



UNIVERSIDAD JUÁREZ AUTÓNOMA DE TABASCO
División Académica de Ciencias Biológicas



**“FISIOLOGÍA DIGESTIVA Y REQUERIMIENTOS NUTRICIONALES DE
LA MOJARRA TAHUINA (*Amphilophus trimaculatus*)”**

Trabajo recepcional, en la modalidad de:

Tesis de Doctorado

Para obtener el grado en:

Doctor en Ciencias en Ecología y Manejo de Sistemas Tropicales

Presenta:

Francisco Javier Toledo Solís

Directores:

Dr. Rafael Martínez García
Dr. Miguel Ángel Sáenz de Rodríguez García

Villahermosa, Tabasco, México

Marzo, 2019



**UNIVERSIDAD JUÁREZ
AUTÓNOMA DE TABASCO**

"ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE"



**DIVISIÓN ACADÉMICA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIRECCION**

MARZO 12 DE 2019

**C. FRANCISCO JAVIER TOLEDO SOLÍS
PAS. DEL DOCTORADO EN CIENCIAS EN ECOLOGÍA Y
MANEJO DE SISTEMAS TROPICALES
P R E S E N T E**

En virtud de haber cumplido con lo establecido en los Arts. 80 al 85 del Cap. III del Reglamento de titulación de esta Universidad, tengo a bien comunicarle que se le autoriza la impresión de su Trabajo Recepcional, en la Modalidad de Tesis de Doctorado en Ciencias en Ecología y Manejo de Sistemas Tropicales titulado: **"FISIOLOGÍA DIGESTIVA Y REQUERIMIENTOS NUTRICIONALES DE LA MOJARRA TAHUINA (*Amphilophus trimaculatus*)"**, asesorado por el Dr. Rafael Martínez García y Dr. Miguel Ángel Sáenz de Rodrigáñez García sobre el cual sustentará su Examen de Grado, cuyo jurado está integrado por el Dr. Carlos Alfonso Álvarez González, Dr. Emyr Saúl Peña Marín, Dr. Rafael Martínez García, Dra. Susana Camarillo Coop, Dr. Luis Daniel Jiménez Martínez, Dra. Judith Andrea Rangel Mendoza y Dra. Carina Shianya Álvarez Villagomez.

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.

A T E N T A M E N T E
ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE

M. EN C. ROSA MARTHA PADRON LOPEZ
DIRECTORA

UJAT
DIVISIÓN ACADÉMICA
DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DIRECCIÓN

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

CARTA AUTORIZACIÓN

El que suscribe, autoriza por medio del presente escrito a la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco para que utilice tanto física como digitalmente el Trabajo Recepcional en la modalidad de Tesis de doctorado denominado: **“FISIOLOGÍA DIGESTIVA Y REQUERIMIENTOS NUTRICIONALES DE LA MOJARRA TAHUINA (*Amphilophus trimaculatus*)”**, de la cual soy autor y titular de los Derechos de Autor.

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

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

Se firma la presente autorización en la ciudad de Villahermosa, Tabasco a los 12 Días del mes de marzo de 2019

AUTORIZO



FRANCISCO JAVIER TOLEDO SOLÍS



**UNIVERSIDAD JUÁREZ
AUTÓNOMA DE TABASCO**

"ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE"



**DIVISIÓN ACADÉMICA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIRECCION**

Villahermosa, Tab., a 12 de Marzo de 2019

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. FRANCISCO JAVIER TOLEDO SOLÍS** egresado del Doctorado en **CIENCIAS EN ECOLOGÍA Y MANEJO DE SISTEMAS TROPICALES** de la División Académica de **CIENCIAS BIOLÓGICAS** la opción de titularse bajo la modalidad de Tesis de Doctorado denominado: **"FISIOLOGÍA DIGESTIVA Y REQUERIMIENTOS NUTRICIONALES DE LA MOJARRA TAHUINA (*Amphilophus trimaculatus*)"**.

Sin otro particular, aprovecho la ocasión para saludarle afectuosamente.

A T E N T A M E N T E

**M. EN C. ROSA MARTHA PADRON LOPEZ
DIRECTORA DE LA DIVISIÓN ACADÉMICA
DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

UJAT
DIVISIÓN ACADÉMICA
DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



DIRECCIÓN

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

DEDICATORIA

A Dios:

Por darme la oportunidad de concluir mis estudios.

A mis Padres y Hermanos:

Por todo su apoyo incondicional durante mi formación académica y la constante motivación para alcanzar mis metas.

A mis abuelos:

Por el apoyo moral y motivacional que siempre me han brindaron durante toda mi vida. En especial a ellos, que se marcharon durante mi formación y no tuve la oportunidad de despedirme, les recuerdo y les llevaré siempre presente.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la Beca de estudios No. 255388 otorgada para realizar los estudios de posgrado (Doctorado en Ecología Y Manejo de Sistemas Tropicales), del 01 Febrero 2015 a 31 de Enero 2019. También por la de Beca de Movilidad en el Extranjero, asignada para la estancia de investigación en Laboratorio de Investigación de Biología Animal, del Departamento de Biología y Geología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Almería, España, del periodo del 01 de Junio al 30 de Noviembre 2018.

A la asociación de Universidades Andaluzas e Iberoamericanas (AUIP), por la Beca del Programa de Movilidad Académica, para el Departamento de Biología y Geología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Almería, España, del 01 de Junio al 30 de Noviembre de 2018.

A la Secretaria de Investigación y Posgrado de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, por los recursos asignados para la Estancia de Investigación en el Laboratorio de Neuroendocrinología del Crecimiento y la Reproducción, en el Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales en la Universidad de Buenos Aires, Argentina, del 29 de Febrero al 29 de Abril de 2016.

A la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco por todas las facilidades brindadas para la realizar mis estudios de posgrado, sobre todo Laboratorio de Acuicultura Tropical y Laboratorio de Bioquímica de la División Académica de Ciencias Biológicas, en donde tuve la oportunidad de realizar la mayor parte de la investigación.

Al Centro de Investigaciones Costeras ICBIOL-UNICACH, por las instalaciones prestadas para realizar una parte de la investigación. Y sobre todo a los técnicos académicos y amigos el Biol. William Rodríguez Valencia y Biol. Mario Alberto Gómez Gómez, por su apoyo en la realización del experimento.

A mis directores de tesis el Dr. Rafael Martínez García y al Dr. Miguel Angel Saénz de Rodrigáñez García, por todo el apoyo y la paciencia que tuvieron durante esta dirección de la tesis y siempre facilitarme las cosas para poder concluir esta meta. Les agradezco también su amistad y confianza que me han brindado.

Al Dr. Carlos Alfonso Álvarez González por todo el apoyo y respaldo en esta investigación; por haber estado siempre disponible para ayudarme a solventar cada uno de los obstáculos que se presentaron durante el posgrado. Y sobre todo por la amistad y confianza brindada.

Al comité sinodal por el tiempo dedicado a la revisión del documento y todas las sugerencias para complementar dicha tesis Dr. Carlos Alfonso Álvarez Gonzales, Dr. Emyr Saúl Peña Marin, Dr. Rafael Martínez

García, Dra. Susana Camarillo Coop, Dr. Luis Daniel Jiménez Martínez, Dra. Judith Andrea Rangel Mendoza y Dra. Carina Shianya Alvarez Villagómez.

A la Dra. Susana Camarillo Coop presidenta del comité predoctoral, por todo el apoyo y disponibilidad brindada durante esta evaluación. También a cada uno de los integrantes del comité: Dra. Judith Andrea Rangel Mendoza, Dr. Nicolás Álvarez Pliego, Dr. Mario Alberto Galaviz Espinoza y Dr. Carlos Alfonso Castillo Domínguez.

Al Dr. Dariel Tovar Ramírez, Dr. Mario Alberto Galaviz Espinoza y Dra. Judith Andrea Rangel Mendoza por todo el apoyo y facilidades brindadas en los ensayos de laboratorio que implicaron parte de esta tesis.

Al Dr. Luis Daniel Jiménez Martínez, gracias por el apoyo y paciencia brinda para poder concluir esta tesis. Sobre todo te agradezco tu amistad y el tiempo dedicado para poder trabajar los fines de semana en el laboratorio.

Al Dr. Emyr Saúl Peña Marin por el apoyo, consejos y facilidades brindadas para poder concluir esta tesis; también por la amistad y confianza en estos años.

Al Dr. Francisco Javier Moyano López y al Dr. Manuel Díaz López por todo el apoyo, consejos y paciencia que me brindaron durante la redacción de buena parte de esta investigación. Gracias por la oportunidad y la confianza de recibirme en su laboratorio. Y porque no, gracias por la buena hospitalidad, amistad y los buenos ratos que pasamos juntos. También a las chicas del laboratorio Mari, Isabel y Paqui gracias por todas las enseñanzas, amistad y hacer más llevaderos los días de trabajo estando fuera de casa.

Al grupo de investigación de la Dra. Paula Vission, a la Dra. Pauli, Dra. Daniela y Dr. Tomas, ha todo ellos gracias por el apoyo y por su amable hospitalidad durante la estancia de investigación.

A la Mtra. Arlette Hernández Franyutti y técnico de laboratorio el Biol. Moisés González por todo el apoyo y disponibilidad del laboratorio para realizar una parte correspondiente de esta investigación.

Los veranos de investigación por la Academia Mexicana de Ciencias las biólogas Andrea Guadalupe y Cecilia Guadalupe por su asistencia, participación y apoyo en los distintos trabajos de laboratorio que implico esta tesis.

A la mujer que ha estado a mi lado en los buenos y malos momentos de este arduo camino; quien con su paciencia, consejos y amor me motiva y ayuda hacer cada día una mejor persona. Mi vida muchas gracias por todo, te amo mi picky.

Y a todas las personas que de una u otra forma participaron y apoyaron en la realización del presente trabajo, y que por cuestiones de espacio omito sus nombres, les doy las gracias.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

ÍNDICE	i
RESUMEN	v
1.- INTRODUCCIÓN	1
2.- ANTECEDENTES	4
2.1.- La acuicultura como alternativa para la seguridad alimentaria	4
2.2.- Fisiología digestiva en peces	4
2.2.1.- Estudios histológicos en la fisiología digestiva de larvas de peces.....	5
2.2.2.- Expresión de genes precursores de las enzimas digestivas en peces	6
2.3.- Requerimientos nutricionales de proteínas y lípidos en peces	8
2.4.- Digestibilidad <i>in vitro</i> en peces	10
2.5.- Estudios realizados en <i>Amphilophus trimaculatus</i>	11
3.- JUSTIFICACIÓN	13
4.- OBJETIVOS	14
4.1.- Objetivo general	14
4.2.- Objetivo específico.....	14
5.- HIPÓTESIS	15
6.- REFERENCIAS	16
7.- CAPÍTULOS	29
7.1.- CAPÍTULO I: Desarrollo histológico del sistema digestivo y expresión génica de enzimas digestivas en la ontogenia inicial de la mojarra tahuina (<i>Amphilophus</i>	

<i>trimaculatus</i>).....	29
7.1.1.- RESUMEN	29
7.1.2.- INTRODUCCIÓN.....	30
7.1.3.- MATERIALES Y MÉTODOS	33
7.1.3.1.- Obtención de material biológico	33
7.1.3.2.- Colecta de muestras para histología y molecular	33
7.1.3.3.- Análisis histológicos del sistema digestivo	34
7.1.3.4.- Extracción de ARN y síntesis de ADNc	34
7.1.3.5.- Diseño de primers para RT-PCR y qRT-PCR.....	34
7.1.3.6.- Cuantificación por qRT-PCR	35
7.1.3.7.- Análisis estadísticos	36
7.1.4.- RESULTADOS	37
7.1.4.1.- Crecimiento en peso húmedo y longitud total.....	37
7.1.4.2.- Descripción histológica del desarrollo del sistema digestivo.....	38
7.1.4.3.- Expresión génica de precursores de enzimas digestivas	48
7.1.5.- DISCUSIÓN.....	50
7.1.5.1.- Crecimiento en peso húmedo y longitud total.....	50
7.1.5.2.- Descripción histológica del sistema digestivo.....	50
7.1.5.3.- Expresión génica de precursores de enzimas digestivas	54
7.1.6.- CONCLUSIÓN	58
7.1.7.- REFERENCIAS	59
7.2.- CAPÍTULO II: Requerimiento de proteína y lípidos en larvas de la mojarra tahuina (<i>Amphilophus trimaculatus</i>).....	72
7.2.1.- RESUMEN	72
7.2.2.- INTRODUCCIÓN.....	73
7.2.3.- MATERIALES Y MÉTODOS	76
7.2.3.1.- Obtención de larvas y sistema de recirculación	76

7.2.3.2.- Diseño experimental.....	76
7.2.3.3.- Formulación y preparación de dietas.....	76
7.2.3.4.- Alimentación y biometría.....	78
7.2.3.5.- Índices de crecimiento.....	79
7.2.3.6.- Toma de muestras para análisis.....	79
7.2.3.7.- Análisis bioquímicos.....	79
7.2.3.8.- Análisis proximales.....	80
7.2.3.9.- Análisis estadísticos.....	81
7.2.4.- RESULTADOS.....	82
7.2.4.1.- Crecimiento e índices de eficiencia.....	82
7.2.4.2.- Análisis de la composición proximal.....	85
7.2.4.3.- Actividad enzimática digestiva.....	85
7.2.5.- DISCUSIÓN.....	90
7.2.5.1.- Crecimiento e índices de eficiencia.....	90
7.2.5.2.- Análisis de la composición proximal.....	93
7.2.5.3.- Actividad enzimática digestiva.....	94
7.2.6.- CONCLUSIÓN.....	97
7.2.7.- REFERENCIAS.....	98

7.3.- CAPÍTULO III: Evaluación *in vitro* de la biodisponibilidad potencial de proteínas y lípidos en los ingredientes de los alimentos para la mojarra tahuina (*Amphilophus trimaculatus*).....

110

7.3.1.- RESUMEN.....	110
7.3.2.- INTRODUCCIÓN.....	111
7.3.3.- MATERIALES Y MÉTODOS.....	114
7.3.3.1.- Ingredientes proteicos y lipídicos.....	114
7.3.3.2.- Material biológico y preparación de extractos enzimáticos.....	115
7.3.3.3.- Proteína soluble y actividad enzimática de los extractos.....	116
7.3.3.4.- Determinación del grado de hidrólisis (GH).....	116

7.3.3.5.- Determinación de aminoácidos libres totales (TFA).....	117
7.3.3.6.- Velocidad de hidrolisis (VH)	117
7.3.3.7.- Análisis estadístico	118
7.3.4.- RESULTADOS	119
7.3.4.1.- Digestibilidad <i>in vitro</i> de harinas proteicas (GH)	119
7.3.4.2.- Digestibilidad <i>in vitro</i> de aceites (VH).....	124
7.3.5.- DISCUSIÓN	125
7.3.5.1.- Digestibilidad <i>in vitro</i> de harinas proteicas (GH)	125
7.3.5.2.- Relación entre GH ácido y alcalino	128
7.3.5.3.- Relación entre GH y TFA	129
7.3.5.4.- Selección de harinas proteicas por GH y TFA	129
7.3.5.5.- Digestibilidad <i>in vitro</i> de aceites (VH).....	130
7.3.6.- CONCLUSIÓN	132
7.3.7.- REFERENCIAS	133
8.- DISCUSIÓN GENERAL.....	146
9.- CONCLUSIONES.....	150
10.- REFERENCIAS	152

RESUMEN

En los últimos años, se ha profundizado en el estudio de cíclidos nativos en la costa del Pacífico Sur de México, con el fin de encontrar candidatos óptimos para su incorporación a la acuicultura nacional. Un caso podría ser la mojarra tahuina (*Amphilophus trimaculatus*), en la cual se ha observado características prometedoras para su adaptación al cultivo. Sin embargo, al igual que en la mayoría de las especies nativas, existen vacíos de información en casi todos los aspectos. En esta especie, en la etapa larvaria hay un desconocimiento generalizado en la fisiología digestiva y nutricional, más específicamente en el desarrollo del sistema digestivo y patrones de expresión de los genes precursores de las enzimas digestivas durante la ontogenia inicial. Todo ello, junto a los requerimientos nutricionales de proteínas y lípidos de esta etapa de cultivo, podría facilitar el desarrollo del larvicultivo de esta especie. Otro enfoque diferente, pero igualmente importante es la localización de ingredientes potenciales proteicos y lipídicos, que podrán ser utilizados para la elaboración de alimentos específicos, que permitan optimizar el crecimiento durante el cultivo. Para abordar el primer apartado, se tomaron muestras de larvas durante la ontogenia inicial hasta el día 30 después de la eclosión (dde). Con el fin de describir el desarrollo del sistema digestivo, realizaron análisis histológicos mediante la tinción de hematoxilina-eosina (H&E). Los resultados indicaron que dicho sistema digestivo presenta un desarrollo similar a lo descrito en otros cíclidos, encontrándose a partir del día 6 dde (5.82 ± 0.32 mm) diferencias histológicas en distintos órganos como esófago, estómago, intestino, páncreas e hígado. En cuanto a la determinación de los patrones de expresión de enzimas digestivas, se realizó la identificación parcial de cada zimógeno (pepsinógeno, tripsinógeno, quimotripsinógeno y α -amilasa). Enseguida se aplicó la técnica de qRT-PCR, para lo cual, se diseñaron oligonucleótidos

específicos. Los resultados obtenidos mostraron un perfil de baja expresión durante los primeros días; sin embargo, cambia a partir del día 6 dde (5.82 ± 0.32 mm); en donde se registra una expresión superior con diferencias significativas, indicando la posible funcionalidad de algunos órganos del sistema digestivo. Los niveles de máxima expresión se obtienen próximos al día 15 dde (7.28 ± 0.26 mm), justo cuando el digestivo se encuentra desarrollado y la alimentación es exclusivamente con pienso comercial. Para la determinación de los requerimientos necesarios de proteína y lípidos para esta especie en edades tempranas, se realizó un diseño bifactorial aleatorizado 4x2 de proteína (35, 40, 45, y 50%) y lípidos (16 y 22%) respectivamente. Este se llevo a cabo en un sistema de recirculación de agua durante 60 días, con larvas de peso inicial de 0.16 ± 0.02 g. Se evaluó crecimiento y eficiencia del alimento mediante índices zootécnicos, análisis químicos proximales y de actividad enzimática, utilizando análisis multivariantes para su interpretación. En los resultados, se puede observar que los porcentajes óptimos están cercanos a 45% de proteína y 22% de lípidos; los cuales generaron los mejores índices de eficiencias del alimento, crecimiento y supervivencia. Asimismo, la actividad de las enzimas digestivas de las larvas indicaron las condiciones nutricionales que presentan los peces, por la influenciada de los distintos porcentajes de proteína y lípidos incluidos en los alimentos. Finalmente, para la búsqueda de materias primas candidatas a ser utilizadas en la elaboración de dietas específicas para esta especie, se utilizó la técnica de digestibilidad *in vitro* mediante pH-stat. Para ello, se utilizaron extractos enzimáticos de juveniles, los cuales sirvieron para evaluar las materias primas proteicas en condiciones ácidas y alcalinas; sumándose la cuantificación de aminoácidos libres totales producidos al finalizar la reacción. En el caso de la digestibilidad de los ingredientes lipídicos únicamente se evaluó la variación del pH en condiciones alcalinas. Las enzimas digestivas de esta especie mostraron una mayor afinidad por las materias primas de origen animal. Ingredientes proteicos como la harina de carne de res, la harina de pescado y la harina ave premium presentaron una mejor digestibilidad; mientras que los ingredientes lipídicos que podrían ser utilizados son los aceites de pescado. Sin embargo, no se descarta la posibilidad de utilizar ingredientes de origen vegetal, como los productos de soya o algunos cereales, así como aceites vegetales de oliva, maíz y soya.

1.- INTRODUCCIÓN

En los últimos años, la acuicultura ha sido considerada como uno de los sectores productivos con mayor crecimiento, aportando casi el 50% de los productos de origen acuáticos para consumo humano (FAO, 2014a). Este sector podría ser una de las alternativas para resolver el problema de la seguridad alimentaria que padecen muchos países, con la producción de diversos organismos acuáticos. Si bien se ha recomendado cultivar especies nativas, son las especies exóticas las que mayor producción mundial han tenido debido tanto a su importancia social como comercial (FAO, 2015a).

En México, la acuicultura se basa en especies introducidas (Baltazar, 2007), pero en los últimos años ha aumentado el interés en el desarrollo del cultivo de especies nativas dulceacuícolas y marinas. En el sur del país, se desarrollan las tecnologías para el cultivo de especies locales como pejelagarto (*Atractosteus tropicus*), tenguayaca (*Petenia splendida*), castarrica (*Cichlasoma urophthalmus*) y robalos (*Centropomus undecimalis*); las cuales son mayormente apreciadas y aceptadas en la región ante las especies introducidas (Márquez, 2011; SAGARPA, 2013; Contreras-Sánchez *et al.*, 2012). Dentro de las especies localizadas en la región sur de la costa del Pacífico Mexicano se ha puesto también interés en la mojarra tahuina con fines acuícolas; recientemente nombrada por Řičan *et al.*, (2016) como *Amphilophus trimaculatus* Günther, (1867), anteriormente nombrada *Cichlasoma trimaculatum*.

Las características con que cuenta *A. trimaculatus* son interesantes para desarrollar su tecnología de cultivo. Es una especie dulceacuícola con tolerancia a la salinidad que se distribuye desde México hasta El Salvador, habita en cuerpos de agua cercanos a la costa, como ríos, lagunas y esteros (Orellana-Amador, 1992; Miller *et al.*, 2009). En los estados de Guerrero, Oaxaca y Chiapas tiene un elevado valor comercial, debido a la demanda que se tiene por el consumo cultura en la región (Ortiz-Cruz, 2011). En cautiverio tolera las condiciones de manejo y variaciones de los parámetros físicos y químicos del agua; posee hábitos alimenticios de un omnívoro, con tendencia a carnívora y acepta fácilmente el consumo de alimentos comerciales de otras especies (Violante, 1995).

La alimentación y nutrición en las especies de cultivo son fundamentales para generar sistemas de producción acuícolas eficientes y económicamente rentables. Por ello, debe formularse un alimento para cada una de las especies cultivadas; en base a que tienen diferentes requerimientos nutricionales, los cuales incluso pueden cambiar durante sus etapas de desarrollo (De la Higuera, 1987; Tacon, 1989). Estos estudios permite conocer los niveles óptimos de proteínas, lípidos, carbohidratos, entre otros; para proporcionar la menor cantidad necesaria para sostener el mantenimiento, crecimiento y reproducción del propio organismo (Watanabe, 1987). Además, de una formulación adecuada, se han establecido protocolos de alimentación para proporcionar las cantidades correctas; reduciendo las perdidas las cuales desembocaría en aumento tanto en los costos y la contaminación de los sistemas de producción (Catacutan *et al.*, 2001; Abdo de la Parra *et al.*, 2010).

Las proteínas y los lípidos son considerados como los nutrientes de mayor relevancia en la formulación de los alimentos para peces. Uno de los factores principales que afecta directamente al crecimiento y desarrollo en peces es la proteína; por estar íntimamente relacionada tanto en la formación de estructuras como en el aporte de energía. Además, es considerado uno de los nutrientes más caros, constituyendo entre el 50 y el 70% del costo de la dieta (García-Ortega *et al.*, 2010; Almeida y Possebon, 2014). El caso de los lípidos, también son de gran relevancia ya que aportan energía, promueven el crecimiento y son la base en el suministro de ácidos grasos esenciales (Watanabe, 1987).

Otro de los aspectos fundamentales para la elaboración de alimentos es la selección de los ingredientes empleados, que se realiza bajo diferentes criterios. Algunas de las condiciones por las que una materia puede ser seleccionada o descartada para su uso en la formulación son la disponibilidad en la región, el precio y las características fisiológicas digestivas de la especie; las cuales permitirán obtener un mayor aprovechamiento de los nutrientes (Álvarez-González, 2003; Moyano 2006). Actualmente los ingredientes más utilizados son las harinas y aceites de pescado, pero la alta demanda de los últimos años ha incrementado su precio y se está alzando el límite máximo de explotación (Tacon *et al.*, 2011). Por ello, la búsqueda de ingredientes alternativas tanto de origen animal como vegetal, para la formulación de dietas para diferentes especies, es uno de los estudios con mayor interés en los últimos años. Una forma de realizar la

selección de ingredientes es la simulación del proceso digestivo mediante la digestibilidad *in vitro* (Moyano *et al.*, 2014). Uno de estos métodos es el pH-stat, mediante el cual se puede obtener una referencia de la bioaccesibilidad de los nutrientes de cada una de las materias primas después de simular el proceso de digestión (Parada y Aguilera, 2007; Hamdan *et al.*, 2009). Así se podrían seleccionar o descartar ingredientes potenciales para la formulación de alimentos en las diferentes etapas del cultivo.

