de acceso de GenBank o NCBI se indican junto a nombre de la especie). Los aminoácidos que son idénticos en todas las especies se caracterizan por (*). Los aminoácidos que son algo similares en todas estas especies están marcados con (:). Los espacios en las secuencias se caracterizan por (-).

Figura 4. Alineamiento de secuencia de aminoácidos de GH en *A. tropicus* en comparación con otras especies de peces (número de acceso de GenBank o NCBI se indican junto a nombre de la especie). Los aminoácidos que son idénticos en todas las especies se caracterizan por (*). Los aminoácidos que son algo similares en todas estas especies están marcados con (:). Los espacios en las secuencias se caracterizan por (-).

Figura 5. Alineamiento de secuencia de aminoácidos de EF1 en *A. tropicus* en comparación con otras especies de peces (número de acceso de GenBank o NCBI se indican junto a nombre de la especie). Los aminoácidos que son idénticos en todas las especies se caracterizan por (*). Los aminoácidos que son algo similares en todas estas especies están marcados con (:). Los espacios en las secuencias se caracterizan por (-).

Figura 6. Analisis de similitud del gen insulina (INS) en *A. tropicus*

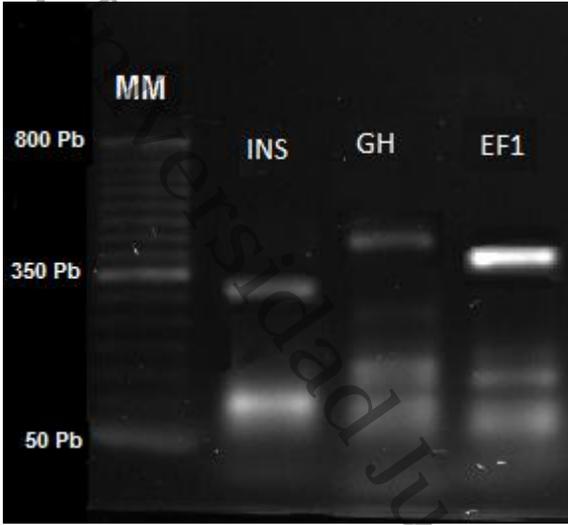
Figura 7. Analisis de similitud del gen de la hormona del crecimiento (GH) en *A. tropicus*

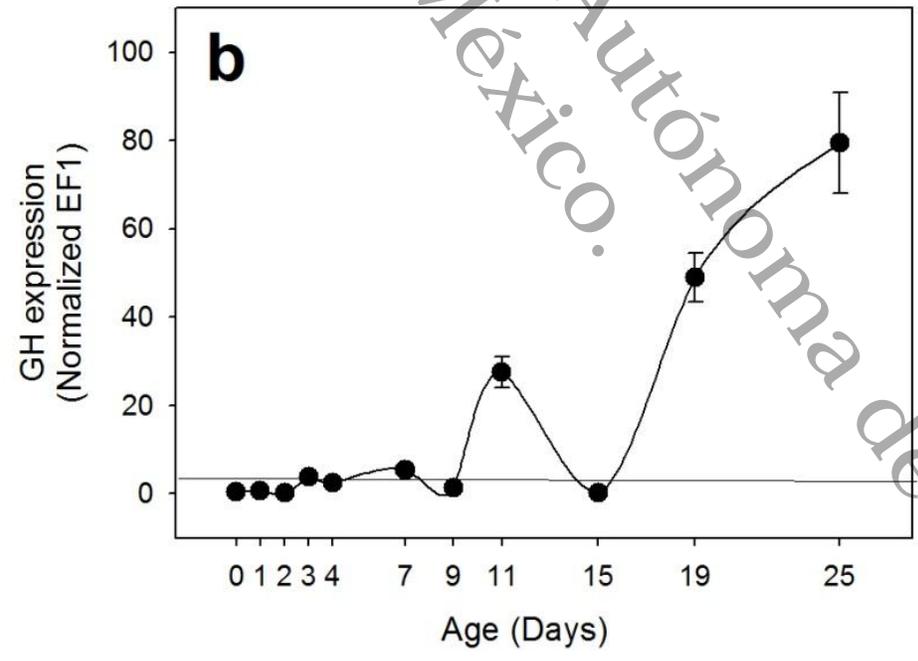
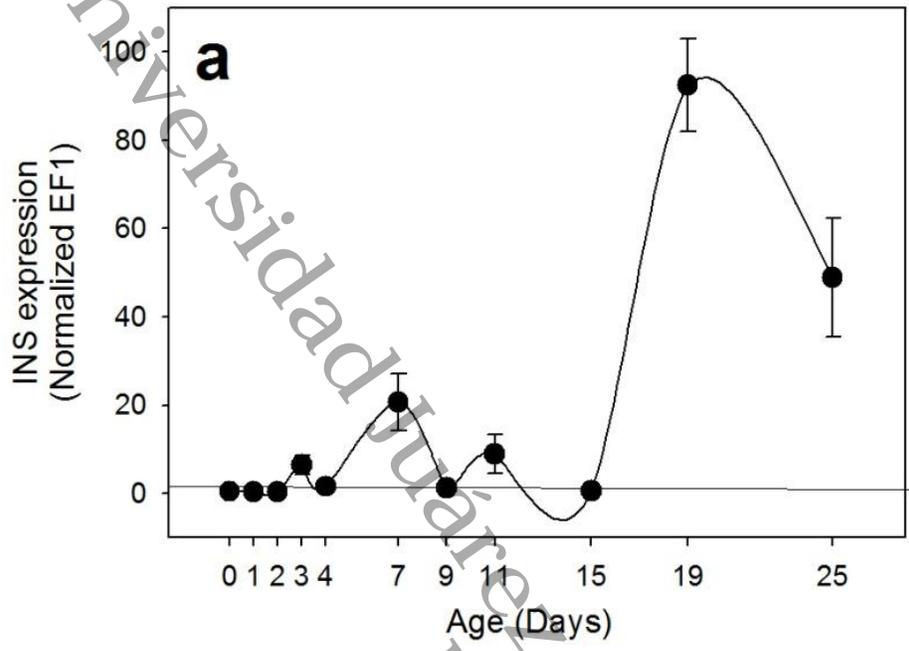
Figura 8. Analisis de similitud del gen de referencia Factor de Elongación 1- α (EF1) en *A. tropicus*

Tabla 1. Secuencias de oligonucleotidos qPCR usados en este estudio

GEN	Nombre	Secuencia	Temperatura Melting (°C)	Tamaño nucleótido (Pb)
Hormona del crecimiento	qGH-F	5' GAAGAGCAGAGACAGTCAAGCA 3'	59.94 °C	119 pb
	qGH-R	5' GAATCTCAGCAGCTCCACATC 3'	59.97 °C	
Insulina	qINS-F	5' AATTTTCTTCATGTGCCTTGTG 3'	59.13 °C	110 pb
	qINS-R	5' CTCATTTTCCTGTCCAGCTTT 3'	59.76 °C	
Factor de Elongación 1- α	qEF1-F	5' GGCATCGACAAGAGAACCAT 3'	60.08 °C	156 pb
	qEF1-R	5' CTTGCTGGTCTCGAACTTCC 3'	59.99 °C	

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.





A. tropicus
 S. partitus [XP 008296936.1](#)
 L. crocea [XP 010746465.1](#)
 O. niloticus [XP 003458727.1](#)
 N. brichardi [XP 006785215.1](#)
 C. crocea [XP 010746465.1](#)
 S. salar [XP 014053670.1](#)
 E. Lucius [XP 010895347.1](#)
 L. oculatus [XM 006631713.2](#)
 L. chalumnae [XP 006008147.1](#)

LNLQOMVEISQPNETF*YLVFCIKKLLK*SRYPDGGKINRSPMVRTLW*IKTKLQLYHSHC
 -----MVALWLQSFSL-----V
 -----MAALWLQSFSL-----V
 -----MAALWLQTFSL-----V
 -----MAALWLQTFSL-----V
 -----MALWFQTAALL-----I
 --MGESVLPQPTFPSAFLLLFYR--ASSPPP-----PQPIINMALWLQAVSLL-----V
 -----MASWLQATSL-----V
 -----STSNLL-----C*SACTMARRFQVFSLL-----A
 -----MALWVRVLPFL-----L
 : *
 :

A. tropicus
 S. partitus [XP 008296936.1](#)
 L. crocea [XP 010746465.1](#)
 O. niloticus [XP 003458727.1](#)
 N. brichardi [XP 006785215.1](#)
 C. crocea [XP 010746465.1](#)
 S. salar [XP 014053670.1](#)
 E. Lucius [XP 010895347.1](#)
 L. oculatus [XM 006631713.2](#)
 L. chalumnae [XP 006008147.1](#)

MIN*CWCV-----KYCFSSVTN*VALENEKYKFSSCALCIIVKCFILQ--SLSPGLL
 LLVVSWPQSQAAPAQHLGSHLVDALY-----LVCGRGFFYNPKR--DVEPL
 LLIVSWPQSQAATAPOHLGSHLVDALY-----MVCGRGFFYNPKR--DVDPL
 LMMVSWPQSQAVGGPQHLGSHLVDALY-----LVCGRGFFYNPKR--DVDPL
 LMMVSWPQSQAVGGPQHLGSHLVDALY-----LVCGRGFFYNPKR--DVDPL
 MVALSSTGGET-AAAQHLGSHLVDALY-----LVCGEQGFYFNPKR--EADPI
 LLALY-PGADA-AAAQHLGSHLVDALY-----LVCGEKGFYFNPKR--DVDPL
 LLSLS-PGANS-AAAQHLGSHLVDALY-----LVCGEKGFYFNPKR--DVDPL
 LLVLTSPPVTDAAANQHLGSHLAEALY-----LVCGERGFTYDPDKMSGTEPG
 LIALSAPSTTQAIANQHLGSHLVEALY-----LVCGEKGFYFNPKR--DVDPL
 : * * * * *
 : * * * * *

A. tropicus
 S. partitus [XP 008296936.1](#)
 L. crocea [XP 010746465.1](#)
 O. niloticus [XP 003458727.1](#)
 N. brichardi [XP 006785215.1](#)
 C. crocea [XP 010746465.1](#)
 S. salar [XP 014053670.1](#)
 E. Lucius [XP 010895347.1](#)
 L. oculatus [XM 006631713.2](#)
 L. chalumnae [XP 006008147.1](#)

VGELTGKA-----GQENEVDKYQFKQO-GEMKVKR-----GIVEQCCHKPG-----
 LGFLPPRAAAA-AAGQNEAADFAFKDQMMEMMKR-----GIVEQCCHKPCNIFDLQNY
 LGFLPPKAGGA-VAAGGENEVAEFAFKDQ-MEMMKR-----GIVEQCCHKPCNIFDLQNY
 LGFLPPKAGGA-VVQGGENEV---TFKDQ-MEMMKR-----GIVEQCCHKPCNIFDLQNY
 LGFLPPKAGGA-VVQGGESEV---TFKDQ-MEMMKR-----GIVEQCCHKPCNIFDLQNY
 QGFLQPKS-----GQENEVAEYPPYKDM-GEMIVKRGIVVRGIVEQCCHKPCNIFDLQNY
 TGFLFPKS-----AQ--EVAEYPPYKDM-MEMMKR-----GIVEQCCHKPCNIFDLQNY
 IGFLSPKS-----AQENEVAENPPFKDQ-MEM-VKR-----GIVEQCCHKPCNIFDLQNY
 LGLLTGKA-----GEENVVDEYPPFKDQ-GEMKVKR-----GIVEQCCHKPCNIFDLQNY
 ----LIKS-----GLENEVEELPPQOQ-GTMKEKR-----GIVEQCCHKPCNIFDLQNY
 : * * * * *
 : * * * * *

A. tropicus
 S. partitus [XP 008296936.1](#)
 L. crocea [XP 010746465.1](#)
 O. niloticus [XP 003458727.1](#)
 N. brichardi [XP 006785215.1](#)
 C. crocea [XP 010746465.1](#)
 S. salar [XP 014053670.1](#)
 E. Lucius [XP 010895347.1](#)
 L. oculatus [XM 006631713.2](#)
 L. chalumnae [XP 006008147.1](#)

 CN-----
 CN-----
 CN-----
 CN-----
 CASLRS-----
 CN-----
 CN-----
 CN*SQVITLN*CDLKYPCVALF*NIKDLKTLK
 CN-----



A. tropicus
 L. oculatus [XP_006638350.1](#)
 A. spatula [AAW63066.1](#)
 A. sinensis [ABV23493.1](#)
 H. huso [BAH97324.1](#)
 C. mydas [XP_007069102.1](#)
 M. reevesii [ABO09819.1](#)
 S. Scrofa [ACH99991.1](#)
 A. jubatus [XP_014931855.1](#)
 C. lupus [CAA80601.1](#)
 L. weddellii [XP_006737704.1](#)
 H. glaber [XP_004868690.1](#)

MASGFLLC--PVLLAVFFMSPVEVGAFP---LYSLFTNAVMAQHLHQLAADIYKDFERT

 MASGLLLC--PVLLVILLVSPKESGAYPIIPLSSLFTNAVLRAQYLHQLAADIYKDFERT

 MAVGFPQNSVLLAFTLLCLPWPQEVGAFPPAMPLSSLFANAVLRAQHLHQLAADTYKEFERA

A. tropicus
 L. oculatus [XP_006638350.1](#)
 A. spatula [AAW63066.1](#)
 A. sinensis [ABV23493.1](#)
 H. huso [BAH97324.1](#)
 C. mydas [XP_007069102.1](#)
 M. reevesii [ABO09819.1](#)
 S. Scrofa [ACH99991.1](#)
 A. jubatus [XP_014931855.1](#)
 C. lupus [CAA80601.1](#)
 L. weddellii [XP_006737704.1](#)
 H. glaber [XP_004868690.1](#)

YVPDEQRHSSKNSPSAFCYSEIIPAPTGKDEAQQRSDVELLRFSLALIQSWISPLQTLRS
 -----AICYSEIIPAPTGKDEAQQRSDVELLRFSLALIQSWISPLQTLRS
 -----SPLQTLRS
 YVPDEQRHSSKNSPSAFCYSEIIPAPTGKDEAQQRSDVELLRFSLALIQSWISPLQSLSH
 -----SPSAFCYSEIIPAPTGKDEAQQRSDVELLRFSLALIQSWISPLQSLRS
 -----NKISQSAFCYSEIIPAPTGKDDAQKSDMELLRFSLILIQSWLNPVQFLSR
 -----NKISQSAFCYSEIIPAPTGKDDAQKSDMELLRFSLILIQSWLNPVQFLSR
 -----QNAQA AFCFSEIIPAPTGKDEAQQRSDVELLRFSLLLIQSWLGPVQFLSR
 -----QNAQA AFCFSEIIPAPTGKDEAQQRSDVELLRFSLLLIQSWLGPVQFLSR
 -----QNAQA AFCFSEIIPAPTGKDEAQQRSDVELLRFSLLLIQSWLGPVQFLSR
 -----YIPEGORYSIQNAQA AFCFSEIIPAPTGKDEAQQRSDVELLRFSLLLIQSWLGPVQFLSR
 -----QNTQA AFCFSEIIPAPTGKEEAQQRSDMELLRFSLLLIQSWLGPVQFLSR
 : *:

A. tropicus
 L. oculatus [XP_006638350.1](#)
 A. spatula [AAW63066.1](#)
 A. sinensis [ABV23493.1](#)
 H. huso [BAH97324.1](#)
 C. mydas [XP_007069102.1](#)
 M. reevesii [ABO09819.1](#)
 S. Scrofa [ACH99991.1](#)
 A. jubatus [XP_014931855.1](#)
 C. lupus [CAA80601.1](#)
 L. weddellii [XP_006737704.1](#)
 H. glaber [XP_004868690.1](#)

VFSNSLVFGTSDRIFEKLDLQDLERGIVTLTRE IDEGSPRIA AAFLLTYEKFDTNLRNDDAL
 VFSNSLVFGTSDRIFEKLDLQDLERGIVTLTRE IDEGSPRIA AAFLLTYEKFDTNLRNDDAL
 VFSNSLVFGTSDRIFEKLDLQDLERGIVTLTRE IDEGSPRIA AAFLLTYEKFDTNLRNDDV
 VFTNSLVFGTSDRVFEKLDLEEGIVALMRDLGEGGFGSSTLLKLT YDKFDVNLNRNDDAL
 VFTNSLVFGTSDRVFEKLDLEEGIVALMRDLGEGGFGSSTLLKLT YDKFDVNLNRNDDAL
 VFTNSLVFGTSDRVYEKLDLEEGIQALMRELEDGSLRGFQVLRPT YDKFDINLRNDDAL
 VFTNSLVFGTSDRVYEKLDLEEGIQALMRELEDGSLRGFQVLRPT YDKFDINLRNDDAL
 VFTNSLVFGTSDRVYEKLDLEEGIQALMRELEDGSPRAGQILKQTYDKFDTNLRSDDAL
 VFTNSLVFGTSDRVYEKLDLEEGIQALMRELEDGSPRAGQILKQTYDKFDTNLRSDDAL
 VFTNSLVFGTSDRVYEKLDLEEGIQALMRELEDGSPRAGQILKQTYDKFDTNLRSDDAL
 VFTNSLVFGTSDRVYEKLDLEEGIQALMRELEDGSPRAGQILKQTYDKFDTNLRSDDAL
 VFTNSLVFGTSDRVYEKLDLEEGIQALMRELEDGSPRAGQILKQTYDKFDTNLRSDDAL
 VFTNSLVFGTSDRVYEKLDLEEGIQALMRELEDGSPRAGQILKQTYDKFDTNLRSDDAL
 VFTNSLVFGTSDRVYEKLDLEEGIQALMRELEDGSPRAGQILKQTYDKFDTNLRSDDAL
 **.* **.* **.* **.* **.* **.* **.* **.* **.* **.* **.* **.* **.* **.* **.*

A. tropicus
 L. oculatus [XP_006638350.1](#)
 A. spatula [AAW63066.1](#)
 A. sinensis [ABV23493.1](#)
 H. huso [BAH97324.1](#)
 C. mydas [XP_007069102.1](#)
 M. reevesii [ABO09819.1](#)
 S. Scrofa [ACH99991.1](#)
 A. jubatus [XP_014931855.1](#)
 C. lupus [CAA80601.1](#)
 L. weddellii [XP_006737704.1](#)
 H. glaber [XP_004868690.1](#)

MKNYGLLACFKKDMHKVETYLKVMKCRRFVESNCTL*
 MKNYGLLACFKKDMHKVETYLKVMKCRRFVESNCT--
 MKNYGLLACFKK-----
 FKNYGLLSCFKKDMHKVETYLKVMKCRRFVESNCTL-
 FKNYGLLSCFKKDMHKVETYLKVMKCRRFVESNCTL-
 LKNYGLLSCFKKDLHKVETYLKVMKCRRFVESNCTI-
 LKNYGLLSCFKKDLHKVETYLKVMKCRRFVESNCTI-
 LKNYGLLSCFKKDLHKAETYLKVMKCRRFVESNCTI-
 LKNYGLLSCFKKDLHKAETYLKVMKCRRFVESNCTI-
 LKNYGLLSCFKKDLHKAETYLKVMKCRRFVESNCTI-
 LKNYGLLSCFKKDLHKAETYLKVMKCRRFVESNCTI-
 LKNYGLLSCFKKDLHKAETYLKVMKCRRFVESNCTI-
 LKNYGLLSCFKKDLHKAETYLKVMKCRRFVETSCVF-
 :*****:***:

