



**UNIVERSIDAD JUÁREZ AUTÓNOMA DE TABASCO**  
División Académica de Ciencias Biológicas  
“Estudio en la duda. Acción en la fe”



---

---

**“ADICCIÓN DE  $\beta$ -GLUCANOS 1/3, 1/6 EN DIETAS PARA LARVAS DEL PEJELAGARTO (*Atractosteus tropicus*): EFECTOS EN EL CRECIMIENTO, FISIOLÓGÍA DIGESTIVA Y SISTEMA INMUNE”**

**Trabajo recepcional, en la modalidad de:**

Tesis de Maestría

**Para obtener el grado de:**

Maestría en Ciencias Ambientales

**Presenta:**

Biol. Laura Alejandra Cigarroa Ruiz

**Directores:**

Dr. Carlos Alfonso Álvarez González  
Dr. Francisco Javier Toledo Solís

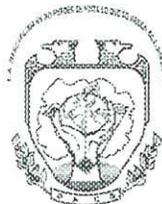
Villahermosa, Tabasco, México

Marzo, 2023



**UNIVERSIDAD JUÁREZ  
AUTÓNOMA DE TABASCO**

"ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE"



**DIVISIÓN ACADÉMICA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
DIRECCIÓN**

Villahermosa, Tab., a 23 de Marzo de 2023

**ASUNTO:** Autorización de Modalidad de Titulación

**C. LIC. MARIBEL VALENCIA THOMPSON  
JEFE DEL DEPTO. DE CERTIFICACIÓN Y TITULACION  
DIRECCIÓN DE SERVICIOS ESCOLARES  
P R E S E N T E**

Por este conducto y de acuerdo a la solicitud correspondiente por parte del interesado, informo a usted, que en base al reglamento de titulación vigente en esta Universidad, ésta Dirección a mi cargo, autoriza al **C. LAURA ALEJANDRA CIGARROA RUÍZ** egresada de la Maestría en **CIENCIAS AMBIENTALES** de la División Académica de **CIENCIAS BIOLÓGICAS** la opción de titularse bajo la modalidad de Tesis de Maestría denominado: **"ADICIÓN DEL  $\beta$ -GLUCANOS 1/3,1/6 EN DIETAS PARA LARVAS DEL PEJELAGARTO (*Atractosteus tropicus*): EFECTOS EN EL CRECIMIENTO, FISIOLÓGÍA DIGESTIVA Y SISTEMA INMUNE"**.

Sin otro particular, aprovecho la ocasión para saludarle afectuosamente.

A T E N T A M E N T E

  
**DR. ARTURO GARRIDO MORA  
DIRECTOR DE LA DIVISIÓN ACADÉMICA  
DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

U.J.A.T.  
DIVISIÓN ACADÉMICA  
DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



DIRECCIÓN

C.c.p. - Expediente Alumno de la División Académica  
C.c.p.- Interesado



UNIVERSIDAD JUÁREZ  
AUTÓNOMA DE TABASCO

"ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE"



DIVISIÓN ACADÉMICA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
DIRECCIÓN

MARZO 23 DE 2023

**C. LAURA ALEJANDRA CIGARROA RUÍZ**  
**PAS. DE LA MAESTRIA EN CIENCIAS AMBIENTALES**  
**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 Maestría en Ciencias Ambientales titulado: **"ADICIÓN DEL  $\beta$ -GLUCANOS 1/3,1/6 EN DIETAS PARA LARVAS DEL PEJELAGARTO (*Atractosteus tropicus*): EFECTOS EN EL CRECIMIENTO, FISIOLÓGÍA DIGESTIVA Y SISTEMA INMUNE"**, asesorado por el Dr. Carlos Alfonso Álvarez González y Dr. Francisco Javier Toledo Solís sobre el cual sustentará su Examen de Grado, cuyo jurado integrado por Dra. Rocío Guerrero Zárate, Dra. Carina Shianya Álvarez Villagómez, Dr. Carlos Alfonso Álvarez González, Dra. Susana Camarillo Coop y Dr. Rafael Martínez García

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

**DR. ARTURO GARRIDO MORA**  
**DIRECTOR**

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

U.J.A.T.  
DIVISIÓN ACADÉMICA  
DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



DIRECCIÓN

## 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 Maestría denominado: **“ADICIÓN DEL  $\beta$ -GLUCANOS 1/3,1/6 EN DIETAS PARA LARVAS DEL PEJELAGARTO (*Atractosteus tropicus*): EFECTOS EN EL CRECIMIENTO, FISIOLÓGÍA DIGESTIVA Y SISTEMA INMUNE”**, 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 el día 23 de Marzo del dos mil veintitrés

AUTORIZO



LAURA ALEJANDRA CIGARROA RUÍZ



UNIVERSIDAD JUÁREZ  
AUTÓNOMA DE TABASCO

"ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE"



División Académica  
de Ciencias Biológicas.

Dirección.



Villahermosa, Tabasco a 15 de febrero de 2023

**C. LAURA ALEJANDRA CIGARROA RUIZ**  
EST. DE LA MAESTRÍA EN CIENCIAS AMBIENTALES  
PRESENTE

En cumplimiento de los lineamientos de la Universidad, y por instrucciones de la Dirección de Posgrado, se implementó la revisión de los documentos recepcionales (tesis), a través de la plataforma Turnitin iThenticate para evitar el plagio e incrementar la calidad en los procesos académicos y de investigación en esta División Académica. Esta revisión se realizó en correspondencia con el Código de Ética de la Universidad, el Reglamento General de Estudios de Posgrado, el Código Institucional de Ética para la Investigación y con los requerimientos para los posgrados en el SNP-CONACYT.

Por este conducto, hago de su conocimiento las observaciones y el reporte de originalidad de su documento de tesis. Con el objetivo de fortalecer y enriquecer el programa de posgrado, el responsable del programa realizó la revisión del documento en la plataforma iThenticate, obteniendo el reporte de originalidad, el índice de similitud y emitió las siguientes sugerencias y recomendaciones para dar seguimiento en el documento de tesis del proyecto de investigación: **"Adición del  $\beta$ -GLUCANOS 1/3, 1/6 en dietas para larvas del pejelagarto (*Atractosteus tropicus*): Efectos en el crecimiento, fisiología digestiva y sistema inmune"**.

OBSERVACIONES:

1. **El índice de similitud obtenido fue de 02%**, el cual se ubica dentro del estándar de tolerancia de acuerdo a las Políticas y Lineamientos para el uso y manejo del Software Antiplagio de la UJAT. Se demuestra el nivel de originalidad del documento y la investigación

KM. 0.5 CARR. VILLAHERMOSA-CÁRDENAS ENTRONQUE A BOSQUES DE SALOYA

Tel. (993) 358-1500 Ext. 6400 y 6401, e-mail: dirección.dacbiol@ujat.mx

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



UNIVERSIDAD JUÁREZ  
AUTÓNOMA DE TABASCO

"ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE"



División Académica  
de Ciencias Biológicas.

Dirección.



2. **Se adjunta el informe de originalidad de la tesis** obtenido a través de la herramienta Turnitin iThenticate.
3. Finalmente, se le solicita a la C. Laura Alejandra Cigarroa Ruiz, integrar en la versión final de tesis, este oficio y el informe de originalidad con el porcentaje de similitud de Turnitin iThenticate.

Sin otro particular al cual referirme, aprovecho la oportunidad para enviarle un cordial saludo.

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

DR. ARTURO GARRIDO MORA  
DIRECTOR DACBIOL

U.J.A.T.  
DIVISIÓN ACADÉMICA  
DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



DIRECCIÓN

C.C.P.

Dr. Carlos Alfonso Álvarez González. Director de Tesis.  
ARCHIVO

KM. 0.5 CARR. VILLAHERMOSA-CÁRDENAS ENTRONQUE A BOSQUES DE SALOYA  
Tel. (993) 358-1500 Ext. 6400 y 6401, e-mail: dirección.dacbiol@ujat.mx

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

# Adición del $\beta$ -GLUCANOS 1/3, 1/6 en dietas para larvas del pejelagarto (*Atractosteus tropicus*): Efectos en el crecimiento, fisiología digestiva y sistema inmune

INFORME DE ORIGINALIDAD

2%

ÍNDICE DE SIMILITUD

FUENTES PRIMARIAS

1	<a href="https://eprints.uanl.mx">eprints.uanl.mx</a> Internet	96 palabras — 1%
2	<a href="https://hidrobiologica.izt.uam.mx">hidrobiologica.izt.uam.mx</a> Internet	24 palabras — < 1%
3	Thamyres Vanessa N. da Silva, Camila F. dos Santos, Jessica M. L. dos Santos, Marcos J. Schmitz et al. "Effects of dietary inclusion of lyophilized açai berries ( <i>Euterpe oleracea</i> ) on growth metrics, metabolic and antioxidant biomarkers, and skin color of juvenile tambaqui ( <i>Colossoma macropomum</i> )", <i>Aquaculture International</i> , 2022 Crossref	22 palabras — < 1%
4	<a href="https://mdpi.com">mdpi.com</a> Internet	17 palabras — < 1%
5	<a href="https://hdl.handle.net">hdl.handle.net</a> Internet	16 palabras — < 1%

EXCLUIR CITAS

DESACTIVADO

EXCLUIR FUENTES

DESACTIVADO

EXCLUIR BIBLIOGRAFÍA

ACTIVADO

EXCLUIR COINCIDENCIAS

< 15 PALABRAS

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco (UJAT) en la División Académica de Ciencias Biológicas (DACBIOL) por brindarme la oportunidad en el seguimiento de preparación profesional y abrirme las puertas de la institución donde he podido formarme.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico brindado durante el tiempo que realice el posgrado (Numero de beca 1078719).

Al Dr. Carlos Alfonso Álvarez González, que ha fungido como mi director, me aconsejó, dirigió continuamente, se preocupó por que siguiera adelante y sobre todo a su paciencia infinita, igualmente que se permitiera unirme al proyecto de investigación del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Fondo: I0017).

Al Dr. Francisco Javier Toledo Solís, que me ha acompañado a lo largo de estos años de formación como mi Co-Director y amigo, por su confianza, el compartir su experiencia de manera generosa y que continuamente me sigue motivando en el camino de la ciencia.

A los miembros del comité que continuamente me exigían mejorar de manera oportuna y que me permitió exigirme más como estudiante y persona.

A mi amiga Susana que me ayudó a librar el posgrado entre risas y empuje, así como sus conocimientos y consejos de vida, gracias neni.

A Talhia, Reyes, Gabriel, por su apoyo en lab. y compañía mientras lidiábamos el estrés, Eli, Caro y Luis que hacían de los días más agradables y me abrieron las puertas de sus corazones tabasqueños.

Así también a los compañeros de laboratorio, doctores que se preocuparon y además fungieron en soportes de ayuda y conocimiento.

# INDICE

AGRADECIMIENTOS .....	1
1.- INTRODUCCIÓN .....	6
2.- ANTECEDENTES .....	9
2.1.- $\beta$ -Glucanos como fibra dietética .....	9
2.2.- $\beta$ -Glucanos en teleósteos .....	10
2.3.- Prebióticos en <i>Atractosteus tropicus</i> .....	12
2.4.- Genes asociados al sistema de protección de la barrera en <i>Atractosteus tropicus</i> en $\beta$ -Glucanos .....	13
3.- JUSTIFICACIÓN.....	15
4.- OBJETIVOS.....	16
4.1.- Objetivo general .....	16
4.2.- Objetivos específicos.....	16
5.- REFERENCIAS.....	17
<b>Adición del <math>\beta</math>-glucanos en dietas para larvas del pejelagarto (<i>Atractosteus tropicus</i>): efectos en el crecimiento, enzimas digestivas y expresión de genes de la integridad del epitelio intestinal y sistema inmune. ....</b>	<b>31</b>
RESUMEN .....	32
INTRODUCCIÓN.....	34
MATERIALES Y MÉTODOS .....	37
Diseño experimental .....	37
Formulación y elaboración de dietas experimentales.....	38
Índices de crecimiento .....	40
Actividad enzimática digestiva .....	40
Análisis de expresión molecular.....	42
Análisis estadístico .....	44
RESULTADOS.....	45
Índices de crecimiento .....	45

Actividad enzimática digestiva .....	47
Expresión de genes inmunitarios .....	48
DISCUSIÓN .....	51
CONCLUSIÓN .....	58
REFERENCIAS .....	60

Universidad Juárez Autónoma De Tabasco.  
México.

## RESUMEN

Se implementó el uso del polisacárido  $\beta$ -1,3/1,6-glucano (prebiótico) como un inmunoestimulante para pejelagarto (*Atractosteus tropicus*) en la etapa larvaria. Con la finalidad de evaluar la capacidad del aditivo en la mejora del crecimiento, actividad de las enzimas digestivas y expresión de genes involucrados en la función de barrera intestinal (física e inmune), utilizándose distintos niveles de inclusión (0.2, 0.4, 0.6, 0.8%) y un grupo control (0.0%). El experimento se realizó por triplicado utilizando 100 organismos por unidad experimental y en un periodo de 21 días. No se presentaron diferencias significativas en los índices de crecimiento con respecto al control ( $p > 0.05$ ). Los resultados en las enzimas digestivas muestran cambios en L-aminopeptidasa, quimotripsina, fosfatasa ácida y alcalina con mayor actividad en las larvas alimentadas con la dieta de 0.4%. Así también, las enzimas lipasa y tripsina, presentaron mayor actividad con las dietas de 0.6% y 0.8%, con respecto al grupo control ( $p < 0.05$ ). Tras la exposición de la dieta del  $\beta$ -glucano, los genes *occ*, *muc-2* y *lys*, involucrados en el reforzamiento de la barrera epitelial intestinal, la síntesis de la capa de mucosa y la defensa antibacteriana, respectivamente, aumentaron su expresión principalmente con la inclusión del 0.4%. Además, el gen *nod-2* involucrado en la respuesta inmune innata, presentó mayor expresión con el nivel de 0.6%. Estos genes presentaron una tendencia a aumentar su expresión a medida que se incrementó el porcentaje de inclusión de  $\beta$ -glucano, para posteriormente descender e inhibirse a la mayor concentración evaluada. Es así como las apreciaciones del polisacárido  $\beta$ -1,3/1,6-glucano como inmunoestimulante para la etapa larvaria, son observadas en la

expresión molecular y actividades enzimáticas, con la adición de bajas dosis del aditivo en la etapa larvaria de pejelagarto, recomendándose incorporaciones del 0.4% en las dietas.

Universidad Juárez Autónoma De Tabasco.  
México.

## 1.- INTRODUCCIÓN

La industria acuícola, es considerada una alternativa ante el evidente declive de las pescas globales. La FAO en el 2020 informó sobre el estado de la pesca mundial, en donde el 34.2% se encontraba en condiciones de sobreexplotación, debido a que el sistema de pesca global tiene límites biológicos y medioambientales (Farradía *et al.*, 2022). Un ascenso del poder adquisitivo en algunos países y el incremento demográfico, han convertido a la acuicultura en una fuente viable para el suministro de proteína animal (FAO, 2016; Hossain *et al.*, 2022).

Para cubrir la demanda mundial, en acuicultura se emplea principalmente sistemas de cultivos intensivos (2 a 30 org / m<sup>2</sup>) para aprovechar el máximo los espacios y obtener el producto en el menor tiempo posible (Sanabria-Parrado, 2016). Naturalmente, los organismos en cultivos conviven con algunos agentes patógenos, hongos, virus y bacterias; no obstante, si alguno de ellos rompe el equilibrio es muy probable que terminen provocando infecciones y patologías (Piazzon *et al.*, 2017; Lizárraga-Velázquez *et al.*, 2018).

Las afecciones, patologías y la muerte masiva de peces en estos sistemas de cultivo encaminaron la búsqueda de recursos como antibióticos, antivirales, parasiticidas, desinfectantes, antifúngicos, y otros productos para contrarrestar tales circunstancias (Cabello, 2004; Van Doan *et al.*, 2016; Mugwanya *et al.*, 2021). No obstante, han desencadenado efectos contraproducentes, como retraso de los ciclos de vida, resistencia bacteriana. Además, generaron un aumento de la mortalidad en organismos tratados, repercutiendo en pérdidas económicas y llegando a ser prohibidos en muchos países (Cabello, 2006; Martins *et al.*, 2014; Darwesh *et al.*, 2022). Además, pueden modificar el color y pH en el agua utilizada en los cultivos, incluso se han encontrado efectos como deformaciones esqueléticas o falta de extremidades, como menciona en algunos casos de estudio en salmón, trucha arcoíris y carpa (Shao, 2001; Benavides *et al.*, 2018; Silva *et al.*, 2022).

Pensando no solo en la salud de los peces, sino también, en el evitar los efectos contraproducentes en la salud humana, y en minimizar el impacto ambiental

(Betancourt-Gordillo, 2014; Santos & Ramos, 2018), se recurrió al uso de suplementos y aditivos alimenticios como carotenoides, ácidos orgánicos, probióticos, prebióticos, péptidos antimicrobianos, entre otros (Mioso *et al.*, 2014; Gadde *et al.*, 2017). En vista de los beneficios obtenidos con este tipo de suplementos, se han tratado de incorporar como aditivos funcionales en las dietas para mejorar el crecimiento, la ingesta y la digestibilidad de alimentos (Puerta-Rico, 2016; Calado *et al.*, 2017).

Actualmente, hay un mercado enfocado en mejorar la salud y supervivencia de peces, entre ellos se encuentra especialmente el polisacárido  $\beta$ -1,3/1,6-glucano, como uno de los inmunoestimulantes más usados en acuicultura (Miest *et al.*, 2016). Clasificándose como una fibra dietética (prebiótico) que se asocia a diversos beneficios en la salud del hospedador, esto depende de la fuente de que provengan como avena, cebada, centeno, hongos, bacterias y levaduras (Mishra, 2020). Principalmente el  $\beta$ -glucano de levadura, tienen las particularidades de mejorar la respuesta inmune innata (dirigida contra virus, hongos y bacterias), por medio de vías de señalización de reconocimiento, principalmente del receptor Dectina-1 desde el huésped (Moreno *et al.*, 2014; Fahie *et al.*, 2016), con el rol esencial de eliminación de patógenos a través de macrófagos y enterocitos. Además, permite una mejor respuesta al estrés, crecimiento y ayuda alcanzar una mayor tasa de supervivencia (Wood, 2007; Pizarro *et al.*, 2014).