La etapa larvaria es crucial para consolidar una especie en la producción acuícola; debido a que el proceso de alimentación es más complejo por las pautas de alimentación y la formulación de alimentos, a causa de la formación y desarrollo del sistema digestivo. Por ello, es importante determinar en qué momento del desarrollo se encuentra el digestivo completo y funcional, para iniciar la alimentación exógena. Los métodos usualmente utilizados para dicho fin son las pruebas histológicas, moleculares y bioquímicas. Los estudios histológicos describen la formación de los órganos del sistema digestivo y la posible funcionalidad (Treviño *et al.*, 2011). Los trabajos moleculares y bioquímicos, permiten el entendimiento de la relación que existe entre la transcripción de un gen particular de una enzima digestiva, y la actividad para llevar a cabo el proceso de digestión (Galaviz *et al.*, 2012). Por ello, un conocimiento adecuado sobre el desarrollo del sistema digestivo permitirá entender parte de las necesidades nutricionales de las larvas; con lo que se podrán elaborar dietas y protocolos de alimentación para reducir los factores limitantes en el larvicultivo y obtener larvas de buena calidad para las siguientes etapas del cultivo (Hamre *et al.*, 2013).

Por lo tanto, la presente investigación tiene como objetivos aportar información sobre el desarrollo y fisiología digestiva en la etapa larvaria; así como también, evaluar los requerimientos nutricionales y los posibles ingredientes potenciales en la elaboración de dietas para la etapa juvenil de *A. trimaculatus*. Esto aportará información relevante para facilitar el diseño de protocolos de alimentación y la formulación de alimentos que potencie la producción acuícola en la región.

2.- ANTECEDENTES

2.1.- La acuicultura como alternativa para la seguridad alimentaria: La acuicultura es una de las alternativas más prometedoras para resolver la problemática de la seguridad alimentaria de la sociedad moderna. La FAO en el Estado de la Inseguridad Alimentaria en el Mundo; reporta que existen alrededor de 805 millones de personas en el mundo crónicamente subalimentadas (FAO, 2014b). También menciona que este problema tan complejo debe ser combatido desde los distintos sectores productivos, tales como el agrario, la silvicultura, el desarrollo rural, el comercio, la pesca, entre otros. En este sentido, la pesca mundial en los últimos años ha aportado alrededor de 90 millones de toneladas de producción; manteniendo una tasa de crecimiento media anual del 3.2%. Mientras que la acuicultura tiene una tasa de crecimiento media anual del 6.2%, considerándose posiblemente como el sector productivo de mayor crecimiento. Aporta casi el 50% del pescado mundial para el consumo humano (FAO, 2014a); lo cual, ha generado contribuciones importantes para reducir la pobreza y la seguridad alimentaria mundial. Actualmente a nivel mundial en el cultivo de especies acuáticas es diversa; la FAO tiene registrada cerca de 567 especies acuáticas cultivables, siendo principalmente peces, crustáceos, algas y moluscos (FAO, 2015b). Mientras que en México se cultivan 61 especies, de las cuales 40 son nativas y 21 son de origen exótico habiéndose introduciendo al país para su cultivo (FAO, 2013). Sin embargo, se siguen realizando investigaciones en el área de fisiología digestiva, nutrición y alimentación, fisiología reproductiva, mejoramiento genético, alternativas para alimentos acuícolas, entre otras áreas para desarrollar la tecnología de cultivo para especies nativas; las cuales tienen una preferencia social en la región y precios más elevados en las distintas regiones (Márquez, 2011; Contreras-Sánchez *et al.*, 2012; SAGARPA, 2013).

2.2.- Fisiología digestiva en peces: La fisiología del sistema digestivo en peces difiere en las distintas especies; a pesar de las diferencias anatómicas, fisiológicas y hábitos alimenticios, la función básica del aparato digestivo es la capacidad de digerir y absorber los nutrientes; pero llevar acabo estos procesos en los primeros días de desarrollo es complicado porque aún se encuentra en formación y aun no es completamente funcional (Treviño *et al.*, 2011). En este caso, se realizan distintos estudios en diferentes áreas (histología, bioquímica, biología molecular, digestibilidad) encaminados a comprender el funcionamiento del sistema digestivo

en la etapa larvaria. Permitiendo así, la generación de tecnología de larvicultivo, en esta etapa considerada para algunas especies el cuello de botella para el cultivo (Gisbert *et al.*, 2008; Zambonino-Infante *et al.*, 2008).

2.2.1.- Estudios histológicos en la fisiología digestiva de larvas de peces: Las técnicas histológicas permiten estudiar la condición nutricional por medio de las modificaciones en el tejido celular de diferentes órganos del aparato digestivo. Estos estudios se han realizado en larvas de *Engraulis anchoita*, donde se describieron las condiciones nutricionales y se determinó un índice de condición histológico para diferentes estadios de crecimiento; así también se encontró que un periodo corto de inanición genera un deterioro progresivo en los diferentes tejidos (Díaz *et al.*, 2011). En peces adultos particularmente se describen la forma de cada órgano del sistema digestivo; en *Pimelodus blochii* se describió detalladamente como está constituida la boca, el esófago, el estómago el cual resultó ser grande y musculoso con gran número de glándulas gástricas, y el intestino que es de longitud intermedia; todas estas características histológicas podrían indicar los hábitos alimenticios de cada especie, en donde para *P. blochii* indica que es de hábitos omnívoros con tendencia a carnívora (Guzmán-Beltrán *et al.*, 2013).

En la etapa larvaria, los estudios se enfocan en la descripción del proceso de formación, desarrollo y funcionalidad del sistema digestivo. En el trabajo de Hernández *et al.*, (2014) se utilizaron pruebas histológicas e histoquímicas para describir la organogénesis en la etapa larvaria de *Rhamdia quelen* encontrando que al momento de eclosión las larvas tiene un sistema digestivo rudimentario (tubo recto), el cual tiene cambios importantes en los días 4 y 6 dde donde se produce la separación de la región anterior y posterior del intestino. Pero es entre los días 12 y 15 dde cuando el sistema digestivo tiene las características de un juvenil y se considera funcional para la digestión y absorción de cualquier alimento. En cíclidos se han realizados algunos estudios como el de *Pterophyllum scalare*, en donde se determinó ocho estadios de desarrollo para el proceso de formación del sistema digestivo, comprendiendo un total de 119 horas con 44 min. El cual, inicia desde el momento de la gástrula hasta la absorción del saco vitelino, siendo en el estadio número ocho donde se presenta el movimiento de las mandíbulas (Ávila *et al.*, 2008). En *P. splendida* y *C. urophthalmus* se ha descrito una pronta formación de

la morfología y funcionalidad del sistema digestivo entre los días 15 y 19 dde, en donde ya se observa la diferenciación de las regiones de bucofaringe, esófago, estómago e intestinos, así como las glándulas de accesorias del tracto digestivo (Treviño *et al.*, 2011; Cuenca-Soria *et al.*, 2013a).

2.2.2.- Expresión de genes precursores de las enzimas digestivas en peces: En peces algunos de los genes precursores de enzimas digestivas que más se han estudiados son el pepsinógeno, tripsinógeno y quimiotripsinógeno. Por mencionar algunos trabajos se describe el de Gawlicka *et al.*, (2001) quienes estudiaron la expresión del pepsinógeno IIa y pepsinógeno IIb en diferentes células del estómago de *Pleuronectes americanus*; encontrando expresión de estos genes en las células de las glándulas gástricas. En donde se lleva a cabo la síntesis de pepsinógeno y la secreción de ácido clorhídrico, para convertir el pepsinógeno a su forma activa (pepsina). Este proceso de síntesis del pepsinógeno y su activación con el ácido clorhídrico se ha descrito también en otros vertebrados (Kageyama, 2002). Otros estudios se han centrado en la aislación y purificación de genes para la caracterización, como en *Lateolabrax japonicus* y *Monopterus albus* en donde a tres tipos de pepsinógenos PG1, PG2 y PG3; se les calculó la temperatura, pH óptimo, efecto de inhibición y peso molecular, encontrando que las características observadas son parecidas a las descritas para otros peces y algunos mamíferos (Min-Jie *et al.*, 2011; Wu-Yin *et al.*, 2011). En *Centropomus undecimalis* y *P. splendida* se han estudiado la expresión del gen tripsinógeno en la ontogenia inicial. En el caso de *C. undecimalis* se midió en los primeros 12 dde de la eclosión, encontrándose expresión a partir del día 3 dde y ésta se incrementa después del día 5 dde (Martínez-Burguete, 2012). Al compararlo con *P. splendida* el tripsinógeno se detectó antes de la eclosión de la larva y la máxima expresión se registró en los días 3 y 23 dde (Arevalo-Galan, 2009). La detección de la expresión del tripsinógeno antes de la eclosión se ha registrado en otras especies; esto es adjudicado a la transferencia genética de los progenitores. En las especies *Dicentrarchus Labrax*, *Sciaenops ocellatus* y *Solea senegalensis*, se ha detectado actividad tripsina al momento de la apertura de la boca entre los días 2 y 4 dde dependiendo de la especie. En este caso la activación del tripsinógeno es previo a la actividad enzimática, coincidiendo con los descrito por Zambonino y Cahu, (2001) quienes mencionan que debe existir una expresión de tripsinógeno antes de la actividad enzimática.

La expresión de genes así como los estudios histológicos y bioquímicos pueden ser aplicados para determinar la funcionalidad del sistema digestivo. En la especie *Lutjanus guttatus* se realizaron estudios histológicos, bioquímicos y moleculares en los primeros 40 dde para entender el desarrollo de la fisiología digestiva. Los resultados muestran que la expresión de tripsinógeno y la actividad enzimática de tripsina son detectadas desde los primeros días de la eclosión, pero se incrementan a lo largo del desarrollo y en los cambios de alimentación. La expresión de pepsinógeno y tripsinógeno es detectada en los días 18 y 25 dde respectivamente; mientras que la actividad enzimática de tripsina y pepsina, en los días posteriores a la expresión de los genes. Con esto se sugiere que el destete de las larvas podría realizarse entre los días 20 y 25 dde, es decir en un menor tiempo al que se realiza en las prácticas acuícolas entre los 28 y 30 dde (Galaviz *et al.*, 2012). Mientras que en *Oreochromis mossambicus* la expresión de ARNm y la actividad enzimática es detectada en la primera semana; en el día 2 dde se expresa el pepsinógeno y en el día 1 dde el tripsinógeno y el quimiotripsinógeno; la actividad específica de pepsina es detectada en el día 3 dde y en el día 5 dde para tripsina y quimiotripsina. La expresión de los genes y la actividad de las enzimas se incrementan gradualmente después de la eclosión (Ming-Ji and Chin-Feng, 2006).

Los estudios realizados sobre la expresión y la actividad de la α -amilasa, se asocian como indicadores de la funcionalidad del páncreas y la maduración del sistema digestivo (Cahu *et al.*, 2004; Darias *et al.*, 2006). Estos estudios son escasos y se han realizado comumente en especies marinas. En donde, se ha descrito comúnmente que los patrones de expresión son elevados en los primeros días de la eclosión; los cuales tienden a disminuir durante las etapas de crecimiento de la ontogenia, como lo reportado en *Dentex dentex* (Gisbert *et al.*, 2009), *Labrus bergylta* (Hansen *et al.*, 2013), y *Totoaba macdonaldi* (Galaviz *et al.*, 2015). Estos primeros niveles de expresión o actividad, no se ha descrito claramente la funcionalidad adjudicándose a una programación genética (Cahu *et al.*, 2004; Darias *et al.*, 2006), o bien, esto hace considerar la importancia de los carbohidratos en los primeros días de desarrollo de estas especies (Lazo *et al.*, 2011; Murashita *et al.*, 2014). Por su parte, los bajos niveles de expresión que se presentan en días posteriores a la absorción de las reservas vitelinas, se han relacionado con el aprovechamiento de los carbohidratos, cuando de forma oportuna son consumidos en los alimentos .

2.3.- Requerimientos nutricionales de proteínas y lípidos en peces: En peces cultivados o con potencial para la producción acuícola, la determinación de los requerimientos nutricionales es fundamental para una correcta formulación del alimento. En estos estudios los principales nutrientes que se consideran son las proteínas, lípidos, carbohidratos, vitaminas y minerales; los cuales tienen que ser proporcionados por lo menos en la mínima cantidad que permitan el mantenimiento y desarrollo de la especie (Maldonado-García *et al.*, 2012). El aporte en exceso podría ser contraproducente ya que en algunos casos genera daños fisiológicos en los organismos (Fernández y Gisbert, 2010). Así también, se deben considerar los hábitos alimenticios y los aspectos fisiológicos del sistema digestivo, porque los requerimientos nutricionales cambian en cada uno de los estadios de desarrollo para cada especie (Sarasquete *et al.*, 2014). Si se cuenta con una buena nutrición y los correctos protocolos de alimentación para las especies cultivadas, la rentabilidad de los cultivos podría aumentar.

La determinación del requerimiento de proteínas permite obtener el máximo crecimiento con la mínima cantidad de proteína en la dieta. El agregar más proteína en el alimento incrementa la excreción de nitrógeno por los peces y el precio del alimento; por ser el nutriente más caro y de mayor proporción en la fórmula (Abdo de la Parra *et al.*, 2010; Gutiérrez *et al.*, 2010). Este exceso de proteína no necesariamente generará un mayor crecimiento, porque podría ser utilizado como fuente de energía; aunque de alto costo (Catacutan *et al.*, 2001). En algunas especies como *Sparus Macrocephalus* se determinó el requerimiento de proteína en 41.8% y se observó que por arriba de este porcentaje la ganancia en peso y la tasa de crecimiento se reduce; por lo que agregar más cantidad de proteína en la dieta no es garantía de un mayor crecimiento (Zhang *et al.*, 2010). Mientras que en *Centropristis striata* requiere de aproximadamente 45% de proteína para obtener un máximo crecimiento (Alam *et al.*, 2008). Sin duda, en peces carnívoros los requerimientos de proteínas son más elevados que en omnívoros, encontrándose entre el 40 y 60% (Alam *et al.*, 2009; Biswas *et al.*, 2009).

Si bien en la mayoría de los peces en cultivo o con potencial acuícola se ha determinado el requerimiento de proteína, en algunas investigaciones se evalúa también el requerimiento de lípidos; por ser el nutriente de mayor aporte energético y de ácidos grasos en los alimentos formulados para peces. Pero además del aporte energético, promueven el crecimiento mediante

el desarrollo de la membrana celular con el suministro de fosfolípidos y colesterol (Carrasco-Chávez, 2004); mejorando la supervivencia en la etapa larvaria. Sin embargo, un exceso de lípidos en los peces puede provocar anomalías en las células del hígado (hepatocitos); afectando la respuesta de inmunidad y reduciendo la resistencia a los agentes patógenos (Yildirim-Aksoy *et al.*, 2009). Por ello, se debe proporcionar la cantidad adecuada o el mínimo requerido por el pez para el mantenimiento, crecimiento y salud de los peces cultivados. La fuente de lípidos debe proporcionar los ácidos grasos esenciales de tipo poliinsaturados (PUFA) como el ácido araquidónico (ARA, 20:4n-6), el ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:5n-3), el ácido docosahexaenoico (DHA, 22:6n-3), el ácido linoleico (18:2n-6) y ácido linolénico (18:3n-3) (Hamre *et al.*, 2013). Los peces dulceacuícolas cuentan con la capacidad de elongar y desaturar ácidos grasos de tipo linolénico (18:3n-3) y linoleico (18:2n-6), para producir ácidos grasos de 20 y 22 carbonos como EPA, ARA y DHA; capacidad que los peces marinos no tienen y que deben obtenerlos a través del alimento (Ackman y Kean-Howie, 1995; Aparicio-Simón, 2004). Los requerimientos de lípidos y ácidos grasos esenciales han sido evaluados en las diferentes etapas de crecimiento mediante el método dosis-respuesta. En varios experimentos se evalúan en conjunto el requerimiento de lípidos y proteínas, como en juveniles (11.80 ± 0.15 g) de *Brachymystax lenok*; en donde evaluaron los niveles de proteína de 400, 450, 500 y 550 g kg⁻¹ con dos niveles de lípidos de 80 y 160 g kg⁻¹. La dieta de 550 g kg⁻¹ de proteína cruda y 80 g kg⁻¹ de lípidos se obtuvo el mayor crecimiento y eficiencia alimenticia. Sin embargo, la dieta con 450 g kg⁻¹ de proteína y 160 g kg⁻¹ de lípidos muestra un crecimiento y una alimentación eficiente similar; y podría ser la más adecuada para la engorda de *B. lenok* por aspectos económicos y ambientales (Xu *et al.*, 2015). Mientras que en *Lutjanus guttatus* (2.2 ± 0.1 g) se requiere de por lo menos 45% de proteína y 9% de lípidos para su mayor crecimiento y supervivencia. Sin afectar los factores de condición y de conversión alimenticia, en este estudio se evaluaron los niveles de proteína de 40, 45 y 50% y de lípidos 9, 12 y 15% (Abdo de la Parra *et al.*, 2010). La tendencia actual, en la formulación de alimentos para peces, busca incrementar la cantidad de lípidos en la dieta para ser utilizados como fuente energética, y así disminuir el nivel de proteína, permitiendo la reducción de costos y el impacto ambiental; al disminuir la cantidad de nitrógeno excretado por los peces debido al exceso de proteína que podría estar en la dieta (Schulz *et al.*, 2008). En algunos estudios únicamente se evalúa el nivel de lípidos para evitar que otros nutrientes puedan modificar las variables de respuestas. En *Oreochromis*

aureus x *Tilapia nilotica* (8.0 ± 0.1 g) se probaron tres niveles de lípidos (40, 60 y 80 g kg⁻¹) con dietas extruidas y en pellet, todas las dietas contenían 280 g kg⁻¹ de proteína cruda. El proceso de extrusión y de peletizado no influyó en el requerimiento de lípidos es cual fue de 60 g kg⁻¹ para ambas dietas (Ma *et al.*, 2015).

2.4.- Digestibilidad “in vitro” en peces: Los métodos de digestibilidad *in vitro* están siendo aplicados en evaluación de ingredientes alternos, para la formulación de alimentos acuícolas. Las pruebas *in vitro* procuran simular el proceso de digestión, algunas intentan integrar las diferentes etapas del proceso; como la digestión ácida/alcalina y la absorción de nutrientes (Morales y Moyano, 2010); mientras que otros son puntuales en la etapa de la digestión ácida y alcalina, como es el método del pH-stat (Hamdan *et al.*, 2009). Sin duda, las ventajas de los métodos *in vitro* es que permiten la evaluación de ingredientes en un menor tiempo, son seguros y no tiene restricciones éticas como los métodos *in vivo* (Velazco-Vargas *et al.*, 2014). El pH-stat permite determinar la biodisponibilidad de los nutrientes proteicos y lipídicos entre otros; por medio del grado de ruptura de los enlaces peptídicos por acción de las diferentes proteasas en ingredientes proteicos (Alarcón *et al.*, 2002); y por la velocidad de hidrólisis de los enlaces éster para los ingredientes lipídicos (Nolasco *et al.*, 2006). En algunos peces marinos se han aplicado estos estudios como en juveniles de *Gadus morhua* con extractos de ciegos pilóricos y en la ontogenia de larvas de *Paralichthys californicus* mediante extractos de pool, en ambos se evaluó la digestión alcalina para 17 y 9 ingredientes respectivamente (Tibbettes *et al.*, 2011; Martínez-Montaña y Lazo, 2012). En peces dulceacuícolas, también se han realizado estas investigaciones, como en juveniles de *Cichlasoma urophthalmus* donde se evaluaron 29 ingredientes proteicos de origen animal y vegetal para la digestión ácida y alcalina; encontrando que los ingredientes con mayor grado de hidrólisis resultaron ser la carne y vísceras de pollo, carne de cerdo y pasta de coco (Cuenca-Soria *et al.*, 2013b). En *Atractosteus tropicus* se han aplicado en la digestión ácida y alcalina, tanto en larvas como juveniles evaluando ingredientes proteicos y lípidos para ser utilizados en la formulación de alimentos balanceados. En larvas, las harinas que podrían ser utilizadas serían la de camarón, jaiba y de pescado (Frias-Quintana *et al.*, 2010); mientras que en juveniles los ingredientes proteicos podrían ser principalmente la harina de pescado, de carne y vísceras de pollo, de res y calamar. En cuanto a los ingredientes lipídicos, se podrían utilizar el aceite de pescado, oliva y de maíz (Guerrero-Zarate, 2010).

2.5.- Estudios realizados en *Amphilophus trimaculatus*: Debido al cambio del nombre científico de esta especie ocurrido durante la investigación, surge el interés de mencionar que toda especie con interés acuícola, deberá ser correctamente identificada taxonómicamente. Estos cambios o adecuaciones taxonómicas pueden generar algunas dificultades en la búsqueda de antecedentes, lo cual podría generar algunas afectaciones en el desarrollo tecnológico del cultivo. En el caso de, *A. trimaculatus* desde la primera vez que se describió ha tenido cuatro cambios en el nombre científico según lo descrito por Eschmeyer *et al.*, (2017). Inicialmente fue nombrada como •*Heros trimaculatus* por Günther, (1867), años más tarde se le asignó el nombre de •*Parapetenia trimaculata* (Günther 1867) por Hernández-Rolon, (1990), pero enseguida se cambió a •*Cichlasoma trimaculatum* (Günther 1867) por Conkel, (1993). Posteriormente, se modificó a •"*Cichlasoma*" *trimaculatum* (Günther 1867) por Miller, (2006). Y actualmente es nombrada como •*Amphilophus trimaculatus* (Günther 1867) por Řičan *et al.*, (2016).

Los pocos estudios de *A. trimaculatus* han sido enfocados en la descripción de los hábitos de alimentación, distribución y abundancia, ciclo de vida, asociación a parásitos, desarrollo gonádico y reproducción en cautiverio. Los hábitos alimenticios fueron descritos por primera vez por Yáñez-Arancibia, (1978), quien la cataloga como un consumidor primario de tipo omnívoro; pero Violante, (1995) menciona que tiende a ser carnívora durante algunos meses del año. Es considerada una especie dulceacuícola con tolerancia a bajas salinidades (Gil, 1991; Díaz-Ruiz, 2006 y Miller, 2009); pero Gómez-González (2005) menciona que tienen una amplia tolerancia a la salinidad de 0 a 34‰. En trabajos de abundancia se tiene los de Gil, (1991) y Díaz-Ruiz, (2006) el primero realizado en la laguna de Tres Palos, Guerrero y el otro en el sistema lagunar-estuarino Chantuto-Panzacola, Chiapas; en los dos sistemas se encontró una abundancia relativa baja (menor al 1%) con respecto a otras especies. Mientras que en el sistema lagunar-estuarino de Carretas-Pereyra, *A. trimaculatus* se encuentra entre las especies que representan el 86% de la captura en distribución y abundancia numérica (Velázquez-Velázquez *et al.*, 2005). En estudios de parasitología se tiene el de Violante-González, (2008), donde menciona que *A. trimaculatus*, presenta mayormente parásitos de tipo generalistas y pocos que son especialistas de cíclidos. En cuestiones de fisiología reproductiva las hembras alcanzan primero la madurez sexual a los 14 cm de longitud total, con desoves promedios de huevos de

3,082.42 ± 1,060.52; mientras que en los machos la madurez sexual es hasta los 14.92 cm longitud total (Violante, 1995). Se ha logrado la producción de larvas en sistemas de recirculación al utilizar una proporción de sexo 2:1 (hembras-machos); las cuales se han utilizado para el repoblamiento de los sistemas lagunares-estuarinos del Estado Chiapas, y otra parte para cuestiones de investigación (Uscanga-Martínez *et al.*, 2012). Se evaluó el desarrollo gonádico en temporada de secas y lluvias, en donde se encontraron cinco estadios de maduración y se indicó que la temporada de reproducción es en la época de secas iniciando posiblemente en el mes de enero (Ortiz-Cruz, 2011).