A. thoracatus|AAQ62532.1| -----
 H. forficulatus|AAQ62482.1| -----
 L. morrowi|AAQ62534.1| -----
 P. lyra|AAQ62483.1| -----
 S. marmoratus|ACF75913.1| -----
 B. lenok|ANA74990.1| -----
 H. taimen|AMZ00507.1| -----
 A. baerii|AGF89849.1| -----
A. tropicus|ALV85597.1| -----
 L. oculatus|XP_006631264.1| ITIDISLWKFETSKYYVTIIDAPGHRDFIKNMITGTSQADCAVLIVAGGVGEFEAGISKN

A. thoracatus|AAQ62532.1| -----
 H. forficulatus|AAQ62482.1| -----
 L. morrowi|AAQ62534.1| -----
 P. lyra|AAQ62483.1| -----
 S. marmoratus|ACF75913.1| -----
 B. lenok|ANA74990.1| -----
 H. taimen|AMZ00507.1| -----
 A. baerii|AGF89849.1| -----
 A. tropidus|ALV85597.1| -----
 L. oculatus|XP_006631264.1| GQPREHALLAYTLGVKQLIVGVNKMDSLEPPYSQKRFEIITKEVSAYIKKIGYNPATVAF

A. thoracatus|AAQ62532.1| -----
 forficulatus|AAQ62482.1| -----
 L. morrowi|AAQ62534.1| -----
 P. lyra|AAQ62483.1| -----
 S. marmoratus|ACF75913.1| -----
 B. lenok|ANA74990.1| -----
 H. taimen|AMZ00507.1| -----
 A. baerii|AGF89849.1| -----
 A. tropidus|ALV85597.1| -----
 L. oculatus|XP_006631264.1| VPISGWHGDNMLEPSSNMGWFKGWKVERKEGNASGTTLEALDAILPPSRPTDKPLRLPL

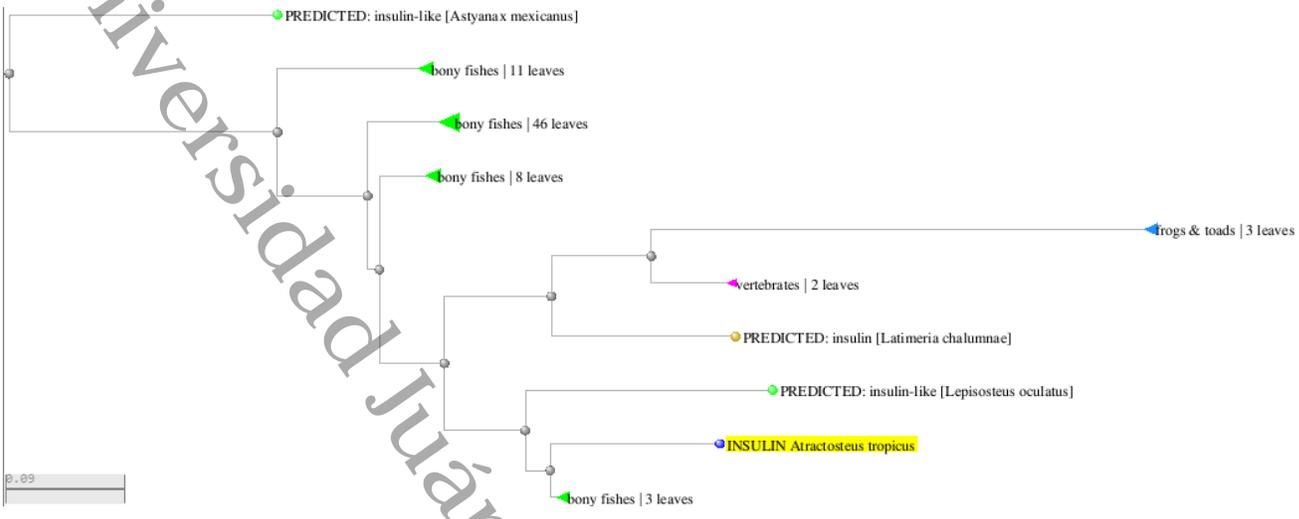
A. thoracatus|AAQ62532.1| -----
 forficulatus|AAQ62482.1| -----
 L. morrowi|AAQ62534.1| -----
 P. lyra|AAQ62483.1| -----
 S. marmoratus|ACF75913.1| -----
 B. lenok|ANA74990.1| -----
 H. taimen|AMZ00507.1| -----
 A. baerii|AGF89849.1| -----
 A. tropidus|ALV85597.1| -----
 L. oculatus|XP_006631264.1| QDVYKIGGIGTVPVGRVETGTLKAGMIVTFAPANVTTEVKSVEMHHELTLEALPGDNVGF

A. thoracatus|AAQ62532.1| -----
 forficulatus|AAQ62482.1| -----
 L. morrowi|AAQ62534.1| -----
 P. lyra|AAQ62483.1| -----
 S. marmoratus|ACF75913.1| -----
 B. lenok|ANA74990.1| -----
 H. taimen|AMZ00507.1| -----
 A. baerii|AGF89849.1| -----
 A. tropidus|ALV85597.1| -----
 L. oculatus|XP_006631264.1| NVKNVSVKDIRRGNVAGDSKNDPPQAEAGSFNAQVILNHPGQISQGYAPVLDCHTAHIAC

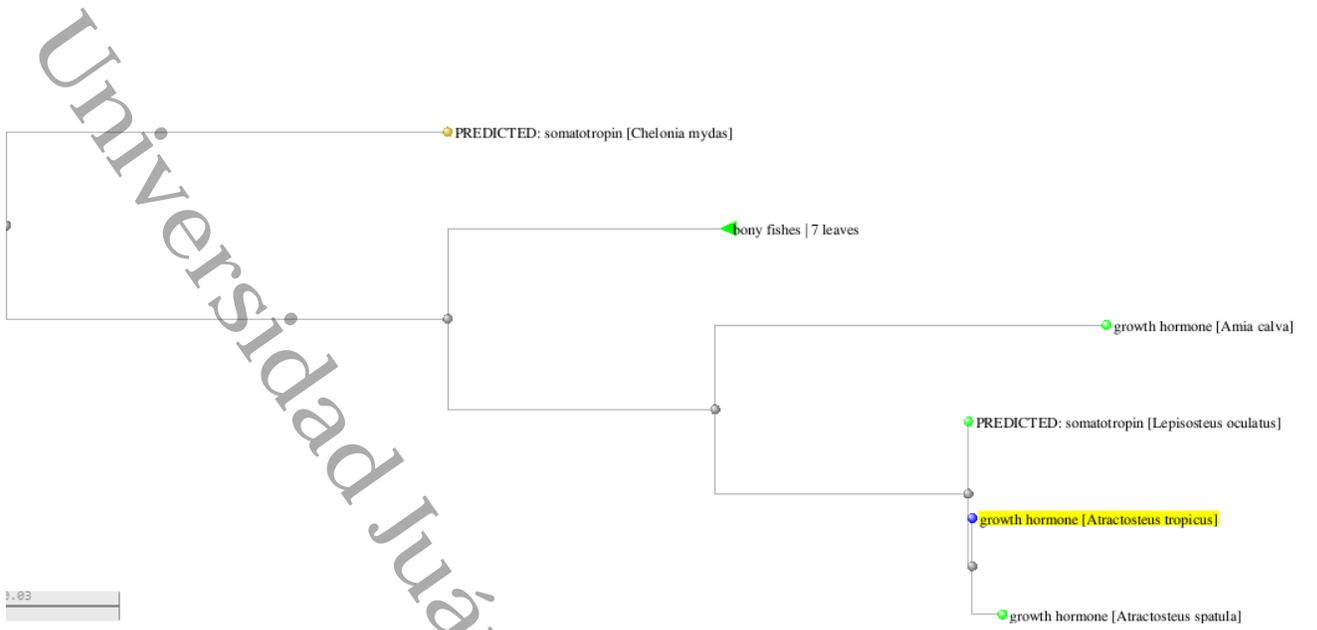
A. thoracatus|AAQ62532.1| -----
 forficulatus|AAQ62482.1| -----
 L. morrowi|AAQ62534.1| -----
 P. lyra|AAQ62483.1| -----
 S. marmoratus|ACF75913.1| -----
 B. lenok|ANA74990.1| -----
 H. taimen|AMZ00507.1| -----
 A. baerii|AGF89849.1| -----
 A. tropidus|ALV85597.1| -----
 L. oculatus|XP_006631264.1| KFSELKEKIDRRSGKKLEDNPKNLKSGDAAIVEMIPGKPMCVESFSFSTYPPPLGRFAVRDMR

A. thoracatus AAQ62532.1	QTVAVGVKSVEKK-----
forficulatus AAQ62482.1	QTVAVGVKSVEKK-----
L. morrowi AAQ62534.1	QTVAVGVKSVEKK-----
P. lyná AAQ62483.1	QTVAVGVKSVEKK-----
S. marmoratus ACF75913.1	-----
B. lenok ANA74990.1	-----
H. taimen AMZ00507.1	-----
A. baerii AGF89849.1	-----
A. tropidus ALV85597.1	-----
L. oculatus XP_006631264.1	QTVAVGVKAVEKKASSGGKVTKSAQKATKAK

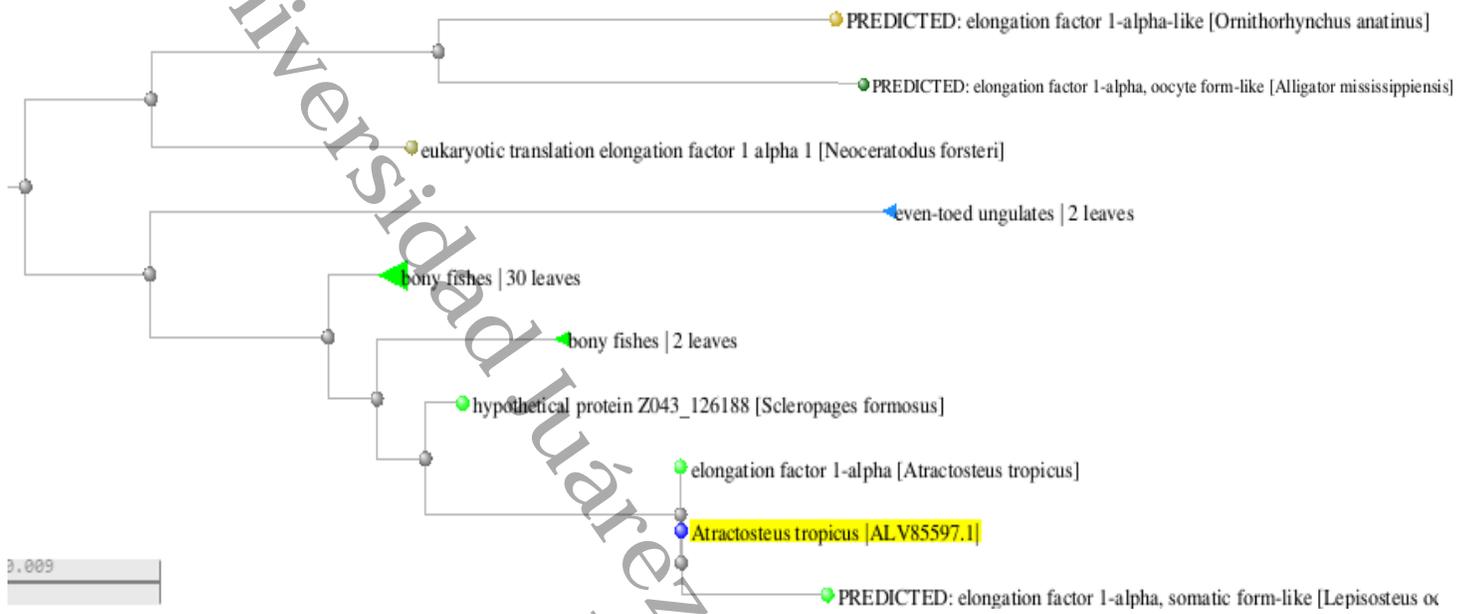
Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.



Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
 México.



Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
 México.



Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.

CAPITULO IV

Efecto de los carbohidratos sobre la fisiología digestiva, expresión molecular de Insulina y hormona del crecimiento (GH) y cambios morfológicos en juveniles de pejelagarto (*Atractosteus tropicus*)

C.A. Frías-Quintana¹, C.A. Álvarez-González^{1*}, D. Tovar-Ramírez², S. Camarillo-Coop¹, R. Martínez-García¹, A. Hernández-Franyutti¹, M. González-Valencia¹.

¹DACBIOL Laboratorio de Acuicultura Tropical, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Carretera Villahermosa-Cárdenas km 0.5, 86139, Villahermosa, Tabasco, México. *autor de correspondencia: alvarez_alfonso@hotmail.com

²CIBNOR, Instituto Politécnico Nacional 195, Playa Palo de Santa Rita Sur, C.P. 23096 La Paz, B.C.S., México

RESUMEN

El desarrollo de la acuicultura en la región sureste de México tiende a incrementarse con el cultivo de especies nativas, y que representan un alto consumo principalmente el pejelagarto (*Atractosteus tropicus*), que es una especie que cuenta con altas expectativas de comercialización ya que se han desarrollado diversos estudios lográndose su cultivo y reproducción en cautiverio. Sin embargo, en cuanto a los aspectos nutricionales existe poca información de los nutrientes que requiere para un adecuado crecimiento y que además minimicen gastos de producción en las dietas. En este estudio se evaluaron dietas usando de base almidón de maíz en juveniles: D1: 0%; D2: 13.3% y D3: 23.6%, utilizando el alimento de trucha Silver Cup® como control, evaluando así el crecimiento, supervivencia, actividades enzimáticas, expresión de hormona del crecimiento (GH) e insulina utilizando el enfoque RTQ-PCR, normalizado con el gen de factor de elongación 1- α (EF1- α) y cambios en la morfología del hígado a través de técnicas de tinción e histología. Los resultados obtenidos muestran un mayor crecimiento con la D3 obteniendo el 100% de supervivencia, en actividades enzimáticas se presentó mayor actividad en proteasa ácida, quimotripsina, carboxipeptidasa A, proteasa alcalina, tripsina y lipasa con la D1, leucina aminopeptidasa y glucosidasa con la D2, mientras el control tuvo mayor actividad la amilasa, al igual que las expresiones de GH e INS, mientras en

las micrografías se observa un mayor número de células fagocitadas con la D1, que implica un daño hepático por parte de la dieta que no cuenta con un porcentaje de almidón, por lo que el efecto observado, muestra que la mayor inclusión de nutrientes (carbohidratos) en el caso de la dieta D3 puede favorecer positivamente en el crecimiento y supervivencia de esta especie.

Palabras clave: Almidón de maíz, Carbohidratos, Expresión génica, Hormona de crecimiento, Insulina, pejelagarto, RT-qPCR.

Introducción

Los conocimientos generados sobre alimentación y nutrición por varias generaciones de investigadores han permitido obtener importantes avances en la domesticación del pejelagarto para establecer su cultivo, sin embargo se requiere abarcar estudios más precisos con respecto a la fisiología digestiva desde el punto de vista nutricional y requerimientos energéticos que permitan maximizar su crecimiento en un menor tiempo promoviendo así su cultivo a una mayor escala y se establezca como una alternativa productiva que garantiza la rentabilidad de su cultivo y la conservación biológica de la especie (Frias-Quintana et al. 2016). Para esto se ha implementado el diseño de alimentos con los requerimientos necesarios para cada etapa de vida de la especie, utilizando fuentes alternativas proteínicas que les aporten los nutrientes necesarios para su crecimiento y supervivencia (Frias-Quintana et al. 2010). A partir de varios estudios en los peces que el mejor uso de la energía de carbohidratos de la dieta depende de la composición de macronutrientes de la dieta. Los peces carnívoros como los salmónidos son alimentados con dietas con niveles relativamente altos de lípidos, ya que se sabe que tienen un mejor efecto de la proteína que los carbohidratos ahorradores en un nivel similar de la ingesta de energía digerible (NRC 2011).

Sin embargo, para regular los niveles de glucosa en la sangre por consecuencia de ingerir carbohidratos, es necesario la intervención de algunas hormonas endocrinas pancreáticas como la insulina (INS) que se encarga de regular los niveles de glucosa en la sangre y el metabolismo subyacente en los vertebrados superiores (Shu y Steiner 2000). En los peces, así como otros vertebrados, la acción primaria de INS es promover un cambio metabólico de catabolismo de los procesos anabólicos. Tal cambio se indica en peces privados de alimentos, donde se ha

demostrado que los niveles de INS en plasma disminuyen en relación con el glucagón (Navarro et al. 2002; Albalat et al. 2005). En general, el tratamiento INS estimula la síntesis de glucógeno, activa la lipogénesis, promueve la síntesis de proteínas, y puede estimular o inhibir la gluconeogénesis, dependiendo de la situación (Planas et al. 2000). La producción y transformación del precursor de INS, la preproinsulina, se llevan a cabo en las células de los islotes pancreáticos en respuesta a cambios en los niveles de glucosa en sangre a través de dos escisiones proteolíticas antes de formar un péptido INS funcional que se libera de los gránulos secretorios en el torrente sanguíneo (Chan y Steiner 2000). El metabolismo de los peces carnívoros, tales como la trucha y el salmón, es diferente de la de los mamíferos en que es muy insensible a niveles elevados de carbohidratos, por lo que intolerancia a altos niveles de glucosa puede deberse a una mala utilización de los carbohidratos digeridos y el proceso de digestión (Kamalalam et al. 2016). En general, se estima que la eficiencia de la utilización estrictamente de carbohidratos se base en la velocidad de suministro de glucosa a partir de la digestión y la eliminación de la glucosa de la sangre en peces, especialmente los carnívoros que tienden a ser los organismos con dietas pobres en carbohidratos (NRC 2011). Por lo que para llevar a cabo un metabolismo eficiente de la glucosa se requiere la presencia de hormonas metabólicas que ayuden al proceso de asimilación y digestión de los carbohidratos en los peces, y esto con mayor atención se refiere al crecimiento donde se ha llevado a cabo investigaciones de transcripciones de genes que codifican GH, IGF-I, IGF-II, y sus receptores, junto con proteínas de unión de IGF (Gabillard et al. 2006; Filby et al. 2007).