En el Sureste de México existen una gran diversidad de especies de peces nativos con potencial de su cultivo, entre ellas, el pejelagarto (*A. tropicus*) es una de las especies dulceacuícolas más importantes en el estado de Tabasco. Es un espécimen valorado culturalmente y con un alto potencial productivo en la región (Méndez-Marin *et al.*, 2012). Debido a la importancia que representa, es necesario comprender y optimizar el cultivo de esta especie a pesar de los avances logrados en el área de ecología, reproducción, alimentación, nutrición y en otras áreas como genómica (Nelson *et al.*, 2006; Guerrero-Zárate *et al.*, 2014; Frías-Quintana *et al.*, 2016; Martínez-Burguete *et al.*, 2021).

Por lo tanto, el presente trabajo se evaluará la inclusión de distintos porcentajes de  $\beta$ -1,3/1,6-glucanos en las dietas de larvas de *A. tropicus*, y el efecto en el crecimiento,

procesos de digestión como la actividad de las enzimas digestivas y en la condición de bienestar animal por análisis moleculares mediante la cuantificación de la expresión relativa (qPCR) de genes involucrados con la función de barrera intestinal y el sistema inmunológico.

Universidad Juárez Autónoma De Tabasco.  
México.

## 2.- ANTECEDENTES

### 2.1.- $\beta$ -Glucanos como fibra dietética

Las investigaciones en acuicultura relacionadas a sanidad, nutrición y bienestar han incorporado componentes funcionales añadidos a las dietas que les permitan a los organismos obtener propiedades benéficas como son ácidos grasos, bioactivos, inmunoestimulantes, probióticos y prebióticos (Abuajah *et al.*, 2015; Akhter *et al.*, 2015). Este último considerado como “fibra dietética”, la cual en los inicios McCance y Lawrence (1929) la definieron como “*fibra no disponible*”; aquellos carbohidratos de origen vegetal constituidos principalmente por celulosa con valor energético insignificante. A partir de la década de los 50's han surgido otras propuestas, entre las más completas se tiene la de Trowell *et al.*, (1976) “*La fibra dietética consiste en los polisacáridos vegetales y la lignina que son resistentes a la hidrólisis por las enzimas digestivas del hombre*”. Esta definición posteriormente fue adoptada por el Comité Asesor de Expertos en Fibra Dietética de Salud y Bienestar de Canadá, que buscó una definición base más amplia que permitiera ajustar futuras declaraciones (NIM, 2001).

Actualmente la definición de “fibra dietética” aceptada por Asociación de Productores de Cereales de la Unión Europea del 2004 (ACC) y Comisión del Codex Alimentarius (Joint FAO, 2006), incluye todos aquellos extractos y/o ramificación de carbohidratos análogos solubles o insolubles en el agua, resistentes a hidrolisis y/o fermentación con grado de polimerización  $>2$  y que contengan, efectos beneficiosos como la estimulación de la fermentación colónica, laxación y/o modulación de glucosa (Abuajah *et al.*, 2015).

Los primeros trabajos en prebióticos las describen como fibras dietéticas asociados a una alta viscosidad y gran peso molecular (Jenkins *et al.*, 1978; Chonchol & Tovar, 1988); que, además, pueden ser despolimerizados por las amilasas (Wood *et al.*, 1991). Los inmunoestimulantes en acuicultura se han aconsejado como protección ante infecciones (Cruz-Suárez *et al.*, 2000; Pionnier *et al.*, 2013), teniendo efectos bastante previsorios como la capacidad de estimular el sistema inmune innato en los peces, actividad de eliminación de bacterias y la integridad intestinal (Rendón & Balcázar, 2016; Chen *et al.*, 2019). Los  $\beta$ -glucanos son bioactivos orgánicos, un tipo de polímero

de glucosa formados por monómeros de sacáridos unidos entre sí por enlaces glucosídicos a través de enlaces lineales  $\beta$ -1 $\rightarrow$ 3 y  $\beta$ -1 $\rightarrow$ 6 (ej. Hongos, levaduras, entre otros) y enlaces  $\beta$ -1 $\rightarrow$ 3 y  $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4 (ej. Cereales) según Del Cornò *et al.*, (2020). También, pueden presentar ramificaciones, que difieren del tipo funciones biológicas, peso molecular y solubilidad debido a la fuente de origen; como cereales, hongos, levaduras, bacterias y algas marinas (Pizarro *et al.*, 2014; Mishra, 2020; Bobade *et al.*, 2022).

## 2.2.- $\beta$ -Glucanos en teleósteos

Los  $\beta$ -Glucanos son un ingrediente valioso y funcional con propiedades importantes a nivel fisiológico, una de las características principales de los  $\beta$ -Glucanos de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* son las funciones inmuno estimulantes (Wilson *et al.*, 2015). Los efectos de  $\beta$ -glucanos de levadura especialmente de *Saccharomyces cerevisiae*, han sido evaluados en peces como *Danio rerio*, inoculados con el patógeno *Aeromonas hydrophila* donde los resultados arrojados fueron positivos a la disminución de la mortalidad; Rodríguez *et al.*, (2009) documentaron diferentes niveles de dosis (5, 2 y 0.5 mg·ml<sup>-1</sup>), en donde el  $\beta$ -glucano estimuló las proteínas como quimiocinas y citocinas, que están envueltas en el proceso de atracción y migración de los leucocitos que intervienen como antígenos, de esta manera, se logró activar expresión del gen IFN- $\gamma$  (Interferón gamma), el cual es importante en el papel de la respuesta inmune innata (Nunes *et al.*, 2016; Xu *et al.*, 2019).

Selvaraj *et al.*, (2005) estudiaron los efectos del  $\beta$ -glucano de levadura como coadyuvantes en *Cyprinus carpio*, bajo el desafío con *Aeromonas hydrophila*, logrando un mayor porcentaje (54%) de sobrevivencia en aquellos suministrados con  $\beta$ -glucano, así mejoró el sistema inmunitario aumentando la producción de anticuerpos, células sanguíneas como leucocitos, neutrófilos, seguidos de monocitos y la expresión del ARNm IL-1b (Pyo *et al.*, 2003).

Los peces en etapa larvaria aún carecen de un sistema inmune específico desarrollado, lo que ha generado tratamientos preventivos para el fortalecimiento del mismo (Bricknell & Dalmo, 2005). Un trabajo en la etapa larvaria realizado en *Oreochromis niloticus* con

$\beta$ -1,3/1,6-glucanos; en donde se realizó un solo tratamiento con la administración del 1% de aditivo en la dieta, mostro una mejora en la absorción de nutrientes en la parte anterior del intestino (Díaz & Gallego, 2016); por lo que también surge la curiosidad de cómo influye en las comunidades microbianas intestinales. Otro estudio en la especie *Cyprinus carpio L.*, alimentada con dietas con incorporación de 0.1%, 1% y 2% de  $\beta$ -1,3/1,6-glucanos, se observaron modificaciones en las comunidades microbianas, los análisis de secuencia detectaron las pertenecientes a filos, *Fusobacterias*, *Proteobacteria*, *Firmicutes* y bacterias no identificadas, las cuales podrían afectar de manera positiva en las microvellosidades intestinales (en cuanto al grosor y densidad), observándose crecimiento beneficioso con la suplementación del 1% y 2% (Kühlwein *et al.*, 2013).

Existe un ensayo con un modelo parecido, en donde se uso la levadura con la misma especie *Cyprinus carpio L.*, los parámetros medidos fueron crecimiento, morfología intestinal y perfil hematoinmunológico en concentraciones de 0%, 0.1%, 1% y 2%, coincidiendo en que las concentraciones 1% y 2% muestran resultados favorables en crecimiento, conversión alimenticia y ganancia en peso (Kühlwein *et al.*, 2014). En el análisis histológico, se mostró la presencia de leucocitos en el epitelio intestinal y una mayor presencia de monocitos intraepiteliales; esto indica una respuesta inmune localizada en la zona intestinal donde las células sanguíneas migran a zonas respondiendo a factores por patógenos (Rubio-Godoy, 2010). En otro estudio para la especie *Rutilus rutilus*, compararon el efecto de la suplementación de  $\beta$ -1,3/1,6-glucanos con *Lactobacillus plantarum*, en cuanto al rendimiento del crecimiento no hubo diferencias significativas, pero mejoro los parámetros de la inmunidad innata, es decir la actividad lisozima y pinocitótica de los fagocitos, capaz de asimilar o ingerir algún cuerpo extraño y eliminarlo (Penagos *et al.*, 2009). Además, se menciona que el efecto puede durar hasta 2 semanas en los organismos, después de volver a alimentar con pienso comercial (Kazuñ *et al.*, 2020).

### 2.3.- Prebióticos en *Atractosteus tropicus*

La inclusión de suplementos como los prebióticos en *A. tropicus* es reciente, iniciando con tres estudios en la etapa juvenil e incorporarlos previamente a la etapa larvaria. Se ha comenzado utilizando los más comunes en otras especies como los oligosacáridos de manano, en concentraciones de 0.0%, 0.2%, 0.4%, 0.6% y 0.8% para juveniles ( $5.11 \pm 0.08$  g; Nájera-Arzola *et al.*, 2018). Este ingrediente alimenticio, ha sido considerado por su capacidad de asimilación en los organismos, con enzimas indicadoras del estado nutricional como proteasa ácida, proteasa alcalina, tripsina, quimotripsina, leucina aminopeptidasa, carboxipeptidasas, lipasas,  $\alpha$ -amilasa, fosfatasas ácidas y fosfatasas alcalinas, siendo reflejado en el peso, la talla y su respuesta ante enfermedades. Y en la etapa larvaria, en concentraciones del 0.0%, 0.25%, 0.5% y 0.75% ( $0,030 \pm 0,006$  g) en donde la suplementación del 0.75% indican mejoras en crecimiento, actividad enzimática y sobrevivencia (Maytorena-Verdugo *et al.*, 2022).

Otro de los prebióticos encaminados a mejorar el rendimiento de *A. tropicus*, es el inmunoestimulante  $\beta$ -glucanos (1,3/1,6), sus efectos demostraron una mejora en la respuesta inmunitaria y un incremento de las actividades enzimáticas utilizadas como marcadores del estado nutricional (proteasas alcalinas, tripsina, leucina, aminopeptidasa y amilasa), en donde la quimotripsina mostró actividad a partir de una concentración a partir del 1.0% y 1.5% (Nievés *et al.*, 2018), la cual está implicada en la hidrólisis de proteínas, además de actuar no solo hidrolasas sino también transferasas (Jesús-Ramírez *et al.*, 2017).

También, se ha utilizado el prebiótico fructooligosacárido (FOS) adicionado en 5, 10, 15 y 20 g/kg<sup>-1</sup> en la dieta para la etapa (con peso de  $0.25 \pm 0.01$  g y longitud total de  $4.2 \pm 0.4$  cm), esto porque el fos tiene una alta solubilidad y estabilidad alimentaria. Se reporta que a partir de la concentración de 5 g/kg<sup>-1</sup> aumentó la actividad de las enzimas digestivas como las proteasas ácidas, quimotripsina y leucina aminopeptidasa), la absorción de lípidos, expresión en genes del sistema inmune y barrera intestinal (*OCC*, *MUC2*, *NOD2*,  $\beta$ -*actin* y *EF1-a*). Los autores señalan que una dieta con FOS a partir de 5g/kg<sup>-1</sup> y 10g/kg<sup>-1</sup> resulta benéfico no solo en actividad enzimática, sino también, en la

morfología de la barrera intestinal (Sepúlveda-Quiroz *et al.*, 2020). Por lo tanto, se incluyó también en la etapa de larvas con porcentajes del 0.0%, 0.25%, 0.50% y 0.75% en donde específicamente en porcentaje de 0.75% mejoró los parámetros de crecimiento y supervivencia, así como aumentar la actividad de amilasa y proteasa alcalina, importantes por su capacidad de hidrolizar nutrientes, así también, logro aumentar la expresión de genes como muc-2, zo-2 y claudin-3, demostrando la capacidad prebiótica de afectar de manera positiva al huésped (Pérez-Giménez *et al.*, 2022)

#### 2.4.- Genes asociados a la función de barrera intestinal en *Atractosteus tropicus* en $\beta$ -Glucanos

El uso de algunos genes involucrados en la función en la barrera de los peces como indicadores de su “condición” (capacidad de resistir al desarrollo de enfermedades), es posible mediante pruebas de biología molecular (Beaz-Hidalgo *et al.*, 2016). Una de las herramientas de análisis frecuentemente utilizadas es la técnica de qPCR, pero se requiere de genes de referencia “estables” que sirvan de control endógeno; entre los más utilizados se encuentran el 18s (ARN Ribosómico), GAPDH (Gliceraldehido-3-Fosfato),  $\beta$ -actina (*actb*) que están implicados en la capacidad estructural y citoesquelética de la célula. También, se encuentra *ef1-a* (factor de elongación factor 1 alpha) en el metabolismo de la síntesis de proteínas en diferentes especies (Rojas *et al.*, 2022; Thépot *et al.*, 2022). Estos genes se han utilizado en peces como *Coregonus maraena* (Altmann *et al.*, 2015), *Micropterus salmoides* (Ma *et al.*, 2019), *Oreochromis niloticus* (Zheng *et al.*, 2019) *Danio rerio* (Rassier *et al.*, 2020) entre otros. Para el caso de *A. tropicus* se reporta como gen más estable el *ef1*, seguido del 18s y  $\beta$ -actina, relacionados a la transmisión, recombinación y segregación de genes entre los apropiados para esta especie (Jiménez-Martínez *et al.*, 2021).

Algunos de los genes involucrados en el reforzamiento de la función de barrera de los peces son el *muc2* (Mucina 2), que forma parte de las mucinas que constituyen la mucosa semipermeable que recubre el tracto digestivo, branquias y piel (Xue *et al.*,

2015); el gen *nod2* (*Domain 2*), considerado el más importante de la familia NLR como receptores del sistema inmune expresado en algunos órganos linfoides (riñón interior, timo, bazo, tejido asociado a mucosas o intestino) (He *et al.*, 2021); el gen *lys* (Lysozima), que rompe eficazmente las paredes bacterianas y presenta una alta actividad fúngica contra una variedad amplia de patógenos (Duffin *et al.*, 2020). Estos genes (*muc2*, *nod2* y *lys*) se han evaluado en peces como *Megalobrama amblycephala* y *Oreochromis niloticus*. En otras especies como *Danio reiro*, se evaluaron los genes asociados al sistema inmune innato de los peces, y además se evaluó el gen *occ* (occludina), que pertenece a un grupo de proteínas que ayudan a sellar las barreras epiteliales (Guo *et al.*, 2019). El gen *lys* muestra una actividad importante en el desarrollo temprano de los teleosteos ante infecciones u estrés (Li *et al.*, 2020), mostrando un aumento de actividad ante aditivos inmunoestimulantes como lo muestran en la investigación para *Lates calcarifer* (Ashouri *et al.*, 2019).

México. Universidad Juárez Autónoma De Tabasco.

### 3.- JUSTIFICACIÓN

Las investigaciones en nutrición acuícola siguen siendo uno de los temas principales en especies cultivadas para mejorar la sanidad, el bienestar y el rendimiento, sobre todo en la etapa larvaria. La cual es considerada una etapa crucial en el desarrollo de peces, puesto que falta que desarrollen sus funciones biológicas al máximo. Uno de los inmunoestimulantes más utilizados en acuicultura han sido los  $\beta$ -Glucanos de levadura, estos han demostrado tener características capaces de estimular células y proteínas relacionadas con el sistema inmune y mejorar el crecimiento, entre otros beneficios. Mejorar el sistema inmune en peces es prioridad, ya que ningún producto de origen farmacológico puede asegurar la ausencia de efectos negativos, como es la resistencia bacteriana, patologías adversas o incluso efectos en los consumidores y el medio ambiente. Sin embargo, existen otras alternativas que permiten atacar las enfermedades desde el individuo, como es reforzando sus defensas sin tener que hacer uso de productos ajenos a su naturaleza. Por lo tanto, en el presente trabajo se evaluó la adición de diferentes concentraciones  $\beta$ -Glucanos  $\beta$ -1/3,  $\beta$ -1/6 en larvas de *Atractosteus tropicus*, y se describieron los efectos que ejercen en el proceso de digestión (actividad enzimática), crecimiento y sistema inmunológico de los organismos.

## 4.- OBJETIVOS

### 4.1.- Objetivo general:

Determinar el efecto de  $\beta$ -Glucanos  $\beta$ -1/3,  $\beta$ -1/6 en el crecimiento, supervivencia, fisiología digestiva y sistema inmune en larvas de *A. tropicus*.

### 4.2.- Objetivos específicos:

1. Evaluar el crecimiento y supervivencia en larvas de *A. tropicus* con diferentes porcentajes de inclusión de  $\beta$ -Glucanos  $\beta$ -1/3,  $\beta$ -1/6 en la dieta.
2. Describir el efecto de la inclusión de  $\beta$ -Glucanos  $\beta$ -1/3,  $\beta$ -1/6 sobre la actividad de las enzimas digestivas en larvas de *A. tropicus*.
3. Evaluar la inclusión de  $\beta$ -Glucanos  $\beta$ -1/3,  $\beta$ -1/6 sobre la expresión de los genes de integridad de la membrana intestinal (*nod2*, *lys*, *muc2*, y *occ*) en larvas de *A. tropicus*.

## 5.- REFERENCIAS

- Abuajah, C. I., Ogbonna, A. C., & Osuji, C. M. (2015). Functional components and medicinal properties of food: a review. *Journal of food science and technology*, 52(5), 2522-2529.
- Joint FAO/WHO Codex Alimentarius Commission, Joint FAO/WHO Food Standards Programme, & World Health Organization. (2003). *Codex Alimentarius: Food hygiene, basic texts*. Food & Agriculture Org.
- Altmann, S., Rebl, A., Kühn, C., & Goldammer, T. (2015). Identification and de novo sequencing of housekeeping genes appropriate for gene expression analyses in farmed maraena whitefish (*Coregonus maraena*) during crowding stress. *Fish Physiology and Biochemistry*, 41(2), 397-412.
- Akhter, N., Wu, B., Memon, A. M., & Mohsin, M. (2015). Probiotics and prebiotics associated with aquaculture: a review. *Fish & shellfish immunology*, 45(2), 733-741.
- Ashouri, G., Soofiani, N. M., Hoseinifar, S. H., Jalali, S. A. H., Morshedi, V., Valinassab, T., ... & Carnevali, O. (2020). Influence of dietary sodium alginate and *Pediococcus acidilactici* on liver antioxidant status, intestinal lysozyme gene expression, histomorphology, microbiota, and digestive enzymes activity, in Asian sea bass (*Lates calcarifer*) juveniles. *Aquaculture*, 518, 734638.