Hasta el momento, solo se dispone de dos estudios relacionados con la actividad enzimática digestiva y otro sobre el requerimiento proteico. En larvas se estudiaron por pruebas bioquímicas y electroforéticas las enzimas de proteasas ácidas y alcalinas, lipasas, amilasas y fosfatasas durante la ontogenia inicial, en donde se considera que esta especie tiene completa su maquinaria enzimática digestiva a partir del día 9 después de eclosión, por lo que se recomienda realizar el proceso de deshabitación de alimento vivo a alimentos inertes al día 15 después de eclosión (Toledo-Solís *et al.*, 2015). El otro estudio, corresponde a la caracterización de las proteasas digestivas en juveniles, encontrando que la digestión es realizada en conjunto con las proteasas ácidas como alcalinas, en donde las proteasas alcalinas resultaron ser más estables a los cambios de pH y temperatura. Mientras que las proteasas ácidas presentan elevada sensibilidad al inhibidor de pepsina tipo A (Toledo-Solís *et al.*, 2016). Por otra parte, se determinó el requerimiento proteico en larvas de 0.70 g de peso y una longitud total de 3.23 cm en promedio; se evaluaron dos niveles de proteínas de 45% y 35%, comparada con un alimento comercial del 45% de proteína. En donde se determinó que las larvas tienen un mayor crecimiento en peso (2.91 g) y longitud total (5.04 cm) con niveles del 45% de proteína (Violante, 1995).

3.- JUSTIFICACIÓN

La acuicultura podría ser una de las alternativas para resolver el problema de la seguridad alimentaria, con la incorporación del cultivo de nuevas especies. En los últimos años, se han realizado investigaciones para desarrollar las técnicas de cultivo para cada especie con potencial acuícola. Sin embargo, uno de los problemas que radica en ciertas especies de cultivo, es un retraso en el crecimiento en algunas etapas de desarrollo con larvaria, juvenil o adulta. Este puede ser afectado por diversos factores, como son genéticos, densidades de siembra, parámetros físico-químicos, alimentación y nutrición, entre otros. En este aspecto, los problemas relacionados a la nutrición son ocasionados principalmente por el alimento suministrado que puede generar un retraso en el crecimiento, debido a que en la mayoría de las ocasiones se proporciona una dieta formulada para otras especies y podría ser deficiente en nutrientes. Si bien, se procura suministrar la dieta más parecida a los hábitos alimenticios de la especie en cultivo; ésta no está formulada de acuerdo a la capacidad digestiva y a los requerimientos nutricionales que se necesitan para mejorar el crecimiento. Además, en la etapa larvaria de algunas especies el crecimiento es aún más complicado; porque no se cuenta con un sistema digestivo desarrollado para llevar a cabo eficientemente el proceso de digestión y absorción de los alimentos. Esto debido a que no todas las enzimas digestivas están presentes desde el momento de la eclosión de la larva y estas muestra actividad después de la formación de los órganos del sistema digestivo y de la expresión de los genes precursores de las enzimas digestivas. Por lo tanto, en la presente investigación se generó información que permitirá mejorar el crecimiento en la etapa larvaria y juvenil del cultivo de *A. trimaculatus*. En la etapa larvaria se generó información para describir el proceso de formación del sistema digestivo y la identificación de algunos genes precursores de las enzimas digestivas; así como los requerimientos nutricionales de proteína y lípidos. Para la etapa juvenil se propusieron los posibles ingredientes para elaborar dietas específicas de la especie.

4.- OBJETIVOS

4.1- Objetivo general

Contribuir al conocimiento en la fisiología digestiva de la etapa larvaria y en la nutrición de juveniles de *Amphilophus trimaculatus* para la elaboración de protocolo de alimentación y formulación de alimentos acuícolas.

4.2- Objetivo específico

4.2.1.- Capitulo I: Describir histológicamente el desarrollo morfológico y fisiológico del sistema digestivo en la etapa larvaria de *A. trimaculatus*.

4.2.2.- Capitulo I: Determinar la expresión de genes precursores de las enzimas digestivas de proteasas (ácidas y alcalinas) y α -amilasa durante la etapa larvaria de *A. trimaculatus*.

4.2.3.- Capitulo II: Determinar el requerimiento de proteína y lípidos en larvas de *A. trimaculatus*.

4.2.4.- Capitulo III: Evaluar la digestibilidad *in vitro* de diversos ingredientes proteicos y lipídicos para la formulación de alimentos en juveniles de *A. trimaculatus*.

5.- HIPÓTESIS

1.- En la etapa larvaria tanto los estudios histológicos como de biología molecular se han aplicado para elegir el momento adecuado para iniciar la alimentación exógena; mediante el entendimiento del desarrollo de la fisiología digestiva y el conocimiento de los zimógenos precursores de las enzimas digestivas. En *A. trimaculatus* los análisis bioquímicos muestran actividad enzimática en días después de la eclosión, pero la actividad enzimática incrementa en el día 6 y 11 dde. Por ello, se espera encontrar zimógenos en los primeros días de la eclosión y que estos se incrementen en el transcurso de los días. Así también, se considera que el sistema digestivo estará completamente formado y será funcional antes del día 15 dde, para llevar a cabo los procesos de digestión y absorción de nutrientes.

2.- En peces con hábitos alimenticios de omnivoría con tendencia a la carnivoría pueden requerir elevados porcentajes de proteínas y de lípidos. Las proteínas son la fuente principal de aminoácidos esenciales y los lípidos de ácidos grasos esenciales; ambos nutrientes promueven un mayor número de procesos bioquímicos eficientes, para incrementar el crecimiento en peso y longitud de los peces. En la etapa larvaria de *A. trimaculatus* se espera que el requerimiento de proteína se encuentre entre 45 y 50%; mientras que el requerimiento de lípidos este entre 15 y 22%.

3.- Existe una gran cantidad de ingredientes proteínicos y lipídicos que pueden ser utilizados para la formulación de dietas en peces. Sin embargo, el uso de estos ingredientes está en función al requerimiento nutricional y a la capacidad digestiva de la especie. Desde el punto de vista enzimático el alimento para *A. trimaculatus* podría estar formulado por ingredientes de origen animal y vegetal. Pero podrían ser las harinas proteicas y aceites provenientes de origen animal las que tengan una mayor digestibilidad a los ingredientes de origen vegetal.

6.- REFERENCIAS

Abdo de la Parra M. I., Rodríguez-Ibarra L. E., Hernández C., Hernández K., González-Rodríguez B., Martínez-Rodríguez I., García-Ortega A. (2010). Efecto de diferentes niveles de proteína y lípidos totales en la dieta sobre el crecimiento y supervivencia de juveniles de pargo lunarejo *Lutjanus guttatus*. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*. Vol. 45(3):433-439.

Ackman R. G., Kean-Howie J. (1995). Fatty acids in aquaculture: are w3 fatty acids always important? En: Nutrition and utilization technology in aquaculture. Lim, C., Sessa, D. J. AOCA Press. 82-104.

Alam M. S., Wade A., Watanabe O., Carroll P. M., Rezek T. (2009). Effects of dietary protein and lipid levels on growth performance and body composition of black sea bass *Centropristis striata* (Linnaeus 1758) during grow-out in a pilot-scale marine recirculating system. *Aquaculture Research*. Vol. 40:442-449.

Alam M.S., Wade O., Watanabe O., Carroll P. M. (2008). Dietary Protein Requirements of Juvenile Black Sea Bass, *Centropristis striata*. *Journal of the World Aquaculture Society*. Vol. 39(5):656-663.

Alarcón F. J., Moyano F. J., Díaz M. (2002). Evaluation of different protein sources for aquafeeds by an optimised pH-stat system. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. Vol. 82:697-704.

Almeida-Bicudo A. J., Possebon-Cyrino J. E. (2014). Evaluation of methods to estimate the essential amino acids requirements of fish from the muscle amino acid profile. *Lat. Am. J. Aquat. Res.* Vol. 42(1): 271-275.

Álvarez-González C. A. (2003). Actividad enzimática digestiva y evaluación de dietas para el destete de larvas de la cabrilla arenosa *Paralabrax maculatofasciatus* (Percoidei: serranidae). Tesis doctoral. CICIMAR. La Paz, Baja California Sur, México. 180 pp.

Aparicio-Simón B. (2004). Importancia de los lípidos en la reproducción y ontogenia del pez blanco de Pátzcuaro (*Chirostoma estor estor*). Tesis de maestría. Centro De Investigaciones Biológicas Del Noroeste, S. C. La Paz, B.C.S. México. 120 pp.

Arévalo-Galán L. M. (2009). Expresión del gen de tripsina durante la ontogenia inicial de la mojarra tenguyaca *Petenia splendida*. Tesis de licenciatura. División Académica De Ciencias Biológicas-UJAT. Villahermosa, Tabasco. 50 pp.

Ávila B. M., León I. I., Guevara R. E. (2008). Organogénesis del sistema digestivo del pez *Pterophylum scalare* (Perciformes: Cichlidae). *Rev. Biol. Trop.* Vol. 56(4): 1857-1870.

Baltazar P. M. (2007). La tilapia en el Perú: Acuicultura, mercado y perspectivas. *Revista Peruana de Biología.* 13:267-273.

Biswas B. K., Ji S. C., Biswas A. K., Seoka M., Kim Y. S., Kawasaki K. L., Takii K. (2009). Dietary protein and lipid requirements for the Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis* juvenile. *Aquaculture.* Vol. 288:114-119.

Cahu C., Rønnestad I., Grangier V., Zambonino-Infante J. L. (2004). Expression and activities of pancreatic enzymes in developing sea bass larvae (*Dicentrarchus labrax*) in relation to intact and hydrolyzed dietary protein; involvement of cholecystokinin. *Aquaculture.* Vol. 238:295–308.

Carrasco-Chávez V. (2004). Variación de ácidos grasos durante la ontogenia inicial y requerimientos lipídicos de juveniles en cautiverio, de cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus*. Tesis de maestría. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas- Instituto Politécnico Nacional. La Paz, Baja California Sur, México. 76 pp.

Catacutan M. R., Pagador G. E., Teshima S. (2001). Effects of dietary protein and lipid levels and protein to energy ratios on growth, survival and body composition of the mangrove red snapper, *Lutjanus argentimaculatus* (Forsskal, 1755). *Aquaculture Research.* Vol. 32: 811-818.

Conkel, D., 1993. Cichlids of North and Central America. T.F.H. Publications, Inc., Estados Unidos.

Contreras-Sánchez W. M., Contreras-García M. J., Mcdonal-Vera A., Hernández-Vidal U., Cruz-Rosado L., Martínez-García R. (2012). Manual para la reproducción de robalo blanco (*Centropomus undecimalis*) en cautiverio. Editorial. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Villahermosa, Tabasco. 31 pp.

Cuenca-Soria C. A., Alvarez-González C. A., Ortiz-Galindo J. L., Tovar-Ramírez D., Guerrero-Zárate R., Aguilar-Hernández S., Perera-García M. A, Hernández-Gómez R and Gisbert E. (2013a). Histological development of the digestive system of Mayan cichlid *Cichlasoma urophthalmus* (Günther 1862). *Appl. Ichthyol.* 1–9 pp. Doi 10.1111/jai.12307.

Cuenca-Soria C. A., Álvarez-González C. A., Ortiz-Galindo J. L., Guerrero-Zarate R., Perera-García M. A., Hernández-Gómez R. E., Nolasco-Soria H. (2013b). Digestibilidad in vitro de ingredientes proteínicos en la mojarra castarrica *Cichlasoma urophthalmus*. *Universidad y Ciencia*. Vol. 29(3):263-275.

Darias M. J., Murray H. M., Gallant J. W., Astola A., Douglas S. E., Cárdenas Yúfera M., Martínez Rodríguez G. (2006). Characterization of a partial α -amylase clone from red porgy (*Pagrus pagrus*): Expression during larval development. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*. Vol. 143:209–218.

De la Higuera M. (1987). Requerimientos de proteína y aminoácidos en peces. 53-98. En: CAICYT. Nutrición en Acuicultura II. Plan de Formación de Técnicos Superiores en Acuicultura. Madrid, España. 318 pp.

Díaz M. V., Christiansen H. E., Pájaro M. y Macchi J. G. (2011). Descripción micro-anatómica de las larvas de *Engraulis anchoita* y su aplicación en estudios de condición nutricional. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*. Vol. 46(3): 431-441.

Díaz-Ruiz S., Aguirre L. A., Cano Q. E. (2006). Evaluación ecológica de las comunidades de peces en dos sistemas lagunares estuarinos del sur de Chiapas, México. *Hidrobiológica*. Vol. 16(2):197-210.

Eschmeyer W. N., Fricke R., Van der Laan R. (2017). Catalog of Fishes: Genera, Species, References.

<http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp>

FAO, (2013). National Aquaculture Sector Overview. Visión general del sector acuícola nacional-México. National Aquaculture Sector Overview Fact Sheets. Texto de Montero Rodríguez, M. In: Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO. Roma, Italia. Disponible electrónicamente en http://www.fao.org/fishery/countrysector/naso_mexico/es (Consultado el 09 de enero del 2019).

FAO (2014a). El estado mundial de la pesca y la acuicultura, Oportunidades y desafíos. Organización de las naciones unidas para la alimentación y la agricultura (FAO), Roma, Italia. Disponible electrónicamente en <http://www.fao.org/3/a-i3720s.pdf> (Consultado el 15 de enero del 2019).

FAO, (2014b). El Estado de la Inseguridad Alimentaria en el Mundo. Organización de las naciones unidas para la alimentación y la agricultura (FAO), Roma, Italia. Disponible electrónicamente en <http://www.fao.org/3/a-i4030s.pdf> (Consultado el 05 de enero del 2019).

FAO, (2015a). Aquaculture topics and activities. Aquaculture resources. In: Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO. Roma, Italia. Disponible electrónicamente en <http://www.fao.org/fishery/topic/13530/es> (Consultado el 20 de enero del 2019).

FAO, (2015b). Papel de la FAO en la acuicultura. Organización de las naciones unidas para la alimentación y la agricultura (FAO), Roma, Italia. Disponible electrónicamente en <http://www.fao.org/aquaculture/es/> (Consultado el 15 de enero del 2019).

Fernández I., Gisbert E. (2010) Senegalese sole bone tissue originated from chondral ossification is more sensitive than dermal bone to high vitamin A content in enriched *Artemia*. *Journal of Applied Ichthyology*. Vol. 26: 344–349.

Frías-Quintana C. A., Álvarez-González C. A., Márquez-Couturier G. (2010). Diseño de microdietas para el larvicultivo de pejelagarto *Atractosteus tropicus* (Gill 1863). *Universidad y Ciencia*. Vol. 26(2): 265-282.

Galaviz M. A., García-Ortega A., Gisbert E., López L. M., García G. A. (2012). Expression and activity of trypsin and pepsin during larval development of the spotted rose snapper *Lutjanus guttatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology*. Vol. 161:9-16

Galaviz M. A., López L. M., García-Gasca A., Álvarez-González A., True C. D., Gisbert E. (2015). Digestive system development and study of acid and alkaline protease digestive capacities using biochemical and molecular approaches in totoaba (*Totoaba macdonaldi*). *Fish Physiol Biochem*. Vol. 41: 1117–1130.

García-Ortega A., Muy-Rangel D., Puello-Cruz A., Villa-López Y., Escalante-Rojas M., Preciado-Iñiguez K. (2010). Uso de ingredientes de origen vegetal como fuentes de proteína y lípidos en alimentos balanceados para peces marinos carnívoros. En: Cruz-Suarez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J. (Eds), Avances en Nutrición Acuícola X - Memorias del Décimo Simposio Internacional de Nutrición Acuícola, 8-10 de Noviembre, San Nicolás de los Garza, N. L., México. ISBN 978-607-433-546-0. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México. 321-340 pp.

Gawlicka A., Leggiadro C.T., Gallart J. W., Douglas S. E. (2001). Cellular expression of the pepsinogen and gastric proton pump genes in the stomach of winter flounder as determined by in situ hybridization. *J. Fish Biol*. Vol. 58:529–536.

Gil S. (1991). Distribución y abundancia de peces, de acuerdo con la salinidad, en la laguna de Tres Palos en Guerrero, México. Tesis. Universidad Autónoma de Guerrero. 78 pp.

Gisbert E., Gimenez G., Fernandez I., Kotzamanis Y., Estevez A. (2009). Development of digestive enzymes in common dentex *Dentex dentex* during early ontogeny. *Aquaculture*. Vol. 287. 381–387 pp.

Gómez-González A., Velázquez-Velázquez E., Rivera-Velázquez G. (2005). Distribución, abundancia y estimación de la relación talla-peso de las mojarras. *Cichlasoma trimaculatum* y *Amphilophus macracanthus* (Perciformes: Cichlidae) en un sistema lagunar-estuarino, de Chiapas, México. Memorias del XVIII Congreso Nacional de Zoología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, N.L. 4 al 7 de Octubre de 2005. 107-108 pp.

Guerrero-Zarate R. (2010). Evaluación de la capacidad digestiva del pejelagarto (*Atractosteus tropicus*). Tesis de maestría. Departamento de Recursos del Mar. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional Unidad Mérida. Mérida, Yucatán, México. 101 pp.

Günther A. (1867). On the fishes of the states of Central America, founded upon specimens collected in fresh and marine waters of various parts of that country by Messrs. Salvin, Godman and Capt. J. M. Dow. *Proc. Zool. Soc.* London 1866(3): 600-604.

Gutiérrez F. W., Quispe M., Valenzuela L., Contreras G., Zaldívar J. (2010). Utilización de la proteína dietaria por alevinos de la gamitana, *Colossoma macropomum*, alimentados con dietas isocalóricas. *Rev. Peru. biol.* Vol. 17(2): 219-223.

Guzmán-Beltrán L., Santana V. D., Verdugo M. H., Gómez-Ramírez G., Hurtado G. H. (2013). Descripción anatómica e histológica del tracto digestivo de Nicuro *Pimelodus blochii* (Valenciennes, 1840). *Orinoquia*. Vol. 17(1): 102-110.

Hamdan M., Moyano F. J., Schuhardt D. (2009). Optimization of a gastro intestinal model applicable to the evaluation of bioaccessibility in fish feeds. *J Sci Food Agric* 89:1195–1201.

Hamre K., Yúfera M., Rønnestad I., Boglione C., Conceição L. E. C., Izquierdo M. (2013). Fish larval nutrition and feed formulation: knowledge gaps and bottlenecks for advances in larval rearing. *Reviews in Aquaculture*. Vol. 5:S26–S58.

Hansen T. W., Folkvord A., Grøtan E., Sæle Ø. (2013). Genetic ontogeny of pancreatic enzymes in *Labrus bergylta* larvae and the effect of feed type on enzyme activities and gene expression. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* Vol. 164. 176–184 pp.

Hernández D. R., Santinón J. J., Sánchez S., Domitrovic H. A. (2014). Estudio histológico e histoquímico de la organogénesis del tubo digestivo de *Rhamdia quelen* en condiciones de larvicultura intensiva. *Lat. Am. J. Aquat. Res.* Vol. 42(5):1136-1147.

Hernández-Rolón A. (1990). Un nouveau cichlidé du système du Rio Balsas, Mexique (Pisces, Teleostei). *Revue Française du cichlidophiles*. Francia.

Kageyama T. (2002). Pepsinogens, progastricsins, and prochymosins: structure, function, evolution, and development. *Cell Mol Life Sci.* Vol. 59:288–306.

Lazo J. P., Darias M. J., Gisbert E. (2011). Ontogeny of the digestive tract. In: Larval Fish Nutrition. G.J. Holt (ed.), pp. 1-46. John Wiley & Sons, UK.

Ma F., Li X. Q., Li B. A., Leng X. J. (2015). Effects of extruded and pelleted diets with differing lipid levels on growth, nutrient retention and serum biochemical indices of tilapia (*Oreochromis aureus* x *Tilapia nilotica*). *Aquaculture Nutrition*. Vol. 22(1): 61–71. Doi:10.1111/anu.12229.

Maldonado-García M., Rodríguez-Romero J., Reyes-Becerril M., Álvarez-González C. A., Civera-Cerecedo R., Spanopoulos M. (2012). Effect of varying dietary protein levels on growth,

feeding efficiency, and proximate composition of yellow snapper *Lutjanus argentiventris* (Peters, 1869). *Lat. Am. J. Aquat. Res.* Vol. 40(4): 1017-1025.

Márquez C. G. (2011). Producción por acuicultura sustentable de pejelagarto en Comalcalco, Tabasco. Informe técnico MEX/SGP/OP4/Y3/ RAF/2009/22 Programa de Pequeñas Donaciones/FMAM/PNUD–Otot Ibam SPR de RL de CV. Comalcalco, Tabasco. México. 35 pp.

Martínez-Burguete T. (2012). Expresión de enzimas digestivas durante la ontogenia inicial del robalo blanco (*Centropomus undecimalis*). Tesis de licenciatura. Centro de Biociencias Campus IV-UNACH. Tapachula, Chiapas. 38 pp.

Martínez-Montaña E., Lazo J.P. (2012). *In vitro* protein digestibility of dietary ingredients throughout ontogeny of California halibut, *Paralichthys californicus*, larvae. *Journal of the World Aquaculture Society*. Vol. (43):51-62.

Miller R. R., Minckley W. L., Norris S. M. (2009). Peces Dulceacuícolas de México. Comisión Nacional para el conocimiento y Uso de la Biodiversidad/El Colegio de la Frontera Sur/Sociedad Ictiológica Mexicana, A.C. /Desert Fishes Council. México. 559 pp.

Miller, R. R. 2006. Freshwater fishes of México. – University of Chicago Press, Chicago. 490 pp.

Ming-Ji L., Chin-Feng W. (2006). Developmental regulation of gastric pepsin and pancreatic serine protease in larvae of the euryhaline teleost *Oreochromis mossambicus*. *Aquaculture*. Vol. 261:1403-1412.

Min-Jie C., Wei-Qin C., Cui-Hong D., Asami Y., Wei-Guang L., Guang-Ming L., Wen-Jin S. (2011). Pepsinogens and pepsins from Japanese seabass (*Lateolabrax japonicus*). *Comparative Biochemistry and Physiology*. Vol. 158:259-265.

Morales G., Moyano F. (2010). Application of an *in vitro* gastrointestinal model to evaluate nitrogen and phosphorus bioaccessibility and bioavailability in fish feed ingredients. *Aquaculture*. Vol. (306):244–251.

Moyano F. J. (2006). Bioquímica Digestiva en Especies Acuicultivadas: Aplicaciones en Nutrición. En editores: Cruz, S.E., Ricque, M.R., Tapia, S.M., Nieto, L.M.G., Villareal, C.D.A., Puello, C.A.C., y García, O.A. Avances en Nutrición Acuícola VIII. VIII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 15-17 Noviembre. Universidad Autónoma de Nuevo León, México. ISBN 970-694-333-5.

Moyano F. J., Sáenz de Rodríguez M. A., Díaz M., Tacon A. G. J. (2014). Application of *in vitro* digestibility methods in aquaculture: constraints and perspectives. *Reviews in Aquaculture*. Vol. 6:1–20.

Murashita K., Matsunari H., Kumon K., Tanaka Y., Shiozawa S., Furuita H., Oku H., Yamamoto T. (2014). Characterization and ontogenetic development of digestive enzymes in Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis* larvae. *Fish Physiol. Biochem.* Vol. 40: 1741–1755.

Nolasco H., Monte M., Hinojosa P., Civera-Cerecedo R., Vega-Villasante. (2006). Digestibilidad *in vitro* de lípidos alimentarios para el camarón. En: Cruz Suárez, L. E., Ricque Marie, D., Nieto López, M. G., Tapia Salazar, M., Villarreal Cavazos, D., Puello Cruz, A. C. y García Ortega, A. Editores. 2006. Avances en nutrición acuícola VIII. Memorias del Octavo Simposio Internacional de Nutrición Acuícola. 15 al 17 de Noviembre. Mazatlán, Sinaloa, México. ISBN 970-694-331-5. Universidad Autónoma de Nuevo León. Monterrey, N. L., México. 377-395 pp.

Orellana-Amador J. J. (1992). Inventario Preliminar de los Crustáceos Marinos y de Agua Dulce de El Salvador, América Central. Trabajo de investigación presentado a Secretaría Ejecutiva del Medio Ambiente. 78 pp.