La hormona del crecimiento (GH) es el principal regulador de crecimiento somático y el metabolismo de los peces, como en otros vertebrados (Fuentes et al. 2013; Vélez et al. 2015). Además, el enfoque de expresión molecular de esta hormona se ha utilizado en varias especies de peces en aspectos de fisiología en *Ictalurus punctatus* (Small y Peterson 2005) *Sparus aurata* (Jiao et al. 2006); *Oncorhynchus nerka* (Amano et al. 2006), *Protopterus dolloi* y *Huso dauricus* (Fukamachi y Meyer 2007); *Oncorhynchus kisutch* (Kim et al. 2015); osmoregulación en peces teleosteos (Sakamoto y McCormick 2006), influencia del medio ambiente (Reinecke 2010), aspectos toxicológicos en *Oreochromis niloticus* (Shved et al. 2008) y ontogenia en *Monopterus albus* (Chen et al. 2015).

De esta forma, su acción promotora del crecimiento se ejerce indirectamente a través de la inducción de la producción local hepática o IGF-I, pero también directamente a través de la unión a sus propios receptores que se expresan en varios tejidos (Sakamoto y Hirano 1991; Pérez-Sánchez y Pierre-Yves 1999). Dado que el efecto promotor del crecimiento de la GH administrada exógenamente ha sido bien establecido, en las últimas dos décadas, los avances en la tecnología de transferencia genética han permitido la creación de los peces transgénicos GH que presentan un crecimiento mejorado de manera espectacular (Nam et al. 2001). Sin embargo estos estudios se han enfocado solamente a especies marinas, por lo que la posibilidad de implementar estudios sobre aspectos de nutrición y fisiología en peces dulceacuícolas es un campo que aun no ha sido explorado, en especial en especies nativas como *A. tropicus*.

Materiales y métodos

Toma de muestras

Para este estudio se obtuvo un total de 2000 juveniles de *A. tropicus*, obtenidos a partir de un desove inducido de reproductores (1 hembra 3.5 Kg de peso promedio y 3 machos 1.5 Kg de peso promedio) utilizando la hormona LHRHa (35 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de pez⁻¹) los cuales se mantuvieron en tanques circulares de 2000 L (0.6 m de alto por 2 m de diámetro) obtenidos del Laboratorio de Acuicultura Tropical en la División Académica de Ciencias Biológicas de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco (DACBIOL-UJAT). Una vez realizado el desove (16 horas post-inducción), se retiraron los reproductores manteniendo los huevos hasta su eclosión (día 3 post-fertilización, 0 días después de la eclosión, DDE), momento en el cual los eleuteroembriones fueron colocados en tres tanques de plástico circulares de 70 L acoplado a un sistema de recirculación que consta de un reservorio de 1500 L que funciona como sedimentador de sólidos y filtro biológico, además de una bomba centrífuga de $\frac{3}{4}$ HP (Jacuzzi, JWPA5D-230A, Delavan WI, USA), un filtro de arena sílica (STA-RITE, S166T, Delavan WI, USA), y dos termostatos de titanio (PSA, R9CE371, Delavan WI, USA). La calidad del agua del sistema se monitoreó diariamente durante los 90 días del experimento registrando la temperatura (29°C), el oxígeno disuelto (6.43 mg l⁻¹) y el pH (6.7) mediante un oxímetro (YSI 85, Ohio, USA) y un potenciómetro (HANNA HI 991001, Romania, Europa) respectivamente. Los organismos permanecieron en este sistema iniciando la fase de alimentación a los 30 DDE, la cual se realizó cinco veces al día (8:00, 11:00, 13:00, 15:00 y 18:00 h).

El muestreo de juveniles se llevó a cabo a los 90 días posterior al inicio del experimento, recolectando 10 organismos por tratamiento para actividades enzimáticas, donde se disectaron los organismos para separar el estómago e intestino y procesarlos para estudios de bioquímica, 3 organismos por réplica para estudios de histología, los cuales fueron disectados obteniendo el sistema digestivo completo y fueron fijados en solución de formol neutro al 10% y para la parte de biología molecular en la expresión de hormonas se colectaron 5 organismos por réplica, disectando Cerebro, Estómago, Intestino e Hígado para cada tratamiento y fueron almacenados en tubos Eppendorf de 1.5 ul con solución RNAlater® (Ambion USA) y se mantuvo en ultracongelación a -80 °C (Thermo Scientific, Ohio, USA) hasta su posterior procesamiento.

Diseño experimental

En este experimento se evaluó el crecimiento de los juveniles utilizando como dieta control (DC) el alimento comercial para trucha (Silver Cup™), con 51 % de proteína y tres dietas experimentales isoproteicas (15%) e isoenergéticas (40%), modificando el porcentaje de carbohidratos (Almidón de maíz, AM: D1: 0%AM, D2: 13.3%AM, D3: 23.6%AM) para juveniles de pejelagarto (Tabla 1). Las asignaciones de los tratamientos en los tanques fueron de manera aleatoria y por triplicado, sembrando 30 organismos por unidad experimental, las cuales consisten en tinas de plástico de 70 L de capacidad adaptadas a un sistema de recirculación.

Formulaciones y preparación de las dietas experimentales

La formulación se realizó por medio del programa MIXITWIN V. 5.0, diseñando las dietas para sustituir los lípidos al incrementar el porcentaje de carbohidratos. Para la elaboración de las dietas experimentales se siguió el protocolo propuesto por Álvarez-González et al. (2006), los ingredientes se pesaron según las formulaciones como se muestra en la tabla 1, con una balanza analítica con capacidad 2000 g (Ohaus mod. CS2000, China), se mezclaron los macronutrientes en seco durante 15 minutos (min) utilizando una batidora industrial (Bathamex, 178716, México D.F, México). De la misma manera, se pesaron los micronutrientes (premezclas de vitaminas, minerales, vitamina C) y fueron agregados a la mezcla de los macronutrientes, mezclando por otros 15 minutos. Como consiguiente se pesaron los ingredientes líquidos (aceite de pescado y lecitina de soya) se añadieron a la mezcla anterior y se mezclaron por otros 15 minutos, y por último, se agregó el agua (aproximadamente 400 ml por Kg de dieta), realizando el mezclado

final durante otros 15 minutos. La mezcla obtenida se colocó en un molino para carne 1 HP (Torrey, M-22RI, Monterrey, N.L, México) para obtener pellets con una criba de 5 mm y fueron secados a 60°C entre 24 y 30 horas en un horno (Coriat, HC-35-D, D.F, México). Las dietas experimentales fueron refrigeradas a -20°C hasta su posterior utilización.

Evaluación de supervivencia y crecimiento

La duración del experimento fue de 90 días, realizándose biometrías cada 15 días donde se registraron el peso individual y la longitud total de toda la población. Para medir el peso (g) se utilizó una balanza digital (Ohaus A5200, U.S.A.) y la longitud (cm) con un ictiométror. Al final de los experimentos se calculó la supervivencia usando la siguiente formula:

$$S = (N_f/N_i) * 100.$$

Donde Ni= numero inicial de organismos, Nf = número final de organismos

Análisis bioquímicos

Los extractos enzimáticos se obtuvieron por medio de la maceración del estomago e intestino previamente obtenidos de los juveniles disectandose en frio, fueron homogenizados en HCl-Tris 50 mmol l⁻¹, CaCl₂ 20 mmol l⁻¹, pH 8 a una concentración de (30 mg ml⁻¹), por medio de un homogenizador de tejidos y se centrifugaron a 14,000 rpm por 30 min a 4 °C. Se recobró la fracción soluble y se distribuyeron en alícuotas de 1 ml y se almacenaron a -20 °C hasta la realización de los análisis enzimáticos. Para el cálculo de la concentración de proteínas soluble de cada muestra, se utilizó la técnica de Bradford (Bradford, 1976), usando una solución estándar de albúmina bovina (1 mg ml⁻¹).

La actividad de proteasa ácida (pepsina) fue estimada por el método de Anson (1938) usando como sustrato hemoglobina (0.5%) en una solución tampón Glicina-HCl 100 mmol l⁻¹ a pH 2. La proteasa alcalina fue medida con la técnica de Walter (1984) usando como sustrato caseína al 0.5 % en tampón Tris-HCl 50 mmol l⁻¹, CaCl₂ 10 mmol l⁻¹ a pH 9. Las mezclas fueron incubadas a 37 °C durante 30 minutos, la reacción se detuvo por adición de 0.5 ml de ácido tricloroacético (TCA 20 %), se centrifugó a 16,000 g durante 15 minutos y la absorbancia de los productos de reacción fue medida a 280 nm. La unidad de actividad enzimática fue definida

como 1 μg de tirosina liberada por minuto, esto con base en el coeficiente de extinción molar (0.005).

La actividad de tripsina se realizó por el método de Erlanger et al., (1961) incubando la muestra con el sustrato BAPNA (N α -Benzoil-DL-Arginina-P-nitroAnilida) a 37 °C, disuelta en el tampón Tris-HCl 50 mmol l⁻¹, CaCl₂ 10 mmol l⁻¹ a pH 8.2, y fue medida a 410 nm. La actividad quimotripsina fue determinada por el método de DelMar et al. (1979) a 37 °C con SAAPNA (N- α -benzoil-DL-arginine p-nitroanilide) como sustrato disuelta en dimethyl sulfóxido (DMSO 5 mmol l⁻¹) y tampón Tris-HCl 100 mmol l⁻¹, CaCl₂ 100 mmol l⁻¹ a pH 7.8 y una absorbancia de 405 nm, La actividad leucina aminopeptidasa fue determinada por el método de Maraux et al., (1973) utilizando como sustrato leucina p-nitroanilida (0.1 mmol l⁻¹) en DMSO usando tampón fosfato sódico 50 mmol l⁻¹ a pH 7.2 a 37 °C, medida a 410 nm. La actividad Carboxipeptidasa A fue determinada a 25 °C usando como sustrato Hyppuryl-L-phenyl-alanine (25 mmol l⁻¹) en una solución tampón de Tris-HCl 5 mmol l⁻¹, NaCl 500 mmol l⁻¹, a pH 7.5 y medido a 254 nm (Folk y Schirmer 1963). Las reacciones de estas técnicas fueron detenidas con ácido acético al 30%; siendo definida la actividad enzimática como 1 μmol de nitroanilida liberada por minuto, usando como coeficiente de extinción molar de tripsina (8.8), de quimotripsina y leucina aminopeptidasa (8.2).

La actividad α -amilasa se realizó usando como sustrato almidón al 2% en el tampón citrato-fosfato 100 mmol l⁻¹, NaCl 50 mmol l⁻¹, pH 7.5 con una incubación de 30 min., se midió los azúcares reductores a 600 nm, definiendo una unidad como la cantidad de enzima que libera 1 μg de maltosa por minuto (Robyt y Whelan 1968). La actividad lipasa fue determinada con la técnica de Versaw et al. (1989), usando como sustrato β -naftil caprilato (200 mmol l⁻¹) disuelto en una solución tampón Tris-HCl 50 mmol l⁻¹ a pH 7.2 con una solución de tauracolato de sodio (100 mmol l⁻¹), donde se incubó el extracto enzimático y el sustrato por 30 min y deteniendo la reacción con TCA 0.72N, adicionando una solución de Fast blue (100 mmol l⁻¹), y clarificando la reacción con una mezcla de etanol: acetato de etilo (1:1 v/v), leyendo la absorbancia a 540 nm. La actividad lipolítica fue definida como 1 μg de naftol liberado por minuto. La actividad de α -glucosidasa fue determinada con la técnica de Dahlqvist (1960a), usando como sustrato α -p-nitrofenol glucosido (10 mM) disuelto en una solución buffer (fosfato de potasio 67 mM pH

6.8), para lo cual se realizó una incubación de 60 min del extracto enzimático en el sustrato y deteniendo la reacción con carbonato de potasio (100 mmol l⁻¹) y la absorbancia fue medida a 420 nm, utilizando una curva de calibración estándar para p-nitrofenol α -glucosido (Sigma). La actividad de α -glucosidasa se expresó como una unidad de enzima que libera 1 μ mol de D-glucosa del p-nitrofenil α -D-glucosido por minuto.

Todos los ensayos se realizaron por triplicado. Para el cálculo de la actividad específica e individual de los extractos se determinó utilizando las siguientes ecuaciones: 1) Unidades. ml⁻¹ = $[\Delta\text{abs} \times \text{volumen final de reacción (ml)}] \cdot [\text{CEM} \times \text{tiempo (min)} \times \text{volumen del extracto (ml)}]^{-1}$; 2) Unidades mg de proteína⁻¹ = $[\text{Unidades por ml}] \cdot [\text{mg de proteína soluble}]^{-1}$. Donde: Δabs es el incremento de absorbancia a una determinada longitud de onda, CEM es el coeficiente de extinción molar para el producto de reacción (ml $\mu\text{g}^{-1} \text{cm}^{-1}$).

Diseño de oligos

El diseño de oligonucleótidos se realizó utilizando el software Primer acceso libre 3 Plus (http://primer3plus.com/web_3.0.0/primer3web_input.htm) de una región específica de la secuencia de hormona de crecimiento (GH), insulina y EF1 obtenida de la especie *Lepisosteus oculatus* cuya secuencia de genes fueron obtenidas a partir de la base de datos GenBank (REF GH: [XP_006638350.1](#); INS: [XM_006631713.2](#)). Los oligos fueron diseñados con las siguientes características: de 20 a 22 nucleótidos de largo, una temperatura de alineamiento de 50 a 60 ° C, CG (guanina-citosina) contenido de 40 y 60% y, finalmente, la formación de estructura secundaria se evaluó utilizando el software Oligo Calculator versión 3.27 de acceso libre (<http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>) (Tabla 2).

Extracción de ARN y síntesis de ADNc mediante RT-PCR en juveniles de A. tropicus

La extracción total de ARN se realizó mediante el uso de un homogeneizado de órganos de juveniles: Cerebro, Estomago, Intestino e Hígado. El proceso se llevó a cabo con un kit comercial de extracción de ARN PurelinkTM RNA Mini Kit (Ambion CA US), finalmente, la muestra se resuspendió en agua libre de ARNasas. La concentración de ARN extraído y purificado se comprobó con el espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Ohio USA) utilizando 1 μ l por muestra. La síntesis de ADNc se realizó utilizando el kit iScriptTM

Reverse Transcription Supermix for RT-qPCR (Bio-Rad, USA) de acuerdo con las indicaciones establecidas por el fabricante utilizando 1 ug de ARN total, utilizando el iCycler TERMOCICLADOR (Bio-Rad, Berkeley, CA, EE.UU.).

Análisis por qPCR

Para la cuantificación de la expresión de hormonas en larvas de *A. tropicus*, se construyó una curva estándar para observar el rango dinámico de detección de cebadores y verificar la eficacia de la amplificación y elegir una dilución a la que deben cuantificarse las muestras teniendo en cuenta que el 100% de la eficiencia corresponde a una pendiente -3.32. Una vez que la dilución se fijó, se procedió a cuantificar el nivel de expresión de las enzimas digestivas a lo largo de la ontogenia usando el SsoAdvanced™ SYBR Green Supermix (BioRad, CA USA), teniendo como referencia el factor de elongación (EF1- α) de genes para normalizar los valores de Ct obtenidos a partir de la diferentes genes analizados de acuerdo con los algoritmos en el software CFX-Manager (BioRad).

Análisis estadístico

Para la evaluación del crecimiento en peso y longitud, los datos obtenidos del experimento se sometieron a pruebas de normalidad (K-S) y homocedasticidad (Levene), y se aplicó un análisis de varianza de una vía (ANOVA), para detectar las diferencias entre los tratamientos se utilizó la prueba posteriori de Tukey. Los datos de supervivencia, actividad enzimática y expresión molecular se analizaron por medio de una prueba de Kruskal-Wallis y pruebas a posteriori de Nemenyi. Todas las pruebas se realizaron utilizando un valor de significancia de 0.05. Asimismo, para realizar los estadísticos se utilizó el programa estadístico STATISTICA v. 7.0.

Resultados

Evaluación de crecimiento y supervivencia.

Los resultados obtenidos en relación al crecimiento de los juveniles de *A. tropicus* en los diferentes tratamientos mostraron diferencias significativas ($P < 0.05$) entre todos los tratamientos, donde los organismos alimentados con la dieta D3 tuvieron el mayor peso promedio de 25.37 ± 7.4 g y una talla de 188.6 ± 15.2 mm, seguidos por los ejemplares que

consumieron la dieta D2 con 16.53 ± 3.7 g, y 171.30 ± 11.8 mm, después la dieta Control (alimento comercial para trucha Silver Cup™) con 11.34 ± 2.9 g, y 152.14 ± 12.8 mm, siendo la dieta D1 la que obtuvo el menor crecimiento con 7.28 ± 2.1 g y una talla de 134.95 ± 13.7 mm (Fig. 1a y b).

Por otra parte, al final del experimento se analizó la supervivencia donde se detectaron diferencias significativas ($P < 0.05$) obteniendo la mayor supervivencia los organismos alimentados con la dieta D3 con un 100%, seguida de la D2 con un 96.7%, la dieta Control con 92.2% y finalmente la dieta D1 con 87.8%. Cabe mencionar que de los tratamientos con mayor inclusión de almidón de maíz tuvieron nulo o mínimo porcentaje de mortalidad ($< 5\%$) (Fig. 2).

Actividades enzimáticas

La actividad específica de proteasas alcalinas mostró diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los tratamientos, con la actividad proteolítica más alta para las larvas que consumieron la dieta D1, seguida de las que se alimentaron con la dieta D2, la dieta D3, siendo la dieta Control la que obtuvo menor actividad enzimática digestiva. Por otra parte, la actividad enzimática de las proteasa ácidas (pepsina) fue estadísticamente mayor ($P < 0.05$) para las larvas alimentadas con la dieta D3, seguidas de la que consumieron la D2 y la dieta Control, siendo los organismos alimentados con la dieta D1 las que obtuvieron la menor actividad enzimática (Fig. 3).

La actividad tripsina mostró diferencias significativas entre todos los tratamientos ($P < 0.05$) donde los organismos alimentados con la dieta D1 tuvieron la mayor actividad, mientras que las alimentadas con las dietas D2 y Control no mostraron diferencias significativas entre ellas, mientras que la dieta D3 registró una menor actividad trípica (Fig. 4a). La actividad específica de quimotripsina registró una mayor actividad con la dieta D3, sin embargo el todos los tratamientos no presentaron diferencias significativas ($P > 0.05$) (Fig. 4b). La actividad específica de leucina-aminopeptidasa mostró una mayor actividad para las larvas alimentadas con la dieta D2, seguida por la dieta D3 y las dietas D1 y control no mostraron diferencias entre ellas (Fig. 4c). Finalmente, la actividad carboxipeptidasa A, también mostró diferencias estadísticas entre todos los tratamientos ($P < 0.05$) donde se presentó la mayor actividad para las

larvas alimentadas con la dieta Control, seguidas de las dietas D3 y D1, siendo la dieta D2 presentó la menor actividad enzimática (Fig. 4d).