Beaz-Hidalgo, R., Romalde, J. L., & Figueras, M. J. (2016). Expresión génica en peces a causa de infecciones causadas por *Aeromonas* spp. *Revista AquaTIC*, (37).

Benavides, O. A., González, F., Sáez, K., Chávez, R., & Hernández, M. (2018). Efectos adversos provocados en la descendencia de *Drosophila melanogaster* Meigen inducidos por antibióticos usados en salmonicultura. *Gayana (Concepción)*, 82(2), 139-155.

Betancourt, D. (2014). Efecto de *Lactobacillus plantarum* lab 9 sobre el crecimiento y sobrevivencia de alevinos y juveniles de tilapia roja (*Oreochromis* sp.). Universidad de Nariño Facultad de Ciencias Exactas Naturales. Departamento de Biología. San Juan de Pasto.

Bobade, H., Gupta, A., & Sharma, S. (2022). Beta-glucan. In *Nutraceuticals and Health Care* (pp. 343-358). Academic Press.

Bricknell, I., & Dalmo, R. A. (2005). The use of immunostimulants in fish larval aquaculture. *Fish & shellfish immunology*, 19(5), 457-472.

Cabello, F. C. (2004). Antibióticos y acuicultura en Chile: consecuencias para la salud humana y animal. *Revista médica de Chile*, 132(8), 1001-1006.

Cabello, F. C. (2006). Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environmental microbiology*, 8(7), 1137-1144.

- Calado, R., Olivotto, I., Oliver, M. P., & Holt, J. (Eds.). (2017). Marine ornamental species aquaculture (Vol. 712). Wiley Blackwell .
- Chen, Z., Lin, S., Jiang, Y., Liu, L., Jiang, J., Chen, S., & Wang, P. (2019). Effects of bread yeast cell wall beta-glucans on mice with loperamide-induced constipation. *Journal of medicinal food*, 22(10), 1009-1021.
- Chonchol, N., & Tovar, J. (1988). Dietary fiber content and starch digestibility in cassava bread. *Nutrition reports international*, 38(2), 437-443.
- Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Olvera-Novoa, M.A., Civera-Cerecedo, R. (2000). Avances en Nutrición Acuícola V: El uso de estimulantes inmunes en alimentos para peces y mariscos. *Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*. Medida, México. Pag. 47-56.
- Darwesh, O. M., Mahmoud, R. H., Abdo, S. M., & Marrez, D. A. (2022). Isolation of *Haematococcus lacustris* as source of novel anti-multi-antibiotic resistant microbes agents; fractionation and identification of bioactive compounds. *Biotechnology Reports*, 35, e00753.
- Del Cornò, M., Gessani, S., Conti, L. (2020). Shaping the innate immune response by dietary glucans: ¿any role in the control of cancer? *Cancers*, 12-1 155.
- Díaz, C.J., Gallego, F.A. (2016). Efecto de  $\beta$ -glucanos 1, 3/1, 6 sobre la viabilidad de larvas de *Oreochromis sp.* durante la etapa de reversión sexual. *Zoociencia*, 3-1.

- Duffin, P., Martin, D.L., Pagenkopp, Lohan, K.M., Ross, C. (2020). Integrating host immune status, (*Labyrinthula spp*). Load and environmental stress in a seagrass pathosystem: Assessing immune markers and scope of a new qPCR primer set. *PloS one*, 15 023-108.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) (2016). El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2016. Contribución a la seguridad alimentaria y la nutrición para todos. Roma. 224 pp.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). (2020). El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2020. *La sostenibilidad en acción*. SSN 2663-8649 Última Edición 243 p. Roma Italy.
- Farradia, Y., Sunarno, M.T.D., Syamsunarno, M.B. (2022). Developing Green Feed Toward Environment Sustainability in Freshwater Aquaculture in Indonesia. *development*, 1, 2.
- Fahie, K., Zachara, N.E. (2016). Molecular Functions of Glycoconjugates in Autophagy. *Journal of Molecular Biology*, 428(16), 3305–3324. doi:10.1016/j.jmb.2016.06.011
- Gadde, U., Kim, W.H., Oh, S.T., & Lillehoj, H.S. (2017). Alternatives to antibiotics for maximizing growth performance and feed efficiency in poultry: a review. *Animal health research reviews*, 18(1), 26-45.
- Guerrero-Zárate, R., Álvarez-González, C.A., Olvera-Novoa, M.A., Perales-García, N., Frías-Quintana, C.A., Martínez-García, R., Contreras-Sanchez, W.M. (2014).

- Partial characterization of digestive proteases in tropical gar (*Atractosteus tropicus*) juveniles. *Fish Physiology. Biochemistry.* 40 1021-1029.
- Guo, X., Li, J., Ran, C., Wang, A., Xie, M., Xie, Y., Zhou, Z. (2019). Dietary nucleotides can directly stimulate the immunity of zebrafish independent of the intestinal microbiota. *Fish & shellfish Immunology.* 86 1064-1071.
- He, J., Meng, Z., Lu, D., Liu, X., Lin, H. (2021). Recognition of MDP and activation of NF- $\kappa$ B by cytosolic sensor NOD2 in *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture.* 540 736-700.
- Jesús-Ramírez, F., Álvarez-González, C.A., Nolasco-Soria, H.G., Peña, E., Martínez-García, R., Camarillo-Coop, S., Pohlenz, C. (2017). Caracterización parcial de proteasas digestivas del chucumite (*Centropomus parallelus*). *Hidrobiológica*, 27(3), 419-427.
- Jenkins, D. J., Wolever, T. M., Leeds, A. R., Gassull, M. A., Haisman, P., Dilawari, J., & Alberti, K. G. (1978). Dietary fibres, fibre analogues, and glucose tolerance: importance of viscosity. *Br Med J*, 1(6124), 1392-1394.
- Kazuń, B., Małaczewska, J., Kazuń, K., Kamiński, R., Adamek-Urbańska, D., Żylińska-Urban, J. (2020). Dietary administration of  $\beta$ -1,3/1,6-glucan and *Lactobacillus plantarum* improves innate immune response and increases the number of intestine immune cells in roach (*Rutilus rutilus*). *BMC veterinary research*, 16(1), 1-10.

- Kühlwein, H., Emery, M. J., Rawling, M. D., Harper, G. M., Merrifield, D. L., & Davies, S. J. (2013). Effects of a dietary  $\beta$ -(1, 3)(1, 6)-D-glucan supplementation on intestinal microbial communities and intestinal ultrastructure of mirror carp (*Cyprinus carpio* L.). *Journal of Applied Microbiology*, 115(5), 1091-1106.
- Kühlwein, H., Merrifield, D.L., Rawling, M.D., Foey, A.D., Davies, S.J., (2014). Effects of dietary  $\beta$ -(1,3) (1,6)-D-glucan supplementations on growth performance, intestinal morphology and haemato-immunological profile of mirror carp (*Cyprinus carpio* L.). *J. animal physiol. animal nutrition*, 98 279-289.
- Li, L., Cardoso, J.C.R., Félix, R.C., Mateus, A.P., Canário, A.V.M., Power, D.M. (2020). Fish lysozyme gene family evolution and divergent function in early development. *Developmental & Comparative Immunology*, 114, 103772.
- Lizárraga-Velázquez, C.E., Hernández, C., González-Aguilar, G.A., Basilio-Heredia, J. (2018). Propiedades antioxidantes e inmunoestimulantes de polifenoles en peces carnívoros de cultivo. *Ciencia UAT* 12 127-136.
- Ma, D., Fan, J., Tian, Y., Jiang, P., Wang, J., Zhu, H., & Bai, J. (2019). Selection of reference genes for quantitative real-time PCR normalisation in largemouth bass *Micropterus salmoides* fed on alternative diets. *Journal of fish biology*, 95(2), 393-400.
- Martins, V. V., Zanetti, M. O. B., Pitondo-Silva, A., & Stehling, E. G. (2014). Aquatic environments polluted with antibiotics and heavy metals: a human health hazard. *Environmental Science and Pollution Research*, 21(9), 5873-5878.

- Martínez-Burguete, T., Peña-Marin, E. S., García-Gasca, A., Alvarez-González, C. A., & Llera-Herrera, R. (2021). Nutrigenomic marker discovery by de novo transcriptomic sequencing during early development of the tropical gar (*Atractosteus tropicus*). *Aquaculture Research*, 52(8), 3829-3842.
- Márquez-Couturier, G., Álvarez-González, C. A., Contreras-Sánchez, W. M., Hernández-Vidal, U., Hernández-Franyutti, A. A., Mendoza-Alfaro, R. E., & Goytortúa-Bores, E. (2006). Advances in food and nutrition alligator gar *Atractosteus tropicus*. *Avances en Nutrición Acuícola. V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*, 15, 446-523.
- Maytorena-Verdugo CI, Peña-Marín ES, Alvarez-Villagómez CS, Pérez-Jiménez GM, Sepúlveda-Quiroz CA, Alvarez-González CA (2022) Inclusion of Mannan-Oligosaccharides in Diets for Tropical Gar *Atractosteus tropicus* Larvae: Effects on Growth, Digestive Enzymes, and Expression of Intestinal Barrier Genes. *Fishes*. 7(3)-127. <https://doi.org/10.3390/fishes7030127>
- McCance, R.A., Lawrence, R.D. (1929). *The Carbohydrate Content of Foods*. London: HMSO *The Carbohydrate Content of Foods*. 135.
- Méndez-Marin, O., Hernández Franyutti, A. A., Álvarez-González, C. A., Contreras-Sánchez, W. M., & Uribe Aranzábal, M. C. (2012). Histología del ciclo reproductor de hembras del pejelagarto *Atractosteus tropicus* (*Lepisosteiformes: Lepisosteidae*) en Tabasco, México. *Revista de Biología Tropical*, 60(4), 1857-1871.

- Miest, J.J., Arndt, C., Adamek, M., Steinhagen, D., Reusch, B.H. (2016). Dietary  $\beta$ -glucan (MacroGard®) enhances survival of first feeding turbot (*Scophthalmus maximus*) larvae by altering immunity, metabolism and microbiota. *Fish & Shellfish Immunology*.4894–104.
- Miller, R.R., Minckley, W.L., Norris, S.M. (2005). *Freshwater fishes of Mexico*. University of Chicago. Association with the Museum of Zoology, University of Michigan. (No. QL 629. M54 2005)
- Mishra, N., Mishra, P., Mishra, R.R., Adetunji, C.O. (2020). Cereal  $\beta$  Glucan as a Functional Ingredient. (eds) *Innovations in Food Technology*. Springer, Singapore.
- Mioso, R., Marante, F.J., Laguna, I.H., Bessonart, M. (2014). Natural products chemistry applied to aquaculture: an interdisciplinary review *Química, Nova* 37-3.
- Moreno, J.A.M., López, J.C.H., Urcuqui-Inchima, S. (2014). La estimulación de TLR, receptores tipo NOD y dectina-1 en neutrófilos humanos induce la producción de citocinas proinflamatorias. *Iatreia*, 27(2), 135-146
- Mugwanya, M., Dawood, M. A., Kimera, F., & Sewilam, H. (2021). Updating the role of probiotics, prebiotics, and symbiotics for tilapia aquaculture as leading candidates for food sustainability: A review. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 1-28.

- Nájera-Arzola, I.C., Álvarez-González, C.A., Frías-Quintana, C.A., Peña, E., Martínez-García, R, Camarillo-Coop, S., Gisbert, E. (2018). Evaluación de oligosacáridos de manano (MOS) en dietas balanceadas para juveniles de pejelagarto (*Atractosteus tropicus*). *Hidrobiológica*, 28 239-246.
- Nelson, S.J. (2006). *Fishes of the World*. 4<sup>th</sup> Edition. A Wiley-Interscience publication. EEUU. 601 p.
- Nieves-Rodríguez, K. N., Álvarez-González, C. A., Peña-Marín, E. S., Vega-Villasante, F., Martínez-García, R., Camarillo-Coop, S., ... & Gisbert, E. (2018). Effect of  $\beta$ -glucans in diets on growth, survival, digestive enzyme activity, and immune system and intestinal barrier gene expression for tropical gar (*Atractosteus tropicus*) juveniles. *Fishes*, 3 (3), 27.
- Nunes, A.C., Sena, M.M., Garcia, S.B., Pereira, P.L., Trugilo, K.P., Watanabe, A.E., de Oliveira, K.B. (2016). Análise da deleção 32 do receptor de quimiocina CCR5 em descendentes asiáticos em Maringá-Paraná. *Biosaúde*, 15 12-21.
- NIM (Nutrition Institute of Medicine). (2001). Panel on the Definition of Dietary Fiber Staff, Food and Nutrition Board Staff. Dietary Reference Intakes: Proposed Definition of Dietary Fiber: A Report of the Panel on the Definition of Dietary Fiber and the Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes. National Academy Press.
- Penagos, G., Barato, P., Iregui, C. (2009). Immune System and Vaccination In Fish. *Acta Biológica Colombiana*, 14 1, 3-26.

- Pérez-Jiménez GM, Peña-Marín ES, Maytorena-Verdugo CI, Sepúlveda-Quiroz CA, Jiménez-Martínez LD, De la Rosa-García S, Alvarez-Villagomez CS (2022) Incorporation of Fructooligosaccharides in Diets Influence Growth Performance, Digestive Enzyme Activity, and Expression of Intestinal Barrier Function Genes in Tropical Gar (*Atractosteus tropicus*) Larvae. *Fishes* 7(3): 137.
- Piazzon, M.C., Caldach-Giner, J.A., Fouz, B., Estensoro, I., Simó-Mirabet, P., Puyalto, M., Pérez-Sánchez, J. (2017). Under control: how a dietary additive can restore the gut microbiome and proteomic profile and improve disease resilience in a marine teleostean fish fed vegetable diets. *Microbiome*, 5 1-164.
- Pionnier, N., Falco, A., Miest, J., Frost, P., Imazarow, I., Shrive, A. (2013). Dietary B-Glucan stimulates complement and acute-phase C-reactive protein responses in common carp (*Cyprinus carpio*) during a *Aeromonas salmonidica* infection. *Fish Shellfish Immunology*. 34 819-31.
- Pizarro, S., Ronco, A.M., Gotteland, M. (2014). Betaglucanos: ¿Qué tipos existen y cuáles son sus beneficios en la salud? *Revista chilena de nutrición*, 41(4), 4339-446.
- Puerta-Rico, L.F. (2016). Coeficientes de digestibilidad aparente de materias primas alternativas en Cachama blanca (*Piaractus brachypomus*) y sus efectos sobre el desarrollo morfométrico de las vellosidades intestinales. Departamento de Producción Animal.

- Pyo, C.W., Hur, S.S., Kim, Y.K., Choi, H.B., Hong, Y.S., Kim, D.W., Kim, T.G. (2003). Polymorphisms of *IL-1B*, *IL-1RN*, *IL-2*, *IL-4*, *IL-6*, *IL-10*, and *IFN-γ* genes in the Korean population. *Human Immunology.*, 64 979–989.
- Rassier, G.T., Silveira, T.L., Remião, M.H., Daneluz, L.O., Martins, A.W., Dellagostin, E.N., Campos, V.F. (2020). Evaluation of qPCR reference genes in GH-overexpressing transgenic zebrafish (*Danio rerio*). 10(1), 1-15
- Rendón, L., Balcázar, J.L. (2016). Inmunología de camarones: Conceptos básicos y recientes avances. *Revista AquaTIC*, (19).
- Rodríguez, I., Chamorro, R., Novoa, B., & Figueras, A. (2009). β-Glucan administration enhances disease resistance and some innate immune responses in zebrafish (*Danio rerio*). *Fish & shellfish immunology*, 27(2), 369-373.
- Rojas, M., Aceituno, P., Salvador, M. E., García-Ordoñez, M., Teles, M., del Mar Ortega-Villaizan, M., Roher, N. (2022). How modular protein nanoparticles may expand the ability of subunit anti-viral vaccines: The spring viremia carp virus (SVCV) case. *Fish & Shellfish Immunology*.
- Rubio-Godoy, M. (2010). Inmunología de los peces óseos: Revisión. *Revista mexicana de ciencias pecuarias*. 1(1), 47-57
- Sanabria-Parrado, Y. A. (2016). Historia de la Acuicultura en Colombia. *Revista científica de la Sociedad Española de Acuicultura AquaTIC*, (37). Pp. 60-77.

- Santos, L., Ramos, F. (2018). Resistencia a los antimicrobianos en acuicultura conocimiento actual y alternativas para abordar el problema. *Int. J. Antimicrobiano. Agentes*. 52, 135–143.
- Selvaraj, V, Sampath, K., Sekar. V. (2005). Administration of yeast glucan enhances survival and some non-specific and specific immune parameters in carp (*Cyprinus carpio*) infected with *Aeromonas hydrophila*. *Fish Shellfish Immunology*. 19:293–306.
- Sepúlveda, C., Peña-Marín, E., Pérez-Morales, A., Martínez-García, R., Maytorena, C., Camaillo-Coop, S, Perez-Sirkin, D., Tovar-Ramírez, D., Galaviz, M., Álvarez-González, C.A. (2018). Fructooligosaccharide supplementation and its effect on tropical gar (*Atractosteus tropicus*) juvenile: Effects on growth, digestive enzyme, gut morphology and epithelial integrity expression. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Academic Division of Biological science; Consejo Nacional de Ciencia y *Tecnología, Aquaculture Research*, 52, 37-50.
- Shao, Z. J. (2001). Aquaculture pharmaceuticals and biologicals: current perspectives and future possibilities. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 50, 229–243.
- Thépot, V., Campbell, A.H., Rimmer, M.A., Jelocnik, M., Johnston, C., Evans, B., Paul, N.A. 2022. Dietary inclusion of the red seaweed (*Asparagopsis taxiformis*) boosts production, stimulates immune response and modulates gut microbiota in Atlantic salmon, (*Salmo salar*). *Aquatic.*, 546 737-286.
- Silva, D.G., Domingues, C.P., Figueiredo, J.F., Dionisio, F., Botelho, A., Nogueira, T. (2022). Estuarine Aquacultures at the Crossroads of Animal Production and

- Antibacterial Resistance: A Metagenomic Approach to the Resistome. *Biology*, 11(11), 1681.
- Trowell, H.C. 1976. Dietary fibre. In *Diet Related to Killer Diseases: Hearings Before the Select Committee on Nutrition and Human Needs of the United States Senate, Ninety-fifth Congress, First Session (No. 4, p. 123)*. US Government Printing Office.
- Van-Doan, H., Hoseinifar, S.H., Tapingkae, W., Tongsir, S., Khamtavee, P. (2016). Combined administration of low molecular weight sodium alginate boosted immunomodulatory, disease resistance and growth enhancing effects of *Lactobacillus plantarum* in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fish & Shellfish Immunology*. 58, 678–685.
- Wood, P. J., Weisz, J., & Mahn, W. (1991). Molecular characterization of cereal  $\beta$ -glucans. II, Size-exclusion chromatography for comparison of molecular weight. *Cereal Chemistry*, 68(5), 530-536.
- Wood, P. J. (2007). Cereal  $\beta$ -glucans in diet and health. *Journal of cereal science*, 46(3) 230-238.
- Xu, H., Jiang, Y., Xu, X., Su, X., Liu, Y., Ma, Y., ... & Cao, X. (2019). Inducible degradation of lncRNA Sros1 promotes IFN- $\gamma$ -mediated activation of innate immune responses by stabilizing Stat1 mRNA. *Nature Immunology*, 20(12), 1621-1630.