Ortiz-Cruz V. M. (2011). Análisis del crecimiento y madurez sexual de *Cichlasoma trimaculatum* (Günther, 1867) de la subcuenca río Atoyac-paso de la reina de la cuenca río Atoyac, Oaxaca. Tesis de maestría. Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Oaxaca, Instituto Politécnico Nacional. Santa Cruz Xoxocotlán, Oaxaca. 87 pp.

Parada J., Aguilera J. M. (2007). Food microstructure affects the bioavailability of several nutrients. *J. Food Sci.* Vol. 72:21–32.

Řičan O., Piálek L., Dragová K. & Novák J. (2016). Diversity and evolution of the Middle American cichlid fishes (Teleostei: Cichlidae) with revised classification. Department of Zoology, Faculty of Science, University of South Bohemia. *Vertebrate zoology*. ISSN 1864-5755.

SAGARPA (2013). Actualización de la Carta Nacional Acuícola, publicado el 09 de septiembre de 2013 en el Diario Oficial de la Federación, Segunda Sección. México D.F. Disponible electrónicamente en www.dof.gob.mx/nota_to_doc.php?codnota=5313325 (Consultado el 16 de Enero del 2019).

Sarasquete C., Ortiz-Delgado J. B., Martos-Sitcha J. A., de las Heras V., Yúfera M., Martínez-Rodríguez G. (2014). Ontogeny and functional histochemistry of the digestive and visual systems and other organs during the larval development of the thick-lipped grey mullet, *Chelon labrosus*. *Sci. Mar.* Vol. 78(4):1-19. Doi: <http://dx.doi.org/10.3989/scimar.04091.27B>.

Schulz C., Huber M., Ogunji J., Rennert B. (2008). Effects of varying dietary protein to lipid ratios on growth performance and body composition of juvenile pike perch (*Sander lucioperca*). *Aquaculture Nutrition*. Vol. 14:166-173.

Tacon J. A. (1989). Nutrición y alimentación de peces y camarones cultivados. Manual de capacitación. GCP/RLA/ 102/ITA Proyecto Aquila II. FAO Documento de Campo 4:1-572.

Tacon A., Hasan M., Metian M. (2011). Demand and supply of feed ingredients for farmed fish and crustaceans. Trends and prospects. Fisheries and Aquaculture Technical Paper. FAO, 564 pp.

Tibbetts S. M., Verreth J. A. J., Lall S. P. (2011). *In vitro* pH-Stat protein hydrolysis of feed ingredients for Atlantic cod, *Gadus morhua*. 2. *In vitro* protein digestibility of common and alternative feed ingredients. *Aquaculture*. Vol. (319): 407–416.

Toledo-Solís F. J., Uscanga-Martínez A., Guerrero-Zárate R., Márquez-Couturier G., Martínez-García R., Camarillo-Coop S., Perales-García N., Rodríguez-Valencia W., Gómez-Gómez M. A., Álvarez-González C. A. (2015). Changes on digestive enzymes during initial ontogeny in the three-spot cichlid *Cichlasoma trimaculatum*. *Fish Physiol Biochem*. Vol. 41:267-279.

Toledo-Solís F.J., Márquez-Couturier G., Uscanga-Martínez A., Guerrero-Zárate R., Perales-García N., Martínez-García R., Álvarez-González C. A. (2016). Partial characterization of digestive proteases of the three-spot cichlid *Cichlasoma trimaculatum* (Günther 1867). *Aquac Nutr*. Vol. 22:1230-1238.

Treviño L., Álvarez-González C. A., Perales-García N., Arévalo-Galán L., Uscanga-Martínez A., Márquez-Couturier G., Fernández I. and Gisbert E. (2011). A histological study of the organogenesis of the digestive system in bay snook *Petenia splendida* Gunther, 1862 from hatching to the juvenile stage. *J. Appl. Ichthyol*. Vol. 27:73–82.

Uscanga-Martínez A., Velázquez-Velázquez E., Rodríguez-Valencia W., Gómez-Gómez M.A. (2012). “Estudio reproductivo para el cultivo de mojarra nativa *Cichlasoma trimaculatum*” Libro de resúmenes del XIII congreso nacional de ictiología y 1er simposio latinoamericano de ictiología. Facultad de Ciencias Biológicas-UNICACH. 28 de octubre al 02 de noviembre de 2012, en San Cristóbal de las Casas, Chiapas.

Velazco-Vargas J., Tomas-Vidal A., Moyano F. J., Jover-Cerda M., Martínez-Llorens S. (2014). Influence of digestible protein levels on growth and feed utilization of juvenile meagre *Argyrosomus regius*. *Aquaculture Nutrition*. Vol. (20): 520–531.

Velázquez-Velázquez E., Vega-Cendejas M. E., Rivera-Velázquez, G. (2005). Riqueza y distribución de peces en un sistema estuarino-lagunar, de la reserva de la biosfera la encrucijada, Chiapas, México. Memorias del XVIII Congreso Nacional de Zoología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, N.L. 4 al 7 de Octubre de 2005. 64 pp.

Violante G. J. (1995). Contribución al conocimiento de la biología de la mojarra nativa *Cichlasoma trimaculatum* (Gunter, 1868), en la laguna de Tres Palos Guerrero, México, y determinación del desarrollo larvario y requerimientos proteicos en condiciones de laboratorio. Tesis de maestría. Facultad de Ciencias Marinas. Universidad de Colima, México. 66 pp.

Violante-González J., Aguirre-Macedo M. L., Rojas-Herrera A., (2008). Comunidad de parásitos metazoarios de la charra *Cichlasoma trimaculatum* en la laguna de Tres Palos, Guerrero, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. Vol. 79: 405-412.

Watanabe T. (1987). Requerimientos de ácidos grasos y nutrición lipídica en los peces. 99-165. En: CAICYT. Nutrición en Acuicultura II. Plan de Formación de Técnicos Superiores en Acuicultura. Madrid, España. 318 pp.

Wu-Yin W., Wu T., Wei-Qin C., Guang-Ming L., Osatomi K., Wen-Jin S., Min-Jie C. (2011). Purification and characterization of pepsinogens and pepsins from the stomach of rice field eel (*Monopterus albus* Zuiew). *Fish Physiol Biochem*. Vol. 37:543-552.

Xu G. F., Wang Y. Y., Han Y., Liu Y., Yang Y. H., Yu S. L., Mou Z. B. (2015). Growth, feed utilization and body composition of juvenile Manchurian trout, *Brachymystax lenok* (Pallas) fed different dietary protein and lipid levels. *Aquaculture Nutrition*. Vol. 21(3): 332–340.

Yáñez-Arancibia A. (1978). Taxonomía, ecología y estructura de las comunidades de peces en lagunas costeras con bocas efímeras del Pacífico de México. Centro de Ciencias del Mar y Limnología, Universidad Autónoma de México, México, D.F. Publicaciones especiales (2): pp 1-306

Yildirim-Aksoy M., Lim C., Shelby R., Klesius P. H. (2009). Increasing fish oil levels in commercial diets influences hematological and immunological responses of channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *J. World Aquacult. Soc.* Vol. 40: 76–86.

Zambonino-Infante J. L., Cahu C. L. (2001). Ontogeny of the gastrointestinal tract of marine fish larvae. *Comp Biochem Physiol.* 130C:477-487.

Zambonino-Infante J., Gisbert E., Sarasquete C., Navarro I., Gutierrez J., Cahu C. L., (2008). Ontogeny and physiology of the digestive system of marine fish larvae. In: Feeding and digestive functions of fish. J. E. O. Cyrino, D. Bureau and B. G. Kapoor (Eds). *Science Publishers Inc., Enfield.* 277–344 pp.

Zhang J., Zhou F., Lei-lei W., Shao Q., and Xu Z. (2010). Dietary Protein Requirement of Juvenile Black Sea Bream, *Sparus Macrocephalus*. *Journal of the World Aquaculture Society.* Vol. 41(S2):151-164.

7.- CAPÍTULOS

7.1.- Capítulo 1. Desarrollo histológico del sistema digestivo y expresión génica de enzimas digestivas en la ontogenia inicial de la mojarra tahuina (*Amphilophus trimaculatus*)

Toledo-Solís F.J.¹, Hilerio-Ruíz A.G.¹, Jiménez-Martínez L.D.², Sáenz de Rodrigáñez M.³, Martínez-García R.¹, Tovar-Ramírez D.⁴, Álvarez-González C.A.¹

¹Laboratorio de Acuicultura Tropical, División Académica de Ciencias Biológicas, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, 0.5 km Carretera Villahermosa-Cárdenas, C.P. 86039 Villahermosa, Tabasco, México.

²Laboratorio de Biología Molecular, División Académica Multidisciplinaria de Jalpa de Méndez, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, km 27 Carretera Estatal Libre Villahermosa-Comalcalco, C.P. 86205. Jalpa de Méndez, Tabasco, México.

³Departamento de Fisiología, Facultad de Ciencias de la Salud, Campus de Melilla, Universidad de Granada. Calle Santander, 1, C.P. 52005. Melilla, España.

⁴Instituto Politécnico Nacional, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste La Paz, B.C.S., México.

7.1.1.- RESUMEN

La mojarra tahuina (*Amphilophus trimaculatus*), es un cíclido nativo en la costa del Pacífico Sur de México. Esta especie es considerada como un candidato potencial para la acuicultura, de acuerdo a la importancia comercial que presenta en la zona y los aspectos biológicos de cultivo. Por ello, actualmente se trabaja en el establecimiento de los protocolos de alimentación para desarrollar su cultivo. Sin embargo, se desconocen diversos aspectos fisiológicos básicos como son el desarrollo del sistema digestivo y los patrones de expresión de los genes precursores de las enzimas digestivas durante la ontogenia inicial. Para ello, se tomaron muestras desde huevo hasta el día 30 después de eclosión (dde, 11.68±0.35 mm) para realizar estudios sobre el desarrollo del sistema digestivo por medio de histología y la expresión de enzimas digestivas por qPCR. En los análisis histológicos se aplicó una tinción con hematoxilina-eosina (H&E), mientras que para los análisis de expresión génica, primeramente

se realizó la identificación de forma parcialmente las secuencias del pepsinógeno (MG967448), tripsinógeno (KX697033), quimotripsinógeno (KX697034) y α -amilasa (MG967449). Posteriormente, se cuantificó por medio de qRT-PCR el patrón de expresión de cada zimógeno. Se encontró que el sistema digestivo presenta un desarrollo abrupto característico a lo descrito en otros cíclidos, encontrándose desde el día 6 dde (5.82 ± 0.32 mm) diferencias histológicas en distintos órganos como estómago, intestino, páncreas e hígado. Por su parte, los patrones de expresión muestran en este día (6 dde, 5.82 ± 0.32 mm) una expresión significativa, indicando la funcionalidad de los distintos órganos del sistema digestivo. Se puede concluir que el completo desarrollo morfológico y funcionalidad del sistema digestivo es próximo a los 15 dde (7.28 ± 0.26 mm), lo que indica que esta especie, presenta hábitos omnívoros con tendencia carnívora desde el periodo larvario, lo cual, podrá ser considerado en el establecimiento de los protocolos de alimentación y en la formulación de alimentos específicos.

Palabras claves: Histología, *A. trimaculatus*, Expresión de genes, Ontogenia, Organogénesis, Proteasas, Sistema digestivo.

7.1.2.- INTRODUCCIÓN

En el área de fisiología digestiva de peces, es usual que los primeros estudios realizados con el fin de generar información básica, estén enfocados en la histología del desarrollo del tracto digestivo, los análisis de la actividad enzimática y en años recientes se han integrado los análisis de expresión de genes precursores de enzimas digestivas gracias al abaratamiento de dichas técnicas (Hachero-Cruzado *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2016). Todos estos análisis, ayudan a comprender el desarrollo morfológico y la funcionalidad del sistema digestivo, principalmente en las etapas iniciales donde la capacidad digestiva es aún limitada (Zambonino Infante *et al.*, 2008). Añadido a esto, también se han utilizado como indicadores del estado nutricional de los organismos en las distintas etapas de desarrollo. Por lo tanto, en las especies con potencial para ser incorporados a la acuicultura, dicha información podrían ayudar a establecer los protocolos de alimentación de las distintas etapas de cultivo.

Las larvas de peces puede ser morfológicamente capaces de alimentarse desde el momento de la apertura de la boca, aunque no necesariamente nutrirse, lo cual depende del tipo de alimento que se les dio (Canino & Bailey, 1995; Govoni *et al.*, 2004); de ahí la importancia de realizar estos estudios. Si bien, histológicamente el desarrollo del sistema digestivo tiende a ser similar en peces teleósteos, estos son considerados interespecíficos en la relación al tiempo de desarrollo y funcionalidad durante la organogénesis (Lazo *et al.*, 2011). Es por ello, que se han realizado en distintas especies como en *Oreochromis niloticus* (Morrison and Wright, 1999), *Petenia splendida* (Treviño *et al.*, 2011) y *Cichlasoma urophthalmus* (Cuenca Soria *et al.*, 2013).

Por su parte, los análisis bioquímicos de actividad enzimática se siguen utilizando para indicar la funcionalidad y madurez del sistema digestivo, como los realizados en *Palabrax maculatofasciatus* (Álvarez González *et al.*, 2008) y en *Dentex Dentex* (Gisbert *et al.*, 2009). Mientras que los estudios de expresión génica permiten comprender eventos moleculares que rigen la capacidad y funcionalidad del sistema digestivo (Murray *et al.*, 2006). Dichos trabajos enfocados en este campo, se centran en el estudio de aquellos genes relacionados con las rutas metabólicas asociadas a los precursores de enzimas pancreáticas y gástricas; debido al papel que desempeñan este tipo de enzimas en el proceso de digestión (Moyano, 2005; Manríquez *et al.*, 2011; Moguel-Hernández *et al.*, 2016). En algunas especies como *Sparus aurata*, *Paralichthys olivaceus*, *Pagrus pagrus* y *Scophthalmus maximus*, se han analizado los patrones de expresión de genes precursores de enzimas pancreáticas como tripsina, quimotripsina, lipasas de sales biliares, α -amylase y en menor proporción las gástricas como pepsina. Esto ha permitido relacionar la variación del comportamiento de la expresión con la organogénesis del sistema digestivo durante las primeras etapas de desarrollo; permitiendo una mayor comprensión de cómo el proceso de digestión es regulado por los mecanismos moleculares correspondientes (Darias *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2017; Chi, *et al.*, 2013; Mata-Sotres, 2016). En la mayoría de los casos, durante la ontogenia inicial de cualquier especie de cierto interés, estos estudios se realizan de forma independientes. Sin embargo, cada vez son más usuales los trabajos que integran estos análisis describiendo los patrones de actividad y expresión génica, como el realizado de la enzima tripsina en *Sphoeroides annulatus* (García-Gasca *et al.*, 2006) y para las enzimas tripsina

y pepsina en *Lutjanus guttatus* (Galaviz *et al.*, 2012); ambos integrando descripciones de tipo histológicas.

Por otro lado, *C. trimaculatum* Günther, (1867), nombrada recientemente por Řičan *et al.*, (2016) como *Amphilophus trimaculatus* Günther, (1867), es un cíclido nativo del suroeste mexicano de importancia comercial en la zona del Pacífico (Violante, 1995; Ortiz-Cruz, 2011). Actualmente se está trabajando en el establecimiento de los protocolos de alimentación para desarrollar y optimizar su cultivo. Sin embargo, son pocos los estudios que se han realizado en la descripción de la fisiología digestiva, resumiéndose en la obtención de las actividades enzimáticas durante la ontogenia inicial y la caracterización de las proteasas digestivas en juveniles (Toledo-Solís *et al.*, 2015; 2016). Por lo tanto, en el presente trabajo se describió el desarrollo del sistema digestivo y los patrones de expresión de los genes precursores de las enzimas digestivas durante la ontogenia inicial de *A. trimaculatus*.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

7.1.3.- MATERIALES Y MÉTODOS

7.1.3.1.- Obtención del material biológico

Las larvas de *A. trimaculatus* se obtuvieron del lote de reproductores del Laboratorio de Nutrición y Producción Acuícola del Centro de Investigaciones Costeras de la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas (UNICACH). Para ello, los reproductores fueron alimentados a saciedad aparente con alimento comercial Silver Cup® (32% de proteína y 5% de lípidos) tres veces al día, manteniéndose a una temperatura en el sistema de 28.25 ± 0.57 °C, con fotoperiodo natural (12/12 h) y una oxigenación continua (5.85 ± 0.62 mg/L). Una vez obtenida la puesta y observado que las larvas obtuvieran el nadado libre, se transfirieron a un sistema de recirculación en tanques de fibra de vidrio circulares de 180 L de capacidad, con oxigenación continua (6.25 ± 0.55 mg/L) y temperatura de 27.78 ± 0.50 °C. En donde, después de la absorción del saco vitelino (día 4 dde) las larvas se alimentaron con nauplios de *Artemia sp.* (INVE®); posteriormente en los días 11 y 12 dde se inició una coalimentación de nauplios y alimento balanceado Silver Cup Pedregal® (45% de proteína y 16% de lípidos), y a partir del día 13 dde (6.21 ± 0.26 mm) únicamente se suministró alimento balanceado hasta finalizar el bioensayo. Todo el alimento se suministró a saciedad aparente a las 8:00, 13:00 y 18:00 h (Toledo-Solís *et al.*, 2015).

7.1.3.2.- Colecta de muestras para histología y molecular

Se tomaron 10 muestras de huevos y de larvas directamente de los tanques antes de ser alimentados para los análisis histológicos y análisis moleculares. Los días seleccionados fueron el día 0 (4.60 ± 0.10 mm), 1 (5.10 ± 0.14 mm), 3 (5.71 ± 0.10 mm), 6 (5.82 ± 0.32 mm), 9 (6.28 ± 0.31 mm), 11 (6.57 ± 0.33 mm), 13 (6.21 ± 0.26 mm), 15 (7.28 ± 0.26 mm), 17 (8.03 ± 0.46 mm), 19 (9.02 ± 0.36 mm), 21 (9.14 ± 0.36 mm), 24 (10.12 ± 0.29 mm), 27 (11.74 ± 0.38 mm) y 30 (11.68 ± 0.35 mm) dde. Las muestras de histología se fijaron en solución bouin durante 6 a 10 horas, de acuerdo al estadio de desarrollo. Después se lavaron con agua destilada y se conservaron en alcohol al 50% hasta su procesamiento. Las muestras para análisis moleculares se lavaron con agua destilada y se preservaron por 24 horas en solución estabilizadora RNALater (Invitrogen®), para luego ser conservadas a -80°C hasta su posterior análisis. Paralelamente, esos mismos días de muestreo se tomaron 10 larvas y se realizó una biometría midiéndose el

peso húmedo con una balanza digital (DENVER® TP-323) y la longitud total se midió con un vernier digital (TRACEABLE® modelo 3415).

7.1.3.3.- Análisis histológicos del sistema digestivo

Las larvas muestreadas se deshidrataron en una serie de soluciones de alcohol de concentración creciente (50, 70, 80, 96, 100%), alcohol 100%/Xilol y Xilol, cada uno por 10 min a temperatura ambiente; para luego mantenerse en Xilol/parafina y parafina a una temperatura de 58°C por 10 min. Seguidamente, las muestras se incluyeron en bloques de parafina, los cuales se elaboraron con un dispensador de parafina AP280-2 Myr. Los bloques se cortaron en un micrótopo en secciones sagitales a un grosor de 5 µm. La parafina de los cortes se removió con xilol y se secaron a 70°C por 4 horas. Posteriormente, las muestras se tiñeron con hematoxilina-eosina (H&E) de acuerdo a la metodología propuesta por Treviño *et al.*, (2011). Finalmente, las preparaciones histológicas se observaron en un estereoscopio (Olympus 8ZX16) y en un microscopio (Olympus BX41) ambos con cámara digital (Olympus DP27, de 5 MP) operada con el programa informático CellSens (Olympus). Para realizar la fotodocumentación del desarrollo del sistema digestivo se obtuvieron microfotografías de las estructuras histológicas del canal alimentario y los órganos asociados.

7.1.3.4.- Extracción de ARN y síntesis de ADNc

En los análisis moleculares la extracción de ARN total de las muestras se realizó mediante las especificaciones del kit PureLink® RNA Mini Kit (Ambion® by life technologies™), el producto final se diluyó en 20 µl de agua libre de RNAsas. Enseguida, se cuantificó por espectrofotometría ($A_{260/280}$) con un nanodrop Jenway® y se observó la integridad del producto en un gel de agarosa al 1.5% con buffer TAE 1X. Posteriormente se realizó la síntesis de ADNc a partir de 1 µg de ARN total de las muestras, bajo las especificaciones del kit iScript™ Reverse Transcription Supermix for RT-qPCR (BIO-RAD®), utilizándose oligo (dT) y random primers en una reacción de volumen final de 20 µl por muestra.

7.1.3.5.- Diseño de primers para RT-PCR y qRT-PCR

Para la obtención de los primers específicos para la qRT-PCR, primeramente se diseñaron primers para la identificación de los genes de interés (pepsina, tripsina, quimotripsina y amilasa)

en *A. trimaculatus* ver tabla 1. Los primers para RT-PCR se diseñaron de regiones conservadas de las secuencias homologas de genes reportados (GenBank) en otros peces y utilizando softwares de acceso libre (ClustalW2, BLAST y Oligoanalyzer). En la identificación del gen pepsinógeno se ocuparon los primers publicados por Ming-Ji *et al.*, (2006). La identificación de los genes se realizó en órganos (estómago, intestino e hígado/páncreas) extraídos de peces adultos cultivados bajo las condiciones descritas anteriormente. La RT-PCR para la identificación de los genes se efectuó mediante el kit Invitrogen® Platinum™ *Taq* DNA Polymerase, en una reacción de volumen final de 20 µl con ayuda de un termociclador eppendorf® AG22331. Los productos de RT-PCR se observaron en un gel de agarosa al 1.5% con buffer TAE 1X, con ayuda de un fotodocumentador Bio-rad® Universal Hood II. Los productos se purificaron con el kit PureLink® PCR Purification y se enviaron a secuenciar a la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM. Las secuencias obtenidas se registraron en la base de datos del GenBank. Finalmente, usando como base las secuencias obtenidas en el paso anterior y mediante la utilización softwares de acceso libre como Primer3 y Oligoanalyzer, se diseñaron los primers para qRT-PCR para una temperatura de 60 °C (Tabla 1).

7.1.3.6.- Cuantificación por qRT-PCR

La cuantificación de la expresión relativa de los genes durante la ontogenia se llevó a cabo en un termociclador CFX96 Touch™ Real-Time (Bio-Rad) en una reacción de volumen total de 10 µL por muestra donde se ocuparon 5 µl de SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix (Bio-Rad), 1 µl ADNc, 0.8 µl de primers (10 µmol) y 3.2 µl de agua destilada. Todas las reacciones se realizaron usando las siguientes condiciones: 1 ciclo de 50°C por 2 min, seguidos de 1 ciclo 95°C por 2 min, 40 ciclos 95°C por 15 segundos y 60°C por 30 segundos, y finalizando con una curva melting bajo condiciones estándar del programa de 60 ciclos para confirmar la amplificación de un solo producto en cada reacción y la ausencia de dímeros. Se utilizó el gen 18s como gen de referencia, por ser el más estable al ser comparado con otros dos genes en la plataforma de RefFinder (Xie *et al.*, 2012); y como muestra control se utilizó la muestra de huevo.

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados para la identificación y expresión de genes precursores de las enzimas digestivas durante la ontogenia inicial de *A. trimaculatus*.