En cuanto a la actividad específica de la α -amilasa se detectó la mayor actividad enzimática ($P < 0.05$) en los organismos alimentados con la dieta Control, seguidas de las que consumieron las dietas D1, D3, y D2, las cuales fueron estadísticamente iguales entre ellas (Fig. 5a). En cuanto a la actividad enzimática tipo α -Glucosidasa, se observó una máxima actividad para los juveniles que consumieron la dieta D2, siendo estadísticamente diferente al resto de los tratamientos ($P < 0.05$), siendo la dieta D1 la cual presentó la menor actividad enzimática (Fig. 5b). Finalmente la actividad enzimática de lipasa se mostró una mayor actividad enzimática para el tratamiento D1, seguida por el tratamiento Control y la dieta D3, siendo la Dieta D2 la que presentó menor actividad enzimática (Fig. 5c).

La expresión de genes de insulina y GH en juveniles de A. tropicus

Para confirmar la especificidad de los oligos a través de la RT-qPCR, se realizó un análisis de picos de fusión, utilizando para ello el software CFX (BioRad). Después de este análisis, se determinó la cuantificación relativa de la insulina y la hormona del crecimiento (GH) utilizando EF1 como gen de referencia y se observó lo siguiente: La expresión de INS y GH fue mayor en la dieta control, mientras que en los otros tratamientos la expresión fue muy baja para ambos genes, donde no se presentaron diferencias significativas ($P < 0.05$) (Fig. 6).

Discusión

En este estudio los resultados de crecimiento obtenidos muestran que los peces alimentados con la dieta con mayor porcentaje de inclusión de almidón de maíz obtuvieron el mayor crecimiento expresado en longitud y peso, presentando también una supervivencia del 98%; estos resultados coinciden con los obtenidos por Frias-Quintana et al. (2016) donde al evaluar dietas con diferentes inclusiones de carbohidratos obtuvieron un mayor crecimiento en larvas de *A. tropicus*. Así mismo este efecto se ha observado en otras especies donde el objeto de estudio se basa en la capacidad funcional de las especies de peces cultivables para utilizar los carbohidratos nutritivos como fuente de energía alimentaria para mejorar el rendimiento de la producción

(Hemre et al. 2002; Stone 2003; Krogdahl et al. 2005; Enes et al. 2009; 2011a; NRC 2011; Panserat et al. 2013; Polakof et al. 2012; Polakof y Panserat 2015).

Estos estudios han sido orientados hacia la acuicultura, basándose en diferentes aspectos o factores relacionados con el uso de carbohidratos digeribles en peces. Sin embargo, un mal balance de los nutrientes presentes en las dietas puede desencadenar un efecto negativo en el crecimiento y supervivencia de los peces, tal es el caso de Panserat et al. (2002b) quienes determinaron que al aumentar los niveles de lípidos en las dietas aumentaba la expresión y actividad de la glucosa-6-fosfatasa, una enzima clave involucrada en la producción de glucosa endógena, resultando en un efecto glucémico postprandial en *Oncorhynchus mykiss*. Lo anterior llevó a los autores a concluir que la mala utilización de los carbohidratos de la dieta en la trucha arco iris puede estar relacionada al aumento de la producción hepática de glucosa en condiciones de alto consumo de grasas en la dieta, ya que los carbohidratos de la dieta no regulan la gluconeogénesis hepática en la trucha arco iris (Figueiredo-Silva et al. 2012).

Por otra parte, la inclusión óptima de carbohidratos en la dieta de los peces de cultivo puede aumentar la retención de proteínas y lípidos mediante la prevención del catabolismo de estos nutrientes para las necesidades de energía (efecto de ahorro); reducir la carga de nitrógeno en el desempeño agrícola; proporcionar metabolitos para la síntesis biológicas; las formulaciones de alimentos de soporte que mantienen el crecimiento a un costo más bajo por unidad de ganancia; ayudar a sedimentar de unión, la estabilidad y la flotabilidad; y facilitar la eliminación de las heces a través de sus propiedades de unión (Hemre et al. 2002; Stone 2003; Hardy 2010; Honorato et al. 2010).

Además de las características de la fuente, el nivel de inclusión en la dieta es un criterio principal específico de la especie que determina las posibilidades de utilización de carbohidratos, incluso se ha observado en los peces carnívoros, existe correlaciones positivas entre la tasa metabólica y el nivel de carbohidratos de la dieta, posiblemente como un mecanismo de adaptación para oxidar el exceso de carbohidratos (Fu y Xie 2004). El cambio más común asociado con el aumento de los niveles de almidón en la dieta es la acumulación de glucógeno en el hígado, incluso hay límites tolerables de inclusión que causa disminución de la

digestibilidad del almidón, utilización del alimento y el crecimiento de los peces (Krogdahl et al. 2005; Enes et al. 2011a).

La reducción en la digestibilidad puede deberse al sobrecargar el sustrato y la posterior saturación de carbohidrasas digestivas o una disminución en el tiempo del tránsito intestinal (NRC 2011), mientras que el retraso en el crecimiento puede explicarse por hiperglucemia severa, disfunción hepática (hepatomegalia) y los cambios relacionados en el metabolismo intermediario (Amoah et al. 2008). También se ha observado cambios epigenéticos por exceso de carbohidratos en la trucha arco iris, es decir, una hipometilación del ADN genómico (Craig y Moon 2013). En general, el límite umbral que asegura la ausencia de trastornos fisiológicos se considera como el nivel óptimo de inclusión. Con base en estudios en diferentes especies de peces, los niveles máximos de inclusión de carbohidratos recomendado en las dietas es de 15-25% para los salmónidos y peces marinos, y puede ir hasta el 50% para las especies de herbívoras y omnívoras (NRC 2011).

Por otra parte, es importante tener en cuenta que la capacidad de los peces de cultivo a utilizar carbohidratos de la dieta como fuente de energía es generalmente menor que en mamíferos terrestres y sigue siendo un tema extenso y controvertido por la diversidad extrema en los hábitos de alimentación, características anatómicas, fisiológicas y hábitats agrícolas (Polakof et al, 2012).

En cuanto a un mal empleo de los carbohidratos en los peces carnívoros es que, se han adaptado evolutivamente su anatomía, fisiología y el metabolismo de acuerdo con su dieta natural que contiene sustancialmente menos o ninguna porción de carbohidratos con almidón (NRC 2011). En consecuencia, después de un alimento rico en carbohidratos, los organismos no son capaces de limpiar la afluencia de glucosa de manera eficiente, dando como resultado un alto y prolongado nivel de glucosa en la sangre (Stone 2003; Polakof et al. 2012). Idéntica o incluso más severo la respuesta glucémica que se puede observar con pruebas orales intra-peritoneales de tolerancia a la glucosa (GTT), y de ahí el término clínico “intolerantes a la glucosa”, que se refiere a la incapacidad de un organismo para hacer frente rápidamente con una carga de glucosa, se aplica comúnmente para la mayoría de los peces carnívoros.

En cuanto a las actividades enzimáticas se observó un efecto una mayor actividad de tipo pepsina con la dieta con mayor inclusión de carbohidratos, esto podría deberse a que los enlaces presentes en la estructura del almidón podría haber requerido una mayor actividad de la enzima pepsina, la cual promueve al aumento de la producción de ácido clorhídrico en el estómago contribuyendo con la ruptura del almidón a través de los enlaces β -Glucosídicos liberando glucosa, la cual será metabolizada en el hígado a través de la glucogénesis para producir energía (Jen et al. 2010).

Es así que los resultados obtenidos en este estudio muestran que en los juveniles de pejelagarto alimentadas con la dieta que contiene 100% de almidón de maíz (usando una proporción del 23% en la fórmula) propicia una mayor digestión ácida en el estómago, lo que a su vez mejora la hidrólisis de proteínas y carbohidratos, mientras que en la parte intestinal se termina la hidrólisis de los oligosacáridos a sus monómeros estructurales (glucosa) para ser absorbidos a través de los enterocitos (Zambonino-Infante y Cahu 2001; Frías-Quintana et al. 2010), como ha sido reportado en *Symphysodon aequifasciata* (Chong et al. 2002); atún aleta azul *Tunnus thynnus* (Essed et al. 2002) y *Atractosteus tristoechus* (Comabella et al. 2006).

En el caso de las proteasas alcalinas, se muestra variaciones en las actividades enzimáticas siendo la dieta sin almidón (D1) y la dieta con 13% de almidón, las que presentaron las mayores actividades enzimáticas, esto se podría deber a que la acción de la pepsina en el estómago promovió la ruptura de los enlaces de hidrogeno de las estructuras de los glúcidos a través del proceso anabólico que permitió la formación de moléculas mas sencillas como la glucosa que se encarga de proporcionar energía al organismo, por lo que al llevar a cabo la mayor proporción de la digestión en el estómago, estas enzimas promovieron su actividad en estos dos tratamientos.

Sin embargo este patrón fue similar en las actividades de las endoproteasas alcalinas como tripsina y quimotripsina, así como de las exopeptidasas como leucina aminopeptidasa y carboxipeptidasa A, las cuales están presentes desde la eclosión (antes de la absorción del vitelo) y durante todo su desarrollo, lo cual también se ha reportado para especies como el pez

espinoso, *Anoplarchus purpureus* y la lucioperca *Sander lucioperca* (Chan et al. 2004; Hamza et al. 2007). Así mismo, la actividad enzimática de la leucina aminopeptidasa ha sido utilizada como otro indicador de la calidad nutricional al disminuir su actividad o incrementarse, lo que indica la maduración de las microvellosidades de los enterocitos como ha sido detectada en larvas de lubina Europea (*Dicentrarchus labrax*); tilapia (*Oreochromis niloticus*); castarrica *Cichlasoma urophthalmus* (López-Ramírez et al., 2011) y tenhuayaca *Petenia splendida* (Uscanga et al. 2011), donde el incremento de estas actividades se han correlacionado con la maduración de los enterocitos, pero que su actividad varía en relación a la dieta proporcionada (Hakim et al., 2007).

Caso similar presenta la actividad específica de la lipasa, la cual fue mayor con la dieta de nula proporción de almidón de maíz (D1), caso contrario al obtenido por Frias-Quintana et al., 2016, que al evaluar actividades enzimáticas en larvas de pejelagarto, se observó una mayor actividad enzimática en dietas con mayor cantidad de almidón.

Esto sugiere que el metabolismo de las larvas es diferente en etapa juvenil utilizando el mismo nutriente en las dietas, ya que en teoría en la etapa juvenil, el organismo ya tiene desarrollado todo su sistema digestivo por lo que cuenta con las enzimas específicas para cada sustrato que promueve una mayor absorción de nutrientes, que en el caso del almidón es utilizable para acelerar su desarrollo y obtener energía al absorber los productos de hidrólisis para ser utilizados en los diversos procesos metabólicos como lo reportan para la perca, *Perca fluviatilis* (Cuvier-Péres y Kestemont 2002), *Melanogrammus aeglefinus* (Pérez-Casanova et al., 2004), *Epinephelus coloides* (Eusebio et al., 2004), *Labeo rohita* (Chakrabarti et al., 2006), *A. trisostichus* (Comabella et al., 2006), *Paralichthys californicus* (Álvarez-González et al., 2006); *Sander lucioperca* (Hamza et al., 2007) y *Palabrax maculatofasciatus* (Álvarez-González et al., 2008a), y que a su vez se relacionan con los cambios morfofisiológicos durante el desarrollo y los hábitos de alimentación (Civera-Cerecedo et al., 2004).

Adicionalmente, se han realizado estudios en *A. tropicus* reportados por Frías-Quintana et al. (2010) y Guerrero-Zarate et al. (2013), quienes determinaron las actividades enzimáticas proteolíticas, amilásicas y lipídicas en juveniles de pejelagarto, quienes argumentan que esta

especie tiene una alta capacidad digestiva a lo largo de su desarrollo como juvenil y adulto. Adicionalmente Cahu et al. (2004), mencionan que la detección de la amilasa indica no solo la maduración de los enterocitos, sino también la posibilidad de incluir cierta cantidad de carbohidratos que completen el aporte energético durante la alimentación, aunque para peces carnívoros esta capacidad es limitada. En cuanto a las enzima α -glucosidasa se presentaron variaciones en las actividades enzimáticas de los tratamientos, la alfa glucosidasa ácida, también conocida como α -1,4-glucosidasa, es una enzima codificada por el gen GAA esencial para el catabolismo de glucógeno a glucosa en los lisosomas, este proceso de degradación evita la sobreacumulación de glucógeno en diferentes células del organismo (Roach 2004).

El buen crecimiento y ahorro de proteínas están relacionados con el hecho de que la glucosa digerida a partir del almidón es el sustrato oxidativo preferido para el tejido nervioso y células de la sangre, el carbohidrato presente en las dieta de los peces pueden deprimir la actividad de la gluconeogénesis, desviando así los aminoácidos lejos de vías oxidativas (Sánchez-Muros et al. 1996); de esta forma, los niveles de la glucosa se deben mantener constantes para permitir un metabolismo adecuado, en este equilibrio intervienen la secreción de insulina, el glucagón, las hormonas de crecimiento y de IGF (factor de crecimiento de insulina) (Hemre et al. 2002). El glucógeno almacenado se utiliza de manera eficiente durante los períodos de privación de alimentos, haciendo uso para la síntesis de pentosas, apoyando así la síntesis de ácidos nucleicos necesarios para fenómenos de crecimiento generales (Hemre et al. 2002).

Con respecto a la evaluación de genes involucrados en el metabolismo de los carbohidratos como la insulina y el crecimiento como la hormona del crecimiento, se evaluaron estos genes en cada uno de los tratamientos para determinar si existía algún efecto en la inclusión de las dietas con respecto a la expresión de cada uno de ellos. En nuestros resultados se observó una mayor expresión de insulina en el hígado del tratamiento control a excepción de los demás tratamientos con inclusión de carbohidratos donde la expresión fue mínima. Esto podría deberse a que la dieta control de Silver Cup® cuenta con un porcentaje de carbohidratos mínimo o nulo y un mayor porcentaje de proteínas de origen animal, lo que atribuye a una sobreexpresión de estas hormonas para compensar la secreción de enzimas que se encargan de degradar los nutrientes,

en este caso los oligosacáridos, para transformarlos en glucosa y destinarse para la obtención de energía o el incremento del crecimiento somático del organismo.

La glucosa al metabolizarse en el hígado, los niveles de insulina son altos debido a que no es utilizada para transportar la glucosa y llevar a cabo la glucólisis para la obtención de energía, por lo que los organismos obtienen su energía a partir de los aminoácidos procedentes de las proteínas presentes en la dieta (Wang et al. 2016).

La posibilidad de utilizar carbohidratos en peces con la presencia de las principales enzimas que intervienen en la digestión del almidón, así como las de metabolismo de la glucosa (Enes et al. 2009; Krogdahl et al. 2005); la presencia de transportadores de glucosa (Planas et al. 2000; Teerijoki et al. 2000; Krasnov et al. 2001), la glucoquinasa inducible y otros componentes de detección de glucosa (Panserat et al. 2000c) y tejidos periféricos (Polakof y Panserat 2015); el uso de glucosa como sustrato de carbono para los mismos fines que en otros animales, es decir, la generación de ATP a través de vías oxidativas y ribosa 5-fosfato / producción de NADPH a través de la vía fosfato pentosa (NRC 2011) y la capacidad de la glucosa para estimular la secreción de insulina (Caruso y Sheridan 2011).

Recientemente Del Sol Novoa et al. (2004), examinaron los efectos de los altos niveles de carbohidratos en el plasma de INS en la trucha arco iris y llegó a la conclusión de que la glucosa no es el principal secretador de INS en esta especie. Una serie de otros factores, entre ellos somatostatinas, puede afectar a la producción y la sensibilidad del INS (Navarro et al. 2002; Sheridan y Kittilson 2004).

Por otro lado la expresión de la hormona del crecimiento en hígado fue mayor también en el tratamiento control, esto puede deberse a que posiblemente las dietas con carbohidratos promueve una mayor secreción de hormona del crecimiento que promueve un crecimiento somático mayor por lo que es utilizada en un mayor porcentaje para estimular el crecimiento de los organismos, al almacenar reservas energéticas en las células lipídicas y utilizar la energía obtenida a partir del metabolismo de la glucosa. Aunque el efecto promotor del crecimiento de la GH está bien documentado, el crecimiento de los peces es multifactorial y GH podrá actuar a

diferentes niveles (Mommsen 2001). La hormona del crecimiento (GH) es el principal regulador de crecimiento somático y el metabolismo de los peces, como en otros vertebrados (Fuentes et al. 2013; Vélez et al. 2015).

En los peces, se está dando un enfoque particular a la determinación del transcriptoma, buscando las relaciones que guardan los genes que codifican GH, IGF-I, IGF-II, y sus receptores, junto con proteínas de unión de IGF (Gabillard et al. 2006; Filby et al. 2007). Además, el enfoque de expresión molecular de esta hormona se ha utilizado en varias especies de peces en aspectos de fisiología como en *Ictalurus punctatus* (Small y Peterson 2005), *Sparus aurata* (Jiao et al. 2006), *Oncorhynchus nerka* (Amano et al. 2006), *Protopterus dolloi* y *Huso dauricus* (Fukamachi y Meyer 2007), *Oncorhynchus kisutch* (Kim et al. 2015); particularmente en el caso de la osmoregulación (Sakamoto y McCormick 2006), la influencia del medio ambiente (Reinecke 2010), los aspectos toxicológicos en *Oreochromis niloticus* (Shved et al. 2008) y la ontogenia temprana en *Monopterus albus* (Chen et al. 2015) que contribuyen en el conocimiento para la producción y el rendimiento para mejorar rasgos tales como el crecimiento, resistencia a enfermedades, desarrollo, así como factores ambientales y nutricionales.

Cabe mencionar que en el aspecto morfológico a través de estudios de histología realizados en el hígado de estos organismos se mostró un daño en las células del hígado (hepatocitos) al observarse células fagocitadas en la dieta D1 y control (alimento de trucha), esto principalmente a que estas dietas no poseen carbohidratos digeribles incluidos por lo que se puede observar un daño hepático a largo plazo que puede influir en el crecimiento e incluso supervivencia de la especie, por lo que es recomendable incluir carbohidratos en las dietas de peces carnívoros como el pejelagarto, que pueda promover un mayor crecimiento y supervivencia en cualquier etapa de desarrollo (Frias-quintana et al. 2016).

Agradecimientos

El autor agradece al CONACYT y al Programa Institucional de Superación Académica de la UJAT por las becas otorgadas durante el desarrollo de esta tesis. Así como al laboratorio de

Bioquímica CICART, y al Laboratorio de Histología del Centro de excelencia en Acuicultura, UJAT por el apoyo técnico para la realización de este estudio.