Xue, C., Xi, B., Ren, M., Dong, J., Xie, J., & Xu, P. (2015). Molecular cloning, tissue expression of gene Muc2 in blunt snout bream *Megalobrama amblycephala* and regulation after re-feeding. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 33(2), 291-298.

Zheng, Y., Hu, G., Wu, W., Zhao, Z., Meng, S., Fan, L., Chen, J. (2019). Transcriptome analysis of juvenile genetically improved farmed tilapia (*Oreochromis niloticus*) livers by dietary resveratrol supplementation. *Comparative Biochemistry. Physiology*. 223, 1-8.

Universidad Juárez Autónoma De Tabasco.  
México.

**Adición del  $\beta$ -glucanos en dietas para larvas del pejelagarto (*Atractosteus tropicus*): efectos en el crecimiento, enzimas digestivas y expresión de genes de la integridad del epitelio intestinal y sistema inmune.**

L.A. Cigarroa-Ruiz<sup>1</sup>, F.J. Toledo-Solís<sup>2</sup>, S.A. Frías-Gómez<sup>3</sup>, R. Guerrero-Zárate<sup>1</sup>, S. Camarillo-Coop<sup>1</sup>, C.S. Alvarez-Villagómez<sup>1</sup>, E.S. Peña-Marín<sup>4</sup>, M.A. Galaviz<sup>5</sup>, R. Martínez-García<sup>1</sup>, C.A. Álvarez-González<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Laboratorio de Fisiología en Recursos Acuáticos, División Académica de Ciencias Biológicas, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco (UJAT), 0.5 km Carretera Villahermosa-Cárdenas, 86000, Villahermosa, Tabasco, México.

<sup>2</sup>Centro de Investigaciones Costeras, Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas (UNICACH), Calle Juan José Calzada s/n, 30500, Tonalá, Chiapas, México.

<sup>3</sup>Laboratorio de Producción Acuícola FES Iztacala. Av. De Los Barrios 1, Los Reyes Iztacala, Barrio de los Héroes, 54090, Tlalnepantla de Baz, México.

<sup>4</sup>Instituto de Investigaciones Oceanológicas, Universidad Autónoma de Baja California (UABC), Carr. Transpeninsular 3917, 22870, Ensenada, Baja California, México.

<sup>5</sup>Facultad de Ciencias Marinas, Universidad Autónoma de Baja California (UABC), PO Box 76, 22860, Ensenada, Baja California, México.

## RESUMEN

Se evaluó el efecto prebiótico del  $\beta$ -glucanos 1,3/1,6 de levadura *Saccharomyces cerevisiae* en distintos porcentajes de inclusión (0.0, 0.2, 0.4, 0.6 y 0.8%) en la dieta para larvas de pejelagarto (*Atractosteus tropicus*) sobre el crecimiento, actividad enzimática digestiva y expresión genómica del sistema inmune. El bioensayo inicio a partir del 3 día después de la eclosión (dde) y duró un periodo de 21 días, en donde se utilizó un total de 1500 larvas de  $0.055 \pm 0.008$  g y longitud total de  $2.46 \pm 0.26$  cm. La larvicultura se realizó en un sistema de recirculación con 15 tanques de  $70 \text{ L}^{-1}$  utilizando una densidad de 100 organismos por unidad experimental. No se observaron diferencias significativas en el crecimiento de las larvas por la inclusión de los  $\beta$ -glucanos ( $p > 0.05$ ). Las enzimas digestivas muestran cambios en las actividades de lipasa y tripsina, presentando valores mayores en los peces alimentados con dietas de 0.6% y 0.8% de  $\beta$ -glucanos comparados con los otros tratamientos ( $p < 0.05$ ). La actividad de L-aminopeptidasa, quimotripsina, fosfatasa ácidas y alcaninas mostraron variaciones superiores en las larvas alimentadas con la dieta de 0.4% de  $\beta$ -glucanos respecto al grupo control. La expresión relativa de los genes de la integridad de la membrana intestinal (mucina 2) *MUC-2*, (*occludinas*) *OCC*, (dominio de oligomerización de unión a nucleótidos) *NOD-2* y del sistema inmune *LYS* (*lisosima*), mostró una sobreexpresión en las larvas alimentadas con la dieta de 0.4%  $\beta$ -glucanos respecto al resto de los tratamientos ( $p < 0.05$ ). En conclusión, la inclusión de  $\beta$ -glucanos en 0.4% a 0.6% en dietas para las larvas de *A. tropicus* podría ayudar en el larvi-cultivo, al observarse efectos en el incremento la actividad de varias enzimas digestivas y la expresión de genes del sistema inmunitario por la adición de  $\beta$ -glucanos.

*Palabras claves:*  $\beta$ -glucanos , prebiótico, pejelagarto, actividad enzimática, expresión génica.

Universidad Juárez Autónoma De Tabasco.  
México.

## INTRODUCCIÓN

En la actualidad hay un mercado enfocado en mejorar la salud y supervivencia de peces, adicionando a las formulaciones diversos tipos de prebióticos. Los comúnmente probados en peces son GOS (galactooligosacáridos), MOS (mannanligosacáridos), FOS (fructooligosacáridos) scFOS (fructooligosacáridos de cadena corta), XOS (xylooligosacáridos), AXOS (arabinoxilooligosacáridos) e inulina, así como otras mezclas prebióticas (Guerreiro *et al.*, 2017). Además, dependiendo de las fuentes de los prebióticos, encontramos diferentes atributos benéficos, como la sustitución de grasas y azúcares la mejora de palatabilidad por medio de la lubricación de la lengua, e incluso la mejora de la respuesta inmune (Singla, 2017; Khangwal *et al.*, 2019). El polisacárido  $\beta$ -1,3/1,6-glucano es uno de los inmunoestimulantes más usados en acuicultura (Miest *et al.*, 2016). Este prebiótico es clasificado como una fibra dietética con particularidades para mejorar la respuesta inmune innata, a nivel de citoquinas promueve un mejor crecimiento y tolerancia al estrés, permitiendo mejorar las tasas de supervivencia (Wood, 2007; Pizarro *et al.*, 2014; Dos Santos *et al.*, 2019; Revina *et al.*, 2020)

De esta manera, los  $\beta$ -glucanos son un ingrediente valioso y funcional con propiedades importantes a nivel fisiológico, una de las características principales de los  $\beta$ -glucanos de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* son las funciones inmunoestimulantes (Wilson *et al.*, 2015). Los efectos de  $\beta$ -glucanos se han evaluado en peces como *Danio rerio* inoculados con el patógeno *Aeromonas hydrophila*, en donde su efecto disminuyó la mortalidad (Rodríguez *et al.*, 2009), al estimular los  $\beta$ -glucanos las proteínas como quimiocinas y citocinas, las cuales están involucradas en el proceso de atracción y migración de los leucocitos que intervienen como antígenos (Nunes *et al.*, 2016).

Asimismo, la adición de  $\beta$ -glucanos aumenta la expresión del gen *IFN- $\gamma$*  (Interferón gamma), el cual juega un importante papel en la respuesta inmune innata (Xu *et al.*, 2019). Por otra parte, el gen *muc-2* es un liberador de mucinas para permitir el mantenimiento del sistema gástrico referente a su lubricación, al crear una barrera de protección y permeabilidad en contra de agentes patógenos (Pelaseyed *et al.*, 2014; Xue *et al.*, 2015). Así también, las ocludinas son proteínas de membrana con una función hermética a nivel citoplasmático y permiten la reorganización celular de actina lo que posibilita funciones de movimiento, división celular, fagocitosis y actividades de manera externa (García & Jay, 2006; Edelblum & Turner, 2015; Kuo *et al.*, 2019). El gen *nod-2* (Proteína del Dominio de Oligomerización de unión de nucleótidos) forma parte de la familia intracelular, expresado en la región epitelial específicamente en células Paneth involucradas en el funcionamiento de células madre, morfogénesis intestinal y principalmente por ser agentes antimicrobianos en la región de la microbiota (Caruso *et al.*, 2014; Gassler, 2017). Por otra parte, la lisozima forma parte de la comunidad de proteínas asociadas al sistema inmune innato, producida a partir de neutrófilos y macrófagos; que fungen como receptores de las familia NOD para la degradación de la pared celular bacteriana (Ragland *et al.*, 2017; Kawai *et al.*, 2018).

En otro orden de ideas, en el Sureste de México existen peces nativos con potencial para su cultivo, entre ellas, el pejelagarto (*Atractosteus tropicus*) es una de las especies dulceacuícolas más importantes en el Estado de Tabasco. Esta especie habita en cuerpos de agua dulce en vegetación abundante (Miller *et al.*, 2005). Es un espécimen valorado culturalmente, tiene un alto potencial productivo en la región y es un importante modelo biológico (Méndez-Marín *et al.*, 2012; Márquez-Couturier, 2015; Vázquez-Navarrete, 2015). La mayor parte de los trabajos se han enfocado en la

nutrición para desarrollar los alimentos específicos, como en la determinación del requerimiento de proteínas y lípidos, diseño de dietas micro encapsuladas, sustitución del alimento vivo, fisiología digestiva, entre otros (Márquez-Couturier *et al.*, 2006; Frías-Quintana *et al.*, 2016; Sáenz de Rodrigáñez *et al.*, 2018; Huerta-Ortiz *et al.*, 2018; Jiménez-Martínez *et al.*, 2020). Recientemente, se comenzó a explorar la evaluación de los aditivos funcionales en dietas para juveniles de *A. tropicus* al incluir  $\beta$ -glucanos 1,3/1,6, en donde la inclusión entre 1.0 y 1.5% mejora el crecimiento, la respuesta de genes del sistema inmune e incremento de la actividad de proteasas alcalinas, tripsina, leucina aminopeptidasa y  $\alpha$ -amilasa (Nieves *et al.*, 2018). Incluyendo además a FOS (Fructooligosacárido) como otro de los aditivos selectos en acuicultura, mejorando la actividad enzimática (proteasas ácidas, quimotripsina y leucina aminopeptidasa), la expresión de genes de la barrera intestinal (*occ*, *muc2*, *nod2*,  *$\beta$ -actina*, *ef1-a*) y la modificación de la morfología en la barrera intestinal, a partir de 5 g/kg<sup>-1</sup> para la etapa juvenil (Sepúlveda-Quiroz *et al.*, 2020), por consiguiente debido a los efectos potenciadores que ha conseguido para la especie, se ha puesto a prueba algunos otros como MOS (oligosacáridos de manano) con resultados favorables en los índices de crecimiento, la actividad enzimática digestiva y marcadores inmunitarios (Nájera-Arzola *et al.*, 2018). De esta forma, en el presente trabajo se evaluó la inclusión de  $\beta$ -glucanos 1,3/1,6 en las dietas para larvas de *A. tropicus* y sus efectos en el crecimiento, actividad de las enzimas digestivas y la expresión de genes de la integridad de la membrana y sistema inmune.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Obtención de organismos

El experimento se realizó en el Laboratorio de Fisiología en Recursos Acuáticos (LAFIRA) de la División Académica de Ciencias Biológicas (DACBIOL) de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco (UJAT). Los organismos para el experimento se obtuvieron de un lote de reproductores de *A. tropicus* que dispone el laboratorio (una hembra de 3.8 kg y cinco machos de 1.5 kg), mediante un desove inducido por la hormona sintético GnRH (Sincroforte) aplicada vía intramuscular (utilizando  $1 \mu\text{g} \cdot \text{kg}$  de pez<sup>-1</sup>).

### Diseño experimental

En este experimento se evaluó el efecto de  $\beta$ -glucanos 1,3/1,6 en porcentajes de inclusión del 0%, 0.2%, 0.4%, 0.6% y 0.8% (nombradas dieta control; dieta 0.2, dieta 0.4, dieta 0.6 y dieta 0.8, respectivamente) en larvas de *A. tropicus*. El bioensayo se efectuó durante un periodo de 21 días (24 DAH) a partir de la eclosión (3 dde) y se utilizaron un total de 1500 organismos (100 peces por unidad experimental por triplicado). La alimentación de las larvas se realizó 5 veces al día a saciedad aparente (8:00, 10:30, 12:30, 15:30 y 18:30 horas), esto de acuerdo con el esquema de alimentación propuesto por Frías-Quintana *et al.*, (2015). El experimento se realizó en un sistema de recirculación conectado a 15 tanques de 70 L<sup>-1</sup> con flujo constante de 10 L<sup>-1</sup>/min y un filtro biológico. La calidad del agua se monitoreó todos los días con una sonda multiparamétrica HANNA (HI9829-00041), midiéndose temperatura ( $30.6 \pm 0.14$  ° C), pH ( $7.1 \pm 0.04$ ) y oxígeno disuelto ( $3.4 \pm 0.34$  mg L<sup>-1</sup>). Además, se sifoneó el

sobrante de alimento al final del día y cada 48 horas se realizó un recambio del 20% de agua al sistema.

#### Formulación y elaboración de dietas experimentales

En la tabla 1 se muestra la formulación de las dietas con la adición de los distintos porcentajes de  $\beta$ -glucanos 1,3/1,6 realizadas a partir de la dieta base propuesta por Frías-Quintana *et al.* (2015). La elaboración de las dietas semipurificadas se realizó por el protocolo propuesto por Álvarez-González *et al.*, (2001), las cuales fueron isoproteicas, isolipídicas e isoenergéticas. Los análisis proximales se determinaron de acuerdo con los métodos oficiales de la Asociación Oficial de Química Analítica (AOAC, 2005). La ceniza a partir de incinerar la dieta en una mufla a 550° C por 24 hora. La determinación proteína se realizó con el método Kjeldahl utilizando ácido clorhídrico como medio para atraparlo e hidróxido sódico para la cuantificación. Los lípidos se cuantificaron mediante la técnica descrita por Bligh & Dyer, (1959) y el extracto libre de nitrógeno (NFE) descrito por Brett & groves, (1979).

**Tabla 1.** Formulación y composición de dietas experimentales para larvas de *A. tropicus*

Ingredientes	DIETAS				
	Control	0.2	0.4	0.6	0.8
Harina de Pescado <sup>a</sup>	29.8	29.8	29.8	29.8	29.8
Harina de Ave <sup>a</sup>	15.00	15.00	15.00	15.00	15.00

Harina de Puerco <sup>a</sup>	15.00	15.00	15.00	15.00	15.00
Harina de Soya 44% <sup>a</sup>	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00
Almidón de Maiz <sup>b</sup>	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00
Trigo <sup>e</sup>	8.66	8.46	8.26	8.06	7.86
Aceite de Pescado <sup>c</sup>	4.1	4.1	4.1	4.1	4.1
Lecitina de Soya <sup>d</sup>	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00
β-Glucano 1,3/1,6	0.00	0.20	0.40	0.60	0.80
Premix de vitamina <sup>e</sup>	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Grenetina <sup>g</sup>	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
Vitamina C <sup>h</sup>	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
<b>Total</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>
<b>Composición Proximal (%)*</b>					
Energía (KJ/g)	17.70	17.69	17.68	17.69	17.74
Proteína Cruda	44.0	43.89	44.25	43.71	43.92
Extracto de Éter	15.01	14.02	14.56	14.83	15.07
Ceniza	15.09	13.76	13.57	13.32	13.78
NFE <sup>1</sup>	27.4	27.39	27.45	28.05	27.28

\*Los datos proximales fueron generados a partir de la dieta teórica base.

<sup>a</sup>Proteínas marinas y agrícolas S.A. de C.V., Guadalajara, Jalisco; <sup>b</sup>Pronat Ultra, Merida, Yucatán, Mexico; <sup>c</sup>Ragasa Industrias S.A. de C.V.; <sup>d</sup>Agaviótica, Monterrey, Nuevo León; <sup>e</sup>Vitamina premix MARCA DEL PREMIX <sup>h</sup>D'gari, alimentos y productos dietéticos relámpago, S.A. de C.V.; <sup>g</sup>ROVIMIX® STAY-C® 35 –DSM, Guadalajara, Mexico; <sup>i</sup>GELPHARMA S.A. de C.V.

## Índices de crecimiento

Al finalizar el bioensayo se evaluó el crecimiento, para el peso húmedo se utilizó una balanza digital (Ohaus HH120) y la longitud total se midió con el Software imageJ (NIH, Bethesda, MD, Estados Unidos) (White *et al.*, 2006). Asimismo, se calcularon los siguientes índices zootécnicos de acuerdo con lo propuesto por Tomás-Almenar *et al.*, (2020):

Ganancia en peso (WG) = [(peso final - peso inicial) / peso inicial] x 100;

Tasa de crecimiento específica (SGR) = [(Ln peso final - Ln peso inicial) / números de días] x 100;

Tasa de conversión alimenticia (FCR) = alimento consumido (g) / peso ganado (g);

Sobrevivencia (%) = (núm. final de organismos / núm. inicial de organismos) x 100.

Factor de conversión alimenticia FCR = Total de alimento consumido (g) / Ganancia en peso (g).

## Actividad enzimática digestiva

Al finalizar el experimento se tomaron tres larvas por unidad experimental (n=9 por tratamiento) para determinar la actividad de las enzimas digestivas. Las larvas se sacrificaron a partir de un shock térmico (-2 °C), para después ser disectadas y extraer el estómago e intestino. A partir de las muestras de los órganos se realizó la preparación de los extractos multi-enzimáticos, para lo cual los órganos fueron homogenizados en frío (4 °C) en un volumen 1:10, con un homogeneizador Ultra-Turrax en solución 1:10 de agua destilada, las muestras homogeneizadas se

centrifugaron (12,000 g por 15 min a 4 °C) y el sobrenadante separó en alícuotas de 60 µL en tubos eppendorf para ser congelados a -80 °C hasta su posterior uso.