Gene/NCBI accession	Direction	Sequence	Size (bp)	Temperature (°C)	Use
Pepsinogen MG967448	Sense	TCTTGTGGGTCCCTTCAGTG	648	58	RT-PCR
	Antisense	TCGGGATGTTCTGGCAGTTC			
Trypsinogen KX697033	Sense	CTGGGTGGTGTCTGCTGC	500	58	RT-PCR
	Antisense	GCACATCCGTAGCCCCAG			
Chymotrypsinogen KX697034	Sense	GAGGAGGCCGTCCCCACTCCTG	647	58	RT-PCR
	Antisense	GGTGACACGGGCGTAGACAGCGG			
α -Amylase MG967449	Sense	TTGCTGCAGAGTGTGAGCGCTT	526	58	RT-PCR
	Antisense	AGGCATCCACTCTGAATCCAGC			
Pepsinogen (Pep)	Sense	GTGAAGTGGTGTGGTGGTA	169	60	RTq-PCR
	Antisense	GAGGTACCAGTGTGATGATG			
Trypsinogen (Try)	Sense	TGCCACCCTCAACAGTTATG	113	60	RTq-PCR
	Antisense	CTATCAGCAGTGGGGCTCAT			
Chymotrypsinogen(Chy)	Sense	GACCAATGATGAGTGCCAGT	156	60	RTq-PCR
	Antisense	CAGGACACAATACCGACCAG			
α -Amylase (Amy)	Sense	CATFGCTCAAGAGTGTGAACGT	176	60	RTq-PCR
	Antisense	GTGAGGCAGAACTGAAGGACAT			
18S rRNA JF698683	Sense	GGACACGGAAAGGATTGACAG	111	60	RTq-PCR
	Antisense	GTTTCGTTATCGGAATTAACCAGAC			

7.1.3.7.- Análisis estadísticos

El análisis de la expresión relativa a lo largo de la ontogenia se realizó con el método comparativo $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (Livak & Schmittgen, 2001). La media de las unidades de expresión relativa se calculó a partir de 3 repeticiones. Enseguida se aplicaron las pruebas estadísticas de Kruskal-Wallis y como prueba a posteriori Nemenyi para encontrar la diferencia entre los días de la ontogenia. Los análisis estadísticos se realizaron en el software STATISTICA V.8 (StatSoft, Tulsa, OK, USA) usando un nivel de significancia de $p < 0.05$ en todas las pruebas.

7.1.4.- RESULTADOS

7.1.4.1.- Crecimiento en peso húmedo y longitud total

El crecimiento en peso húmedo y longitud total de *A. trimaculatus* desde la eclosión hasta el día 30 dde (11.68 ± 0.35 mm) se muestran en la figura 1. En donde, se observa un crecimiento constante de tipo exponencial, siendo el peso húmedo = $0.004 * \exp^{(0.1299 * \text{días})}$ ($r=0.992$) y la longitud total = $4.7301 * \exp^{(0.0314 * \text{días})}$ ($r=0.985$). El promedio máximo del peso húmedo resulto en 0.0207 g y la longitud total en 11.68 mm al finalizar la colecta del ensayo.

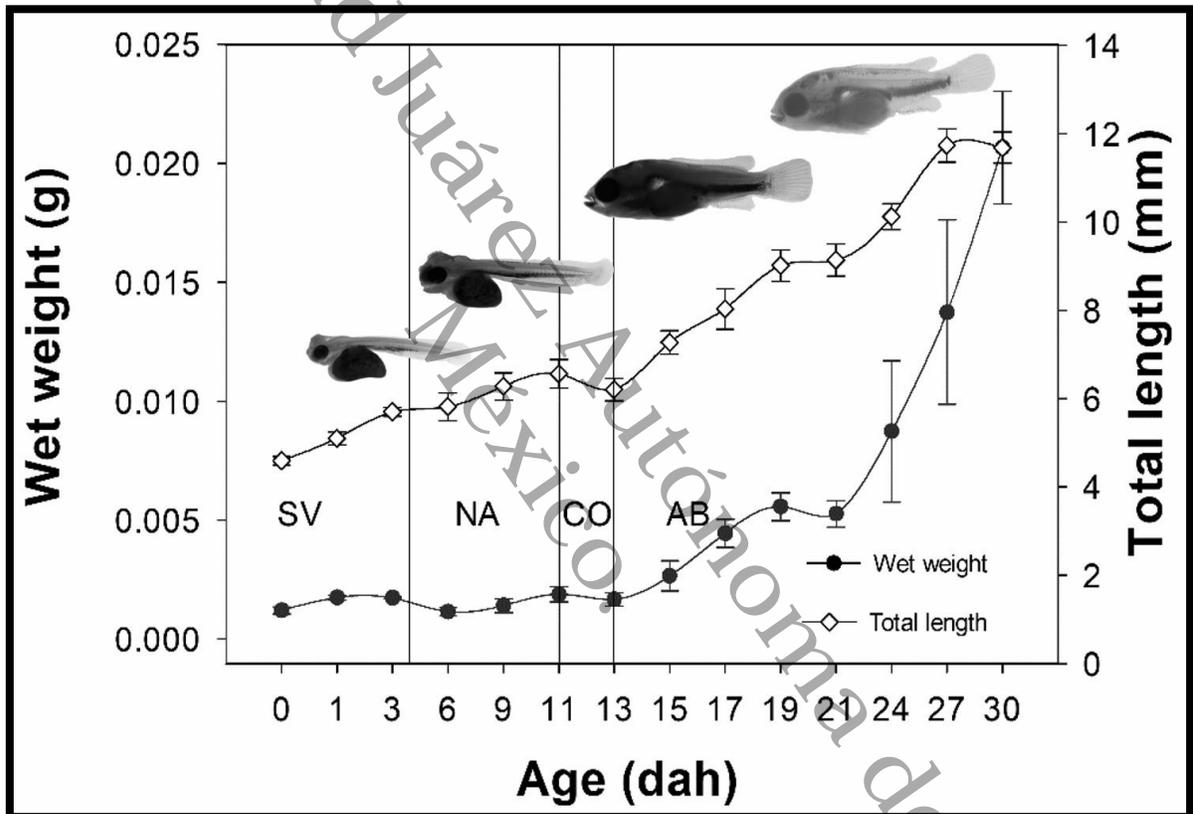


Figura 1. Crecimiento en peso húmedo (g) y longitud total (mm) durante la ontogenia inicial (0-30 días después de eclosión) de *A. trimaculatus* (Promedio \pm error estándar, $n=10$). Las líneas verticales indican el momento de los cambios de la alimentación. Las letras en mayúsculas el tipo de alimento y las letras en minúsculas indican es estadio de desarrollo. SV) Saco vitelino, NA) Nauplios de *Artemia sp.* CO) Coalimentación de nauplios de *Artemia sp.* y alimento balanceado, AB) Alimento balanceado.

7.1.4.2.-Descripción histológica del desarrollo del sistema digestivo

Los organismos del día 3 dde (5.71 ± 0.10 mm), se alimentan exclusivamente de vitelo ya que no se suministró alimento balanceado, los cuales presentan un digestivo rudimentario compuesto por tres regiones principales, cavidad bucofaríngea, esófago e intestino. En este día, se presenta el primordio de la vejiga gaseosa revestido por un epitelio de células cúbicas, y también se visualiza la presencia de glándulas adhesivas en la región cefálica (Fig. 2). El día 4 dde se observa la apertura de la boca y se inicia la alimentación exógena con nauplios de *Artemia sp.*, en conjunto con la alimentación endógena de las reservas de vitelo y glóbulos de aceite. En el día 6 dde (5.82 ± 0.32 mm) se observan cambios morfológicos y estructurales importantes en las larvas, incrementándose el desarrollo del tracto digestivo con la aparición de las primeras glándulas gástricas (Fig. 3A, D). Para el día 11 dde (6.57 ± 0.33 mm), se visualiza una regionalización del sistema digestivo con la diferenciación del intestino anterior y posterior, coincidiendo con la coalimentación de nauplios de *Artemia sp.* y alimento balanceado (Fig. 4A, D). En el día 15 dde (7.28 ± 0.26 mm) se puede observar un sistema digestivo desarrollado y se suministra únicamente alimento comercial (Fig. 5). Para el día 30 dde (11.68 ± 0.35 mm) se presenta un incremento del tamaño del sistema digestivo completamente desarrollado con las características de un juvenil (Fig. 6A). En donde, los diferentes órganos del sistema digestivo presentaron cuatro capas constitutivas; la mucosa, submucosa, muscular y serosa.

Saco vitelino

Al momento de la eclosión, los embriones presentan un saco vitelino de gran tamaño y homogéneo, el cual se encuentra ubicado en la región ventral asociado al hígado (Fig. 2A, E). El vitelo se encuentra rodeado por la capa sincitial vitelina, la cual está recubierta por un epitelio escamoso. Estas reservas se dejan de observar macroscópicamente en el día 11 dde (6.57 ± 0.33 mm) (Fig. 4A). Sin embargo, microscópicamente se pueden evidenciar remanentes hasta el día 30 dde (11.68 ± 0.35 mm); observándose de forma compacta, rodeada de melanóforos y tejido hepático (Fig. 6B).

Bucofaringe

En el día 3 dde (5.71 ± 0.10 mm), la boca permanece cerrada y la cavidad bucofaríngea está revestida por un delgado epitelio estratificado, con algunas células caliciformes dispersas (Fig.

2B). Para el día 6 dde (5.82 ± 0.32 mm), se observa la presencia de papilas gustativas, un incremento en la cantidad de células caliciformes y se hicieron visibles dientes bucofaríngeos (Fig. 3B). Mientras que los dientes mandibulares son visibles hasta el día 15 dde (7.28 ± 0.26 mm) (Fig. 5B). Entre los días 15 y 30 dde (11.68 ± 0.35 mm), no se presentaron nuevas estructuras, aunque se observó un aumento del crecimiento en la cavidad bucofaríngea.

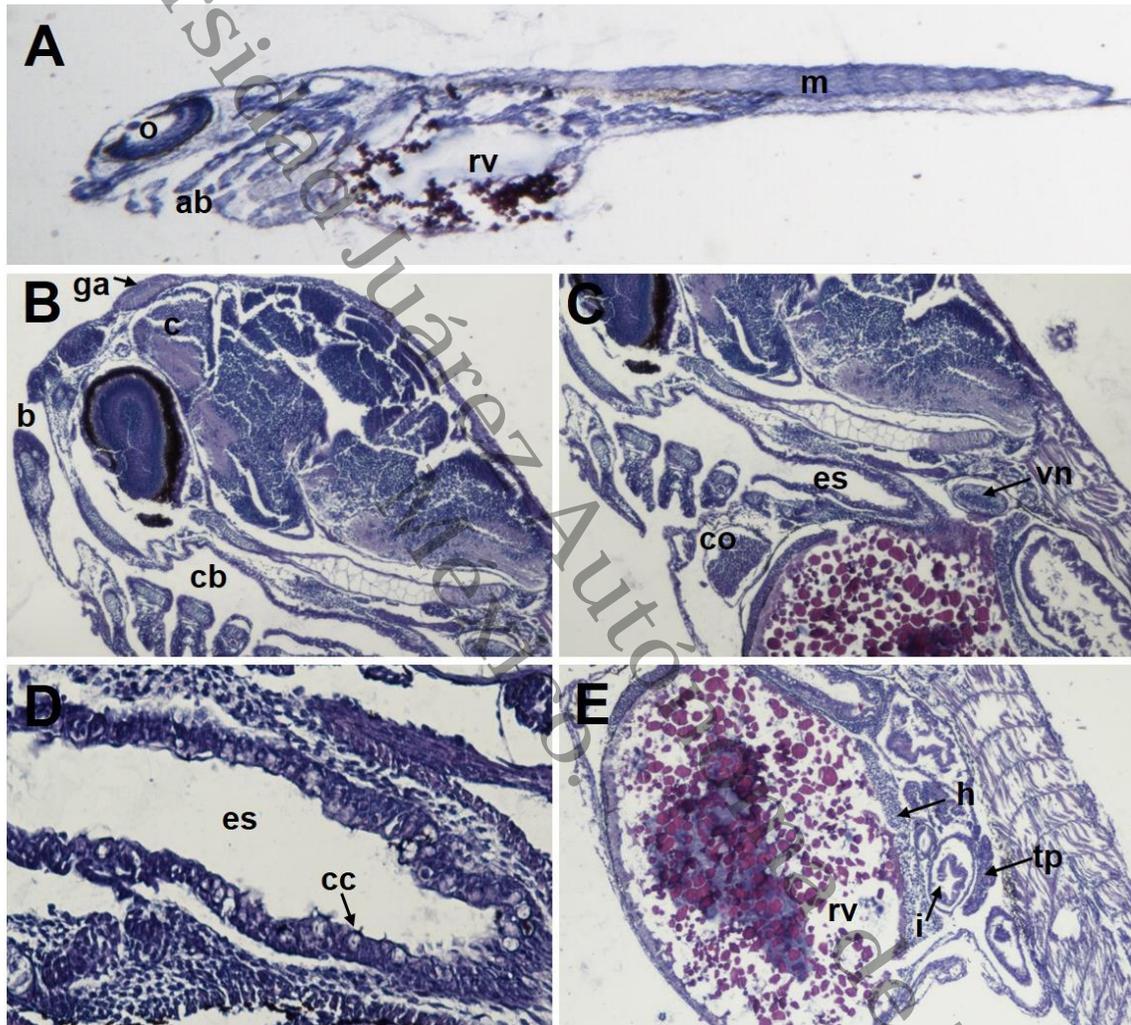


Figura 2. Desarrollo del sistema digestivo de *A. trimaculatus* al día 3 dde (5.71 ± 0.10 mm) con tinción de H&E. A) Vista general de un corte sagital, 10x. B) región cefálica, 40x. C) detalle de la zona de la cavidad bucofaríngea, 40x. D) detalle de la zona del esófago, 100x. D) región visceral, 40x. Abreviaturas: ab = arcos branquiales, b = boca, c = cerebro, cb = cavidad bucofaríngea, cc = células caliciformes, co = corazón, es = esófago, ga = glándulas adhesivas, h = hígado, i = intestino, m = musculo, o = ojo, rv = reservas vitelinas, tp = tejido pancreático, vn = vejiga natatoria.

Esófago

En el día 3 dde (5.71 ± 0.10 mm), después del cuarto par de arcos branquiales inicia un corto esófago y termina con un esfínter, dividiéndolo de la región del intestino. El cual está revestido por un grueso epitelio cuboidal simple formando pliegues longitudinales (Fig. 2C). Este epitelio presenta un mayor número de células caliciformes que la cavidad bucofaringea (Fig. 2D). Subyacente al epitelio esofágico, se encuentran dos capas de tejido muscular una de tipo circular y otra longitudinal que conforman la mucosa esofágica. En el día 6 dde (5.82 ± 0.32 mm) el epitelio del esófago presenta abundantes células caliciformes y un aumento en la cantidad de pliegues longitudinales, lo cual se incrementó con el desarrollo de la larva (Fig. 3C). En el día 11 dde (6.57 ± 0.33 mm) se presentó una mayor longitud y profundidad de la mucosa esofágica, la cual está cubierta por células caliciformes (Fig. 4B). Para el día 15 dde (7.28 ± 0.26 mm) las células caliciformes cubren todo el epitelio esofágico, visualizándose también una capa de tejido conectivo a lo largo del esófago (Fig. 5C). Finalmente, para el día 30 no se presentan diferencias histológicas con respecto a los días anteriores visualizándose un esófago completamente desarrollado.

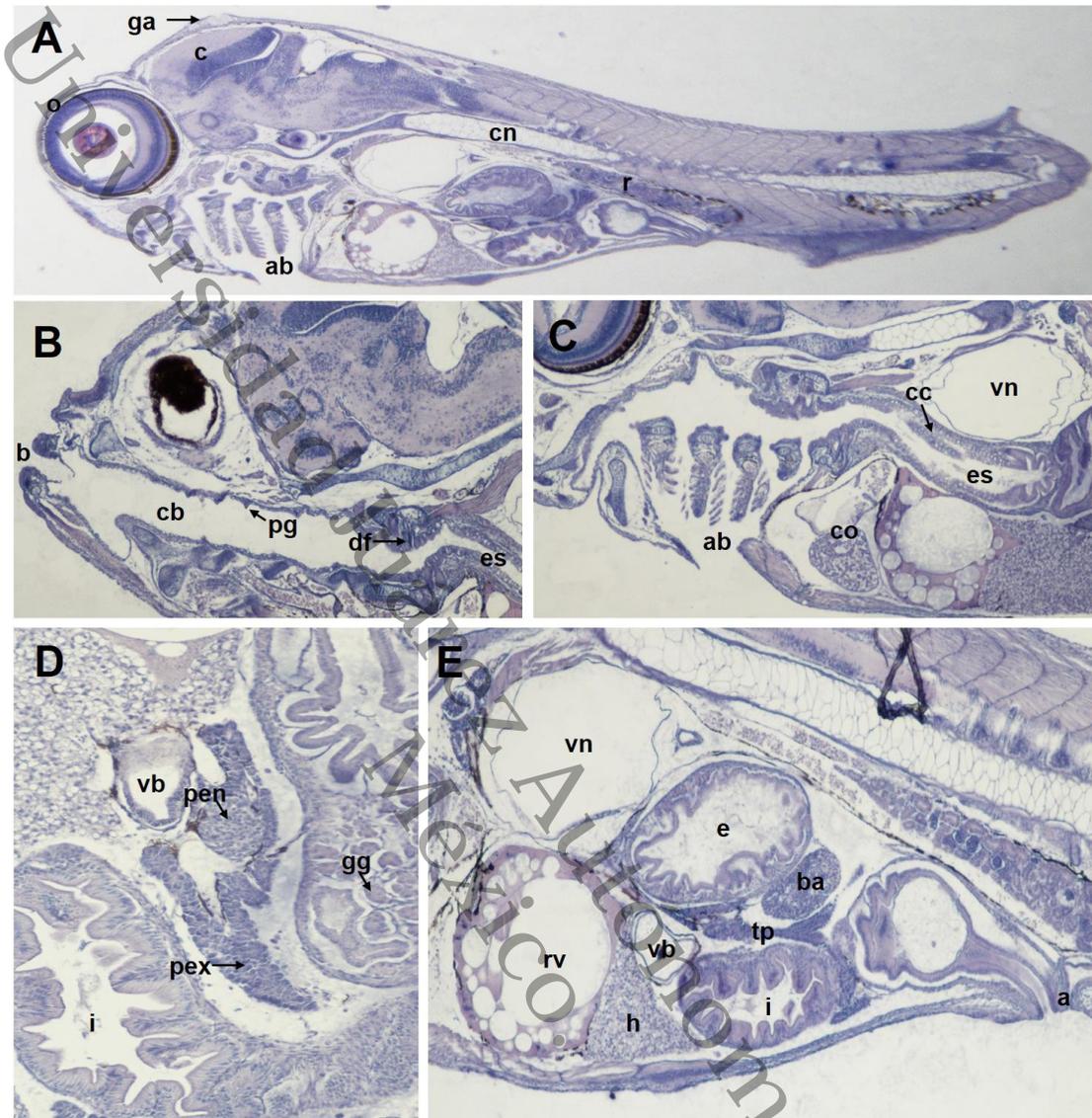


Figura. 3. Desarrollo del sistema digestivo de *A. trimaculatus* al día 6 dde (5.82 ± 0.32 mm) con tinción de H&E. A) Vista general de un corte sagital, 10x. B) región cefálica, 40x. C) detalla de la zona esofágica, 40x. D) detalle de la zona pancreática, 100x. E) región visceral, 40x. Abreviaturas: a = ano, ab = arcos branquiales, b = boca, ba = bazo, c = cerebro, cb = cavidad bucofaringea, cc= células caliciformes, cn = células notocordales, co = corazón, df = dientes faríngeos, e = estómago, es = esófago, ga = glándulas adhesivas, gg = glándulas gástricas, h = hígado, i = intestino, o = ojo, pen = páncreas endocrino, pex = páncreas exocrino, pg = papilas gustativas, r = riñón, rv = reservas vitelinas, tp= tejido pancreático, vb = vesícula biliar, vn = vejiga natatoria.

Estómago

Al día 3 dde (5.71 ± 0.10 mm) aún no existe presencia de estómago, este se observa hasta el día 6 dde (5.82 ± 0.32 mm), el cual está revestido por un epitelio de células cuboidales con núcleos basales. Debajo de la mucosa gástrica en la región media, se presentan las primeras glándulas gástricas (Fig. 3D). Las cuales están conformadas por agrupaciones de células cúbicas en forma de acinos, en las cuales se observan gránulos de secreción altamente basófilos. Para el día 11 dde (6.57 ± 0.33 mm) en el estómago se observa un importante incremento en el número de glándulas gástricas y pliegues en la mucosa (Fig. 4C). En el día 15 dde (7.28 ± 0.26 mm) se presenta una diferenciación morfológica en tres regiones: cardiaca (se visualiza un epitelio columnar simple con núcleos basales), fúndica (se presenta un epitelio cilíndrico con abundantes glándulas gástricas) y pilórica (se observa un epitelio columnar sin presencia de glándulas gástricas). En el día 30 dde (11.68 ± 0.35 mm) no se presentaron cambios notales, observándose un estómago desarrollado (Fig. 6C).

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

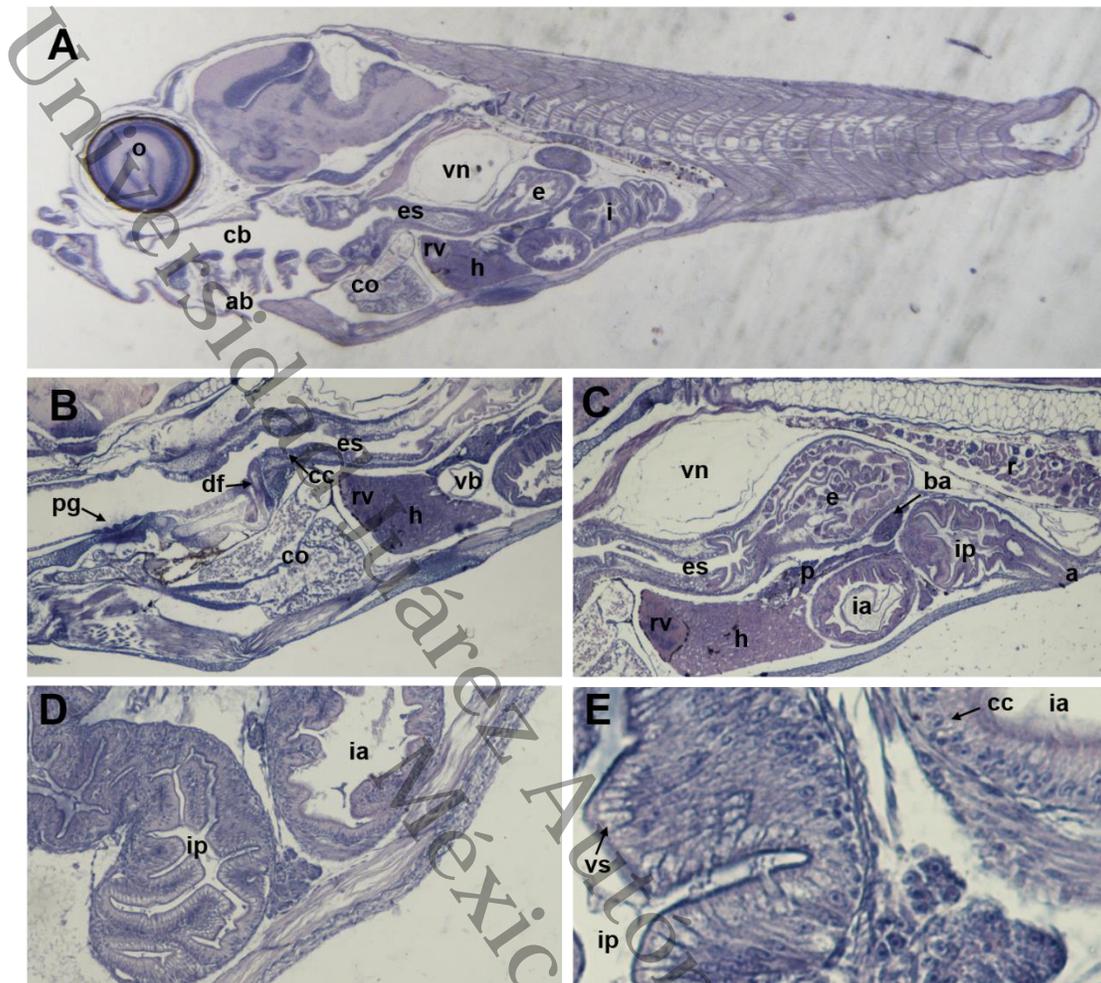


Figura 4. Desarrollo del sistema digestivo de *A. trimaculatus* al día 11 dde (6.57 ± 0.33 mm) con tinción de H&E. A) Vista general de un corte sagital, 10x. B) región bucofaríngea, 40x. C) región visceral, 40x. D) detalle de la zona intestinal, 100x. E) detalle del intestino anterior y posterior, 200x. Abreviaturas: a = ano, ab = arcos branquiales, ba = bazo, cb = cavidad bucofaríngea, cc = células caliciformes, co = corazón, df = dientes faríngeos, e = estómago, es = esófago, h = hígado, i = intestino, ia = intestino anterior, ip = intestino posterior, o = ojo, p = páncreas, pg = papilas gustativas, rv = reservas vitelinas, vb = vesícula biliar, vn = vejiga natatoria, vs = vacuolas suprarrenales.