Referencias

- Albalat A., Gómez-Requeni P, Rojas P, Médale F, Kaushik S, Vianen G, Van den G, Gutiérrez J, Pérez-Sánchez J, Navarro I (2005) Nutritional and hormonal control of lipolysis in isolated gilthead seabream (*Sparus aurata*) adipocytes. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* Vol. 289 no. 1, R259-R265 DOI: 10.1152/ajpregu.00574.2004.
- Alvarez-González CA, Cervantes-Trujano M, Tovar-Ramírez D, Conklin D, Nolasco H, Gisbert E, Piedahita R (2006) Development of digestive enzymes in California halibut *Paralichthys californicus* larvae. *Fish Physiol Biochem* 31:83–93.
- Alvarez-González CA, Moyano-López FJ, Civera-Cerecedo R, Carrasco-Chávez V, Ortiz-Galindo JL, Dumas S (2008) Development of digestive enzyme activity in larvae of spotted sand bass *Paralabrax maculatofasciatus*. 1. Biochemical analysis. *Fish physiology and biochemistry*, 34(4), 373-384.
- Amano M, Moriyama S, Iigo M, Kitamura S, Amiya N, Yamamori K, Ukena K, Tsutsui K (2006) Novel fish hypothalamic neuropeptides stimulate the release of gonadotrophins and growth hormone from the pituitary of sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*). *Journal of Endocrinology* 188, 417–423.
- Amoah A, Coyle SD, Webster CD, Durborow RM, Bright LA, Tidwell JH (2008) Effects of graded levels of carbohydrate on growth and survival of largemouth bass, *Micropterus salmoides*. *J. World Aquacult. Soc.* 39: 397–405.
- Anson ML (1938) The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin. *J Gen Physiol* 22:79–89.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248–254

- Cahu C, Rønnestad I, Grangier V, Zambonino-Infante J (2004) Expression and activities of pancreatic enzymes in developing sea bass larvae (*Dicentrarchus labrax*) in relation to intact and hydrolyzed dietary protein; involvement of cholecystokinin. *Aquaculture* 238:295–308
- Caruso MA, & Sheridan M (2011) New insights into the signaling system and function of insulin in fish. *General and Comparative Endocrinology* 173: 227–247.
- Civera-Cerecedo R, Álvarez-González CA, Moyano-López FJ (2004) Nutrición y alimentación de larvas de peces marinos. En: Cruz-Suárez, LE, Ricque-Marie D, Nieto-López MG, Villarreal, Scholz U, González M (2004) Avances en nutrición acuícola VII. Memorias del VII Simposium Internacional de nutrición Acuícola, Hermosillo, Sonora, México, 87 pp.
- Comabella Y, Mendoza R, Aguilera C, Carrillo O, Hurtado A, García-Galano T (2006) Digestive enzyme activity during early larval development of the Cuban gar *Atractosteus tristoechus*. *Fish Physiol Biochem* 32:147–157
- Craig PM, Moon TW (2013) Methionine restriction affects the phenotypic and transcriptional response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to carbohydrate enriched diets. *Brit. J. Nutr.* 109, 402–412.
- Cuvier-Pérez A, Kestemont P (2002) Development of some digestive enzymes in Eurasian perch larvae *Perca fluviatilis*. *Fish Physiol Biochem* 24:279–285
- Chakrabarti R, Rathore R, Kumar S (2006) Study of digestive enzyme activities and partial characterization of digestive proteases in a freshwater teleost, *Labeo rohita*, during early ontogeny. *Aquac Nutr* 12:35–43
- Chan AS, Horn M, Dickson K, Gawlicka A (2004) Digestive enzyme activities in carnivores and herbivores: comparisons among four closely related prickleback fishes (Teleostei: Stichaeidae) from a California rocky intertidal habitat. *J Fish Biol* 65:848–858
- Chan S & Steiner D (2000) Insulin Through the Ages: Phylogeny of a Growth Promoting and Metabolic Regulatory Hormone. *Amer. Zool.*, 40:213–222.
- Chen D, Liu J, Chen W, Shi S, Zhang W, Zhang L (2015) Expression and ontogeny of growth hormone (Gh) in the protogynous hermaphroditic ricefield eel (*Monopterus albus*) *Fish Physiology and Biochemistry* Volume 41 (6): 1515-1525.
- Chong AS, Hashim R, Lee L, Ali A (2002) Characterization of protease activity in developing discus (*Symphysodon aequifasciatus*) larvae. *Aquac Res* 33:663–672

- Chong-Carrillo O, Vega-Villanasante F (2003) El camarón: Diccionario decamaronicultura. CIBNOR-Universidad de la Habana, Cuba. pp 56-67.
- Dahlqvist A (1960a) Hog Intestinal α -glucosidases. Dissertation, University of Lund
- Del Mar EG, Largman C, Brodrick J, Geokas M (1979) A sensitive new substrate for chymotrypsin. *Anal Biochem* 99:316–320
- Del Sol-Novoa M., Capilla E., Rojas P., Baró J., Gutiérrez J., Navarro I., (2004) Glucagon and insulin response to dietary carbohydrate in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *General and Comparative Endocrinology Volume 139* (1): 48–54.
- Enes P, Panserat S, Kaushik S, Oliva-Teles A (2009) Nutritional regulation of hepatic glucose metabolism in fish. *Fish Physiol. Biochem.* 35: 519–539.
- Enes P, Panserat S, Kaushik S, Oliva-Teles A, (2011a) Dietary carbohydrate utilization by European sea bass (*Dicentrarchus labrax L.*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata L.*) juveniles. *Rev. Fish. Sci.* 19: 201–215.
- Erlanger FE, Kokoswky N, Cohen W (1961) The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Arch Biochem Biophys* 95:271–278
- Essed Z, Fernández I, Alarcón FJ, Moyano FJ, (2002) Caracterización de la actividad proteasa digestiva de atún rojo *Thunnus thynnus* (Linnaeus, 1758). *Bol. Inst. Esp. Oceanogr.* 18 (1-4):99-107.
- Eusebio PS, Toledo J, Mamauag R, Bernas M (2004) Digestive enzyme activity in developing grouper (*Epinephelus coioides*) larvae. In: Rimmer MA, McBride S, Williams KC (eds) *Advances in grouper aquaculture*. Melbourne, CIAR Monograph Series, pp 35–40.
- Figueiredo-Silva AC, Panserat S, Kaushik S, Geurden I, Polakof S (2012). High levels of dietary fat impair glucose homeostasis in rainbow trout. *Journal of Experimental Biology*, 215(1), 169-178.
- Filby A, Tyler C (2007). Cloning and characterization of cDNAs for hormones and/or receptors of growth hormone, insulin-like growth factor-I, thyroid hormone, and corticosteroid and the gender-, tissue-, and developmental-specific expression of their mRNA transcripts in fathead minnow (*Pimephales promelas*). *General and comparative endocrinology*; 150(1):151-63.
- Folk J, Schirmer E (1963) The porcine pancreatic carboxypeptidase A System. I. Three forms of the active enzyme. *J Biol Chem* 238:38–84.

- Frías-Quintana CA, Álvarez-González CA, Márquez-Couturier G (2010) Diseño de microdietas para el larvicultivo de pejelagarto *Atractosteus tropicus*, Gill 1863. Universidad y Ciencia, vol. 26, núm. 3, ISSN: 0186-2979, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, México. pp. 265-282.
- Frías-Quintana CA, Domínguez-Lorenzo J, Álvarez-González A, Tovar-Ramírez D, Martínez-García R (2016) Using cornstarch in microparticulate diets for larvicultured tropical gar (*Atractosteus tropicus*). Fish Physiology and Biochemistry 41(6): 1-12.
- Fu SJ, Xie XJ (2004) Nutritional homeostasis in carnivorous southern catfish (*Silurus meridionalis*): is there a mechanism for increased energy expenditure during carbohydrate overfeeding? Comp. Biochem. Physiol. Part A: Mol. Integr. Physiol. 139 (3):359–363.
- Fuentes E, Valdés J, Molina A, Björnsson B (2013) Regulation of skeletal muscle growth in fish by the growth hormone–Insulin-like growth factor system. General and Comparative Endocrinology. 192: 136-148.
- Fukamachi S, Meyer A (2007) Evolution of Receptors for Growth Hormone and Somatolactin in Fish and Land Vertebrates: Lessons from the Lungfish (*Protopterus dolloi*) and Sturgeon Orthologues (*Huso dauricus*). Journal of Molecular Evolution 65 (4): 359-372.
- Gabillard JC, Kamangar BB, Montserrat N (2006) Coordinated regulation of the GH/IGF system genes during refeeding in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). The Journal of endocrinology; 191(1):15-24.
- Guerrero-Zárate R, Álvarez-González CA, Perales-García N, Olvera-Novoa M, Frías-Quintana C, Martínez-García R, Contreras-Sánchez W (2013) Partial characterization of digestive proteases in Tropical gar *Atractosteus tropicus* juveniles. Fish Physiol Biochem. doi:10.1007/s10695-013- 9902-7
- Hakim Y, Rowland S, Guy J, Mifsud C, Uni Z, Harpaz S (2007) Effects of genetic strain and holding facility on the characteristics of alkaline phosphatase and brush border enzymes in silver perch (*Bidyanus bidyanus*). Aquac Res 38:361–372
- Hamza N, Mhetli M, Kestemont P (2007) Effects of weaning age and diets on ontogeny of digestive activities and structures of pikeperch (*Sander lucioperca*) larvae. Fish Physiol Biochem 33:121–133

- Hardy RW (2010) Utilization of plant proteins in fish diets: effects of global demand and supplies of fishmeal. *Aquac. Res.* 41, 770–776.
- Hemre GI, Mommsen TP, Krogdahl A (2002) Carbohydrates in fish nutrition: effects on growth, glucose metabolism and hepatic enzymes. *Aquacult. Nutr.*, 8: 175–194.
- Honorato CA, Almeida LC, Da Silva Nunes C, Carneiro DJ, Moraes G (2010) Effects of processing on physical characteristics of diets with distinct levels of carbohydrates and lipids: the outcomes on the growth of pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *Aquac. Nutr.* 16 (1), 91–99.
- Jiao B, Huang X, Chan Ch, Zhang L, Wang D, Cheng Ch (2006) The co-existence of two growth hormone receptors in teleost fish and their differential signal transduction, tissue distribution and hormonal regulation of expression in seabream. *Journal of Molecular Endocrinology* 36: 23–40.
- Kamalam BS, Medale F, Panserat S (2016) Utilisation of dietary carbohydrates in farmed fishes: New insights on influencing factors, biological limitations and future strategies. *Aquaculture AQUA-632008*; 25 pp.
- Kim J, Leggatt R, Chan M, Volkoff H, Devlin R (2015) Effects of chronic growth hormone overexpression on appetite-regulating brain gene expression in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Molecular and Cellular Endocrinology Volume 413*: 178–188.
- Krasnov A, Teerijoki H, Mölsä H (2001) Rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) hepatic glucose transporter. *Biochem. Biophys. Acta (BBA) Gene Struct. Expr.* 1520, 174–178.
- Krogdahl Å, Hemre GI, Mommsen T (2005) Carbohydrates in fish nutrition: digestion and absorption in postlarval stages. *Aquac. Nutr.* 11, 103–122.
- Lehninger AL (1994) *Bioquímica*. 2a ed., Ed. Omega
- Li WS, Lin HR, Wong AO (2002) Effects of gonadotropin-releasing hormone on growth hormone secretion and gene expression in common carp pituitary. *Comp. Biochem. Physiol. B* 132, 335–341.
- López-Ramírez G, Cuenca-Soria CA, Álvarez-González CA, Tovar-Ramírez D, Ortiz-Galindo JL, Perales- García N, Márquez-Couturier G, Arias- Rodríguez L, Indy JR, Contreras-Sánchez WM, Gisbert E (2011) Development of digestive enzymes in larvae of Mayan cichlid *Cichlasoma urophthalmus*. *Fish Physiol Biochem* 37:197–208

- Maraux S, Louvard D, Baratti J (1973) The aminopeptidase from hog-intestinal brush border. *Acta Biochim Biophys* 321:282–295.
- Mommsen TP & Plisetskaya EM (2001) Insulin in fishes and agnathans: History, structure and metabolic regulations. *Rev. Aquat. Sci.* 4:225–259.
- Moon TW (2004) Hormones and fish hepatocyte metabolism: “the good, the bad and the ugly!”. *Comp. Biochem. Physiol. Part B: Biochem. Mol. Biol.* 139, 335–345.
- Nam YK, Noh JK, Cho YS, Cho HJ, Cho KN, Kim CG, Kim DS (2001) Dramatically accelerated growth and extraordinary gigantism of transgenic mud loach *Misgurnus mizolepis*. *Transgenic Res.* 10, 353– 362.
- Navarro I, Rojas P, Capilla E, Albalat A, Castillo J, Montserrat N, Codina M, Gutiérrez J (2002) Insights into insulin and glucagon responses in fish. *Fish Physiology and Biochemistry* 27:205–216.
- NRC (2011) Carbohydrates and Fibre, in: *Nutrient Requirements of Fish and Shrimp*. The National Academies Press, Washington DC, pp. 135–162.
- Panserat S, Kaushik S, Médale F (2013) Rainbow trout as a model for nutrition and nutrient metabolism studies. In: Polakof S, Moon TW (Eds.), *Trout: from Physiology to conservation*. Nova Science Publishers, pp. 131–153.
- Panserat S, Médale F, Blin C, Brèque J, Vachot C, Plagnes-Juan E, Gomes E, Krishnamoorthy R, Kaushik S (2000c) Hepatic glucokinase is induced by dietary carbohydrates in rainbow trout, gilthead seabream, and common carp. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 278, R1164–R1170.
- Pedersen B & Eggum B (1983) Prediction of protein digestibility by an in vitro enzymatic pH-Stat procedure. *Journal Animal Physiology.* 49: 265-277.
- Pérez-Casanova JC, Murray H, Gallant J, Ross N, Douglas S, Johnson S (2006) Development of the digestive capacity in larvae of haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) and Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Aquaculture* 251:377–401.
- Pérez-Sánchez J & Pierre-Yves L (1999) Growth hormone axis as marker of nutritional status and growth performance in fish. *Aquaculture* 177:117–128.
- Planas JV, Capilla E, Gutiérrez J (2000) Molecular identification of a glucose transporter from fish muscle. *FEBS Lett.* 481, 266–270.

- Polakof S, Panserat S (2015) How Tom Moon's research highlighted the question of glucose tolerance in carnivorous fish. *Comp. Biochem. Physiol. Part B: Biochem. Mol. Biol.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpb.2015.11.001>.
- Polakof S, Panserat S, Soengas JL, Moon TW (2012) Glucose metabolism in fish: a review. *J. Comp. Physiol. B.* 182, 1015–1045.
- Reinecke M (2010) Influences of the environment on the endocrine and paracrine fish growth hormone–insulin-like growth factor-I system. *Journal of Fish Biology* 76: 1233–1254.
- Riley LG, Hirano T, Grau EG (2003) Effects of transfer from seawater to fresh water on the growth hormone/insulin-like growth factor-I axis and prolactin in the tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Comp. Biochem. Physiol., B* 136, 647– 655.
- Roach PJ (2004) Glycogen metabolism. In *Encyclopedia of Biological Chemistry* (Vol. 2). Indiana, USA: Elsevier, Inc.
- Robyt JF, Whelan W (1968) Amylases. In: Radley JA (ed) *Starch and its Derivates*. Chapman and Hall, England, pp 430–476.
- Sakamoto T & Hirano T (1991) Growth hormone receptors in the liver and osmoregulatory organs of rainbow trout: characterization and dynamics during adaptation to seawater. *Journal of Endocrinology* 130: 425–433.
- Sakamoto T, & McCormick S (2006) Prolactin and growth hormone in fish osmoregulation. *General and Comparative Endocrinology* 147: 24–30.
- Sakamoto T, Hirano T (1991) Growth hormone receptors in the liver and osmoregulatory organs of rainbow trout: characterization and dynamics during adaptation to seawater. *J. Endocrinol.* 130, 425–433.
- Sanchez-Muros MJ, Garcia-Rejon L, Lupianez JA, De la Higuera M (1996) Long-term nutritional effects on the primary liver and kidney metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). 2. Adaptive response of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity to high carbohydrate/low-protein and high-fat/ non-carbohydrate diets. *Aquacult. Nutr.* 2: 193–200.
- Sheridan M & Kittilson J (2004) The role of somatostatins in the regulation of metabolism in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* Volume 138 (4): 323–330.

- Sheridan MA (1986) Effects of thyroxin, cortisol, growth hormone and prolactin on lipid metabolism of coho salmon *Oncorhynchus kisutch*, during smoltification. Gen. Comp. Endocrinol. 64, 220–238.
- Shu JC & Steiner DF (2000) Insulin Through the Ages: Phylogeny of a Growth Promoting and Metabolic Regulatory Hormone. Amer. Zool., 40:213–222.
- Shved N, Berishvili G, Baroiller J, Segner H, Reinecke M (2008) Environmentally Relevant Concentrations of 17 α -Ethinylestradiol (EE2) Interfere With the Growth Hormone (GH)/Insulin-Like Growth Factor (IGF)-I System in Developing Bony Fish (*Oreochromis niloticus*). Toxicological sciences 106(1), 93–102.
- Small B & Peterson B (2005) Establishment of a time-resolved fluoroimmunoassay for measuring plasma insulin-like growth factor I (IGF-I) in fish: effect of fasting on plasma concentrations and tissue mRNA expression of IGF-I and growth hormone (GH) in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). Domestic Animal Endocrinology 28 202–215
- Stone DAJ (2003) Dietary carbohydrate utilization by fish. Rev. Fish. Sci. 11, 337–370.
- Teerijoki H, Krasnov A, Pitkänen TI, Mölsä H (2000) Cloning and characterization of glucose transporter in teleost fish rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Gene Struct. Expr. 1494, 290–294.
- Uscanga-Martínez A, Moyano-López FJ, Álvarez-González CA, Perales-García N (2011) Aplicaciones a la mejora de la utilización nutritiva del alimento en cíclidos cultivados en México. En: Cruz-Suárez, LE, Ricque-Marie D, Tapia-Salazar M, Nieto-López MG, Villarreal-Cavazos DA, Gamboa-Delgado J, Hernández-Hernández L, (Eds) Avances en Nutrición Acuícola XI - Memorias del Décimo Primer Simposio Internacional de Nutrición Acuícola, 23-25 de Noviembre, San Nicolás de los Garza, N. L., México. ISBN 978-607-433-775-4. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México, pp. 46-104.
- Vélez E, Azizi S, Millán-Cubillo A, Fernández-Borràs J, Blasco J, Chan S, Calduch-Giner J, Pérez-Sánchez J, Navarro I, Capilla E, Gutiérrez J (2015) Effects of Sustained exercise on GH-IGFs axis in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, DOI: 10.1152/ajpregu.00230.2015

- Versaw WS, Cuppett D, Winters L (1989) An improved colorimetric assay for bacterial lipase in nonfat dry milk. *J Food Sci* 54:232–254.
- Walter HE (1984) Proteinases: methods with hemoglobin, casein and azocoll as substrates. In: Bergmeyer HU (ed) *Methods of enzymatic analysis*, vol V. Chemic Weinham, Germany, pp 270–277.
- Wang J, Li X., Han T, Yang Y., Jiang Y., Yang M., Xu Y., Harpaz S (2016) Effects of different dietary carbohydrate levels on growth, feed utilization and body composition of juvenile grouper *Epinephelus akaara*. *Aquaculture* 459: 143–147.
- Yada T, Azuma T, Takagi Y (2001) Stimulation of non-specific immune functions in seawater-acclimated rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, with reference to the role of growth hormone. *Comp. Biochem. Physiol., B* 129, 695– 701.
- Yada T, Uchida K, Kajimura S, Azuma T, Hirano T, Grau EG (2002) Immunomodulatory effects of prolactin and growth hormone in the tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *J. Endocrinol.* 173, 483– 492.
- Zambonino-Infante JL & Cahu CL (2001) Ontogeny of the gastrointestinal tract of marine fish larvae. *Comp. Biochem. Physiol.*, 130C: 477-487.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Crecimiento de los juveniles de *A. tropicus* durante la alimentación dietas de micropartículas: a) longitud total (mm juvenil⁻¹ ± SD, n=30) y b) peso promedio (g juvenil⁻¹ ± SD, n=30).