Para la concentración de proteína se realizó por la técnica de Bradford (1976) utilizando como estándar una curva de albúmina de suero bovino. La actividad de proteasas ácidas se midió por la técnica de Anson (1938), utilizando como sustrato hemoglobina (0.25%) disuelta con buffer en tampón de Glicina-HCl 100 mmol L<sup>-1</sup> a pH 2 y 37 °C. La actividad proteasas alcalinas por la técnica descrita por Kunitz (1947) modificada por Walter (1984) utilizando caseína (1%) as a sustrato in 100 mmol L<sup>-1</sup>Tris-HCl buffer, 10 mmol L<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub> (pH = 9.0) a 37° C. Para ambas técnicas se utilizaron 15 µl de extracto, 15 minutos de reacción, un coeficiente de extinción molar (CEM) de 0.008 y la lectura a una absorbancia de 280 nm. La actividad tripsina por la técnica de Erlanger *et al.* (1961) utilizando 20 µl de extracto enzimático en sustrato BAPNA (N-α-Benzoil-DL-Arginina P-nitroanilida) 2mM diluido en un buffer de Tris-HCL 50mM + CaCl<sub>2</sub> pH 8. La actividad quimotripsina por la técnica descrita por Del Mar *et al.* (1979) utilizando 15 µl de extracto en sustrato SAPNA (succinyl-(Ala)<sub>2</sub>-Pro-Phe-p-nitroanilida) 1.25 mMol L<sup>-1</sup> con tampón Tris-HCl 50mM (pH 8.0) con un tiempo de reacción de 30 min. La actividad leucina-aminopeptidasa por la técnica descrita por Maraux *et al.* (1973) usando L-leucina-p-nitroanilida 1 mmol L<sup>-1</sup> como sustrato en buffer fosfato sódico 50 mMol L<sup>-1</sup> a pH 7.8 y 37 °C para las técnicas descritas anteriormente con 15 µl de extracto con un tiempo de reacción 30 min. La medición de estas técnicas se realizó a una absorbancia de 410 nm, utilizándose un CEM de 964 para quimotripsina y de 8800 para tripsina y L-aminopeptidasa. La actividad de lipasa por la técnica descrita por Versaw *et al.* (1989) usando 10 µl de extracto enzimático con β-naftil caprilato 100 mmol L<sup>-1</sup> como sustrato en buffer Tris-HCl 50 mmol L<sup>-1</sup> con colato de sodio 100 mMol L<sup>-1</sup> a pH 7.5 a 37° C

realizado con un tiempo de incubación de 15 min, se utilizó un CEM de 0.02 y una absorbancia 540 nm. La actividad  $\alpha$ -amilasa por la técnica de Somoyi-Nelson descrito por Robyt & Whelan (1968), utilizando 15  $\mu$ l de extracto en almidón (2%) como sustrato en tampón fosfato-sodio 100 mmol L<sup>-1</sup>, NaCl 50 mmol L<sup>-1</sup> a pH 7.5 con un tiempo de incubación de 30 min, un CEM 133.87 y una absorbancia de 540 nm. Finalmente, para medir las actividades de fosfatasa ácida y alcalina se utilizó la técnica de Bergmeyer, (1974) utilizando 4-nitrofenilfosfato al 2.04% para fosfatasas ácidas en buffer de ácido cítrico y citrato de sodio (1:1 p/p) 0.1 mmol L<sup>-1</sup> a pH 5.5, en buffer de glicina NaOH 0.1 mmol L<sup>-1</sup> a pH 10 para fosfatasas alcalinas, con un tiempo de incubación de 15 min, 10  $\mu$ l de extracto, un CEM 18.5 y absorbancia de 280 nm. Las actividades de todas las enzimas se calcularon con las siguientes ecuaciones: 1) Unidad por ml = ( $\Delta$ abs x volumen final de la reacción (ml)) x (CEM x tiempo (min) x volumen del extracto (ml)); 2) Unidades por mg de proteína = Unidades por ml / mg de proteína soluble.

#### Análisis de expresión molecular

En la evaluación de la expresión de genes involucrados en la respuesta de protección de la barrera *nod-2* (Nucleotide-Binding and Oligomerización Domain), *muc2* (Mucin2), y *occ* (Ocludin) y del sistema inmune *lys* (Lysosima), los primers se diseñaron a partir del transcriptoma de *A. tropicus* (Martínez-Burguete *et al.*, 2021) y se utilizaron como genes de referencia el *ef1a* (Elongation factor 1) y  $\beta$ -Actin (BAC) donde la expresión relativa, fue calculada del promedio de ambos genes de referencia confrontada con el control (Livak & Schmittgen, 2001; ver tabla 2). Para ello, se realizó el muestreo de tres larvas (24 h de inanición) por unidad experimental (N=9 por tratamiento), las cuales

fueron sacrificadas con un shock frío (-2 °C) y se conservaron en RNA later (volumen 1:10) por 24 horas y luego se almacenaron a - 80 °C hasta su uso. El ARN total se extrajo con reactivo trizol (Invitrogen® código de reactivo) según las instrucciones del fabricante y se cuantificó el ARN total por espectrofotometría (A260/280) con un nanodrop Jenway®. Posteriormente se realizó la síntesis de ADNc a partir de 1.5 µg de ARN total de las muestras, bajo las especificaciones del kit iScript™ Reverse Transcription Supermix for RT-PCR (BIO-RAD®), utilizándose oligo (dT) y/o random primers en una reacción de volumen final de 20 µl por muestra. El ADNc se almacenó a - 80 °C hasta su posterior análisis.

La cuantificación de la expresión relativa de los genes se realizó por análisis de qPCR, utilizando un termociclador CFX96 Touch™ Real-Time (Bio-Rad) en una reacción de volumen total de 10 µL por muestra, donde se utilizaron 5 µL de SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix (Bio-Rad), 4.5 µL ADNc, 0.5 µl de primers (10 µmol). Todas las reacciones se realizaron usando las siguientes condiciones: 1 ciclo de 50°C por 2 min, seguidos de 1 ciclo 95°C por 10 min, 40 ciclos 95°C por 15 segundos y 60°C por 1 minuto, y finalizaron con una curva melting bajo condiciones estándar del programa de 60 ciclos para confirmar la amplificación de un solo producto en cada reacción.

**Tabla 2.** Secuencia de referencia de oligonucleótidos para genes de defensa de la barrera intestinal para qPCR de *Atractosteus tropicus*.

Nombre del Gen	Símbolos	Oligo	Secuencia de primer (5'-3')	Temp. (°C)
Dominio de unión a nucleótidos y oligoma-2	<i>nod-2</i>	-F	GTAGTGAACAAGGAGGCGGAC	66°
		-R	TGAGCTCATCCAGGCCATCG	64°
Ocludina	<i>occ</i>	-F	TGACGAATACCACAGACTGAAG	64°
		-R	CGATCATAGTCGCTGACCATC	64°
Mucina-2	<i>muc-2</i>	-F	GGCCTCCTCAAGAGCAGCACGGTG	70°
		-R	TCTGCACGCTGGAGCACTCAATG	72°
Lisozima	<i>lys</i>	-F	CACTGCAGCCATCAATCACAAC	66°
		-R	ATTAGTCAGCAGCTTGCTGCAG	66°
Factor de elongación 1	<i>ef1</i>	-F	ACGCTGAAGGCCGGCATGGTG	70°
		-R	GGATGTCCTTCACCGACACGTTC	72°
β-actina	<i>bac</i>	-F	GTCATCACCATTGGCAATGAGAG	68°
		-R	GACAGTACAGTGTGGCATAACAG	68°

#### Análisis estadístico

Todos los datos se analizaron mediante la prueba de la normalidad (Kolmogorov Smirnov) y homocedasticidad (Levene). Los datos de crecimiento se analizaron mediante un análisis de la varianza (ANOVA) de una vía y como prueba a posteriori se utilizó la prueba Tukey. En los análisis de la actividad enzimática y expresión génica se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis y a posteriori la prueba de Nemenyi. Todos los análisis se realizaron en el programa estadístico Statistica 7 y se utilizó un nivel de significancia de  $p < 0.05$ .

## RESULTADOS

### Índices de crecimiento

Las larvas de *A. tropicus* alimentadas durante 21 días con los distintos porcentajes de inclusión de  $\beta$ -glucanos no mostraron diferencias significativas en el crecimiento (peso húmedo y longitud total) con respecto a las larvas alimentadas con la dieta control ( $p>0.05$ ). Los índices de crecimientos tampoco mostraron diferencias significativas comparados con las larvas alimentadas con el tratamiento control ( $p>0.05$ ). Únicamente, en el porcentaje de sobrevivencia de las larvas alimentadas con las dietas Control, dieta 0.2% y dieta 0.6% presentaron valores estadísticos significativos mayores, a las larvas alimentadas con las dietas 0.4% y 0.8% de  $\beta$ -glucanos ( $p>0.05$ ; tabla 3).

**Table 3.** Parámetros de crecimiento y supervivencia (media  $\pm$  SD) de *A. tropicus* alimentados con dietas formuladas con diferentes concentraciones de  $\beta$ -glucanos 1,3/1,6.

Días	Indices de Crecimiento	DIETAS				
		Control	0.2	0.4	0.6	0.8
0	LTI (cm)	2.50 $\pm$	2.48 $\pm$	2.53 $\pm$	2.36 $\pm$	2.41 $\pm$
		0.18	0.09	0.13	0.12	0.11
	PCI (g)	0.054 $\pm$	0.055 $\pm$	0.058 $\pm$	0.051 $\pm$	0.057 $\pm$
		0.23	0.20	0.28	0.16	0.26
21	LTF (cm)	2.63 $\pm$	2.66 $\pm$	2.76 $\pm$	2.58 $\pm$	2.64 $\pm$
		0.23	0.20	0.28	0.16	0.26
	PCF (g)	0.59 $\pm$	0.58 $\pm$	0.63 $\pm$	0.56 $\pm$	0.59 $\pm$
		0.02	0.01	0.02	0.01	0.02
	Sobrevivencia (%)	33.66 $\pm$	34.66 $\pm$	27.33 $\pm$ 1.41 <sup>b</sup>	32.99 $\pm$	25.99 $\pm$
		4.93 <sup>a</sup>	3.05 <sup>a</sup>		7.79 <sup>a</sup>	1.73 <sup>b</sup>
	TCE (% days)	5.18 $\pm$	5.17 $\pm$	5.21 $\pm$	5.26 $\pm$	5.08 $\pm$
		0.06	0.14	0.14	0.18	0.23
	GP(%)	13.37 $\pm$	13.34 $\pm$	13.80 $\pm$	13.22 $\pm$	13.19 $\pm$
		0.4	0.6	0.9	0.8	0.7
ICA	1.30 $\pm$	1.15 $\pm$	1.20 $\pm$	1.83 $\pm$	1.43 $\pm$	
	0.82	0.91	0.25	0.44	0.61	

LTI: longitud total inicial; PCI: peso corporal inicial; LTF: longitud total final; PCF: peso corporal final; GP: ganancia de peso; TCE: tasa de crecimiento específica; ICA: índice de conversión alimenticia. (Las letras en superíndice indican diferencias significativas entre tratamientos de hileras).

## Actividad enzimática digestiva

La actividad de las enzimas digestivas en las larvas alimentadas con distintos porcentajes de inclusión de  $\beta$ -glucanos se muestra en la tabla 4. La actividad de las proteasas ácidas y alcalinas no fue modificada por la inclusión de  $\beta$ -glucanos ( $p>0.05$ ). Por su parte, la mayor actividad de tripsina fue detectada en las larvas alimentadas con la dieta 0.8% ( $608.67 \pm 63.45$  U mg proteína<sup>-1</sup>) con respecto a las larvas alimentadas con la dieta control ( $189.13 \pm 33$  U mg proteína<sup>-1</sup>;  $p<0.05$ ). La mayor actividad de quimotripsina ( $26.33 \pm 3.32$  U mg proteína<sup>-1</sup>) y L-aminopeptidasa ( $552.63 \pm 38.06$  U mg proteína<sup>-1</sup>) se registró en los peces alimentados con la dieta 0.6, con respecto al nivel de actividad del control ( $16.64 \pm 1.05$  U mg proteína<sup>-1</sup>;  $214.64 \pm 6.68$  U mg proteína<sup>-1</sup>; respectivamente;  $p>0.05$ ). Por otra parte, la mayor actividad de la lipasa se registró en las larvas alimentadas con la dieta 0.6% y 0.8% ( $3.56 \pm 0.21$  U mg proteína<sup>-1</sup> y  $4.0 \pm 0.46$  U mg proteína<sup>-1</sup>; respectivamente;  $p>0.05$ ) y la mayor actividad de fosfatasa ácidas y alcalinas se obtuvieron en las larvas alimentadas con la dieta con 0.4% de  $\beta$ -glucanos ( $0.71 \pm 0.04$  y  $0.33 \pm 0.04$  U mg proteína<sup>-1</sup>, respectivamente;  $p>0.05$ ). Finalmente, la actividad de la  $\alpha$ -amilasa no presentó diferencias significativas entre los tratamientos ( $p<0.05$ ).

**Tabla 4.** Actividad de las enzimas digestivas en larvas de *A. tropicus* alimentadas con distintos porcentajes de inclusión de  $\beta$ -glucanos 1,3/1,6 (media  $\pm$  SD).

Actividad Enzimática (U/mg proteína <sup>-1</sup> )	DIETAS				
	Control	0.2	0.4	0.6	0.8
Proteasa Ácida	8.02 $\pm$ 0.89	7.35 $\pm$ 0.86	9.84 $\pm$ 0.11	8.80 $\pm$ 2.06	8.12 $\pm$ 1.72
Proteasa					
Alcalina	13.56 $\pm$ 3.08	8.05 $\pm$ 0.95	9.43 $\pm$ 1.09	13.12 $\pm$ 4.10	8.61 $\pm$ 2.86
Tripsina	189.13 $\pm$	212.44 $\pm$	282.51 $\pm$	323.93 $\pm$	608.67 $\pm$
	33.00 <sup>c</sup>	13.64 <sup>c</sup>	44.42 <sup>b</sup>	9.48 <sup>b</sup>	63.45 <sup>a</sup>
Quimotripsina		19.18 $\pm$	26.33 $\pm$	21.61 $\pm$	23.30 $\pm$
	16.64 $\pm$ 1.05 <sup>b</sup>	0.21 <sup>b</sup>	3.32 <sup>a</sup>	1.90 <sup>b</sup>	1.97 <sup>b</sup>
L-aminopeptidasa	214.64 $\pm$	355.25 $\pm$	552.63 $\pm$	376.76 $\pm$	365.77 $\pm$
	6.68 <sup>c</sup>	61.49 <sup>b</sup>	38.06 <sup>a</sup>	52.73 <sup>b</sup>	47.13 <sup>b</sup>
Lipasa	1.47 $\pm$ 0.24 <sup>b</sup>	0.18 $\pm$ 0.11 <sup>c</sup>	1.86 $\pm$ 0.48 <sup>b</sup>	3.56 $\pm$ 0.21 <sup>a</sup>	4.0 $\pm$ 0.46 <sup>a</sup>
$\alpha$ -amilasa	0.23 $\pm$ 0.05	0.14 $\pm$ 0.02	0.16 $\pm$ 0.02	0.22 $\pm$ 0.07	0.14 $\pm$ 0.05
Fosfatasa Ácida	0.31 $\pm$ 0.05 <sup>c</sup>	0.44 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>	0.71 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	0.53 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>	0.45 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>
Fosfatasa					
Alcalina	0.21 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>	0.24 $\pm$ 0.002 <sup>c</sup>	0.33 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	0.27 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>	0.29 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>

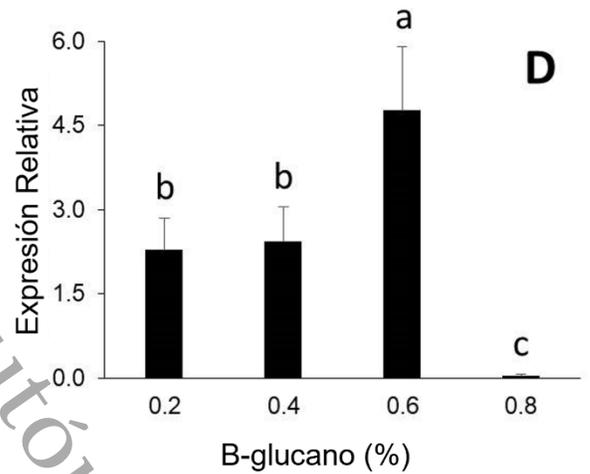
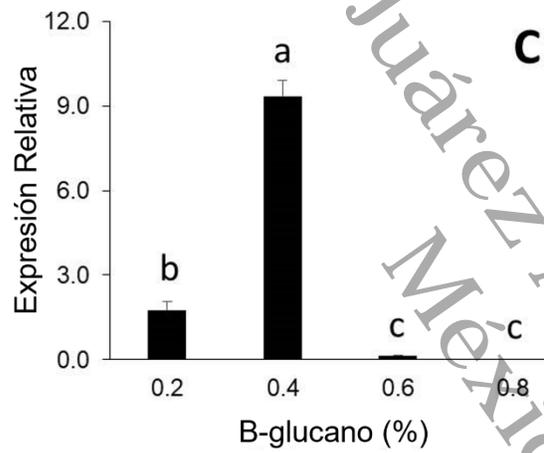
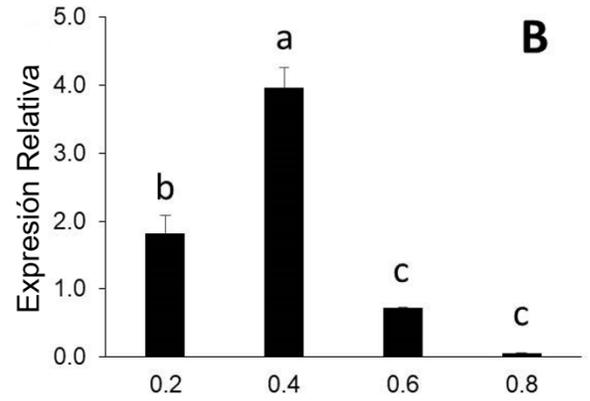
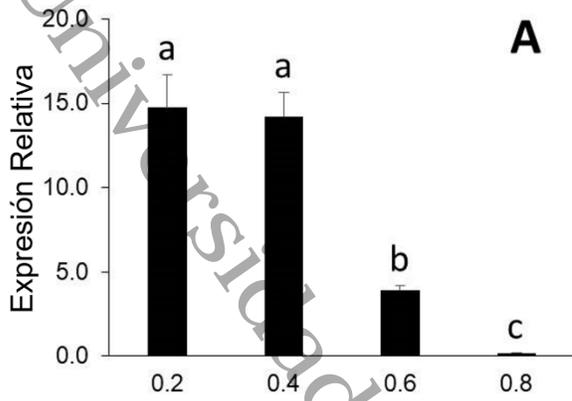
Las letras en superíndice indican diferencias significativas entre tratamientos de hileras.