Intestino

Al día 3 dde (5.71 ± 0.10 mm) el intestino permanece aún sin una clara regionalización, constituido por una capa epitelial simple de células columnares y un epitelio estratificado. En este día no hay evidencia de una capa muscular ni de abertura anal (Fig. 2E). En el día 6 dde (5.82 ± 0.32 mm), el intestino sigue sin una regionalización morfológica evidente. Sin embargo, se observa la presencia de la válvula intestinal que separa la región anterior y posterior; y

también se visualiza la abertura anal, lo cual indica la funcionalidad del intestino (Fig. 3E). En el día 11 dde (6.57 ± 0.33 mm), existe una clara diferencia morfológica entre los intestinos anterior y posterior (Fig. 4D). El primero presenta un mayor plegamiento de la mucosa intestinal, la cual está cubierta por un epitelio cilíndrico simple con núcleos basales y una gran cantidad de células caliciformes (Fig. 4E). El segundo se caracteriza por presentar abundantes enterocitos con vacuolas supranucleares (Fig. 4E). Para este día también se observa una mayor longitud intestinal y un aumento en el espesor de la mucosa intestinal. De aquí en adelante (día 15 dde 7.28 ± 0.26 mm), sólo se observa un incremento en la cantidad de células caliciformes y vacuolas supranucleares de los enterocitos, las cuales debido a las inclusiones lipídicas ocuparon la mayor parte del citoplasma desplazando los núcleos a una posición basal (Fig. 5D). Finalmente en el día 30 dde (11.68 ± 0.35 mm) no se encontraron modificaciones histológicas en el intestino.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

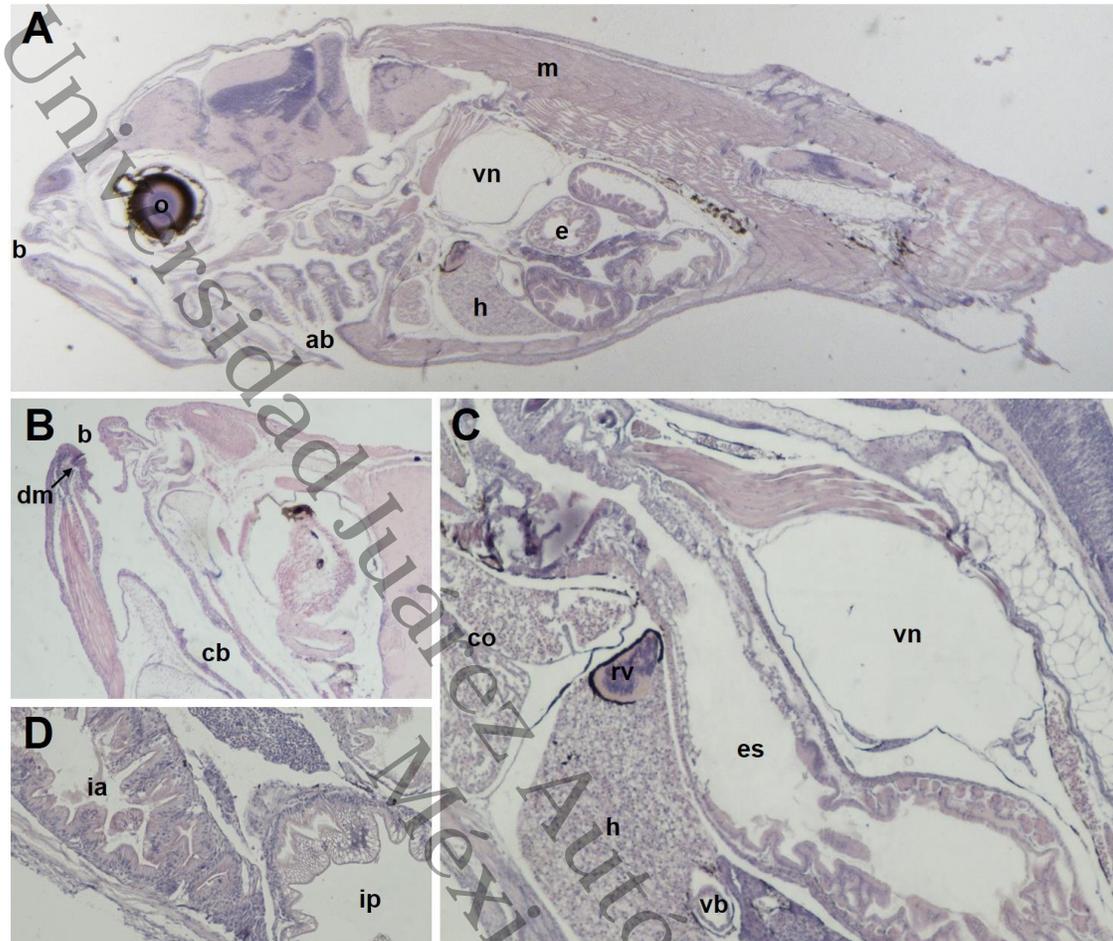


Figura 5. Desarrollo del sistema digestivo de *A. trimaculatus* al día 15 dde (7.28 ± 0.26 mm) con tinción de H&E. A) Vista general de un corte sagital, 10x. B) región bucofaríngea, 40x. C) región visceral, 40x. D) detalle de la zona intestinal, 100x. Abreviaturas: ab = arcos branquiales, b = boca, cb = cavidad bucofaríngea, co = corazón, dm = dientes mandibulares, e = estómago, es = esófago, h = hígado, ia = intestino anterior, ip = intestino posterior, m = musculo, o = ojo, rv = reservas vitelinas, vb = vesícula biliar, vn = vejiga natatoria.

Glándulas accesorias: Hígado y Páncreas

En el día 3 dde (5.71 ± 0.10 mm), se observa la presencia del hígado ubicándose debajo del intestino y por encima de la capa sincitial vitelina, con la que mantiene un contacto directo. Inicialmente, los hepatocitos poliédricos presentan núcleos centrales y ausencia de vacuolas (Fig. 2E). Dichas vacuolas, específicamente las lipídicas se pueden apreciar a partir del día 6 dde (5.82 ± 0.32 mm) observándose la presencia de sinusoides hepáticos. También en este día, se visualizó la vesícula biliar en posición superior al hígado (Fig. 3D). Para el día 11 dde (6.57 ± 0.33 mm) se observa un incremento de acumulación lipídica en las vacuolas de los

hepatocitos y la proliferación de los mismos. En el día 15 dde (7.28 ± 0.26 mm) se presentan abundantes sinusoides hepáticos distribuidos de forma difusa entre los hepatocitos y el hígado ocupa la mayor parte de la cavidad abdominal. El cual contiene abundantes hepatocitos con grandes vacuolas lipídicas, estas ocupan la mayor parte del citoplasma, desplazando el núcleo a la periferia del hepatocito (Fig. 5C). Para el día 30 dde (11.68 ± 0.35 mm) no se presentaron nuevos elementos estructurales y se muestran los sinusoides hepáticos del hígado (Fig. 6D).

Por otro lado, en el día 3 dde (5.71 ± 0.10 mm) se dispone de tejido pancreático exocrino rodeando la porción media intestinal, con un arreglo celular compacto en acinos, sin observarse la presencia de gránulos de zimógenos (Fig. 2E). En el día 6 dde (5.82 ± 0.32 mm) es cuando se presenta una diferenciación celular del tejido pancreático, observándose los elementos endocrinos (islotos de Langerhans) y exocrinos (células piramidales basófilas formando acinos pancreáticos y abundantes gránulos de zimógeno eosinófilos) (Fig. 3D). Para el día 11 dde (6.57 ± 0.33 mm), se observa la presencia de un páncreas difuso, asociado a órganos como el intestino, estómago e hígado, observándose su distribución en el mesenterio y de forma irregular (Fig. 4C). En el día 15 y 30 dde (11.68 ± 0.35 mm) no se presentan cambios histológicos en el tejido pancreático, presentándose un páncreas completamente desarrollado.

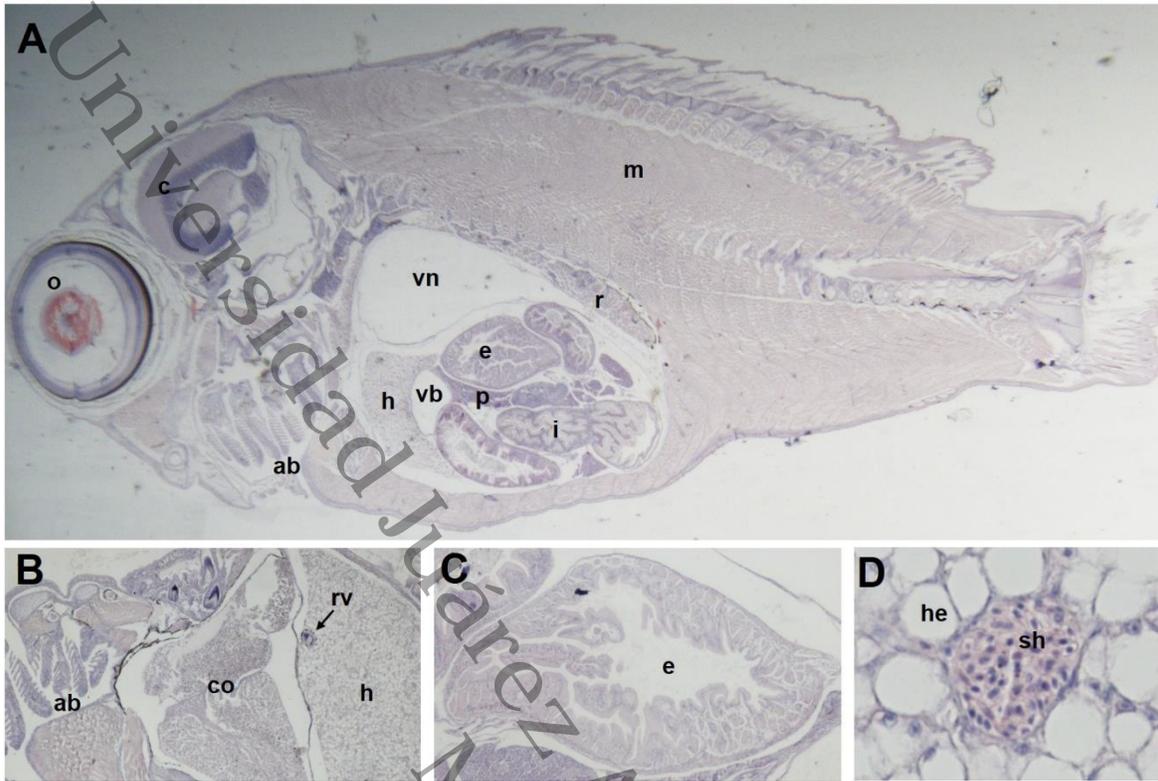


Figura 6. Desarrollo del sistema digestivo de *A. trimaculatus* al día 30 dde (11.68 ± 0.35 mm) con tinción de H&E. A) Vista general de un corte sagital, 7x. B) detalle de la zona del hígado, 100x. C) detalle de la zona del estómago, 100x. D) detalle de la zona del hígado, 200x. Abreviaturas: ab = arcos branquiales, c = cerebro, co = corazón, e = estómago, h = hígado, he = hepatocito, i = intestino, m = musculo, o = ojo, p = páncreas, r = riñón, rv = reservas vitelinas, sh = sinusoide hepático, vb = vesícula biliar, vn = vejiga natatoria.

7.1.4.3.- Expresión génica de precursores de enzimas digestivas

La expresión relativa del gen pepsinógeno, tripsinógeno, quimotripsinógeno y α -amilasa en los primeros días cuando se absorbe el saco vitelino es mínima, pero se incrementa significativamente cuando se inicia la alimentación exógena con nauplios de *Artemia sp.*, alcanzando los puntos máximos de expresión cuando se suministra alimento balanceado a excepción del pepsinógeno (Fig. 7). El cual, presentó los puntos máximos en los días 9 y 13 dde (6.28 ± 0.31 - 6.21 ± 0.26 mm respectivamente), coincidiendo con el suministro de nauplios de *Artemia sp.* y el inicio del alimento comercial. El tripsinógeno presenta un incremento para el día 13 dde (6.21 ± 0.26 mm) y alcanza su máxima expresión el día 15 dde (7.28 ± 0.26 mm); mientras que la expresión relativa máxima del quimotripsinógeno se presentó días después (17 dde, 8.03 ± 0.46 mm) y la α -amilasa presenta puntos máximos de expresión el día 15 y 17 dde (7.28 ± 0.26 - 8.03 ± 0.46 mm). En todos los casos, en los últimos días de muestreo, la expresión relativa desciende hasta sus valores basales.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

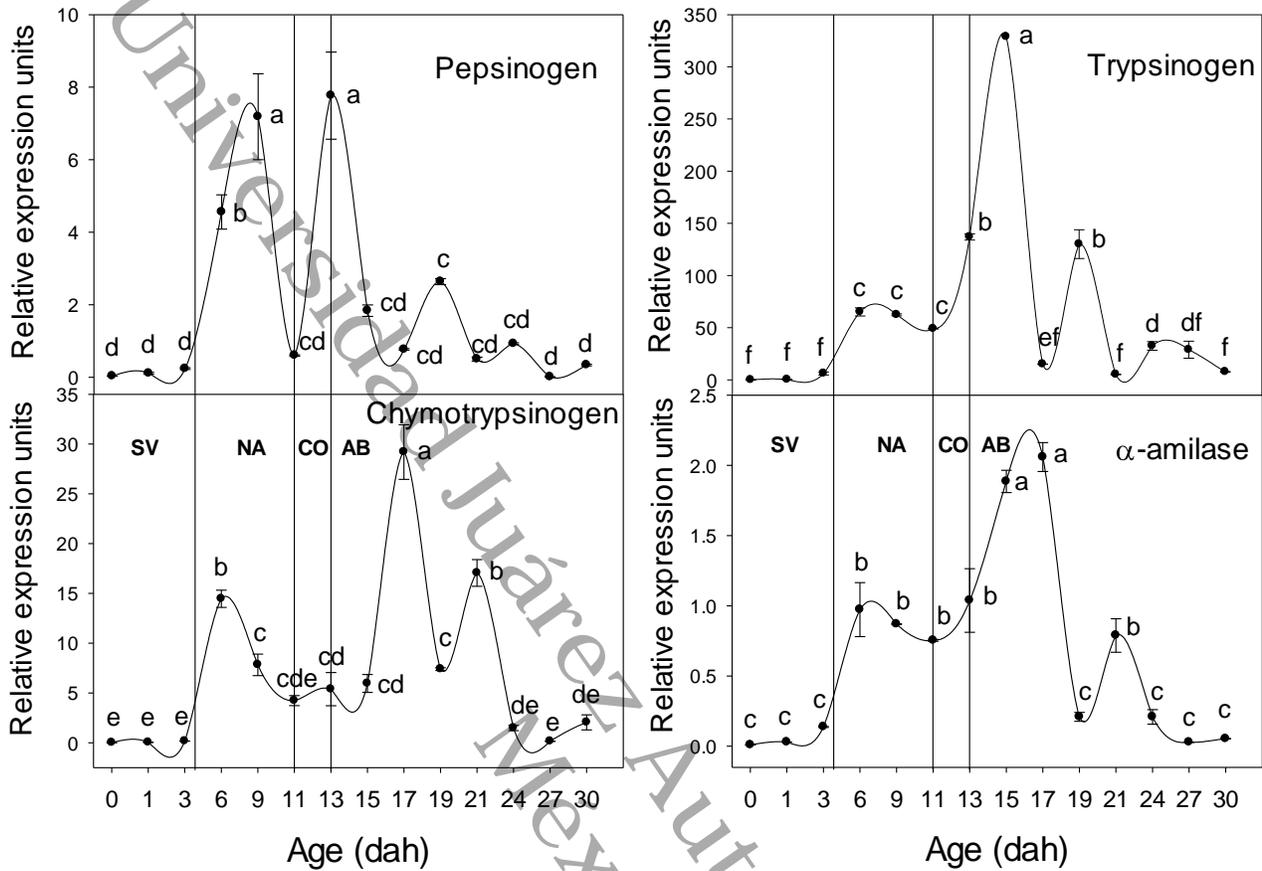


Figura 7. Expresión relativa (promedio \pm error estándar) de genes precursores de enzimas digestivas durante la ontogenia inicial de *A. trimaculatus* (media, n=3 de homogenizado de larvas). Letras minúsculas indican diferencias significativas ($p < 0.05$). Líneas verticales indican el momento de los cambios de la alimentación. Las letras en mayúsculas el tipo de alimento como SV) Saco vitelino, NA) Nauplios de *Artemia sp.* CO) Coalimentación de nauplios de *Artemia sp.* y alimento balanceado, AB) Alimento balanceado.

7.1.5.- DISCUSIÓN

7.1.5.1.- Crecimiento en peso húmedo y longitud total

El crecimiento en peso húmedo y longitud total promedios durante la ontogenia inicial de *A. trimaculatus*, se ajusta a una ecuación exponencial similar a lo descrito en estudios anteriores de la misma especie (Toledo-Solís *et al.*, 2015) y en otros peces (Treviño *et al.*, 2011; Moguel-Hernández *et al.*, 2016); los cuales presentan tasas de crecimiento aceleradas en este periodo de desarrollo.

7.1.5.2.- Descripción histológica del sistema digestivo

Los cambios histológicos en el sistema digestivo de *A. trimaculatus*, tiene un patrón de desarrollo similar a otros cíclidos dulceacuícolas como lo descrito en *Amphilophus rostratus* (Molina, 2008), *Amphilophus alfari* (Molina, 2010), *P. splendida* (Treviño *et al.*, 2011) y *C. urophthalmus* (Cuenca-Soria *et al.*, 2013). Sin embargo los tiempos en que se presentan los eventos de desarrollo y las distintas estructuras que componen el sistema digestivo son interespecíficos, debido a la influencia de factores genéticos o ambientales (Lazo *et al.*, 2011).

En los primeros días de desarrollo (0-3 dde, 4.60 ± 0.10 - 5.71 ± 0.10 mm respectivamente) *A. trimaculatus* presenta un sistema digestivo rudimentario constituido por un tubo recto, el cual en el día 3 dde (5.71 ± 0.10 mm) se comienza a diferenciar en tres regiones principales; la cavidad bucofaríngea y el esófago con algunas células caliciformes y el intestino, con células columnares. En otras especies de hábitos omnívoros como *Pagellus erythrinus* (Micale *et al.*, 2006) y otros cíclidos como *O. niloticus* (Morrison *et al.*, 2001) en este día han presentado la misma diferenciación del sistema digestivo que *A. trimaculatus*. Estas diferenciaciones se han asociado al comienzo de la preparación del digestivo para el inicio de la alimentación exógena, para evitar la abrasión en el epitelio al momento de ingerir los alimentos. Sin embargo, en estos días la boca y ano permanecen cerrados. Por lo tanto, se mantiene una alimentación endógena a partir de las reservas del saco vitelino, las cuales se pueden llegar a observar de forma macroscópica hasta el día 9 dde (6.28 ± 0.31 mm). Sin embargo, microscópicamente estas reservas son visibles hasta el día 30 dde (11.68 ± 0.35 mm). En especies como *C. urophthalmus* y *P. splendida* se observa este mismo comportamiento, pero con un menor tiempo de duración. Las especies que presentan un mayor tiempo de absorción de las reservas vitelinas (como el

caso de estos cíclidos), se ha asociado a estrategias de alimentación, para evitar periodos de inanición si no se dispone de alimento en el medio natural en los primeros días de vida (Zavala, 2011). Esta característica, ha sido aprovechada en las prácticas acuícolas como una ventaja para una transición exitosa a la alimentación exógena. Ya que si se llegará a presentar un retraso en el suministro de la primera alimentación, no se llegara afectar el rendimiento del crecimiento larvario (Gisbert & Williot, 1997; Treviño *et al.*, 2011). Por su parte, el evento de la abertura de la boca se registra en el día 4 dde, este evento coincide con otros cíclidos como *Cichlasoma dimerus* (Mejide & Guerrero, 2000).

La diferenciación de los distintos órganos en el sistema digestivo se hace evidente en el día 6 dde (5.82 ± 0.32 mm), debido a que los peces se preparan para asimilar la alimentación exógena. En la cavidad bucofaríngea se presentan papilas gustativas, las cuales son estructuras quimiosensoriales que permiten a las larvas ser selectivas con sus alimentos; esto coincide con lo documentado para *Danio rerio* donde la aparición de dichas papilas coincide con el inicio de la alimentación exógena (Hansen *et al.*, 2002). Para el día 6 dde (5.82 ± 0.32 mm), también se hacen presentes dientes bucofaríngeos los cuales se desarrollan en los siguientes días, esta característica ha sido asociada a especies omnívoras que pueden consumir larvas de peces, insectos, moluscos, crustáceos y material vegetal; en general los dientes faríngeos desempeñan una función de protección, de manera que trituran el alimento antes de que este siga su curso en el sistema digestivo (Wootton, 1990; Sanz *et al.*, 2009). Por otra parte, el esófago presenta una mayor cantidad de células caliciformes que la cavidad bucofaríngea; estas células producen mucus para evitar la abrasión en el epitelio esofágico por el paso del alimento y han sido documentadas en otras especies de cíclidos como *Amatitlania nigrofasciata* (Arman and İşisağ, 2017), *Pterophyllum scalare* (Leknes 2010) y *Maylandia zebra* (Leknes 2010), así como en teleósteos marinos como *Oncorhynchus mykiss* (Khojasteh *et al.*, 2013) y *Scophthalmus rhombus* (Hachero-Cruzado *et al.*, 2009).

Se ha descrito que el estómago presenta características morfológicas particulares y funcionalidad de acuerdo los hábitos alimenticios de las especies (Carrassón *et al.*, 2006; Ghosh & Chakrabarti, 2015). En esta especie el estómago es el último órgano del sistema digestivo en diferenciarse, con la visualización de las glándulas gástricas en el día 6 dde (5.82 ± 0.32 mm). El

cual es importante en la digestión de los alimentos, en donde se lleva a cabo una digestión ácida de los alimentos. Esta funcionalidad del estómago, se ha descrito en otros ciclidos de hábitos omnívoros como *C. urophthalmus* (Cuenca-Soria *et al.*, 2013) y carnívoros como *P. splendida* (Treviño *et al.*, 2011). En donde, las glándulas gástricas son las encargadas de la secreción del pepsinógeno y HCl para la digestión ácida en el estómago (Gisbert *et al.*, 2004; Arellano *et al.*, 2001). Cuando está completamente desarrollado se compone de tres regiones principales, la cardíaca, fúndica y pilórica. La cardíaca es la región que se encuentra más próxima al esófago, llamada así por su cercanía al corazón y se caracteriza por la presencia de pliegues longitudinales anchos. En la región fúndica se encuentran abundantes glándulas gástricas tubulares y pliegues longitudinales continuos y cortos. La región pilórica se encuentra delimitada por un esfínter que divide al estómago del intestino, esta región se caracteriza por tener un epitelio columnar ausente de glándulas gástricas (Atencio *et al.*, 2008; Hachero-Cruzado *et al.*, 2009; Huseyn *et al.*, 2015; Manisha *et al.*, 2015).