Figura 2. Supervivencia registrada de juveniles durante la alimentación dietas de micropartículas (media \pm SD, n=30).

Figura 3. Actividades enzimáticas digestivas de juveniles de *A. tropicus*, alimentados con dietas microparticuladas (media \pm SD, n=30). La actividad enzimática específica de la proteasa ácida (negro) y actividad enzimática específica de la proteasa alcalina (gris).

Figura 4. Actividades enzimáticas digestivas de juveniles de *A. tropicus*, alimentados con dietas microparticuladas (media \pm SD, n=30). Actividades enzimáticas específicas de tripsina (a), actividades enzimáticas específicas de quimotripsina (b), actividades enzimáticas específicas de leucina aminopeptidasa (c) y actividades enzimáticas específicas de carboxipeptidasa A (d).

Figura 5. Actividades enzimáticas digestivas de juveniles de *A. tropicus*, alimentados con dietas microparticuladas (media \pm SD, n=30). Actividad enzimática específica de la lipasa (a); α -glucosidasa (b) y amilasa (c).

Figura 6. Niveles de expresión relativa de INS(a) y GH (b) normalizadas con Ef1 en los diferentes tratamientos de alimentación de juveniles de *A. tropicus*

Figura 7. Micrografía del corte histológico de hígado de juveniles de *A. tropicus* alimentados con dietas microparticuladas: (a) Hígado de juvenil del tratamiento Control de 90 DPH, con hepatocitos poligonales H y espacios intercelulares dispuestas a lo largo de los sinusoides Si (flecha) y que contienen grandes vacuolas lipídicas. (b) Hígado de juvenil del tratamiento D1 observe una mayor cantidad de Hepatocitos cerca del conducto biliar BD y la presencia de células fagocitadas CF (flecha). (c) Hígado de juvenil del tratamiento D2 observe un mayor numero de células fagocitadas CF y hepatocitos agrupados H. (d) Hígado de juvenil del tratamiento D3, observe una menor presencia de células fagocitadas LP. Abreviaturas: H hepatocitos, LP Trabecula de hepatocitos, Si Sinosoide, BD Conducto biliar, CF Célula fagocitada. Tinción Hematoxilina-Eosina.

Tabla 1. Formulación de dietas microparticuladas utilizando almidón de maíz, para juveniles de pejelagarto *A. tropicus*.

Ingredients (g/100 g dieta)	D1	D2	D3	DCo
Fish meal ^a	40	38.2	40	
Pork meal ^a	10	10	10	
Poultry-by product ^a	13.3	15.4	13.4	
Alfa celullose ^b	23.6	10	-	
Corn starch ^c	-	13.3	23.6	
Fish oil ^d	5	5	5	
Soybean Lecitin ^e	5	5	5	
Grenetin ^f	2	2	2	
Vitamin C ⁱ	0.5	0.5	0.5	
Vitamin Premix ^h	0.3	0.3	0.3	
Mineral Premix ^h	0.2	0.2	0.2	
Nutrient (g/ 100 g dry matter)				
Energy (cal / g)	3723 ± 0.037	3874 ± 0.37	4031 ± 0.37	5667 ± 15.7
Protein	40 ± 0.02	40 ± 0.02	40 ± 0.02	51.5 ± 0.4
Carbohydrates	0	13.3	23.6	-
Fat	15 ± 0.01	15 ± 0.01	15 ± 0.01	15.5 ± 0.4
Fiber	24.6 ± 0.37	11.07 ± 0.37	1 ± 0.37	1.04 ± 0.1
Ash	13.2 ± 0.037	13.53 ± 0.37	13.23 ± 0.37	10.3 ± 0.0

^a Proteínas marinas y agropecuarias, Guadalajara, Jalisco

^b Sigma-Aldrich, catalogue no. C8002

^c IMSA Industrializadora de maíz, Guadalajara, Jalisco, México

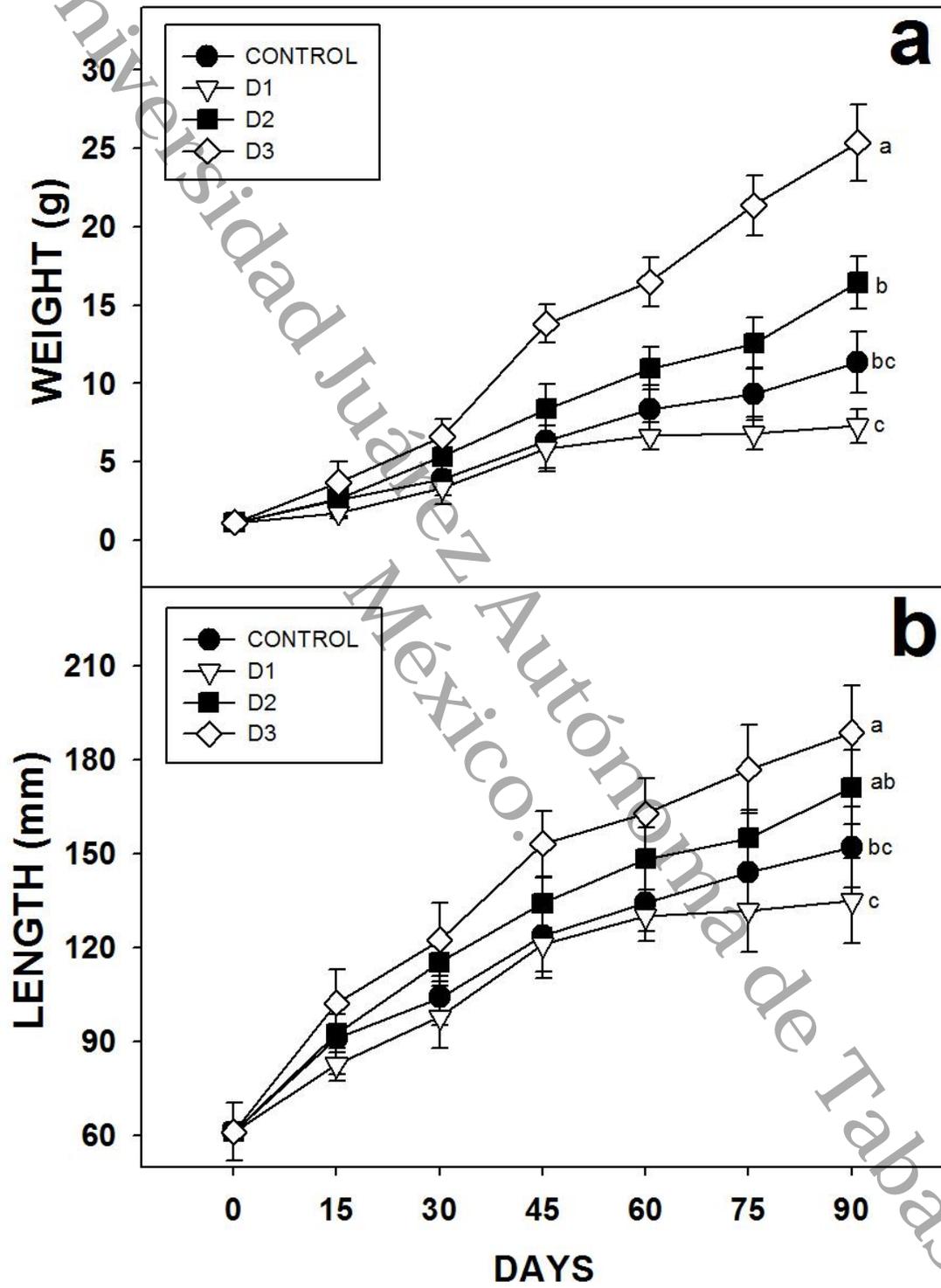
^d GALMEX Comercializadora de Insumos Agrícolas, Villahermosa, Tabasco, México

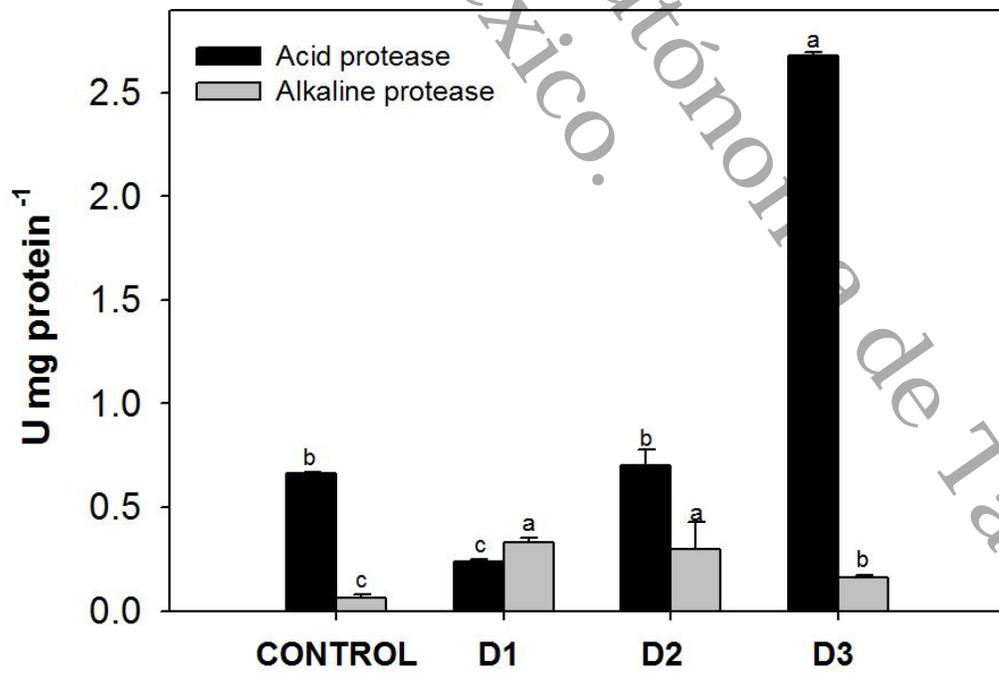
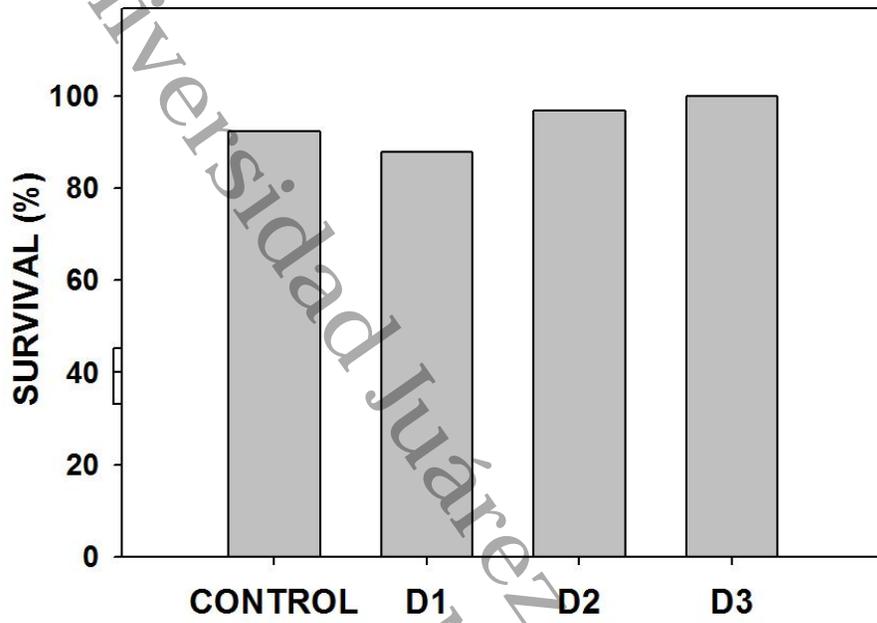
^e Pronat Ultra, Mérida, Yucatán, México

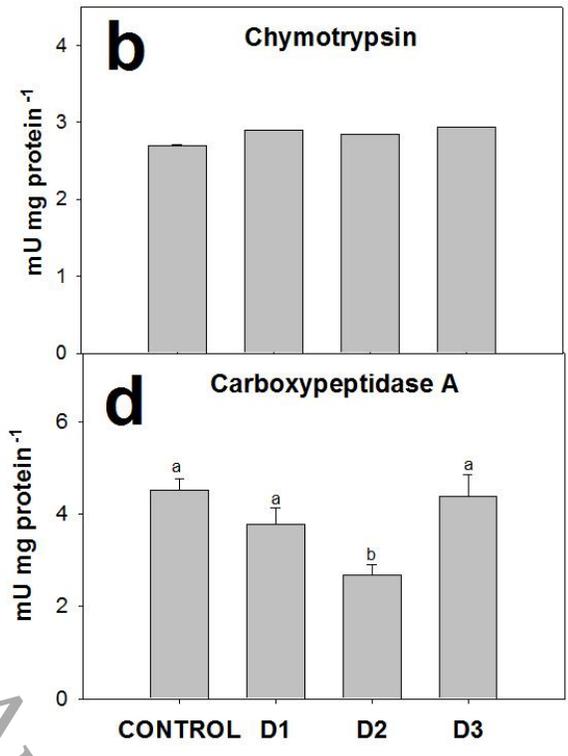
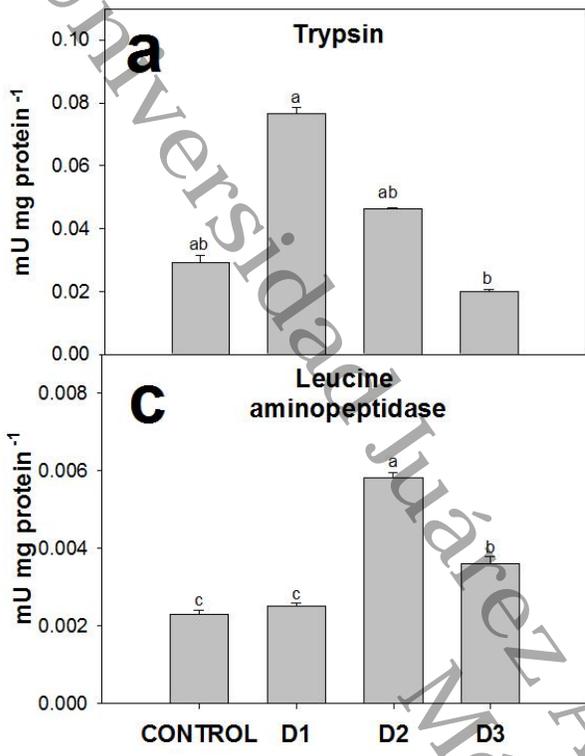
^f D'gari Productos alimenticios y dietéticos relámpago, Tlalpan, México D.F.

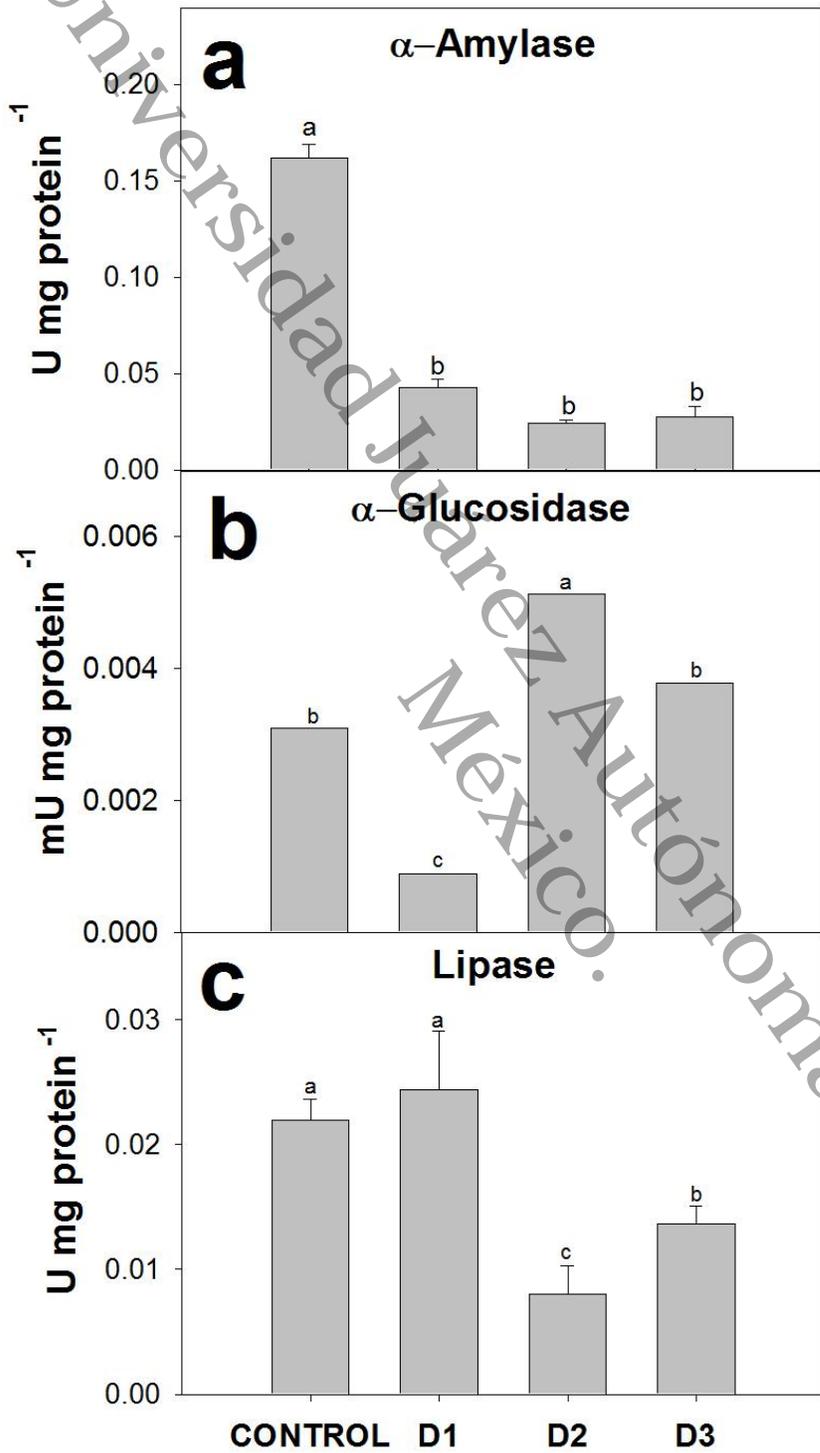
^g ROVIMIX_C-EC (Roche) agente activo de 35 %