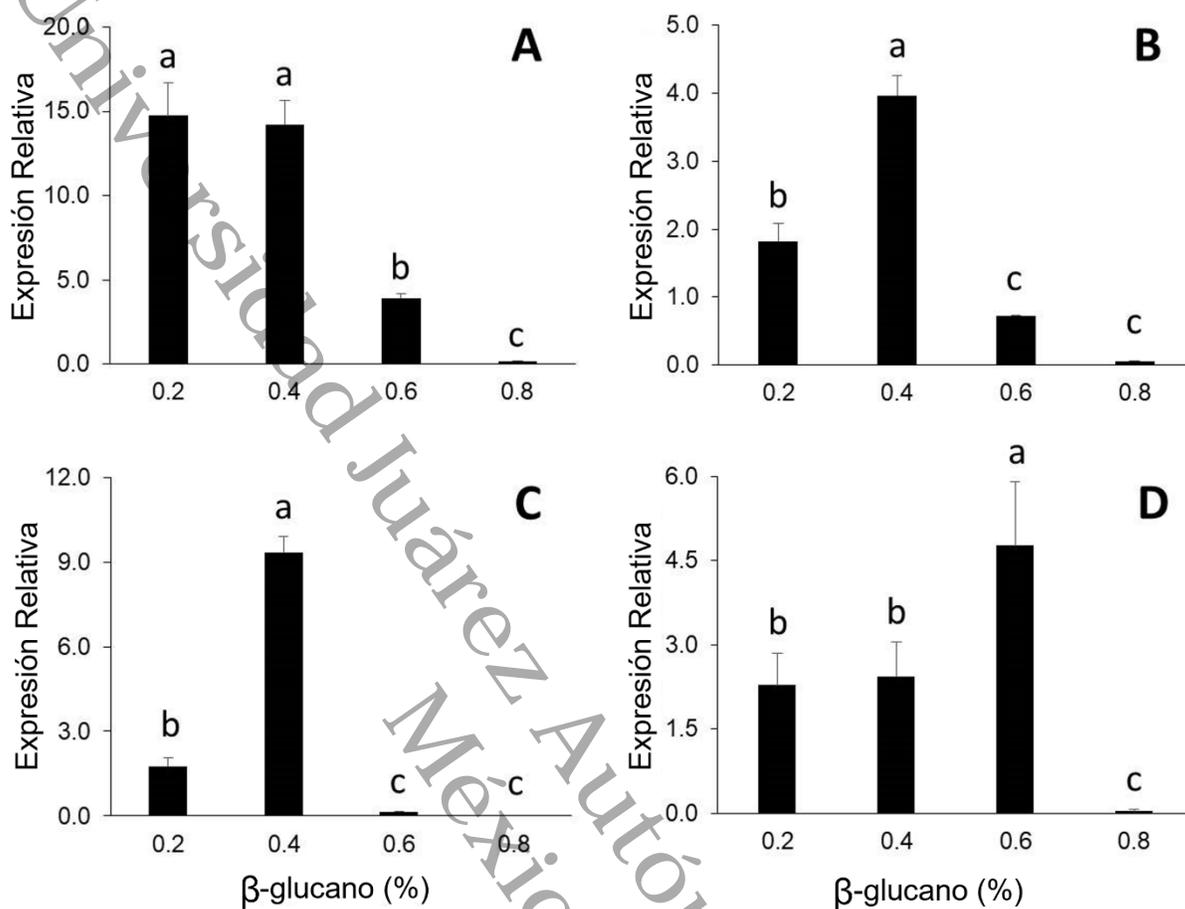
#### Expresión de genes inmunitarios

La expresión relativa de genes analizados en las larvas de *A. tropicus* alimentadas con distintos porcentajes de  $\beta$ -glucanos se muestra en la figura 1. Las expresiones de *muc-*

2 y *occ* mostraron los valores mayores (de  $14.75 \pm 1.93$  y  $3.97 \pm 0.30$ , respectivamente) para las larvas alimentadas con la inclusión del 0.4% de  $\beta$ -glucanos (Fig. 1a y b). Finalmente, la mayor expresión de *lys* ( $9.34 \pm 0.39$ ) se detectó para las larvas alimentadas con la inclusión de 0.4% de  $\beta$ -glucanos (Fig. 1c). El gen *nod-2* tuvo la mayor expresión (de  $3.69 \pm 1.05$ ) en las larvas alimentadas con la inclusión de 0.6% de  $\beta$ -glucanos (fig. 1d), este porcentaje de inclusión podría ser suficiente para activar el mecanismo del sistema inmune, defendiendo la pared intestinal de organismos patógenos para la etapa larvaria de *A. tropicus*.

Universidad Juárez Autónoma De Tabasco.  
México.





**Figura 1.** Expresión relativa (media  $\pm$  SD) de a) Mucina-2 (*muc-2*); b) ocludina (*occ*); c) lisozima (*lys*) y d) dominio de unión a nucleótidos y oligomerización dominio 2 (*nod-2*) en larvas de *A. tropicus* alimentadas con distintos porcentajes de inclusión de  $\beta$ -glucanos (Las letras en superíndice indican diferencias significativas entre tratamientos de hileras).

## DISCUSIÓN

Los  $\beta$ -glucanos son cadenas de polisacáridos y son componentes estructurales en de la pared celular de diversas especies como levaduras, cereales, hongos, bacterias y algunas algas (Vetvicka *et al.*, 2013). Los tipos de enlaces pueden variar de acuerdo con la propiedad de las fuentes, por ejemplo, los  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3), (1 $\rightarrow$ 6)-glucano son

específicamente de la levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) y son activadores de respuesta de protección mediante macrófagos, efectos antioxidantes, curación de heridas y los receptores de por medio de células inmunes (monocitos, linfocitos, neutrófilos, Langerhans) y no inmunes (epiteliales, endoteliales y fibroblastos) (Petračić-Tominac *et al.*, 2010).

Por otra parte, los  $\beta$ -glucanos procedentes de levaduras forman parte de aditivos promotores de efectos benéficos en organismos acuáticos (Dharsono *et al.*, 2018). Es así, que han sido evaluados en especies como el *Lutjanus peru*, por exposición de nanopartículas de 5 mg ml<sup>-1</sup> de solución salina añadido a 100 mg hidroxidocloruro de zinc, los resultados mostraron mejorando la respuesta inmune celular, midiendo niveles de la enzima superóxido dismutasa, catalasa y peroxidasa (Velazquez-Carriles *et al.*, 2018). Asimismo, su adición mejoró la viabilidad de las células ZT4 (10 $\mu$ g/ml por 24h) que son dirigidos a glicoproteínas para inhibir la replicación del virus SVCV (virus de la carpa), en un reto ensayado en *Danio rerio* (Medina-Gali *et al.*, 2018). Otro efecto de los  $\beta$ -glucanos, es usado como un agente contra el trastorno de enteritis en *Oncorhynchus mykiss* y *lius mayor* en concentraciones de 0.0%, 0.1%, and 0.2% en un periodo de 30 días, mejorando los parámetros sanguíneos, la capacidad antioxidante, tolerancia al estrés y rendimiento de los índices de crecimiento (Ji *et al.*, 2019; Shadrack *et al.*, 2022). En crustáceos como el *Litopenaeus vannamei* (Alvarez-Sánchez *et al.*, 2018), *Portunus pelagicus* (Anjugam *et al.*, 2016) y *Cherax tenuimanus* (Sang & Fotedar, 2010) su uso ha sido exitoso con una concentración superior al 0.1% con resultados benéficos.

Los índices de crecimiento de las larvas de *A. tropicus* en este estudio, son típicos en la etapa larvaria de esta especie según lo descrito por diversos autores (Frías-Quintana *et*

*al.*, 2015; Palma-Cancino *et al.*, 2019; Maytorena-Verdugo *et al.*, 2022). Sin embargo, el uso de los  $\beta$ -glucanos en la etapa larvaria de *A. tropicus* como promotor de crecimiento no muestra un efecto directo. En este sentido, el estudio de Nieves *et al.*, (2018) con juveniles de *A. tropicus* tampoco mostró un mayor crecimiento al utilizar los  $\beta$ -glucanos. En otras especies como *Oreochromis niloticus* (Pilarski *et al.*, 2017), *Cyprinus carpio* (Pionnier *et al.*, 2013) y *Morone chrysops* x *Morone saxatilis* (Li *et al.*, 2009), tampoco mostraron incrementos en el crecimiento al incluir los  $\beta$ -glucanos. Esto probablemente se debe a diferentes aspectos como la dosis suministrada, la vía de administración, el tiempo del tratamiento, el tipo de  $\beta$ -glucano y la etapa de vida (Dalmo *et al.*, 2008). Otra situación es metabolizar los  $\beta$ -glucanos para pasarlos de oligosacáridos complejos a monosacáridos simples, para ello se debe contar con enzimas intestinales y pancreáticas de tipo  $\beta$ -glucanasas principalmente, o bien pueden ser suministrada de forma exógena (Chen & Seviour, 2007; González *et al.*, 2011). Bajo este panorama, disponer de bacterias con la capacidad de digerir componentes vegetales a oligosacáridos más simples como: Bacteroides específicas que usen como sustrato a los glicanos para que sean hidrolizados por la glucósido hidrolasa (Temple *et al.*, 2017). Lo que promueve la estabilidad del microbioma, ligando así la mejora de la digestión, asimilación de nutrientes, además de disminuir el daño ocasionado por patógenos al mejorar el sistema inmune (Ghanbari *et al.*, 2015).

Las actividades tipo quimotripsina y L-aminopeptidasa mostraron los valores más altos para las larvas de *A. tropicus* alimentadas con 0.4% de  $\beta$ -glucanos. De esta forma, nuestros resultados muestran un efecto claro de la adición de este prebiótico sobre la fisiología digestiva, particularmente de las proteasa de larvas de *A. tropicus*, las cuales presentan hábitos alimenticios típicos de un carnívoro en su etapa temprana de vida

(Frías-Quintana *et al.*, 2015). Asimismo, se observa una mayor actividad para las enzimas digestivas como las lipasas,  $\alpha$ -amilasa y fosfatasas. En este aspecto, la actividad de diversas enzimas digestivas en *Lutjanus peru* (Guzmán-Villanueva *et al.*, 2014), *Scophthalmus maximus* (Miest *et al.*, 2016) y *Cyprinus carpio* (Mohammadian *et al.*, 2019), se incrementan al incluir los  $\beta$ -glucanos, lo que se relación con la composición microbiana e influye en las actividades enzimáticas digestivas al mejorar las funciones gástricas como la absorción, digestión intestinal y la integridad celular de los enterocitos (Dimitroglou *et al.*, 2011; Santos *et al.*, 2020). En un estudio reportado en *Carassius auratus var. Pengze* por Cao *et al.*, (2019) se muestra el aumento de las actividades lipasa, tripsina, fosfatasa ácida y alcalina, lo que indica mayor funcionalidad de los enterocitos (Dimitroglou *et al.*, 2011). Ahora bien, las actividades de fosfatasas están relacionadas a la transfosforilación de mono ésteres de fosfato y se consideran importantes para la capacidad regulación metabólica, metabolismo energético y traducción de señalización de rutas celulares (Ezquerria-Brauer *et al.*, 2015).

En cuanto a la actividad de  $\alpha$ -amilasa no observaron diferencias significativa sen los diferentes niveles de inclusión de  $\beta$ -glucano. En este sentido, Liranço *et al.*, (2013) reportaron en juveniles de *Oreochromis niloticus* una disminución de la actividad, ya que esta enzima degrada los almidones y glucógeno a partir de la ruptura del enlace  $\alpha$ -glucosídico (Singh *et al.*, 2012), por lo que la presencia de los  $\beta$ -glucanos, que son carbohidratos no digeribles, tiene un efecto diferente al llegar hasta la región de la microbiota y estimular la secreción de ácidos grasos de cadena corta a partir de la fermentación bacteriana (Wang *et al.*, 2015). Respecto a la lipasa en las larvas de *A. tropicus*, se observa un aumento de su actividad, lo que estaría relacionada con la mayor capacidad de romper el enlace éster de los ácidos grasos y propiciar una mejora

del metabolismo de lípidos (Dawood *et al.*, 2020). En un ensayo con (*Pagellus acarne*) coincide que la implementación de prebióticos se relaciona con una mayor disponibilidad de nutrientes a partir del incremento de las actividades enzimáticas digestivas, lo que promueve un aumento de la eficiencia alimentaria (Zaineldin *et al.*, 2018). Asimismo, Sarao & Arora, (2017), relacionan este efecto con la modificación de bacterias colónicas y el aumento de fermentación por acción del metabolismo microbiano. En este mismo sentido, se menciona que el uso de prebióticos como los  $\beta$ -glucanos, puede contribuir en el aumento de la actividad enzimática de lipasas, tripsina, proteasas y celulosas, esto debido a la comunidad bacteriana por la producción de enzimas extracelulares como se demuestra en *Lutjanus peru* (Guzmán-Villanueva *et al.*, 2014). Sin embargo, los beneficios por el uso de prebióticos, puede variar en cada especie desde la estimulación actividad enzimática, mejora de la morfología intestinal, mayor resistencia a infecciones, aumento en el crecimiento, mejora en la composición corporal y un mayor equilibrio de las comunidades microbianas (Merrifield *et al.*, 2010).

Por otra parte, los  $\beta$ -glucanos tiene la capacidad de estimular factores humorales por medio reconocimiento de patrones moleculares asociados a daños (DAMPs), lo que ocasiona una respuesta enérgica contra infecciones bacterianas (Reis *et al.*, 2021). De esta forma, los efectos de un inmunoestimulante es aumentar los mecanismos de respuesta a la protección, lo que reduce los efectos por inmudepresores (estrés, bacterias, contaminantes, parásitos entre otros), por medio de actividades fagocíticas, liberando nutrientes, activando proteínas y antioxidantes (Kiron, 2012). La primera línea de defensa de la respuesta inmune innata es el mucus en el pez, y se sabe que en el

caso de los  $\beta$ -glucanos, pueden aumentar la expresión de las mucinas, las cuales tienen la finalidad de incrementar la producción del mucus (Anadón *et al.*, 2019).

El gen de la *muc-2* (Mucina-2) es una glicoproteína expresada a partir de las células epiteliales, la cual crea una red de defensa a partir de la señalización de la matriz celular y citoquinas (Wang & El-Bahrawy, 2014). El efecto de las dosis 0.2 y 0.4% de  $\beta$ -glucanos en la etapa larvaria en *A. tropicus*, aumentaron de manera significativa la expresión de este gen. En este aspecto, Shelby *et al.*, (2009) argumentan en el ensayo de juveniles de *Oreochromis niloticus* el uso prolongado de  $\beta$ -glucanos puede provocar un efecto solo transitor, al igual que dosis altas llegan a inhibir los efectos inmunitarios, lo que responde a las discrepancias para establecer beneficios específicos en otros teleósteos.

Así mismo, la expresión de los genes de *occ* (Occludin) y *lys* (Lisozima) en las larvas de *A. tropicus* muestran un incremento con la dosis de 0.4% de  $\beta$ -glucano. Este incremento en las expresiones al adicional el  $\beta$ -glucano ha sido reportado en otras especies de peces como *Cyprinus carpio*, *Oreochromis niloticus*, y *Danio rerio*, ya que este prebiótico es capaz de estimular la actividad inmunológica con la acción de la proteína lisozima (Nguyen *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2017; Carballo *et al.*, 2018), la cual tiene un efecto bactericida, asociado al sistema de monocitos y macrófagos localizada en el moco y órganos linfoides (riñón, branquias, piel, timo) y plasma, lo que se ve reflejado por una inhibición del crecimiento e invasión de los patógenos (Dawood *et al.*, 2015; Nayak *et al.*, 2018). En los teleósteos, la familia de claudinas es amplia, lo cual se debe a la plasticidad fisiológica, estas moléculas se encuentran en mayor cantidad en los tejidos epiteliales de la piel y branquias, ya que estos órganos están expuestos en el agua y son vulnerables a cambios ambientales (Kolosov *et al.*, 2013). A diferencia

de las claudinas que son esenciales para la cohesión macromolecular, la proteína Occludin trasciende en el ensamblaje de dichas uniones, es decir, mantienen la estabilidad de la función de la barrera intercelular de la membrana plasmática, ya que mantiene su cohesión, lo que evita la difusión celular e impide el paso a sustancias nocivas a través de las células intestinales en los organismos (Campbell *et al.*, 2017).

Por otra parte, el gen *nod-2* se sobre-expresa en las larvas de *A. tropicus* alimentadas con 0.6% de  $\beta$ -glucanos. Es así como *nod-2* es una proteína sensora citoplasmática la cual ha sido previamente reportada en varias especies de teleósteos asociada con la microbiota intestinal (Azad *et al.*, 2012), ya que participa en la detección innata de posibles patógenos y promueve la liberación de peptidoglicanos bacterianos, además que regula respuestas proinflamatorias y la supervivencia intramacrófago (Zou *et al.*, 2016). Se ha podido observar su actividad en los enterocitos en *Danio reiro*, con potencial sobre el reconocimiento a enfermedades de intestinal inflamatoria (Salinas *et al.*, 2015). Asimismo, se ha demostrado que los  $\beta$ -glucanos aumentan la capacidad inmunitaria y de protección ante la infección SVCV (*Spring Viremia of Carp Virus*) a partir de la acción de las citoquinas (Medina-Gali *et al.*, 2018).