Las funciones principales del intestino son la digestión alcalina del alimento y la posterior absorción de los nutrientes (Caballero *et al.*, 2003). Las características morfológicas y funcionalidad del intestino, se ha relacionado al hábito alimenticio de las especies, en donde el mayor porcentaje de material vegetal en la dieta se asocia con la longitud intestino (Buddington *et al.*, 1997). Por otra parte, los peces que carecen de estómago realizan la digestión de los alimentos principalmente en el intestino; mientras que los peces que disponen de una digestión importante en el estómago, este funciona mayormente para absorber los nutrientes de la digestión (Sundell *et al.*, 2003). Las células encargadas de realizar ambas funciones son los enterocitos, los cuales forman una superficie de contacto con las microvellosidades (Minghetti *et al.*, 2017; Buddington & Kuzmina, 2000). Así también, presenta células caliciformes las cuales producen y liberan mucus para recubrir la superficie epitelial (Arman & İşisağ Üçüncü, 2017). En esta especie el intestino se presenta en los primeros días como un tubo recto indiferenciado, similar a lo descrito en otras especies como *Dormitator latifrons* (López-López *et al.*, 2015), *Schizothorax zarudnyi* (Shahriari-Moghadam *et al.*, 2015) y *O. niloticus* (Morrison & Weigh, 1999). Posteriormente se hace presente la abertura anal, lo cual podría indicar la funcionalidad para una alimentación exógena. La regionalización comienza con la presencia de la válvula que separa al intestino anterior y posterior. Es en el día 11 dde (6.57 ± 0.33 mm),

cuando se observa una diferenciación en la estructura celular, en donde en el intestino anterior se observa una abundante cantidad de enterocitos, mientras que en la región posterior se presentan diversas vacuolas supranucleares lipídicas. Esta regionalización también se ha descrito en otras especies como *Dicologlossa cuneata* (Herrera *et al.*, 2010), *Ariopsis seemanni* (Gómez Ramírez *et al.*, 2010) y *Petenia splendida* (Treviño *et al.*, 2011), en donde la parte anterior del intestino esta mayormente asociada a la absorción de nutrientes y la posterior a una mayor actividad fagocitótica, donde la pinocitosis de las proteínas tienen gran importancia nutricional (Buddington & Diamond, 1987; Ezeasor & Stokoe, 1981; Clements & Aubenheimer, 2006).

Por último, las glándulas accesorias son observadas desde los primeros días de desarrollo como tejido hepático y pancreático (3 dde, 5.71 ± 0.10 mm), mientras que la vesícula biliar se hace evidente en días posteriores (6 dde, 5.82 ± 0.32 mm). La presencia de tejido hepático y pancreático de forma temprana en el desarrollo, se ha asociado a la transferencia de nutrientes del saco vitelino, regulando principalmente el metabolismo de lípidos (Morrison *et al.*, 2001). La presencia de estos órganos en los primeros días se ha descrito en especies de hábitos omnívoros y carnívoros (Boulhic & Gabaudan, 1992; López-López *et al.*, 2015). Por otra, parte en el día 6 dde (5.82 ± 0.32 mm) la funcionalidad del páncreas se hace evidente con la presencia de islotes de Langerhans y gránulos de zimógeno, confirmando la diferenciación del páncreas endocrino (producción y secreción de hormonas peptídicas) y exocrino (síntesis y secreción de precursores de enzimas digestivas) (Fortin *et al.*, 2015; Ghosh & Chakrabarti, 2016).

De forma general, se aprecia que la mayoría de los cambios importantes del sistema digestivo en esta especie, se presentan en los primeros días. Esta característica se ha descritos en otras especies de cíclidos como *Amphilophus alfari* (Molina, 2010), *C. urophthalmus* (Martínez-Palacios & Ross, 2004) y *O. niloticus* (Morrison *et al.*, 2001). Es posible que estos tiempos de desarrollo de las especies, estén determinados por factores genéticos y ambientales, como la calidad de puesta, la historia de vida, la carga genética que los reproductores hayan heredado, alimento disponible en el medio, temperatura, oxígeno disponible, etc (Alix *et al.*, 2015; Cucchi *et al.*, 2011). Así como las estrategias reproductivas; en el caso de los peces con incubación

bucal, pueden llegar a presentar un desarrollo más lento por la protección que brindan los progenitores durante los primeros días desarrollo, a diferencia de los incubadores de sustrato que debido a la vulnerabilidad que presentan las larvas al medio ambiente se consideran que desarrollan un crecimiento más rápido (Meijide & Guerrero, 2000; Fujimura & Okada, 2007; Molina, 2008). Por ello, en el día 15 dde (7.28 ± 0.26 mm) *A. trimaculatus*, presenta un sistema digestivo desarrollado y funcional, el cual únicamente presenta cambios en el aumento del tamaño de las estructuras preexistentes hasta finalizar el bioensayo a los 30 dde (11.68 ± 0.35 mm).

7.1.5.3.- Expresión génica de precursores de enzimas digestivas

Últimamente, las herramientas moleculares han contribuido al entendimiento de la fisiología digestiva en los primeros estadios de desarrollo; lo cual podría permitir mejorar los protocolos de alimentación para la producción en masas (Lazo *et al.*, 2011). En algunos estudios se habla de una programación genética de los genes precursores de las enzimas digestivas para efectuar la digestión en los primeros días de los estadios de desarrollo durante la ontogenia inicial (García-Gasca *et al.*, 2006; Yúfera *et al.*, 2018). Mientras que en otros, son producidos por células u órganos específicos cuando estos comienzan a ser funcionales (Chi *et al.*, 2013; Yúfera *et al.*, 2018).

Pepsinógeno

Los zimógenos del pepsinógeno son transformados por las condiciones ácidas del estómago a su forma activa la enzima pepsina, la cual es importante en la digestión de las especies gástricas (Kageyama, 2002). Por lo tanto, la expresión génica del pepsinógeno podría servir como un indicador de la funcionalidad del estómago. En este caso, en los días 0 al 3 dde (4.60 ± 0.10 - 5.71 ± 0.10 mm respectivamente) cuando se presenta la fase de embrión libre los niveles de expresión son casi nulos, mostrándose el incremento de la expresión de forma significativa en el día 6 dde (5.82 ± 0.32 mm) (fase larvaria), dos días posteriores a la apertura de la boca y cuando existe una alimentación exógena. Estos datos se pueden relacionar a los análisis histológicos que muestran en este mismo día (6 dde 5.82 ± 0.32 mm) se da un desarrollo importante del sistema digestivo, lo que se observa claramente la diferenciación del estómago y la presencia de glándulas gástricas. Mientras que la actividad enzimática de la pepsina en esta

especie es significativa en el día 9 dde (6.28 ± 0.31 mm) (Toledo-Solis *et al.*, 2015); la cual coincide con uno de los puntos máximos de la expresión del pepsinógeno. Desde el contexto nutricional la actividad de la enzima pepsina se ha utilizado como un indicador de la transformación de larva a juvenil, indicando la funcionalidad del estómago (Feng *et al.*, 2008). En otros estudios realizados en la ontogenia temprana como en *Pagrus pagrus* (Darias *et al.*, 2007) y en *Paralichthys olivaceus* (Lee *et al.*, 2015), la expresión del pepsinógeno no se ha detectado antes de la formación o desarrollo del estómago, indicando la especificidad de segregación por parte de las glándulas gástricas del estómago (Gawlicka *et al.*, 2001). Sin embargo, en *Scophthalmus maximus* la presencia de glándulas gástricas se ha registrado en el 16 dph sin haber expresión del pepsinógeno, la cual es detectada hasta el día 22 dph indicándose una asincronía entre la organogénesis y la expresión (Chi *et al.*, 2013). Los autores mencionan que esto probablemente se deba a que el estómago no está completamente desarrollado. Posteriormente, en la mayoría de los casos los patrones de expresión del pepsinógeno se mantienen fluctuante a lo largo de la ontogenia y son influenciados por las pautas de alimentación.

Tripsinógeno

La tripsina tiene un rol importante en la digestión de las proteínas y en la activación de otros zimógenos secretados por el páncreas (Zhong *et al.*, 2011). Esta es secretada en forma de tripsinógeno por el páncreas al lumen del intestino, en donde es activado por la enteroquinasa; estando en su forma activa ayuda en la activación de la quimotripsina, elastasa, carboxipeptidasa, fosfolipasa y colipasa (Rønnestad *et al.*, 2013). La tripsina es importante en la digestión de las proteínas en el intestino; esta endoproteasa puede estar presente en distintas isoformas y tienen sitios de acción específicos en los aminoácidos lisina y arginina (Cara *et al.*, 2007; Belitz *et al.*, 2009). Los niveles de expresión del tripsinógeno son casi nulos en los primeros días cuando se presenta una alimentación endógena; este incrementa significativamente durante la alimentación exógena (nauplios de *Artemia sp.*), coincidiendo con la diferenciación del páncreas exocrino y endocrino (día 6 dde 5.82 ± 0.32 mm). El momento en que se detectan los primeros niveles de expresión significativos han sido asociados a la funcionalidad del páncreas exocrino (Galaviz *et al.*, 2012). Por su parte, en el patrón de la actividad enzimática de tripsina y la expresión del tripsinógeno alcanzan los puntos máximos

en el suministro de alimento balanceado (Toledo-Solís *et al.*, 2015). Por lo tanto, parece ser que la ingesta de los alimentos y la composición de la dieta, son factores claves que modulan la expresión del tripsinógeno, y este por su parte regula la síntesis de tripsina de acuerdo al contenido de la proteína en la dieta (Cahu *et al.*, 2004; Gamboa-Delgado *et al.*, 2011). Por otra parte, los niveles de expresión del tripsinógeno resultaron ser los más altos al resto de los zimógenos de pepsina y quimotripsina, y a lo descrito en otras especies como en *Lutjanus guttatus* (Galaviz *et al.*, 2012; Moguel-Hernández *et al.*, 2015) y *Spherooides annulatus* (García-Gasca *et al.*, 2006). Sin embargo, los altos niveles de expresión del tripsinógeno se han descritos en otras especies como *Paralichthys olivaceus* (Lee *et al.*, 2015). Posiblemente los elevados niveles de expresión podrían corresponder a los distintos tipos de isoformas existentes, debido a que la cuantificación se realizó en la región conservada de las isoformas presentes.

Quimotripsinógeno

Los primeros niveles de expresión del quimotripsinógeno en conjunto con otras enzimas pancreáticas, han sido asociadas a una programación genética de las larvas; registrándose al momento de la eclosión como en el caso de *Lutjanus guttatus* (Moguel-Hernández *et al.*, 2016); y en otras especies como en *Sparus aurata* (Mata-Sotres *et al.*, 2016) y en *Oreochromis mossambicus* (Lo & Weng, 2006) se ha registrado antes de la apertura de la boca. Esta expresión también se ha descrito al momento de iniciar la alimentación exógena como en *Paralichthys olivaceus* (Srivastava *et al.*, 2002). En el caso de *A. trimaculatus* los primeros niveles de expresión se registraron días posteriores a la eclosión, una diferenciación del páncreas, apertura de la boca y se lleva a cabo la alimentación exógena; mientras que los picos máximos de expresión se alcanzan en días posteriores cuando se suministra alimento balanceado. Esto evidencia la importancia de la quimotripsina, la cual es una endoproteasa en la digestión de las proteínas en el intestino, con sitios de acción en los enlaces que involucran los aminoácidos de tirosina y fenilalanina (Gisbert *et al.*, 2013). Por lo tanto, la quimotripsina y la tripsina al tener diferentes sitios de acción, tienen un rol importante de complementariedad en la alimentación exógena, sobre todo en los primeros días que se desarrolla el sistema digestivo (Rønnestad *et al.*, 2013); las cuales podrían ser producidas de acuerdo a la diferencia de la composición de proteínas y el perfil de aminoácidos, de alimentos vivos o inertes (Conceição *et al.*, 2003).

α -amilasa

El patrón de expresión génica y actividad enzimática de α -amilasa, se han descrito comúnmente en especies marinas con elevados niveles en los primeros días de la eclosión; los cuales tienden a disminuir durante las etapas de crecimiento de la ontogenia, en *Dentex dentex* (Gisbert *et al.*, 2009), *Labrus bergylta* (Hansen *et al.*, 2013), *Totoaba macdonaldi* (Galaviz *et al.*, 2015), *Lutjanus guttatus* (Moguel-Hernández *et al.*, 2016) and *Sparus aurata* (Mata-Sotres *et al.*, 2016). Los primeros niveles de expresión o actividad, no se ha descrito claramente su funcionalidad adjudicándose a una programación genética (Cahu *et al.*, 2004; Darias *et al.*, 2006), o bien, esto hace considerar la importancia de los carbohidratos en los primeros días de desarrollo de estas especies (Lazo *et al.*, 2011; Murashita *et al.*, 2014). Por su parte, los bajos niveles de expresión que se presentan en días posteriores a la absorción de las reservas vitelinas, se han relacionado con el aprovechamiento de los carbohidratos en una ingesta oportuna en los alimentos. En *A. trimaculatus*, los niveles de expresión muestran un patrón opuesto, el cual incrementa de forma fluctuante hasta alcanzar un punto máximo durante la alimentación exógena con alimento comercial. Este es parecido al patrón de actividad enzimática α -amilasa reportado anteriormente (Toledo-Solís *et al.*, 2015); y a lo descrito también en otras especies dulceacuícolas como *P. splendida* (Uscanga-Martínez *et al.*, 2011) y *C. urophthalmus* (López-Ramírez *et al.*, 2011). Estos perfiles de incremento de la α -amilasa, se han asociado mayormente a especies con hábitos omnívoros, debido al aprovechamiento del contenido de carbohidratos en los alimentos (Parma *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2014). Por otra parte, se han considerado que los zimógenos y los niveles de actividad de α -amilasa indican la funcionalidad del páncreas y la maduración del digestivo (Cahu *et al.*, 2004; Darias *et al.*, 2006; Asencio-Alcudia *et al.*, 2018). En donde la α -amilasa tiene como sitios de acción los enlaces glucosídicos α -1,4 del almidón y glucógeno (Lévêque *et al.*, 2000).

7.1.6.- CONCLUSIÓN

El sistema digestivo de *A. trimaculatus* durante la ontogenia inicial presenta un desarrollo abrupto característico a lo descrito en otros cíclidos. En donde, desde el día 6 dde (5.82 ± 0.32 mm) esta especie presenta diferencias histológicas de los distintos órganos del sistema digestivo. Por su parte, los patrones de expresión génica de las enzimas digestivas en este mismo día, muestran una expresión significativa indicando la funcionalidad de los distintos órganos; los cuales son influenciados por el suministro de los alimentos exógenos, alcanzando los puntos máximos de expresión cerca del día 15 dde (7.28 ± 0.26 mm). Por lo tanto, en estos días (6-15 dde, 5.82 ± 0.32 - 7.28 ± 0.26 mm respectivamente) el sistema digestivo puede llevar acabo la alimentación de tipo exógena. Sin embargo, el completo desarrollo morfológico y funcional del sistema digestivo se presenta hasta el día 15 dde (7.28 ± 0.26 mm), y de acuerdo a las características histológicas y genéticas esta especie, presenta hábitos omnívoros con tendencia carnívora.

7.1.7.- REFERENCIAS

Alix M., Chardard D., Ledoré Y., Fontaine P., Schaerlinger B. (2015). An alternative developmental table to describe non-model fish species embryogenesis: application to the description of the *Eurasian perch* (*Perca fluviatilis* L. 1758) development. *EvoDevo*. Vol. 6(1). Doi: 10.1186/s13227-015-0033-3

Álvarez-González C. A., Moyano-López F. J., Civera-Cercedo R., Carrasco-Chávez V., Ortiz-Galindo J., Dumas S. (2008). Development of digestive enzyme activity in larvae of spotted sand bass *Palabrax maculatofasciatus*. I Biochemistry analysis. *Fish Physiol Biochem*. Vol. 34:373–384.

Arellano J. M., Storch V., Sarasquete C. (2001). Histological and histochemical observations in the stomach of the Senegal sole, *Solea senegalensis*. *Histol. Histopathol.*, 16. pp. 511-521.

Arman S., İşısağ Üçüncü S. (2017). Histochemical Characterization of Convict Cichlid (*Amatitlania nigrofasciata*) Intestinal Goblet Cells. *Pakistan J. Zool.*, Vol. 49(2): 445-453. Doi: <http://dx.doi.org/10.17582/journal.pjz/2017.49.2.445.453>

Asencio-Alcudia G. G., Tovar-Ramírez D., Latisnere-Barragán H., Martínez-García R., Contreras-Sánchez W. M., Alvarez-González C. A. (2018). Gene expression of digestive enzymes during the initial ontogeny of Mexican snook *Centropomus poeyi*. *Lat. Am. J. Aquat. Res.* Doi: 10.3856/vol46-issue5-fulltext-x.

Atencio V. J., Hernández J., Pardo S. C. (2008). Descripción morfológica del tubo digestivo de juveniles de rubio *Salminus affinis* (pisces: characidae). *Acta biológica colombiana*. Vol. 13:3. 99-112 pp. issn 1900-1649.

Belitz H. D., Grosch W., Schieberle P. (2009). Amino Acids, Peptides, Proteins. In: *Food Chemistry*. Springer, Berlin, Heidelberg. 12-15 pp.

Boulhic M., Gabaudan J. (1992). Histological study of the organogenesis of the digestive system and swim bladder of the Dover sole, *Solea solea* (Linnaeus 1758). *Aquaculture*. Vol. 102(4): 373–396. Doi: 10.1016/0044-8486(92)90190-v.

Buddington R. K., Kuz'mina V. (2000). Digestive System. *The Laboratory Fish*. Vol. 379–384. Doi:10.1016/b978-012529650-2/50029-9.

Buddington R. K., Diamond J. M. (1987). Pyloric ceca of fish: a “new” absorptive organ. *Am J Physiol*. Vol. 252: G65-76.

Buddington R. K., Krogdahl A., Bakke-Mckellep A. M. (1997). The intestines of carnivorous fish: structure and functions and the relations with diet. *Acta Physiol Scand Suppl*. Vol. 638:67-80.

Caballero M., Izquierdo M., Kjorsvik E., Montero D., Socorro J., Fernández A. J., Rosenlund G. (2003). Morphological aspects of intestinal cells from gilthead seabream (*Sparus aurata*) fed diets containing different lipid sources. *Aquaculture*. Vol. 225(1-4). 325–340 pp. Doi: 10.1016/s0044-8486(03)00299-0.

Cahu C., Rønnestad I., Grangier V., Zambonino-Infante J. L. (2004). Expression and activities of pancreatic enzymes in developing sea bass larvae (*Dicentrarchus labrax*) in relation to intact and hydrolyzed dietary protein; involvement of cholecystokinin. *Aquaculture*. Vol. 238:295–308.

Canino M. F., Bailey K. M. (1995). Gut evacuation of walleye pollock larvae in response to feeding conditions. *J. Fish Biol*. Vol. 46: 389–403.

Cara B., Moyano F.J., Zambonino-Infante J. L., Fauvel C. (2007). Trypsin and chymotrypsin as indicators of nutritional status of post-weaned sea bass larvae. *J. Fish Biol*. Vol. 70:1798–1808.

Carrassón M., Grau A., Dopazo L. R., Crespo. S. (2006). A histological, histochemical and ultrastructural study of the digestive tract of *Dentex dentex* (Pisces, Sparidae). *Histol. Histopathol.* Vol. 21. 579-593 pp.

Chen J., Yinglei L., Junbin Z., Huifen L. and Yongqi L. (2016). Identification and expression analysis of two Wnt4 genes in the spotted scat (*Scatophagus argus*). *Electronic Journal of Biotechnology.* China.

Chi L., Xu S., Xiao Z., Lin F., Ma D., Zhao C. Xiao Y., Liu Q., Li J. (2013). Pepsinogen A and C genes in turbot (*Scophthalmus maximus*): Characterization and expression in early development. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology.* Vol. 165(1), 58–65. Doi:10.1016/j.cbpb.2013.03.002

Clements K.D., Raubenheimer D. (2006). Feeding and Nutrition. In: Evans, D.H., laiborne, J.B. (Eds.), *The Physiology of Fishes.* Taylor and Francis Group, Boca Raton, FL, USA.

Conceição L. E. C., Grasdalen H., Rønnestad I. (2003). Amino acid requirements of fish larvae and post-larvae: new tools and recent findings. *Aquaculture.* Vol. 227:221–232.

Cucchi P., Sucré E., Santos R., Leclère J., Charmantier G., Castille, R. (2011). Embryonic development of the sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Helgoland Marine Research.* Vol. 66(2): 199–209. Doi: 10.1007/s10152-011-0262-3

Cuenca-Soria C. A., Alvarez-González C. A., Ortiz-Galindo J. L., Tovar-Ramírez D., Guerrero-Zárate R., Aguilar-Hernández S, Perera-García M. A, Hernández-Gómez R. and Gisbert E. (2013). Histological development of the digestive system of Mayan cichlid *Cichlasoma urophthalmus* (Günther 1862). *Appl. Ichthyol.* 1–9 pp. Doi 10.1111/jai.12307.

Darias M. J., Murray H. M., Gallant J. W., Astola A., Douglas S. E., Cárdenas Yúfera M., Martínez Rodríguez G. (2006). Characterization of a partial α -amylase clone from red porgy

(*Pagrus pagrus*): Expression during larval development. *Comparative Biochemistry and Physiology*, Part B. Vol. 143:209–218.

Darias M. J., Murray H. M., Gallant J. W., Douglas S. E., Yúfera M., Martínez-Rodríguez G. (2007). Ontogeny of pepsinogen and gastric proton pump expression in red porgy (*Pagrus pagrus*): determination of stomach functionality. *Aquaculture*. Vol. 270: 369–378.

Deshmukh M. R., Chirde S. G., Gadhikar Y. A. (2015). Histological and histochemical study on the stomach and intestine of catfish *Heteropneustes fossilis* (BLOCH, 1794). *G.J.B.A.H.S.* Vol. 4(1):16-23. ISSN: 2319 – 5584.

Ezeasor D. N., Stokoe W. M. (1981). Light and Electron Microscopic Studies on the Absorptive Cells of the Intestine Ceca and Rectum of the Adult Rainbow Trout *Salmo gairdneri*. *Journal of Fish Biology*. Vol. 18. 527-544 pp.

Feng S., Li W., Lin H. (2008). Characterization and expression of the pepsinogen C gene and determination of pepsin-like enzyme activity from orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, Part B. Vol. 149:275–284.

Fortin J. S., Santamaria-Bouvier A., Lair S., Dallaire A. D., Benoit-Biancamano M. (2015). Anatomical and molecular characterization of the endocrine pancreas of teleostean fish: Atlantic wolffish (*Anarhichas lupus*). *Zoological Studies*. Vol. 54: 21.

Fujimura K., Okada N. (2007). Development of the embryo, larva and early juvenile of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Pisces: Cichlidae). Developmental staging system. *Development, Growth & Differentiation*. Vol. 49(4). 301–324 pp. Doi:10.1111/j.1440-169x.2007.00926.x

Galaviz M. A., García-Ortega A., Gisbert E., López L. M., García Gasca A. (2012). Expression and activity of trypsin and pepsin during larval development of the spotted rose snapper *Lutjanus guttatus*. Facultad de Ciencias Marinas, Universidad Autónoma de Baja California. Ensenada B.C. México. *Comparative Biochemistry and Physiology*, Part B. Vol. 161. 9–16 pp.

Galaviz M. A., López L. M., García-Gasca A., Álvarez-González A., True C. D., Gisbert E. (2015). Digestive system development and study of acid and alkaline protease digestive capacities using biochemical and molecular approaches in totoaba (*Totoaba macdonaldi*). *Fish Physiol Biochem.* Vol. 41: 1117–1130.

Gamboa-Delgado J., Vay L. L., Fernández-Díaz C., Cañavate P., Ponce M., Zerolo R., Manchado M. (2011). Effect of different diets on proteolytic enzyme activity, trypsinogen gene expression and dietary carbon assimilation in Senegalese sole (*Solea senegalensis*) larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B.* Vol. 158:251–258.

García-Gasca A., Galaviz M. A., Gutiérrez J. N., García O. A. (2006). Development of the digestive tract, trypsin activity and gene expression in eggs and larvae of the bullseye puffer fish *Sphoeroides annulatus*. *Aquaculture.* Vol. 251: 366-376.

Gawlicka A., Leggiadro C. T., Gallart J. W., Douglas S. E. (2001). Cellular expression of the pepsinogen and gastric proton pump genes in the stomach of winter flounder as determined by in situ hybridization. *J. Fish Biol.* Vol. 58:529–536.

Ghosh S. K., Chakrabarti P. (2015). Histological and histochemical characterization on stomach of *Mystus cavasius* (Hamilton), *Oreochromis niloticus* (Linnaeus) and *Gudusia chapra* (Hamilton): Comparative study. *The Journal of Basic & Applied Zoology.* Vol. 70: 16–24. Doi:10.1016/j.jobaz.2015.04.002.