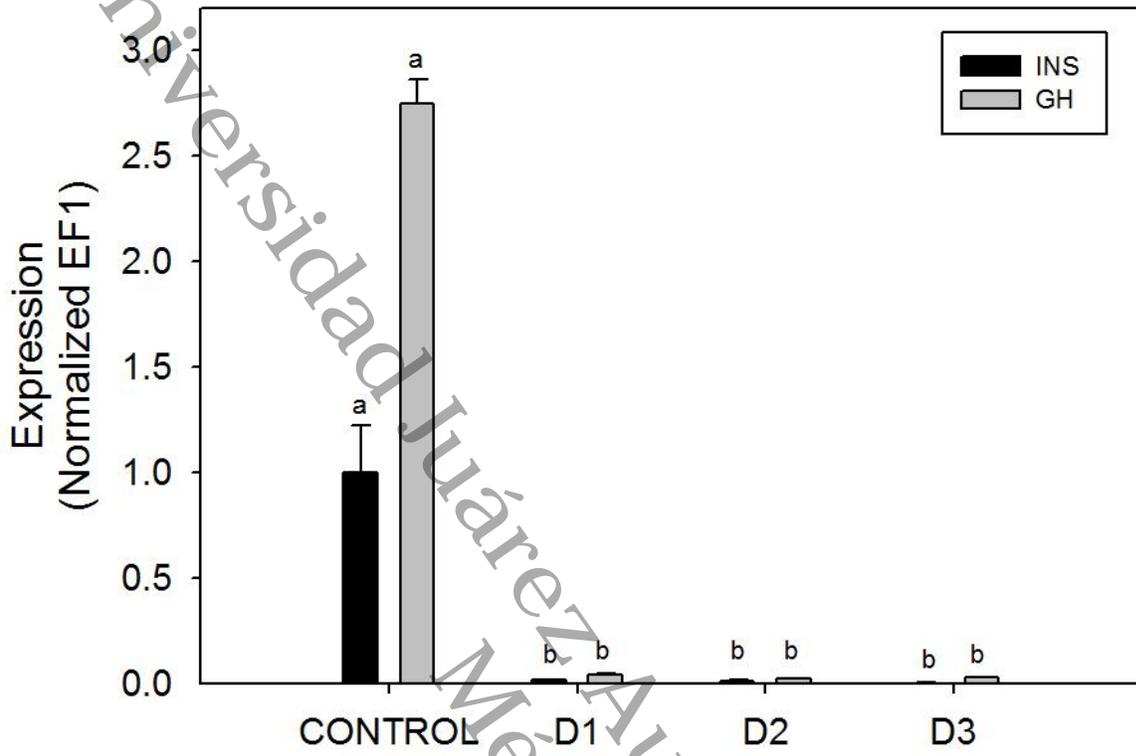
^h Pedregal (para trucha Silver Cup), Toluca, Edo. Mex., México

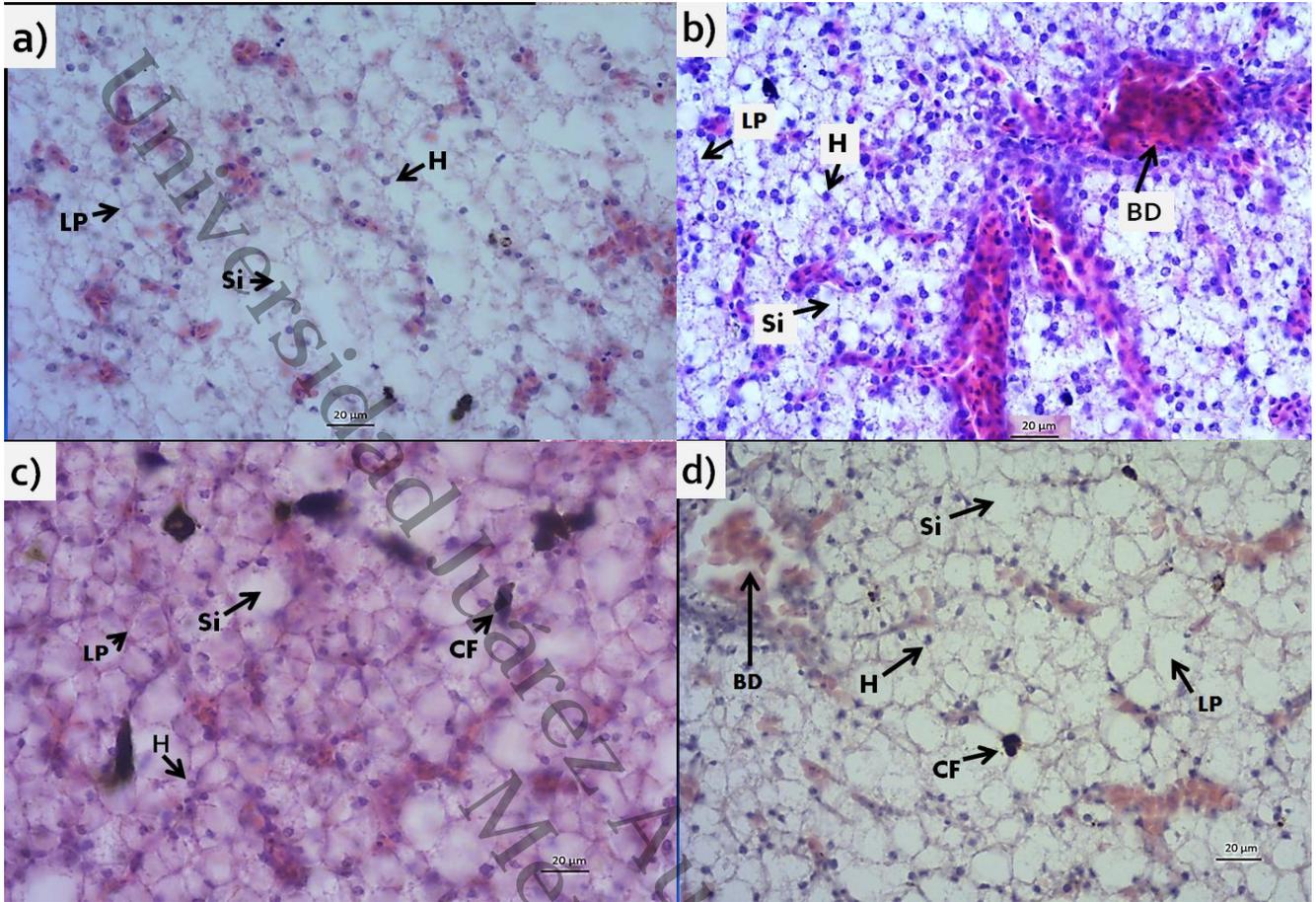












CAPITULO V

Discusión general

Los estudios realizados en nutrición de peces, están basados principalmente en especies marinas, siendo una pequeña parte destinado a especies dulceacuícolas de interés comercial, sin embargo debido a la demanda del mercado de especies nativas se ha implementado investigaciones que avalen un cultivo rentable de estas especies nativas, entre ellas el pejelagarto *A. tropicus*. Para esta especie se han realizado diversos estudios que han logrado su reproducción en cautiverio, su larvicultivo utilizando presas vivas y alimentos balanceados (Gómez 1989; Rodríguez et al. 1997; García et al. 1997; Hernández et al. 1997; Hernández 1999; Mendoza et al. 2005; Márquez et al. 2006), además que en el caso de los juveniles se conocen sus requerimientos nutricionales (proteína, energía y lípidos) (Jesús-Contreras 2008; Huerta-Ortiz 2008), diseño de dietas en base a la bioquímica digestiva (Frias-Quintana et al., 2010; Aguilar-Tellez V, 2013) y fisiología digestiva y ontogenia (Guerrero-Zarate et al., 2013; Frias-Quintana et al., 2015) al grado que actualmente existen granjas comerciales para la producción de crías y engorda en diversos sistemas (González-Arévalo 2006; Álvarez-González et al., 2007; Gómez-Gómez 2009).

Para esto se ha implementado el diseño de alimentos con los requerimientos necesarios para cada etapa de vida de la especie, utilizando fuentes alternativas proteínicas que les aporten los nutrientes necesarios para su crecimiento y supervivencia (Frias-Quintana et al., 2010). Las enzimas juegan un papel importante en el proceso de la digestión, la cual es la transformación de los alimentos a través de la hidrólisis enzimática que fracciona los nutrientes en moléculas simples fácilmente asimilables por las células del intestino que serán transportadas al torrente circulatorio para su distribución (Chong-Carrillo y Vega-Villanasante, 2003). Para entender el proceso digestivo es necesario poner de manifiesto el papel que juegan las enzimas. Estas son catalizadores biológicos que incrementan la velocidad de una reacción química, sin verse alterada ella misma en el proceso global. La mayor parte de los catalizadores químicos son proteínas y se han clasificado en seis grupos; Oxido reductasas, transferasas, hidrolasas, liasas, isomerasas, ligasas, siendo las hidrolasas las encargadas de catalizar rupturas hidrolíticas. En el caso de las hidrolasas digestivas se dividen en los siguientes grupos en función del nutriente que hidrolizan: proteasas (digestión de proteínas), grupo compuesto por tripsina, quimiotripsina,

pepsina, carboxipeptidasa, etc., amilasas (catalizan la hidrólisis de almidón y glucogeno), lipasas (hidrólisis de ácidos grasos) y fosfatasas (catalizan la separación de fósforo inorgánico a partir de fosfato orgánico) (Lehninger, 1994). La capacidad digestiva de los organismos está directamente relacionada con la cantidad de enzimas digestivas disponibles, necesarias para el rompimiento de un alimento (Pedersen y Eggum, 1983). El tipo y funcionalidad de las enzimas digestivas presentes en cualquier especie acuática es el resultado de un proceso evolutivo en el que el principal factor de selección ha sido sin duda el régimen alimenticio, tanto desde el punto de vista de la composición de los alimentos ingeridos preferentemente como de las pautas de alimentación (Civera-Cerecedo et al., 2004).

En cuanto a las actividades enzimáticas se observó un efecto una mayor actividad de tipo pepsina con la dieta con mayor inclusión de carbohidratos, esto podría deberse a que los enlaces presentes en la estructura del almidón podría haber requerido una mayor actividad de la enzima pepsina, la cual promueve al aumento de la producción de ácido clorhídrico en el estomago contribuyendo con la ruptura del almidón a través de los enlaces α -Glucosídicos liberando glucosa, la cual será metabolizada en el hígado a través de la glucogénesis para producir energía (Jen et al., 2010). Es así que los resultados obtenidos en este estudio muestran que en los juveniles de pejelagarto alimentadas con la dieta que contiene 100% de almidón de maíz (usando una proporción del 23% en la fórmula) propicia una mayor digestión ácida en el estómago, lo que a su vez mejora la hidrólisis de proteínas y carbohidratos, mientras que en la parte intestinal se termina la hidrólisis de los oligosacáridos a sus monómeros estructurales (glucosa) para ser absorbidos a través de los enterocitos (Zambonino-Infante y Cahu, 2001; Frías-Quintana et al., 2010), como ha sido reportado en *Symphysodon aequifasciata* (Chong et al., 2002); atún aleta azul *Tunnus thynnus* (Essed et al., 2002) y *Atractosteus tristoechus* (Comabella et al., 2006).

En el caso de las proteasas alcalinas, se muestra variaciones en las actividades enzimáticas siendo la dieta sin almidón (D1) y la dieta con 13% de almidón, las que presentaron las mayores actividades enzimáticas, esto se podría deber a que la acción de la pepsina en el estómago promovió la ruptura de los enlaces de hidrogeno de las estructuras de los glúcidos a través del proceso anabólico que permitió la formación de moléculas mas sencillas como la glucosa que se

encarga de proporcionar energía al organismo, por lo que al llevar a cabo la mayor proporción de la digestión en el estómago, estas enzimas promovieron su actividad en estos dos tratamientos. Sin embargo este patrón fue similar en las actividades de las endoproteasas alcalinas como tripsina y quimotripsina, así como de las exopeptidasas como leucina aminopeptidasa y carboxipeptidasa A, las cuales están presentes desde la eclosión (antes de la absorción del vitelo) y durante todo su desarrollo, además se ha reportado para especies como el pez espinoso, *Anoplarchus purpureus* y la lucioperca *Sander lucioperca* (Chan et al., 2004; Hamza et al., 2007); asimismo, la actividad enzimática de la leucina aminopeptidasa ha sido utilizada como otro indicador de la calidad nutricional al disminuir su actividad o incrementarse, lo que indica la maduración de las microvellosidades de los enterocitos como ha sido detectada en larvas de lubina Europea (*Dicentrarchus labrax*); tilapia (*Oreochromis niloticus*); castarrica *Cichlasoma urophthalmus* (López-Ramírez et al., 2011) y tenhuayaca *Petenia splendida* (Uscanga et al. 2011), donde el incremento de estas actividades se han correlacionado con la maduración de los enterocitos, pero que su actividad varía en relación a la dieta proporcionada (Hakim et al., 2007).

Caso similar presentan la actividad específica de la lipasa, la cual presentan una mayor actividad en relación con la dieta con nula proporción de almidón de maíz (D1), caso contrario al obtenido por Frias-Quintana et al. (2016), que al evaluar actividades enzimáticas en larvas de pejelagarto, se observaron una mayor actividad enzimática en dietas con mayor cantidad de almidón. Esto sugiere que el metabolismo de las larvas es diferente en etapa juvenil utilizando el mismo nutriente en las dietas, ya que en teoría en la etapa juvenil, el organismo ya tiene desarrollado todo su sistema digestivo por lo que cuenta con las enzimas específicas para cada sustrato que promueve una mayor absorción de nutrientes, que en el caso del almidón es utilizable para acelerar su desarrollo y obtener energía al absorber los productos de hidrólisis para ser utilizados en los diversos procesos metabólicos como lo reportan para la perca, *Perca fluviatilis* (Cuvier-Péres y Kestemont 2002), *Melanogrammus aeglefinus* (Pérez-Casanova et al., 2004), *Epinephelus coloides* (Eusebio et al., 2004), *Labeo rohita* (Chakrabarti et al., 2006), *A. trisostichus* (Comabella et al., 2006), *Paralichthys californicus* (Álvarez-González et al., 2006); *Sander lucioperca* (Hamza et al., 2007) y *Palabrax maculatofasciatus* (Álvarez-González et al.,

2008a), y que a su vez se relacionan con los cambios morfofisiológicos durante el desarrollo y los hábitos de alimentación (Civera-Cerecedo et al., 2004).

Adicionalmente, se han realizado estudios en *A. tropicus* reportados por Frías-Quintana et al. (2010) y Guerrero-Zarate et al. (2013), quienes determinaron las actividades enzimáticas proteolíticas, amilásicas y lipídicas en juveniles de pejelagarto, quienes argumentan que esta especie tiene una alta capacidad digestiva a lo largo de su desarrollo como juvenil y adulto. Adicionalmente, Cahu et al., (2004), mencionan que la detección de la amilasa indica no solo la maduración de los enterocitos, sino también la posibilidad de incluir cierta cantidad de carbohidratos que completen el aporte energético durante la alimentación, aunque para peces carnívoros esta capacidad es limitada. En cuanto a las enzima α -glucosidasa se presentaron variaciones en las actividades enzimáticas de los tratamientos, la alfa glucosidasa ácida, también conocida como α -1,4-glucosidasa, es una enzima codificada por el gen GAA esencial para el catabolismo de glucógeno a glucosa en los lisosomas, este proceso de degradación evita la sobreacumulación de glucógeno en diferentes células del organismo (Roach, 2004). El buen crecimiento y ahorro de proteínas están relacionados con el hecho de que la glucosa digerida a partir del almidón es el sustrato oxidativo preferido para el tejido nervioso y células de la sangre, el carbohidrato presente en las dieta de los peces pueden deprimir la actividad de la gluconeogénesis, desviando así los aminoácidos lejos de vías oxidativas (Sánchez-Muros *et al.* 1996); de esta forma, los niveles de la glucosa se deben mantener constantes para permitir un metabolismo adecuado, en este equilibrio intervienen la secreción de insulina, el glucagón, las hormonas de crecimiento y de IGF (factor de crecimiento de insulina) (Hemre et al., 2002). El glucógeno almacenado se utiliza de manera eficiente durante los períodos de privación de alimentos, haciendo uso para la síntesis de pentosas, apoyando así la síntesis de ácidos nucleicos necesarios para fenómenos de crecimiento generales (Hemre et al., 2002).

A partir de varios estudios en los peces que el mejor uso de la energía de carbohidratos de la dieta depende de la composición de macronutrientes de la dieta. Los carbohidratos son una excelente fuente de energía y carbono pero, en principio, como en otros vertebrados, los peces pueden sobrevivir y crecer cuando alimentados con dietas sin carbohidratos o en otras palabras que no tienen un requisito dietético de carbohidratos debido a su capacidad de sintetizar de

manera eficiente glucosa a partir de precursores no de hidratos de carbono, tales como aminoácidos (NRC, 2011) lactato y piruvato. Sin embargo, la inclusión óptima de carbohidratos en la dieta de los peces de cultivo puede aumentar la retención de proteínas y lípidos mediante la prevención del catabolismo de estos nutrientes caros para las necesidades de energía (efecto de ahorro); reducir la carga de nitrógeno en el desempeño agrícola (salvaguardia del medio ambiente); proporcionar metabolitos para la síntesis biológicas; las formulaciones de alimentos de soporte que mantienen el crecimiento a un costo más bajo por unidad de ganancia; ayudar a sedimentar de unión, la estabilidad y la flotabilidad; y facilitar la eliminación de las heces a través de sus propiedades de unión (Hemre et al., 2002; Stone, 2003; Hardy, 2010; Honorato et al., 2010). En general, si la eficiencia de utilización de carbohidratos se estima estrictamente en base en la velocidad de suministro de glucosa a partir de la digestión y la eliminación de la glucosa de la sangre, los peces especialmente los carnívoros tienden a ser los usuarios con carbohidratos deficientes en la dieta (NRC, 2011). Sin embargo, para regular los niveles de glucosa en la sangre por consecuencia de ingerir carbohidratos, es necesaria la intervención de dos principales hormonas endocrinas pancreáticas; la insulina y el glucagón que se encargan de regular los niveles de glucosa en la sangre y el metabolismo subyacente en los vertebrados superiores.

Por otra parte, es importante tener en cuenta que la capacidad de los peces de cultivo a utilizar carbohidratos de la dieta como fuente de energía es generalmente menor que en mamíferos terrestre y inherentemente sigue siendo un tema complicado y controvertido por la diversidad extrema en los hábitos de alimentación, características anatómicas, fisiológicas y hábitats agrícolas (Kaushik, 2001; Moon, 2001; Polakof et al., 2012).