En ensayos anteriores, con *Cyprinus carpio* alimentados con alimento granulado por 14 días (6 mg por kg de peso corporal) y posteriormente a una inyección intraperitoneal de  $\beta$ -glucanos con muestreos en 0 y 6 h, 12 h, 1 día, 3 días y 5 días después de la inyección, mostraron resultados interesantes, donde el nivel más alto de la expresión de citoquinas se registró a las 6 h del muestreo con la infección y posteriormente reportar una disminución de los niveles de transcripción del gen en intestino y riñón (Falco *et al.*, 2012) y un segundo ensayo con picos de expresión en 6 h y 12 h para una disminución posterior (Pionnier *et al.*, 2013). En el *Pseudosciaena crocease*, realizó un

experimento con dietas suplementadas (control 0%, 0.09% y 0.18%) de  $\beta$ -glucano durante 4 semanas, y siendo la dosis 0.09% en la cual se detectó un incremento en el estallido fagocítico, respiratorio y una menor tasa de mortalidad (Ai *et al.*, 2007).

Al comparar estos estudios con Nieves-Rodríguez *et al.*, (2018), se reportó la sobreexpresión de los genes de respuesta inmunitaria, con una suplementación intermedia del 1.5% de  $\beta$ -glucano, y reveló la disminución en la dosis más alta del 2% en dietas para juveniles de *A. tropicus*; de forma similar al confrontar los resultados de este estudio coincide, en que la estimulación de dosis bajas, pero en este caso para las larvas (0.4 a 0.6%) regulan la expresión. No obstante, las respuestas fisiológicas no siempre son claras, ya que esto puede depender del órgano por la preparación potencial a un agente infeccioso, mientras mejora una respuesta inflamatoria. Debido a esto el uso adecuado de las dosis es valioso para evitar lo mencionado por Anderson *et al.*, (1992), ya que, si se exceden las dosis de prebióticos, puede ocasionar una inmunosupresión por la interferencia en las citoquinas (Dung *et al.*, 2021).

## CONCLUSIÓN

La inclusión de  $\beta$ -glucanos en alimentos para larvas de *A. tropicus* no mostraron una mejora significativa en los índices de crecimiento, pero si se observa un aumento de la actividad de las enzimas digestivas, como es el caso de lipasa y tripsina con la inclusión de 0.4% y 0.6% de  $\beta$ -glucanos. Así mismo, las actividades de L-aminopeptidasa, quimotripsina, fosfatasa ácida y alcalina se incrementan con la adición de 0.4% del prebiótico. Los patrones de sobreexpresión de *muc*, *lys* y *occ* pueden asociarse al mantenimiento de la barrera intestinal, lubricación y defensa, al utilizar

dosis de 0.2% y 0.4% de  $\beta$ -glucano, mientras que el gen *nod-2* presentó mejor actividad con la suplementación del 0.6% del prebiótico. Por lo tanto, al incluir dosis entre 0.4 y 0.6% de  $\beta$ -glucanos en la dieta para larvas se mejoran las funciones fisiológicas durante la etapa larvaria de *A. tropicus*, además que puede reforzar la acción del sistema inmunológico contra posibles patógenos. Es por ello, que se recomienda realizar más estudios que permitirán evaluar la modificación del microbioma y capacidad antioxidante por medio de pruebas de estrés y/o infecciones bacterianas.

Universidad Juárez Autónoma De Tabasco.  
México.

## REFERENCIAS

- Ai Q, Mai K, Zhang L, Tan, B, Zhang W, Xu W, Li H, (2007) Effects of dietary  $\beta$ -1, 3 glucans on innate immune response of large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea*. Fish & Shellfish Immunol 22: 394–402. [doi:10.1016/j.fsi.2006.06.011](https://doi.org/10.1016/j.fsi.2006.06.011)
- Allen PJ, Mitchell ZA, DeVries, RJ, Aboagye DL, Ciaramella MA., Ramee, S.W., Shartau, R.B, (2014) Salinity effects on Atlantic sturgeon (*Acipenser oxyrinchus oxyrinchus* Mitchell, 1815) growth and osmoregulation. Journal of Applied Ichthyol. 30: 1229–1236. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2006.06.011>
- Álvarez-González, C.A., Civera-Cerecedo, R., Ortiz-Galindo, J.L., Dumas, S., Moreno-Legorreta, M., Grayeb-Del, A.T., (2001) Effect of dietary protein level on growth and body composition of juvenile spotted sand bass, (*Paralabrax maculatofasciatus*), fed practical diets. Aquac 194: 151-159. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(00\)00512-3](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(00)00512-3)
- Álvarez-Sánchez AR, Nolasco-Soria H, Peña-Rodríguez A, Mejía-Ruiz H (2018) In vitro digestibility of *Yarrowia lipolytica* yeast and growth performance in whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei*. Turk. J. F. Aquat Sci 18: 395-404. [https://doi.org/10.4194/1303-2712-v18\\_3\\_05](https://doi.org/10.4194/1303-2712-v18_3_05)
- Anadón A, Ares I, Martínez-Larrañaga MR, Martínez MA (2019) Prebiotics and Probiotics in Feed and Animal Health. Nutr. Vet. Medic. 261–285 [doi:10.1007/978-3-030-04624-8\\_19](https://doi.org/10.1007/978-3-030-04624-8_19)
- Anderson DP (1992) Immunostimulants, adjuvants, and vaccine carriers in fish: applications to aquaculture. Ann. Rev. Fish dis. 2: 281-307. [https://doi.org/10.1016/0959-8030\(92\)90067-8](https://doi.org/10.1016/0959-8030(92)90067-8)

- Ángeles-Esteban M (2012) "An overview of the immunological defenses in fish skin." Intl school Res.notices 1-29 [doi:10.5402/2012/853470](https://doi.org/10.5402/2012/853470)
- Anjugam M, Iswarya A, Vaseeharan B, (2016) Multifunctional role of  $\beta$ -1, 3 glucan binding protein purified from the hemocytes of blue swimmer crab *Portunus pelagicus* and *in vitro* antibacterial activity of its reaction product. Fish Shellfish Immunol 48 196–205. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.11.023>
- Anson ML, (1938) Plant proteolytic enzyme. J Gen Physiol 22, 79-84.
- Horwitz W, Latimer G (2005) AOAC. Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis of AOAC International 18th edition. ed, Gaithersburg, Maryland, USA, 45: 75-76.
- Azad AK, Sadee W, Schlesinger LS, (2012) Innate immune gene polymorphisms in tuberculosis. Infect immunity. 80(10): 3343-3359. .
- Bergmeyer HU, Bernt E, Lachenicht R, (1974) Alkaline Phosphatase in Serum Determination with Automatic Analysers. In Methods enzymatic anal. pp. 864-868. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-091302-2.50069-4>
- Betancourt-Gordillo DM, (2014) Efecto de *Lactobacillus platarum* Lab 9 sobre el crecimiento y sobrevivencia de alevinos y juveniles de Tilapia Roja (*Oreochromis sp.*) Univ. de Nariño. 22-53.
- Bligh EG, Dyer WJ (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem. Physiol. 37(8): 911–917. <https://doi.org/10.1139/o59-099>
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. Anali Biochem 72(1-2): 248–254.

- Brett JR, Groves TDD (1979) Physiological energetics. *Fish. Physiol.* 8(6): 1-786.
- Campbell HK, Maiers JL, De Mali KA (2017). Interplay between tight junctions & adherens junctions. *Exp Cell Res* 358(1): 39-44.  
<https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2017.03.061>
- Cao H, Yu R, Zhang Y, Hu B, Jian S, Wen C, Yang G (2019) Effects of dietary supplementation with  $\beta$ -glucan and *Bacillus subtilis* on growth, fillet quality, immune capacity, and antioxidant status of Pengze crucian carp (*Carassius auratus* var. *Pengze*). *Aquac* 508: 106-112  
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.04.064>
- Carballo C, Chronopoulou EG, Letsiou S, Maya, C, Labrou NE, Infante C, Manchado M (2018) Antioxidant capacity and immunomodulatory effects of a chrysolaminarin-enriched extract in *Senegalese sole*. *Fish & shellfish Immunol.* 82: 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.07.052>
- Caruso R, Warner N, Inohara N, Núñez G (2014) NOD1 and NOD2: signaling, host defense, and inflammatory disease. *Immunity.* 41: 898-908.  
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.12.010>
- Chen J, Seviour R (2007) Medicinal importance of fungal beta-(1 $\rightarrow$ 3), (1 $\rightarrow$ 6)-glucans. *Mycol Res* 111(6): 635–652. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2007.02.011>
- Cho C, Slinger S, Bayley H (1982) Bioenergetics of salmonid fishes: Energia intake, expenditure, and productivity. Part B. *Comp Biochem Physiol* 73(1): 25-41.  
[https://doi.org/10.1016/0305-0491\(82\)90198-5](https://doi.org/10.1016/0305-0491(82)90198-5)
- Dalmo RA, Bøgwald J (2008) " $\beta$ -glucans as conductors of immune symphonies". *Fish & shellfish Immunol.* 25(4): 384-396. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2008.04.008>

- Dawood MAO, Koshio S, Ishikawa M, Yokoyama S, El Basuini MF, Hossain MS, Wei H (2015) Dietary supplementation of  $\beta$ -glucan improves growth performance, the innate immune response and stress resistance of red sea bream, *Pagrus major*. *Aquac. Nutri.* 23(1): 148–159. <https://doi.org/10.1111/anu.12376>
- Dawood MAO, Magouz FI, Salem MFI (2020) Synergetic Effects of *Lactobacillus plantarum* and  $\beta$ -Glucan on Digestive Enzyme Activity, Intestinal Morphology, Growth, Fatty Acid, and Glucose-Related Gene Expression of Genetically Improved Farmed Tilapia. *Probiotics & Antimicro. Prot.* 12(2): 389–399. <https://doi:10.1007/s12602-019-09552-7>
- Del Mar EG, Largman C, Brodrick JW, Geokas MC (1979) A sensitive new substrate for chymotrypsin. *Anal. Biochemistry* 99(2): 316–320.
- Dharsono T, Rudnicka K, Wilhelm M, Schoen C (2018) Effects of yeast (1, 3)-(1, 6)-beta-glucan on severity of upper respiratory tract infections: a double-blind, randomized, placebo-controlled study in healthy subjects." *J. Am. Coll. of Nutrit.* 38(1): 40-50. <https://doi.org/10.1080/07315724.2018.1478339>
- Dimitroglou A, Merrifield DL, Carnevali O, Picchiatti S, Avella M, Daniels C, Davies, SJ (2011) Microbial manipulations to improve fish health and production – A Mediterranean perspective. *Fish & Shellfish Immunol.* 30(1): 1–16.
- Dos Santos-Voloski AP, de Figueiredo-Soveral L, Dazzi CC, Sutili F, Frandoloso R, Kreutz LC (2019)  $\beta$ -Glucan improves wound healing in silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Fish & Shellfish Immunol.* 93: 575-579 <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.08.010>
- Dung NT, Trong TD, Vu NT, Binh NT, Minh TTL, Luan LQ (2021) Radiation Synthesis of Selenium Nanoparticles Capped with  $\beta$ -Glucan and Its Immunostimulant

- Activity in Cytoxan-Induced Immunosuppressed Mice. *Nanomaterials* 11(9): 24-39.
- De Souza FP, De Lima ECS, Pandolfi VCF, Leite NG, Furlan-Murari PJ, Leal CNS, Lopera-Barrero NM (2020) Effect of  $\beta$ -glucan in water on growth performance, blood status and intestinal microbiota in tilapia under hypoxia. *Aquac. Rep.* 17: 100-369. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2020.100369>
- Edelblum KL, Turner JR (2015) Epithelial Cells: Structure, Transport, and Barrier Function. In *Mucosal Immunology* Academic Press. 187–210. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415847-4.00012-4>
- Erlanger BF, Kokowsky N, Cohen W (1961) The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Arch. Biochem. Biophys.* 95(2): 271-278. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(61\)90145-X](https://doi.org/10.1016/0003-9861(61)90145-X)
- Ezquerro-Brauer JM, Arias-MoscOSO JL, (2015) Shrimp alkaline phosphatase: structure, characteristics, and functions. *Biocatalysis*. 17(1): 47-54.
- Falco A, Frost P, Miest J, Pionnier N, Irnazarow I, Hoole D (2012) Reduced inflammatory response to *Aeromonas salmonicida* infection in common carp (*Cyprinus carpio L.*) fed with  $\beta$ -glucan supplements. *Fish & Shellfish Immunol* 32 1051–1057. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2012.02.028>
- FAO. El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2016. Contribución a la seguridad alimentaria y la nutrición para todos. Roma. 224 pp. <https://www.fao.org/naeval582.com/pesca/pdf/informe.pesca.fao.pdf>
- FAO. El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2020. La sostenibilidad en acción. SSN 2663-8649 Última Edición 243 p. Roma Italy. <https://www.fao.org/publications/sofia/2020/es/>

- 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 Physiol and Biochem* 41(5): 1075-1091. [doi:10.1007/s10695-015-0070-9](https://doi.org/10.1007/s10695-015-0070-9)
- Frías-Quintana CA, Domínguez-Lorenzo J, Álvarez-González CA, Tovar-Ramírez D, Martínez-García R (2016) (Using cornstarch in microparticulate diets for larvicultured tropical gar (*Atractosteus tropicus*). *Fish Physiol. and Biochem* 42(2): 517-528. [doi:10.1007/s10695-015-0156-4](https://doi.org/10.1007/s10695-015-0156-4)
- Gadde U, Kim WH, Oh ST, Lillehoj HS (2017) Alternatives to antibiotics for maximizing growth performance and feed efficiency in poultry: a review. *Animal Health Res Rev* 18(1): 26–45. <https://doi.org/10.1017/S1466252316000207>
- García E, Jay D (2006) Platelet filamin: a cytoskeletal protein involved in cell signal integration and function. *Arch Cardio de Méx* 76(S4): 67-75 .
- Ghanbari M, Kneifel W, Domig K J (2015) A new view of the fish gut microbiome: advances from next-generation sequencing. *Aquac* 448: 464-475. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.06.033>
- Gassler N (2017) Paneth cells in intestinal physiology and pathophysiology. *W J Gastrointestinal pathophysiol.* 8(4):150. [doi: 10.4291/wjgp.v8.i4.150](https://doi.org/10.4291/wjgp.v8.i4.150)
- González I, Infante D, Peteira B, Martínez B, Arias Y, González N, Miranda I (2011) Caracterización bioquímica de aislamientos de *Trichoderma spp.* promisorios como agentes de control biológico. II. Expresión de actividad glucanasa. *Rev. Protec. Veg.* 26(1): 23-29.

- Guerreiro I, Oliva-Teles A, Enes P (2017) Prebiotics as functional ingredients: focus on Mediterranean fish aquaculture. *Rev. in Aquac.* 10(4): 800-832.  
<https://doi.org/10.1111/raq.12201>
- Guzmán-Villanueva LT, Ascencio-Valle F, Macías-Rodríguez ME (2014) Effects of dietary  $\beta$ -1,3/1,6-glucan on the antioxidant and digestive enzyme activities of Pacific red snapper (*Lutjanus peru*) after exposure to lipopolysaccharides. *Fish Physiol. Biochem.* 40(3): 827–837  
[doi:10.1007/s10695-013-9889-0](https://doi.org/10.1007/s10695-013-9889-0)
- Huerta-Ortiz M, Álvarez-González CA, Civera-Cerecedo R, Martínez-García R, Camarillo-Coop S, Goytortúa-Bores E, Pérez-Morales A (2018) Optimum level of dietary lipids for growth, chemical composition, and apparent digestibility of lipids for *Atractosteus tropicus*. *Lat. Am. J. Aquatic Res.* 46(5): 1073-1082. <http://dx.doi.org/10.3856/vol46-issue5-fulltext-19>
- Hossain A, Senff P, & Glaser M (2022) Lessons for Coastal Applications of IMTA as a Way towards Sustainable Development: A Review. *Applied Sciences*, 12(23), 11920. <https://doi.org/10.3390/app122311920>
- Jesús-Ramírez F, Álvarez-González CA, Nolasco-Soria HG, Peña E, Martínez-García R, Camarillo-Coop S, Pohlenz C (2017) Caracterización parcial de proteasas digestivas del chucumite (*Centropomus parallelus*). *Hidrobiol.* 27(3): 419-427.
- Ji L, Fu S, Ji R, Li X, Liu Y (2019)  $\beta$ -glucan mitigated trinitrobenzene sulfonic acid-induced enteritis in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquac.* 513: 734-393 <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734393>

- Jiménez-Martínez LD, Tovar-Ramírez D, Álvarez-González CA, Peña-Marín E, Camarillo-Coop S, Martínez-García R, Concha-Frías B (2020) Assessment of dietary lipid sources in tropical gar, *Atractosteus tropicus* larvae: Growth parameters and intermediary lipogenic gene expression. *Aquac Res* 51(7): 2629-2640. <https://doi.org/10.1111/are.14603>
- Kawai Y, Mickiewicz K, Errington J (2018) Lysozyme counteracts  $\beta$ -lactam antibiotics by promoting the emergence of L-form bacteria. *Cell* 172(5):1038-1049. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.01.021>
- Kiron V (2012) Fish immune system and its nutritional modulation for preventive health care. *Anim Feed Sci and Technol* 173(1-2): 111–133. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2011.12.015>
- Khangwal I, Shukla P (2019) Potential prebiotics and their transmission mechanisms: Recent approaches. *J. Food Drug Anal.* 27(3): 649–656. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2019.02.003>
- Kolosov D, Bui P, Chasiotis H, Kelly SP (2013). Claudins in teleost fishes. *Tissue Barriers* 1(3): e25-391. <https://doi.org/10.4161/tisb.25391>
- Kuo WT, Shen L, Zuo L, Shashikanth N, Ong MLD, Wu L, Turner JR (2019) Inflammation-induced occludin downregulation limits epithelial apoptosis by suppressing caspase-3 expression. *Gastroenterol* 157(5): 1323-1337. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2019.07.058>
- Kunitz M (1947) Crystalline soybean trypsin inhibitor: II. General properties. *The J. G Physiol* 30(4): 291-310. <https://doi.org/10.1085/jgp.30.4.291>