Parte del metabolismo de los carbohidratos se ve reflejado en las reservas energéticas, las cuales a través del proceso de gluconeogénesis, las moléculas de glucosa son almacenadas en el hígado, el cual dependiendo del consumo de calorías del organismo, se van a almacenar en espacios intercelulares en grandes vacuolas lipídicas, los cuales se determinarían en estudios histológicos si hay un efecto positivo en las características que presente el hígado, ya que a mayor número de células fagocitadas presentes en el tejido, sería un indicativo de un daño hepático. Sin embargo las técnicas histológicas/moleculares se utilizan a menudo como un medio para evaluar

indirectamente el papel de las hormonas en la regulación de la alimentación. El examen de la distribución tisular de la proteína en sí o su ARNm proporciona pistas sobre el papel fisiológico del péptido examinado: si una hormona o su ARNm se expresa en regiones del cerebro o el intestino conocido para regular la alimentación, entonces puede deducirse que esa hormona podría tener un papel en la regulación de la alimentación.

Las hormonas gastroenteropancreáticas (GEP) están involucrados en la regulación de casi todos los aspectos del metabolismo de los peces. Los polipéptidos pancreáticos incluyen la insulina (ISN), que al igual que otras hormonas pancreáticas, han sido fuertemente asociadas con la regulación de la ingesta de energía y el balance energético de los peces. La insulina regula una amplia gama de procesos en peces, incluyendo la regulación del apetito, crecimiento, desarrollo, y el metabolismo intermediario. Mientras que la mayoría INS es producida por el páncreas endocrino de peces, sino que también se produce en el cerebro, así como en diversas regiones del tejido intestinal y adiposo. La comprensión de cómo el gen INS está regulado en estos tejidos extra-pancreáticos, ampliando nuestra comprensión general de tejidos específicos de la activación transcripcional (Caruso et al., 2011).

Estas investigaciones indican que la secreción INS se ve afectada por una variedad de macronutrientes. Sin embargo, no han surgido patrones claros de la especificidad de especie y el impacto de la dieta inicial en la capacidad de respuesta a cada uno de los macronutrientes. Por otra parte, la explicación de la mala eliminación de la glucosa en los peces carnívoros todavía no se comprende totalmente. Tales estudios mejoran nuestra comprensión general del INS y moduladores conocidos de señalización de respuesta del INS en peces y establecen correlaciones de estas características con la historia de vida de los organismos (Caruso et al., 2011). Los peces también poseen múltiples ARNm que codifican INS, cuya expresión varía durante el curso del desarrollo embrionario, así como entre los tejidos de juveniles y adultos. Mientras que estos patrones de expresión diferencial son sugestivos, requieren investigaciones adicionales que llevarse a cabo para evaluar las funciones fisiológicas de las distintas isoformas y para dilucidar los mecanismos reguladores que subyacen en su expresión.

Otra hormona que contribuye a la regulación del metabolismo y crecimiento somático es la hormona del crecimiento (Fuentes et al., 2013; Vélez et al., 2015). Sin embargo, estudios recientes sugieren que GH extrapituitario juegan un papel importante en el crecimiento temprano embrionario y la diferenciación (Sanders y Harvey, 2008). Estos datos llevaron a dar otra dimensión de la acción de la GH en los vertebrados en el desarrollo temprano. Aunque la expresión de GH se ha descrito ampliamente en euteleosteos, hasta ahora se conoce poco de GH en la fisiología de peces primitivos. Al revelar los mecanismos moleculares por los que la señalización de GH e INS se modula tanto en forma endocrina, paracrina y autocrina, debido a esto los fisiólogos tienen mayor precisión al inferir los patrones de crecimiento de las poblaciones de peces silvestres y optimizar las estrategias de cría de las poblaciones domesticadas (Picha et al., 2008; Beckman, 2011).

CONCLUSIÓN

El uso de carbohidratos va a depender de que la especie tenga la capacidad digestiva de poder transformar este nutriente en glucosa asimilable para la obtención de energía, y dependerá de que tipo de almidón se usará para la elaboración de dietas, ya que las estructuras moleculares de almidones como el almidón de papa, el cual posee enlaces que a través del catabolismo son difíciles de romper y por tanto, no son digeribles por el organismo, lo que se verá reflejado en un aumento del canibalismo, en el caso de las larvas, y desnutrición en el caso de los juveniles, al momento de obtener los nutrientes faltantes en las dietas proporcionadas. Sin embargo, al modificar los nutrientes, particularmente los carbohidratos, se puede compensar este balance energético para obtener el mismo efecto que con el uso de fuentes proteínicas, obteniendo un efecto positivo en el crecimiento y supervivencia de los peces. En este aspecto, la inclusión de carbohidratos (almidón de maíz) en una mayor proporción en peces carnívoros, ya sea en etapa larval o juvenil es adecuado en el crecimiento de pejelagarto *A. tropicus*, al igual que posee un efecto fisiológico, ya que se manifiestan mayores actividades enzimáticas digestivas en proteasas alcalinas, lipasas, amilasas y glucosidasas durante etapa larval y en juvenil, relacionadas principalmente por el tipo de almidón que se está utilizando. Es así que nuestros resultados permiten concluir que con la dieta formulada con una inclusión de 15% de carbohidratos digeribles (almidón de maíz) en larvas y 23% en juveniles en sustitución de la

fibra no digerible (celulosa) en juveniles de *A. tropicus* se pueden obtener un mayor crecimiento y supervivencia, y a su vez disminuir el canibalismo que presenta esta especie. A su vez promueve un incremento en las actividades enzimáticas digestivas, lo cual es un indicador de la hidrólisis de los alimentos y asimilación de las biomoléculas a partir de la dieta proporcionada, donde el almidón de maíz puede ser la fuente principal de aporte de energía. Asimismo el uso de almidón de papa se puede implementar aumentando los niveles energéticos, modificando los nutrientes para disminuir las proteínas presentes en las dietas y sustituyéndolo por carbohidratos de origen vegetal de donde obtendrán energía los organismos, disminuyendo costos de adquisición de ingredientes proteínicos por nutrientes mas económicos. Cabe resaltar que con la inclusión del almidón, se puede eliminar al 100% el uso de *Artemia*, lo cual es costoso y obteniendo una alta producción de juveniles para su engorda en etapas posteriores.

Literatura citada

- Aguilar-Tellez FV (2013) Diseño de dietas microencapsuladas para la alimentación en larvas de pejelagarto *Atractosteus tropicus*. Tesis de maestria. División Académica de Ciencias Biológicas, UJAT, Villahermosa Tabasco, México. 76 pp.
- Álvarez-González CA, Márquez-Couturier G, Contreras-Sánchez WM, Rodríguez-Valencia W, (2007) Estrategia para el uso sustentable de los recursos pesqueros en Boca de Chilapa, reserva de la biosfera Pantanos de Centla, Tabasco: establecimiento de una planta de producción de peces nativos, pejelagarto, tenguayaca y castarrica. In: Halffer G, Guevara S, Melic A (eds) Hacia una cultura de conservación de la diversidad biológica. Monografías del tercer milenio Vol. VI. Zaragoza, España, pp 197-205
- Alvarez-González CA, Cervantes-Trujano M, Tovar-Ramírez D, Conklin D, Nolasco H, Gisbert E, Piedahita R (2006) Development of digestive enzymes in California halibut *Paralichthys californicus* larvae. *Fish Physiol Biochem* 31:83–93.
- Alvarez-González CA, Moyano-López FJ, Civera-Cerecedo R, Carrasco-Chávez V, Ortiz-Galindo JL, Dumas S (2008) Development of digestive enzyme activity in larvae of spotted sand bass *Paralabrax maculatofasciatus*. 1. Biochemical analysis. *Fish physiology and biochemistry*, 34(4), 373-384.

- Beckman BR (2011) Perspectives on concordant and discordant relations between insulin-like growth factor 1 (IGF1) and growth in fishes. *Gen. Comp. Endocrinol.* 170, 233–252.
- Cahu C, Rønnestad I, Grangier V, Zambonino-Infante J (2004) Expression and activities of pancreatic enzymes in developing sea bass larvae (*Dicentrarchus labrax*) in relation to intact and hydrolyzed dietary protein; involvement of cholecystokinin. *Aquaculture* 238:295–308.
- Caruso MA, & Sheridan M (2011) New insights into the signaling system and function of insulin in fish. *General and Comparative Endocrinology* 173: 227–247.
- Civera-Cerecedo R, Álvarez-González CA, Moyano-López FJ (2004) Nutrición y alimentación de larvas de peces marinos. En: Cruz-Suárez, LE, Ricque-Marie D, Nieto-López MG, Villarreal, Scholz U, González M (2004) Avances en nutrición acuícola VII. Memorias del VII Simposium Internacional de nutrición Acuícola, Hermosillo, Sonora, México, 87 pp.
- Comabella Y, Mendoza R, Aguilera C, Carrillo O, Hurtado A, García-Galano T (2006) Digestive enzyme activity during early larval development of the Cuban gar *Atractosteus tristoechus*. *Fish Physiol Biochem* 32:147–157.
- Cuvier-Pérez A, Kestemont P (2002) Development of some digestive enzymes in Eurasian perch larvae *Perca fluviatilis*. *Fish Physiol Biochem* 24:279–285.
- Chakrabarti R, Rathore R, Kumar S (2006) Study of digestive enzyme activities and partial characterization of digestive proteases in a freshwater teleost, *Labeo rohita*, during early ontogeny. *Aquac Nutr* 12:35–43.
- Chan AS, Horn M, Dickson K, Gawlicka A (2004) Digestive enzyme activities in carnivores and herbivores: comparisons among four closely related prickleback fishes (Teleostei: Stichaeidae) from a California rocky intertidal habitat. *J Fish Biol* 65:848–858.
- Eusebio PS, Toledo J, Mamauag R, Bernas M (2004) Digestive enzyme activity in developing grouper (*Epinephelus coioides*) larvae. In: Rimmer MA, McBride S, Williams KC (eds) *Advances in grouper aquaculture*. Melbourne, CIAR Monograph Series, pp 35–40.
- Frías-Quintana CA, Álvarez-González CA, Márquez-Couturier G (2010). Diseño de microdietas para el larvicultivo de pejelagarto *Atractosteus tropicus*, Gill 1863. *Universidad y Ciencia*, vol. 26, núm. 3, ISSN: 0186-2979, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, México. pp. 265-282.

- Frías-Quintana CA, Márquez-Couturier G, Alvarez-González CA, Tovar-Ramírez D, Nolasco-Soria H, Galaviz-Espinosa MA, Gisbert E (2015). Development of digestive tract and enzyme activities during the early ontogeny of the tropical gar *Atractosteus tropicus*. *Fish physiology and biochemistry*, 41(5): 1075-1091.
- Frías-Quintana CA, Domínguez-Lorenzo J, Álvarez-González A, Tovar-Ramírez D, Martínez-García R (2016) Using cornstarch in microparticulate diets for larvicultured tropical gar (*Atractosteus tropicus*). *Fish Physiology and Biochemistry* 41(6): 1-12.
- Fuentes E, Valdés J, Molina A, Björnsson B (2013) Regulation of skeletal muscle growth in fish by the growth hormone – Insulin-like growth factor system. *General and Comparative Endocrinology*. 192: 136-148.
- García J, Márquez G, Páramo S (1997) Utilización de alimento fresco y artificial en la sustitución de alimento vivo para la cría de larvas y postlarvas de pejelagarto *Atractosteus tropicus*. En: Memorias de la Semana de Investigación y Divulgación Científica de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Villahermosa Tabasco, México. 61-64 p.
- Gómez M (1989). Reproducción del pejelagarto en estanquería rústica. En: Primer Seminario sobre Acuicultura PEMEX-UJAT en el estado de Tabasco. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Villahermosa, Tabasco, México. 13-14 pp.
- Gómez-Gómez MA (2009) Diseño y operación de un laboratorio de producción de juveniles de pejelagarto (*Atractosteus tropicus* gill, 1863) en tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México. Tesis profesional. DACBiol. UJAT. 60 p.
- González-Arévalo E (2006) Diseño y operación de un laboratorio de Producción de alevines de pejelagarto *Atractosteus tropicus* (Gill, 1863) en el municipio de Comalcalco, Tabasco, México. Tesis profesional. DACBiol. UJAT. 132 p.
- Guerrero-Zárate R, Álvarez-González CA, Perales-García N, Olvera-Novoa M, Frías-Quintana C, Martínez-García R, Contreras-Sánchez W (2013) Partial characterization of digestive proteases in Tropical gar *Atractosteus tropicus* juveniles. *Fish Physiol Biochem*. doi:10.1007/s10695-013-9902-7
- Hakim Y, Rowland S, Guy J, Mifsud C, Uni Z, Harpaz S (2007) Effects of genetic strain and holding facility on the characteristics of alkaline phosphatase and brush border enzymes in silver perch (*Bidyanus bidyanus*). *Aquac Res* 38:361–372

- Hamza N, Mhetli M, Kestemont P (2007) Effects of weaning age and diets on ontogeny of digestive activities and structures of pikeperch (*Sander lucioperca*) larvae. *Fish Physiol Biochem* 33:121–133
- Hardy RW (2010) Utilization of plant proteins in fish diets: effects of global demand and supplies of fishmeal. *Aquac. Res.* 41, 770–776.
- Hemre G, Mommsen TP, Kroghdahl A (2002) Carbohydrates in fish nutrition: effects on growth, glucose metabolism and hepatic enzymes. *Aquac. Nutr.* 8, 175–194.
- Hernández VU (1999) Punto crítico de no retorno en larvas de pejelagarto *A. tropicus* (Gill 1823). Tesis de licenciatura. División Académica de Ciencias Biológicas, UJAT, Villahermosa Tabasco, México. 46 pp.
- Hernández VU, Márquez G, Páramo S, Félix S, Hernández S (1997) Valor nutritivo de nauplios de *Artemia* spp y su uso en la larvicultura del pejelagarto *Atractosteus tropicus*. En: Memoria, semana de divulgación y video científico de la UJAT 1997. División Académica de Ciencias Biológicas. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Villahermosa, Tabasco, México. Pp 65-67.
- Honorato CA, Almeida LC, Da Silva Nunes C, Carneiro DJ, Moraes G (2010) Effects of processing on physical characteristics of diets with distinct levels of carbohydrates and lipids: the outcomes on the growth of pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *Aquac. Nutr.* 16 (1), 91–99.
- Huerta-Ortiz M (2008) Requerimientos de lípidos en larvas y juveniles del pejelagarto *Atractosteus tropicus*. Tesis de maestría. División Académica de Ciencias Biológicas, UJAT, Villahermosa Tabasco, México. 126 pp
- Jesús-Contreras R (2008) Relación proteína/energía en juveniles de pejelagarto (*Atractosteus tropicus*) empleando dietas semipurificadas. Tesis de licenciatura. División Académica de Ciencias Biológicas, UJAT, Villahermosa Tabasco, México. 78 pp
- Kaushik S (2001) Carbohydrate nutrition: importance and limits of carbohydrate supplies. In: Guillaume, J., Kaushik, S., Bergot, P., Metailler, R. (Eds.), *Nutrition and Feeding of Fish and Crustaceans*. Praxis Publishing Ltd., Chichester, pp. 131–144.
- López-Ramírez G, Cuenca-Soria CA, Álvarez-González CA, Tovar-Ramírez D, Ortiz-Galindo JL, Perales- García N, Márquez-Couturier G, Arias- Rodríguez L, Indy JR, Contreras-

- Sánchez WM, Gisbert E (2011) Development of digestive enzymes in larvae of Mayan cichlid *Cichlasoma urophthalmus*. *Fish Physiol Biochem* 37:197–208
- Márquez-Couturier G, Álvarez C, Contreras W, Hernández U, Hernández A, Mendoza R, Aguilera C, García T, Civera R, Goytortua E (2006). Avances en la alimentación y nutrición de pejelagarto *Atractosteus tropicus*. pp. 446-523. En: Memorias del VIII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. UANL. Monterrey, Nuevo León, México. ISBN 970-694-333-5.
- Mendoza R, Aguilera C, Montemayor J, Cortes V, Santillán O, Hernández U (2005). Domestication and culture of alligator gar *Atractosteus spatula* in Mexico. In: Memories of Aquaculture America. New Orleans, Louisiana, EUA. pp 272.
- Moon TW (2004) Hormones and fish hepatocyte metabolism: “the good, the bad and the ugly!”. *Comp. Biochem. Physiol. Part B: Biochem. Mol. Biol.* 139, 335–345.
- NRC (2011) Carbohydrates and Fibre, in: Nutrient Requirements of Fish and Shrimp. The National Academies Press, Washington DC, pp. 135–162.
- Picha ME, Turano MJ, Beckman BR, Borski RJ (2008) Endocrine biomarkers of growth and applications to aquaculture: a minireview of growth hormone, insulin-like growth factor (IGF)-I, and IGF-binding proteins as potential growth indicators in fish. *N. Am. J. Aquacult.* 70: 196–211.
- Polakof S, Panserat S, Soengas JL, Moon TW (2012) Glucose metabolism in fish: a review. *J. Comp. Physiol. B.* 182, 1015–1045
- Roach PJ (2004) Glycogen metabolism. In *Encyclopedia of Biological Chemistry* (Vol. 2). Indiana, USA: Elsevier, Inc.
- Rodríguez F, Márquez G, Páramo S (1997) Utilización del uso de cladóceros y nauplios de *Artemia* en la alimentación de larvas de pejelagarto *Atractosteus tropicus*. En: Memorias de la Semana de Investigación y Divulgación Científica de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Villahermosa Tabasco, México. 72 -77 p.
- Sanchez-Muros MJ, Garcia-Rejon L, Lupianez JA, De la Higuera M (1996) Long-term nutritional effects on the primary liver and kidney metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). 2. Adaptive response of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity to high carbohydrate/low-protein and high-fat/ non-carbohydrate diets. *Aquacult. Nutr.* 2: 193–200.

- Sanders EJ & Harvey S (2008). Peptide hormones as developmental growth and differentiation factors. *Developmental Dynamics*, 237(6), 1537-1552.
- Stone DAJ (2003) Dietary carbohydrate utilization by fish. *Rev. Fish. Sci.* 11, 337–370.
- Uscanga-Martínez A, Moyano-López FJ, Álvarez-González CA, Perales-García N (2011) Aplicaciones a la mejora de la utilización nutritiva del alimento en cíclidos cultivados en México. En: Cruz-Suárez, LE, Ricque-Marie D, Tapia-Salazar M, Nieto-López MG, Villarreal-Cavazos DA, Gamboa-Delgado J, Hernández-Hernández L, (Eds) *Avances en Nutrición Acuícola XI - Memorias del Décimo Primer Simposio Internacional de Nutrición Acuícola*, 23-25 de Noviembre, San Nicolás de los Garza, N. L., México. ISBN 978-607-433-775-4. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México, pp. 46-104.
- Vélez E, Azizi S, Millán-Cubillo A, Fernández-Borràs J, Blasco J, Chan S, Calduch-Giner J, Pérez-Sánchez J, Navarro I, Capilla E, Gutiérrez J (2015) Effects of Sustained exercise on GH-IGFs axis in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, DOI: 10.1152/ajpregu.00230.2015.