- Lallès JP (2019) Biology, environmental and nutritional modulation of skin mucus alkaline phosphatase in fish: A review. *Fish & Shellfish Immunol.* 89:179-186. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.03.053>
- Li P, Wen Q, Gatlin DM (2009) Dose-dependent influences of dietary  $\beta$ -1,3-glucan on innate immunity and disease resistance in hybrid striped bass. *Morone chrysops* x *Morone saxatilis*. *Aquac Res* 40(14): 1578-1584. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02257.x>
- Liranço ADDS, Ciarlini PC, Moraes G, Camargo ALS, & Romagosa E (2013) Mannan oligosaccharide (mos) and  $\beta$ -glucan ( $\beta$ -glu) in dietary supplementation for Nile tilapia juveniles kept in cages. *Pan-American J Aquatic Sci* 112-125. <https://orcid.org/0000-0003-1480-5208>
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C(T)}$  *Methods*. San Diego. 25(4):402–408 <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Lizárraga-Velázquez CE, Hernández C, González-Aguilar GA, Basilio-Heredia J (2018) Propiedades antioxidantes e inmunoestimulantes de polifenoles en peces carnívoros de cultivo. *Ciencia UAT*, 12(2): 127-136.
- Martínez-Burguete T, Peña-Marin ES, García-Gasca A, Alvarez-González CA, & Llera-Herrera R (2021) Nutrigenomic marker discovery by de novo transcriptomic sequencing during early development of the tropical gar (*Atractosteus tropicus*). *Aquaculture Research* 52(8), 3829-3842. <https://doi.org/10.1111/are.15228>
- Márquez-Couturier G, Álvarez-González CA, Contreras W, Hernandez U, Hernandez A, Mendoza R, Goytortua E (2006) Advances in food and nutrition tropical gar

- Atractosteus tropicus*. Advances in Nutrición Acuícola. Proceedings of the eighth international symposium on aquac. Nutrit. 15: 446-523.
- Maytorena-Verdugo CI, Peña-Marín ES, Alvarez-Villagómez CS, Pérez-Jiménez GM, Sepúlveda-Quiroz CA, Alvarez-González CA (2022) Inclusion of Mannan-Oligosaccharides in Diets for Tropical Gar *Atractosteus tropicus* Larvae: Effects on Growth, Digestive Enzymes, and Expression of Intestinal Barrier Genes. Fishes. 7(3)-127. <https://doi.org/10.3390/fishes7030127>
- Maroux S, Louvard D, Baratti J (1973) The aminopeptidase from hog-intestinal brush border. Biochim Biophys Act (BBA)-Enzymology 321(1): 282–295. [https://doi.org/10.1016/0005-2744\(73\)90083-1](https://doi.org/10.1016/0005-2744(73)90083-1)
- Medina-Gali RM, del Mar Ortega-Villaizán M, Mercado L, Novoa B, Coll J, Perez L. (2018) Beta-glucan enhances the response to SVCV infection in zebrafish. Develop. Comparative Immunology 84:307-314. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2018.02.019>
- Méndez-Marin O, Hernández-Franyutti A, Álvarez-González CA, Contreras-Sánchez WM, Uribe-Aranzábal M (2012) Histología del ciclo reproductor de hembras del pejelagarto *Atractosteus tropicus* (*Lepisosteiformes: Lepisosteidae*) en Tabasco, México. Rev. Biol. Trop. 60(4): 1857-1871.
- Merrifield DL, Dimitroglou A, Foey A, Davies SJ, Baker RTM, Bøggwald J, Ringø E, (2010) The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids. Aquac. 302(1-2): 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.02.007>
- Miest JJ, Arndt C, Adamek M, Steinhagen D, Reusch TBH (2016) Dietary  $\beta$ -glucan (MacroGard®) enhances survival of first feeding turbot (*Scophthalmus*

- maximus*) larvae by altering immunity, metabolism, and microbiota. Fish Shellfish Immunol. 48: 94–104. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.11.013>
- Miller RR, Minckley WL, Norris SM (2005) Freshwater fishes of Mexico. University of Chicago. Association with the Museum of Zool., Univ. of Michigan. No. QL 629. M54
- Mioso R, Marante FJ, Laguna IH, Bessonart M (2014) Chemistry of natural products applied to aquaculture: an interdisciplinary review Chem Nova 37:513-520. <https://doi.org/10.5935/0100-4042.20140084>
- Mohammadian T, Nasirpour M, Tabandeh MR, Mesbah M (2019) Synbiotic effects of  $\beta$ -glucan, mannan oligosaccharide and *Lactobacillus casei* on growth performance, intestine enzymes activities, immune-hematological parameters, and immune-related gene expression in *common carp*, *Cyprinus carpio*: An experimental infection with *Aeromonas hydrophila* Aquac 511:634-197. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.06.011>
- Nájera-Arzola IC, Álvarez-González CA, Frías-Quintana CA, Peña E, Martínez-García R, Camarillo-Coop S, Gisbert E (2018) Evaluación de oligosacáridos de manano (MOS) en dietas balanceadas para juveniles de pejelagarto (*Atractosteus tropicus*). Hidrobiológica, 28(3): 239-246.
- Nayak S, Khozin-Goldberg I, Cohen G, Zilberg D (2018). Dietary Supplementation With  $\omega$ 6 LC-PUFA-Rich Algae Modulates Zebrafish Immune Function and Improves Resistance to *Streptococcal Infection*. Frontiers in Immunol 9:1960. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01960>

- Nguyen TM, Mandiki SNM, Tran TNT, Larondelle Y, Mellery J, Mignolet E, Kestemont, P (2019) Growth performance and immune status in *common carp* and *Cyprinus carpio* as affected by vegetable oil-based diets supplemented with  $\beta$ -glucan. *Fish and shellfish immunol* 92: 288–299. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.06.011>
- Nieves-Rodríguez KN, Álvarez-González CA, Peña-Marín E, Vega-Villasante F, Martínez-García R, Camarillo-Coop S, Tovar-Ramírez D, Guzmán-Villanueva L (2018) Effect of-Glucans in Diets on Growth, Survival, Digestive Enzyme Activity, and Immune System and Intestinal Barrier Gene Expression for Tropical Gar (*Atractosteus tropicus*) Juveniles. *Fishes. Villahermosa Tabasco*. 33(3):27 <https://doi.org/10.3390/fishes3030027>
- Nunes AC, Sena MM, Garcia SB, Pereira APL, Trugilo KP, Watanabe MAE, De Oliveira KB (2016) Análise da deleção 32 do receptor de quimiocina CCR5 em descendentes asiáticos em Maringá-Paraná. *Biosaúde*, 15(1): 12-21.
- Palma-Cancino DJ, Martínez-García R, Álvarez-González CA, Camarillo-Coop S, Peña-Marín ES (2019). Evaluation of feeding strategies in tropical gar (*Atractosteus tropicus* Gill) larvae: growth, survival and cannibalism. *Ecosys Rec Agropecuario* 6(17): 273-281. <https://doi.org/10.19136/era.a6n17.2092>
- Pelaseyed T, Bergström JH, Gustafsson JK, Ermund A, Birchenough GMH, Schütte A, Hansson GC (2014) The mucus and mucins of the goblet cells and enterocytes provide the first defense line of the gastrointestinal tract and interact with the immune system *Immunol Rev* 260(1): 8–20. <https://doi.org/10.1111/imr.12182>

- Petravić-Tominac V, Zechner-Krpan V., Grba S, Srećec, S, Panjkota-Krbavčić I, Vidović L (2010) Biological effects of yeast  $\beta$ -glucans. *Agricul. Conspectus Sci* 75(4): 149-158.
- Pilarski F, Ferreira de Oliveira CA, Darpossolo de Souza FPB, Zanuzzo FS (2017) Different  $\beta$ -glucans improve growth performance and bacterial resistance in Nile tilapia. *Fish and shellfish Immunol.* 70:25–29. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.06.059>
- Pionnier N, Falco A, Miest J, Frost P, Irnazarow I, Shrive A, Hoole D (2013) Dietary  $\beta$ -glucan stimulate complement and C-reactive protein acute phase responses in common carp (*Cyprinus carpio*) during an *Aeromonas salmonicida* infection. *Fish & shellfish immunol* 34(1): 819-831. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2012.12.017>
- Pizarro S, Ronco AM, Gotteland M (2014) Betaglucanos: ¿Qué tipos existen y cuáles son sus beneficios en la salud? *Revista chilena de nutrición.* 41(4): 4339-446.
- Rai AK, Saikia P, Mech B (2013) Histochemical localization of alkaline phosphatase activity during cutaneous wound healing in a catfish under acid stress. *Int. J. Sci. Res. Publ.* 3 1-9.
- Reis IC dos, Fierro-Castro C, Gonçalves GS, Moromizato BS, Tort L, Biller JD, (2021)  $\beta$ -glucan mimics tissue damage signaling and generates a compensation between the head kidney and spleen to activate acquired immunity in vaccinated tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fish and shellfish Immunol.* 117: 179–187. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2021.08.003>

- Ragland SA, Criss, AK (2017) From bacterial killing to immune modulation: Recent insights into the functions of lysozyme. *PLoS pathogens*, 13(9): e-100 6512.  
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006512>
- Robyt JF, Whelan W (1968) *Amylases Starch and its Derivates*; Readlet, J.A., Ed, Chapman and Hall: London, UK. 430–476.
- Rodríguez I, Chamorro R, Novoa B, Figueras A (2009)  $\beta$ -Glucan administration enhances disease resistance and some innate immune responses in zebrafish (*Danio rerio*). *Fish & shellfish Immunol.* 27(2): 369-373.  
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2009.02.007>
- Rodríguez FE, Valenzuela B, Fariñas A, Sandino AM, Imarai M, (2016)  $\beta$ -1,3/1,6-Glucan-supplemented diets antagonize immune inhibitory effects of hypoxia and enhance the immune response to a model vaccine. *Fish & Shellfish Immunol.* 59: 36–45. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.10.020>
- Sáenz de Rodrigáñez M, Aguilar-Tellez FV, Alarcón-López FJ, Pedrosa-Islas R, Peña-Marín ES, Martínez-García R, Álvarez-González CA (2018) Alimentos microencapsulados para el cultivo de larvas de pejelagarto (*Atractosteus tropicus*). *Revista de Biología Tropical*, 66(3): 1298-1313.
- Salinas I, Parra D (2015) Fish mucosal immunity: intestine. *Mucosal Health in Aquac.* 135–170. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417186-2.00006-6>
- Sang HM, Fotedar R, (2010) Effects of dietary  $\beta$ -1, 3-glucan on the growth, survival, physiological and immune response of marron, *Cherax tenuimanus* (smith, 1912). *Fish Shellfish Immunol* 28(5-8): 957–960.  
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2010.01.020>

- Santos W, Costa L, López-Olmeda J, Costa N, Santos F, Oliveira C, Ribeiro P, (2020) Dietary protein modulates digestive enzyme activities and gene expression in red tilapia juveniles. *Animal* 14(9): 1802-1810. <https://doi.org/10.1017/S1751731120000543>
- Sarao LK, Arora M (2017) Probiotics, prebiotics, and microencapsulation: A review. *Critical Rev. Food Sci. Nutrition.* 57(2):344-371. <https://doi.org/10.1080/10408398.2014.887055>
- Schmitt P, Wacyk J, Morales-Lange B, Rojas V, Guzmán F., Dixon, B., Mercado, L., 2015. Immunomodulatory effect of cathelicidins in response to a  $\beta$ -glucan in intestinal epithelial cells from rainbow trout. *Developmental Comp. Immunol.* 51(1): 160–169. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2015.03.007>
- Shadrack RS, Manabu I, Yokoyama S, Koshio S, Miguel VA, Yukun Z, El Basuini MF (2022) Specific importance of low-level dietary supplementation of yeast strain in red sea bream . *Annals of Animal Sci* 22:1073 – 1085. <https://doi.org/10.2478/aoas-2022-0012>
- Shelby RA, Lim C, Yildirim-Aksoy M, Welker TL, Klesius PH (2009) Effects of Yeast Oligosaccharide Diet Supplements on Growth and Disease Resistance in Juvenile Nile *Tilapia*, *Oreochromis niloticus*. *J Appl Aquac* 21(1): 61–71. <https://doi.org/10.1080/10454430802694728>
- Singh M, Kim S, Liu SX (2012) Effect of Purified Oat  $\beta$ -Glucan on Fermentation of Set-Style Yogurt Mix. *Journal of food science* 77(8): E195-E201. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2012.02828.x>

- Singla V, Chakkaravarthi S, (2017) Applications of prebiotics in food industry: A review. Food Sci Technol Internat 23(8): 649–667. <https://doi.org/10.1177/1082013217721769>
- Temple MJ, Cuskin F, Baslé A, Hickey N, Speciale G, Williams SJ, Lowe EC, (2017) A Bacteroidetes locus dedicated to fungal 1, 6- $\beta$ -glucan degradation: unique substrate conformation drives specificity of the key endo-1, 6- $\beta$ -glucanase. J. Biol. Chem. 292(25):10639-10650. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.787606>
- Tomás-Almenar C, Toledo-Solís FJ, Larrán AM, de Mercado E, Alarcán FJ, Rico D, Martín-Diana AB, Fernández I (2020) Effects and safe inclusion of narbonne vetch (*Vicia narbonensis*) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) diets: Towards a more sustainable aquaculture. Anim 10(11):1–19. <https://doi.org/10.3390/ani10112175>
- Revina O., Avsejenko J., Revins V, Sargautis D, Čirule D, Valdovska A (2020) Effect of dietary supplementation with  $\beta$ -glucan on growth performance and skin-mucus microbiota of sea trout (*Salmo trutta*). Fisheries & Aquatic Life 28:(3) <https://doi.org/10.2478/aopf-2020-0019>
- Tort L (2011) Stress and immune modulation in fish. Developmental & Comparative Immunology, 35(12):1366-1375. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2011.07.002>
- Varsamos S, Nebel C, Charmantier G (2005) Ontogeny of osmoregulation in postembryonic fish: a review. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Mol Integr Physiol 141(4): 401-429. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2005.01.013>

- Vázquez-Navarrete CJ (2015) Empoderamiento de las organizaciones sociales en el cultivo de pejelagarto (*Atractosteus tropicus*) en el sureste de México. Agro Productividad, 8 (3). Recuperado a partir de <https://mail.revista-agroproductividad.org/index.php/agroproductividad/article/view/659>
- Velazquez-Carriles C, Macias-Rodríguez ME, Carbajal-Arizaga GG, Silva-Jara J, Angulo C, Reyes-Becerril M (2018) Immobilizing yeast  $\beta$ -glucan on zinc-layered hydroxide nanoparticle improves innate immune response in fish leukocytes. Fish & Shellfish Immunol 82:504–513. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.08.055>
- Versaw WK, Cuppett SL, Winters DD, Williams LE (1989) An Improved Colorimetric Assay for Bacterial Lipase in Nonfat Dry Milk. J. Food Sci. 54(6): 1557–1558. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1989.tb05159.x>
- Vetvicka V, Vannucci L, Sima P (2013) The effects of  $\beta$  - glucan on fish immunity. North American J. Med. Sci. 5(10):580-588. [doi: 10.4103/1947-2714.120792](https://doi.org/10.4103/1947-2714.120792)
- Villanueva LTG (2014) Efecto del  $\beta$ -glucano 1, 3/1, 6 sobre la respuesta inmune, la actividad enzimática digestiva y la expresión de genes de *Lutjanus peru* y *Sparus aurata*. <http://cibnor.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1001/89>
- Walter HE (1984) Proteases, and their inhibitors. Method with haemoglobin, casein and azocoll as substrate. Methods of enzymatic análisis 270-277.
- Wang J, El-Bahrawy M (2014) Expression profile of mucins (MUC1, MUC2, MUC5AC, and MUC6) in ovarian mucinous tumours: changes in expression from benign to malignant tumours. Histopathol. 66(4): 529–535. <https://doi.org/10.1111/his.12578>

- Wang X, Huang M, Yang F, Sun H, Zhou X, Guo Y, Zhang M (2015) Rapeseed polysaccharides as prebiotics on growth and acidifying activity of probiotics in vitro. *Carbohydrate Polymers* 125:232–240. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.02.040>
- Wang P, Jiang C, Liu S, Cui P, Zhang Y, Zhang S (2017) Trans-generational enhancement of C-type lysozyme level in eggs of zebrafish by dietary  $\beta$ -glucan. *Developmental Comparative Immunol* 74: 25-31. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2017.04.006>
- Wei G, Tan H, Ma S, Sun G, Zhang Y, Wu Y, Jian J (2020) Protective effects of  $\beta$ -glucan as adjuvant combined inactivated *Vibrio harveyi* vaccine in pearl gentian grouper. *Fish & Shellfish Immunol* 106: 1025–1030. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.09.027>
- White, D.J., Svellingen, C., Strachan, N.J.C., 2006. Automated measurement of species and length of fish by computer vision. *Fisheries Research* 80, 203–210. <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2006.04.009>
- Wilson W, Lowman D, Antony SP, Puthumana J, Singh IB, Philip R (2015) Immune gene expression profile of *Penaeus monodon* in response to marine yeast glucan application and white spot syndrome virus challenge. *Fish & Shellfish Immunol* 43(2): 346-356. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.12.032>
- Wood PJ (2007) Cereal  $\beta$ -glucans in diet and health. *J Cereal Sci* 46(3):230-238. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2007.06.012>
- Xue C, Xi B, Ren M, Dong J, Xie J, Xu P (2015) Molecular cloning, tissue expression of gene *Muc2* in blunt snout bream *Megalobrama amblycephala* and

- regulation after re-feeding. Chinese J. Oceanol Limnol 33(2)- 291-298.  
doi:10.1007/s00343-015-4047-4
- Xu H, Jiang Y, Xu X, Su X, Liu Y, Ma Y, Cao X (2019) Inducible degradation of lncRNA Sros1 promotes IFN- $\gamma$ -mediated activation of innate immune responses by stabilizing Stat1 mRNA. Nature Immunol 20(12): 1621-1630.  
doi:10.1038/s41590-019-0542-7
- Zaineldin AI, Hegazi S, Koshio S, Ishikawa M, Bakr A, El-Keredy AM, Dawood MAO, Dossou S, Wang W, Yukun Z (2018) Bacillus subtilis as probiotic candidate for red sea bream: growth performance, oxidative status, and immune response traits. Fish Shellfish Immunol 79: 303–312.  
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.05.035>
- Zimmer AM, Wright PA, Wood CM (2017) Ammonia and urea handling by early life stages of fishes. J. Exp. Biol. 220(21): 3843–3855.  
<https://doi.org/10.1242/jeb.140210>
- Zou PF, Chang MX, Li Y, Xue NN, Li JH, Chen SN, Nie P (2016) NOD2 in zebrafish functions as antibacterial and also antiviral responses via NF- $\kappa\beta$ , and also MDA5, RIG-I and MAVS. Fish Shellfish Immunol 55: 173-185.  
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.05.031>