Ghosh S. K., Chakrabarti P. (2016). Comparative studies on histology and histochemistry of páncreas between *Labeo calbasu* (Hamilton, 1822) and *Mystus gulio* (Hamilton, 1822). *Iran. J. Ichthyol.* 3(4): 251–265. *Iranian Society of Ichthyology.* P-ISSN: 2383-1561; E-ISSN: 2383-0964.

Gisbert E., Gimenez G., Fernandez I., Kotzamanis Y., Estevez A. (2009). Development of digestive enzymes in common dentex *Dentex dentex* during early ontogeny. *Aquaculture*. Vol. 287. 381–387 pp.

Gisbert E., Morais S., Moyano F. J. (2013). Feeding and Digestion. In: Qin JG (ed) Larval fish aquaculture. Nova Publishers, New York. 73–124 pp.

Gisbert E., Piedrahita R. H., Conklinm D. E. (2004). Ontogenetic development of the digestive system in California halibut (*Paralichthys californicus*) with notes on feeding practices. *Aquaculture*. Vol. 232: 455-470.

Gisbert E., Williot P. (1997). Larval behaviour and effect of the timing of initial feeding on growth and survival of Siberian sturgeon (*Acipenser baeri*) larvae under small scale hatchery production. *Aquaculture*. Vol. 156. 63–76 pp.

Gómez-Ramírez E., Tovar Bohorquez M. O., Obando-Bulla M. J., Hurtado Giraldo H. (2010). Estudio Histológico del Tracto Digestivo del Pez *Ariopsis seemanni* (Ariidae). *Revista Facultad de Ciencias Básicas*, 6:2;216-225. ISSN 2500-5316. Doi: 10.18359/rfcb.2075.

Govoni J. J. (2004). The development of form and function in fishes and the question of larval adaptation. *Am. Fish. Soc. Symp.* Vol. 40: 1–5.

Günther A. (1867). On the fishes of the states of Central America, founded upon specimens collected in fresh and marine waters of various parts of that country by Messrs. Salvin, Godman and Capt. J. M. Dow. *Proc. Zool. Soc. London*. Vol. 1866(3): 600-604.

Hachero-Cruzado I., Ortiz-Delgado J. B., Borrega B., Herrera M., Navas J. I. Sarasquete C. (2009). Larval organogenesis of flatfish brill *Scophthalmus rhombus* L: Histological and histochemical aspects. *Aquaculture*. 286:138–149. Doi:10.1016/j.aquaculture.2008.09.039

Hansen A., Reutter K., Zeiske, E. (2002). Taste bud development in the zebrafish, *Danio rerio*. *Developmental Dynamics*. Vol. 223(4). 483–496 pp. Doi:10.1002/dvdy.10074.

Hansen T. W., Folkvord A., Grøtan E., Sæle Ø. (2013). Genetic ontogeny of pancreatic enzymes in *Labrus bergylta* larvae and the effect of feed type on enzyme activities and gene expression. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* Vol. 164. 176–184 pp.

Herrera M., Hachero-Cruzado I., Naranjo A., Mancera J. M. (2010). Organogenesis and histological development of the wedge sole *Dicologlossa cuneata* M. larva with special reference to the digestive system. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*. Vol. 20(4). 489–497. Doi: 10.1007/s11160-010-9161-y

Huseyn K., Hossein Z., Negin S., Abdolali M. (2015). Anatomy and histology of the stomach and pyloric caeca in Mugilidae, *Liza klunzingeri* (Day, 1888), from northeastern *Persian Gulf*. 3(6): 401-404.

Kageyama T. (2002). Pepsinogens, progastricsins, and prochymosins: structure, function, evolution and development. *Cell. Mol. Life Sci.* Vol. 59:288–306.

Khojasteh S. M., Sheikhzadeh F., Mohammadnejad D., Azami A. (2013). Histological, Histochemical and Ultrastructural Study of the Intestine of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *World Applied Sciences Journal*. Vol. 6(11): 1525-1531. ISSN 1818-4952

Kim K. H., Horn M. H., Sosa A. E., German D. P. (2014). Sequence and expression of an α -amylase gene in four related species of prickleback fishes (Teleostei: Stichaeidae): ontogenetic, dietary, and species-level effects. *J. Comp. Physiol. B. Biochem. Syst. Environ. Physiol.* 184, 221–234.

Lazo J. P., Darias M. J., Gisbert E. (2011). Ontogeny of the digestive tract. In: *Larval Fish Nutrition*. G.J. Holt (ed.), pp. 1-46. John Wiley & Sons, UK.

Lee Y. M., Lee J. H., Noh J. K., Kim H. C., Park C. J., Park J. W., Noh G. E., Kim K. K. (2015). Temporal expression analyses of pancreatic and gastric digestive enzymes during early development of the olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquaculture Research*. Vol. 48(3): 979–989. Doi:10.1111/are.12940

Lee Y. M., Lee J. H., Noh J. K., Kim H. C., Park C. J., Park J. W., Noh G. E. Kim K. K. (2017). Temporal expression analyses of pancreatic and gastric digestive enzymes during early development of the olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquaculture Research*. Vol 48. 979–989 pp. Doi:10.1111/are.12940

Leknes I. L. (2010). Histochemical study on the intestine goblet cells in cichlid and poecilid species (Teleostei). *Tissue and Cell*. Vol. 42(1), 61–64. Doi:10.1016/j.tice.2009.09.001.

Lévêque E., Janeček Š., Haye B., Belarbi A. (2000). Thermophilic archaeal amylolytic enzymes. *Enzyme and Microbial Technology*. Vol. 26(1): 3–14. Doi: 10.1016/s0141-0229(99)00142-8.

Livak K. J., Schmittgen T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- Δ CT method. *Methods*. Vol. 25: 402-408.

Lo M. J., Weng C. F. (2006). Developmental regulation of gastric pepsin and pancreatic serine protease in larvae of the euryhaline teleost, *Oreochromis mossambicus*. *Aquaculture*. Vol. 261(4): 1403–1412. Doi:10.1016/j.aquaculture.2006.09.016.

López-López V., Rodríguez M. O., Gustavo A., Galavíz M. A., Román Reyes, C., Medina-Hernández E. A., Dabrowski K., Haws M. C. (2015). Descripción histológica comparativa del desarrollo del sistema digestivo y visual de larvas de chame *Dormitator latifrons* (Pisces: Eleotridae). *Latin American Journal of Aquatic Research*. Vol. 43(3): 484-494. Doi: 10.3856/vol43-issue3-fulltext-10.

López-Ramírez G., Cuenca-Soria C. A., Álvarez-González C. A., Tovar-Ramírez D., Ortiz-Galindo J. L., Perales-García N., Márquez-Couturier G., Arias-Rodríguez L., Indy J. R.,

Contreras-Sánchez W. M., Gisbert E., Moyano F. J. (2011). Development of digestive enzymes in larvae of mayan cichlid *Cichlasoma urophthalmus*. *Fish Physiol Biochem*. Vol. 37:197–208.

Manríquez Santos T., Cruz Suárez L. E., Ricque Marie D., Tapia Salazar M., Nieto López M. G., Villarreal Cavazos D. A., Gamboa Delgado J., Hernández Hernández L. (2011). Caracterización de enzimas digestivas, digestibilidad in vitro y síntesis de ADNc del gen de tripsina en adultos de la pigua *Macrobrachium carcinus*. Avances en Nutrición Acuícola XI - Memorias del Décimo Primer Simposio Internacional de Nutrición Acuícola. Vol. 23-25. San Nicolás de los Garza, N. L., México. ISBN 978-607-433-775-4.

Martinez-Palacios C. A., Ross L. G. (2004). Post-hatching geotactic behaviour and substrate attachment in *Cichlasoma urophthalmus* (Gunther). *J. Appl. Ichthyol*. Vol. 20. 545–547 pp. Blackwell Verlag, Berlin. ISSN 0175–8659

Mata-Sotres J. A., Martos-Sitcha J. A., Astola A., Yúfera M. Martínez-Rodríguez G. (2016). Cloning and molecular ontogeny of digestive enzymes in fed and food-deprived developing gilthead seabream (*Sparus aurata*) larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B* 191 (2016) 53–65.

Meijide F. J., Guerrero G. A. (2000). Embryonic and larval development of a substrate brooding cichlid *Cichlasoma dimerus* (Heckel, 1840) under laboratory conditions. *J. Zool., Lond*. Vol. 252: 481 – 493.

Micale V., Garaffo M., Genovese L., Spedicato M. T., Muglia U. (2006). The ontogeny of the alimentary tract during larval development in common pandora *Pagellus erythrinus* L. *Aquaculture* Vol. 251(2-4): 354–365. Doi:10.1016/j.aquaculture.2005.05.048.

Minghetti M., Drieschner C., Bramaz N. Schug H., Schirmer K. (2017). A fish intestinal epithelial barrier model established from the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) cell line, RTgutGC. *Cell Biol Toxicol*. Vol. 33: 539. Doi.org/10.1007/s10565-017-9385-x.

Moguel Hernández I., Peña R., Andree K.B., Tovar Ramírez D., Bonacic K., Dumas S., Gisbert E. (2016). Ontogeny changes and weaning effects in gene expression patterns of digestive enzymes and regulatory digestive factors in spotted rose snapper (*Lutjanus guttatus*) larvae. *Fish Physiol Biochem*. Doi: 10.1007/s10695-016-0220-8.

Molina A. (2008). Desarrollo Larval de *Amphilophus rostratus* (Gill 1877) (Pises: Cichlidae) cultivados en laboratorio. Informe, Estación Piscícola. Brenesia. Vol. 70:47-52.

Molina A. (2010). Desarrollo Larval de *Amphilophus alfari* (Meek 1907) (Pisces: Cichlidae) cultivados en laboratorio. Brenesia. Vol. 73-74: 103-107.

Morrison C. M., Miyake T., Wright J. R. (2001). Histological study of the development of the embryo and early larva of *Oreochromis niloticus* (Pisces: Cichlidae). *Journal of Morphology*. Vol. 247(2), 172–195. Doi:10.1002/1097-4687(200102)247:2<172::aid-jmor1011>3.0.co;2-h.

Morrison C. M., Wright J. R. (1999). A study of the histology of the digestive tract of the Nile tilapia. *Journal of Fish Biology*. Vol. 54(3): 597–606 pp. Doi:10.1111/j.1095-8649.1999.tb00638.x.

Moyano F. J., Barros A. M., Prieto A., Cañabate J. P. Cárdenas S. (2005). Evaluación de la ontogenia de enzimas digestivas en larvas de hurta, *Pagrus auriga*. *AquaTIC*. Vol. 22. 39-47.

Murashita K., Matsunari H., Kumon K., Tanaka Y., Shiozawa S., Furuita H., Oku H., Yamamoto T. (2014). Characterization and ontogenetic development of digestive enzymes in Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis* larvae. *Fish Physiol. Biochem*. Vol. 40: 1741–1755.

Murray H. M., Gallant J. W., Johnson S. C., Douglas S. E. (2006). Cloning and expression analysis of three digestive enzymes from Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) during early development: Predicting gastrointestinal functionality. *Aquaculture*. Doi:10.1016/j.aquaculture.2005.03.030.

Ortiz Cruz V. M. (2001). Análisis del crecimiento y madurez sexual de *Cichlasoma trimaculatum* (Günther, 1867) de la subcuenca río Atoyac-paso de la reina de la cuenca río Atoyac, Oaxaca. Tesis de maestría, 87 pp. Centro interdisciplinario de investigación. IPN. Santa Cruz Xoxocotlán, Oaxaca.

Parma L., Bonaldo A., Massi P., Yúfera M., Martínez-Rodríguez G., Gatta P.P. (2013). Different early weaning protocols in common sole (*Solea solea* L.) larvae: implications on the performance and molecular ontogeny of digestive enzyme precursors. *Aquaculture*. Vol. 415:26-35

Řičan O., Piálek L., Dragová K., Novák J. (2016). Diversity and evolution of the Middle American cichlid fishes (Teleostei: Cichlidae) with revised classification. *Vertebrate Zoology*. Vol. 66(1):1-102.

Rønnestad I., Yúfera M., Ueberschär B., Ribeiro L., Sæle Ø., Boglione C. (2013). Feeding behaviour and digestive physiology in larval fish: current knowledge, and gaps and bottlenecks in research. *Rev. Aquacult.* Vol. 5 (Suppl. 1), S59–S98.

Sanz F., Zamora S., Rubio V., Cerda M., Yúfera M., Martínez F., Borja A. (2009). La nutrición y alimentación en piscicultura. Fundación Observatorio Español De Acuicultura. Editorial Paraninfo. 803 pp. ISBN 8484766322, 9788484766322.

Shahriari Moghadam M., Abtahi B., Rezaei S., Rahdari A., (2014). Early ontogenetic development of digestive system in *Schizothorax zarudnyi* Nikolskii, 1897 (Actinopterygii: Cyprinidae) larvae, *Italian Journal of Zoology*. Vol. 81:2, 194-203. Doi: 10.1080/11250003.2014.903304.

Srivastava A. S., Kurokawa T., Suzuki T. (2002). mRNA expression of pancreatic enzyme precursors and estimation of protein digestibility in first feeding larvae of the Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*. Vol. 132:629–635.

Sundell K., Jutfelt F., Augustsson T., Olsen R. E., Sandblom E., Hansen T., Björnsson B. (2003). Intestinal transport mechanisms and plasma cortisol levels during normal and out of season parr-smolt transformation of Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Aquaculture*. Vol. 222. 265-285.

Toledo-Solís F. J., Uscanga-Martínez A., Guerrero-Zárate R., Márquez-Couturier G., Martínez-García R., Camarillo-Coop S., Perales-García N., Rodríguez-Valencia W., Gómez-Gómez M. A., Álvarez-González C. A. (2015). Changes on digestive enzymes during initial ontogeny in the three-spot cichlid *Cichlasoma trimaculatum*. *Fish Physiol Biochem*. Vol. 41:267-279.

Toledo-Solís F. J., Márquez-Couturier G., Uscanga-Martínez A., Guerrero-Zárate R., Perales-García N., Martínez-García R., Álvarez-González C. A. (2016). Partial characterization of digestive proteases of the three-spot cichlid *Cichlasoma trimaculatum* (Günther 1867). *Aquac Nutr*. Vol. 22:1230-1238.

Treviño L., Álvarez-González C. A., Perales-García N., Arévalo-Galán L., Uscanga-Martínez A., Márquez-Couturier G., Fernández I., Gisbert E. (2011). A histological study of the organogenesis of the digestive system in bay snook *Petenia splendida* Günther, 1862 from hatching to the juvenile stage. *J. Appl. Ichthyol*. Vol. 27:73-82.

Uscanga-Martínez A., Perales-García N., Álvarez-González C. A., Moyano F.J., Tovar-Ramírez D., Gisbert G. E., Márquez-Couturier G., Contreras-Sánchez W. M., Arias-Rodríguez L., Indy J. R. (2011). Changes in digestive enzyme activity during initial ontogeny of bay snook *Petenia splendida*. *Fish Physiol Biochem*. Vol. 37:667-680.

Violante G. J. (1995). Contribución al conocimiento de la biología de la mojarra nativa *Cichlasoma trimaculatum* (Gunter, 1868), en la laguna de Tres Palos Guerrero, México, y determinación del desarrollo larvario y requerimientos proteicos en condiciones de laboratorio. Tesis de maestría, pp. 70. Facultad de ciencias marinas, Universidad de Colima, Manzanillo, Colima, México.

Wootton R. J. (1990). Ecology of teleost fishes. Chapman and Hall, Londres, Inglaterra. 404 pp.

Xie P., Xiao D., Chen L. Xu B. Zhang F. (2012). miRDeepFinder: a miRNA analysis tool for deep sequencing of plant small RNAs. *Plant molecular biology*. Vol. 80 (1). 75-84 pp.

Yúfera M., Moyano F. J., Martínez-Rodríguez G. (2018). The Digestive Function in Developing Fish Larvae and Fry. From Molecular Gene Expression to Enzymatic Activity. In: Yúfera M. (eds) *Emerging Issues in Fish Larvae Research*. Springer, Cham, 51-86 pp.

Zambonino Infante J. L., Gisbert E., Sarasquete C., Navarro I., Gutiérrez J., Cahu C. L. (2008). Ontogeny and physiology of the digestive system of marine fish larvae. *Journal of fish biology*. Vol. 75. 756-773. Doi 10.1111/j.1095-8649.2009.02318_2.x.

Zavala I. (2011). Chemical characterization of vitelline reserves consumption in teleost fish of indirect ontogeny. REDVET. *Revista electrónica de Veterinaria* 1695-7504. Vol. 12: 3.

Zhong G., Qian X., Hua X., Zhou H. (2011). Effects of feeding with corn gluten meal on trypsin activity and mRNA expression in *Fugu obscurus*. *Fish Physiol Biochem*. Vol. 37:453-460.

7.2.- Capítulo II. Requerimiento de proteína y lípidos en larvas de la mojarra tahuina (*Amphilophus trimaculatus*)

Toledo-Solís F.J.^{1,2}, Saenz de Rodrigáñez M.², Álvarez-González C.A.¹, Martínez-García R.¹, Hilerio-Ruiz A.G.¹, Galaviz M.A.³, Moyano F.J.⁴

¹Laboratorio de Acuicultura Tropical, División Académica de Ciencias Biológicas, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, 0.5 km Carretera Villahermosa-Cárdenas, C.P. 86039 Villahermosa, TAB, Mexico.

²Centro de Investigaciones Costeras, Instituto de Ciencias Biológicas, Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas, Calle Juan José Calzada y Av. Prolongación Calzada de Guadalupe, Colonia Evolución, C.P. 30500, Tonalá, Chiapas, Mexico

³Facultad de Ciencias Marinas, Universidad Autónoma de Baja California (UABC), PO Box 76, 22860 Ensenada B.C., Mexico

⁴Universidad de Almería, CEIMAR, Dept. Biología Aplicada, Escuela Politécnica Superior. Edificio CITE II-B, Campus universitario de la Cañada, 04120 Almería, Spain.

7.2.1.- RESUMEN

En la formulación y elaboración de los alimentos de las especies nativas con potencial acuícola, es necesario determinar los requerimientos nutricionales en cada etapa de cultivo. En este aspecto, se determinó el requerimiento de proteína y lípidos en larvas de mojarra tahuina (*Amphilophus trimaculatus* = *Cichlasoma trimaculatum*) mediante un diseño experimental bifactorial aleatorizado 4 x 2 de proteína (35, 40, 45, y 50%) y lípidos (16 y 22%) respectivamente. El experimento se realizó en un sistema de recirculación por triplicado durante 60 días, sembrándose 30 peces por replica de un peso húmedo de 0.16 ± 0.02 g. En la evaluación del crecimiento se aplicaron los diferentes índices de crecimiento y de eficiencia del alimento, los análisis de actividad de las enzimas digestivas, así como la evaluación de los análisis químicos proximales en los peces al final del experimento, haciendo uso de los análisis multivariantes para su interpretación. Se encontró que las larvas de *A. trimaculatus* tienen

requerimientos nutricionales próximos a 45% de proteína y 22% de lípidos, con estos porcentajes en la alimentación se registró un mejor crecimiento e índices de eficiencias del alimento. La inclusión de los elevados contenidos de lípidos en los alimentos genera mayor aprovechamiento de las proteínas y mejora la supervivencia en las larvas. Asimismo, las actividades de las enzimas digestivas en las larvas indican las condiciones nutricionales que presentan los organismos, por la influenciada de los distintos porcentajes de inclusión de las proteínas y los lípidos en los alimentos.

Keywords: Actividad enzimática, *A. trimaculatus*, Larvas, Proteínas, Lípidos.

7.2.2.- INTRODUCCIÓN

En México se cultivan 34 especies de peces de agua dulce, de las cuales solo seis son especies nativas y el resto introducidas (DOF 2013; Davila-Camacho *et al.*, 2018), por lo que su cultivo puede promover el desarrollo económico regional y la conservación de la ictiofauna local. Sin embargo, el cultivo de especies nativas no es fácil y la selección de la especie es importante para tener éxito en la producción, por lo que es necesario escoger especies de rápido crecimiento, alto valor comercial, demanda creciente en los mercados (Álvarez-Lajonchère *et al.*, 2011); y de condiciones biológicas dóciles para manejo en cautiverio. Atendiendo a ello, la mojarra tahuina (*Cichlasoma trimaculatum*, Günther, 1867) ó nombrada recientemente por Řičan *et al.*, (2016) como *Amphilophus trimaculatus* (Günther, 1867); cumple con muchos de los criterios de selección (Yáñez-Arancibia, 1978; Violante, 1995). Esta es una especie eurihalina que se distribuye en la costa del Pacífico Sur de México y es de hábitos omnívoro con tendencia a la carnivoría (Miller *et al.*, 2005). En cultivo se ha logrado la reproducción (Uscanga-Martínez *et al.*, 2015), el larvicultivo y la pre-engorda de juveniles para estudios de la fisiología digestiva (Toledo-Solís *et al.*, 2015, 2016). Sin embargo, la falta de información en aspectos biológicos en las distintas etapas del cultivo, siguen siendo un limitante del cultivo a nivel experimental y piloto comercial de esta especie y del resto de especies nativas (Ross *et al.*, 2008). En este aspecto, los costos por alimentación representan alrededor del 50% de los costos totales de los cultivos (Kissil *et al.*, 1997; Bowyer *et al.*, 2013); siendo la proteína y los lípidos

los nutrientes más caros en su elaboración. Es por ello, que en el desarrollo de los paquetes tecnológicos de cultivo para nuevas especies, deben considerar la elaboración de los alimentos de acuerdo sus requerimientos nutricionales, en cada etapa de desarrollo, los cuales se formulan con el fin de promover un mejor crecimiento y alcanzar las tallas comerciales en menos tiempo (McGoogan and Gatlin, 2000).

Por otra parte, la etapa larvaria es considerada el cuello de botella en el desarrollo del cultivo de algunas especies por las distintas dificultades que se presentan (Gisbert *et al.*, 2009; Olivotto *et al.*, 2011; Galaviz *et al.*, 2015). Lo que implica la necesidad de alimentos de alta calidad que requieren una gran cantidad de proteínas, particularmente para lograr una elevada formación de tejidos y acelerar las tasas de crecimiento (NRC, 2011; Kumar *et al.*, 2018). Es así que la proteína, además de aportar los aminoácidos esenciales en el crecimiento; sin embargo, pueden ser utilizadas para fines energéticos cuando se suministran en cantidades inadecuadas (exceso o deficiencia) (Chatzifotis *et al.*, 2012; Wu and Gatlin, 2014). De forma paralela, los lípidos representan la principal fuente de energía y de ácidos grasos esenciales, particularmente en peces carnívoros, y están implicados en la conformación de las membranas celulares (fosfolípidos), por lo que si se presenta alguna deficiencia, puede afectarse el desarrollo embrionario y crecimiento de la larva (Hamre *et al.*, 2013; Tocher, 2010; Xu *et al.*, 2018). Por lo tanto, es fundamental determinar el requerimiento óptimo de proteína y lípidos, con lo que se mejora el crecimiento y la calidad de las larvas para las próximas etapas de cultivos (Saavedra *et al.*, 2006; Lazo *et al.*, 2007; Novelli *et al.*, 2016). En este contexto, la determinación de los requerimientos de algún nutriente, permite modificar el nivel de inclusión en la dieta (dosis-respuesta). Sin embargo, en contextos metabólicos, estos nutrientes están relacionados con la fisiología y metabolismo celular y que se reflejará en un mejor crecimiento y supervivencia. En este caso, los diseños experimentales multifactoriales ayudan en la medida de lo posible a entender las interacciones y poder hacer más eficiente el aprovechamiento de los nutrientes en los alimentos (Wang *et al.*, 2013; Amin *et al.*, 2014). Este tipo de estudios se ha realizado en larvas de *Dentex dentex* (Espinós *et al.*, 2003), *Seriola dumerili* (Takakuwa *et al.*, 2006) y en híbridos de *Channa maculata* ♀ × *Channa argus* ♂ (Zhang *et al.*, 2017) encontrando un mejor aprovechamiento de la proteína con la variación de los niveles de inclusión de los lípidos en los alimentos.

De esta manera, los niveles de inclusión de los nutrientes en las dietas no solo deben mejorar el crecimiento, sino tomar en cuenta la capacidad digestiva de los organismos para un mejor aprovechamiento de los alimentos, así como generar conocimiento sobre la capacidad digestiva durante los distintos estadios de desarrollo, por lo que se han utilizado diversas técnicas como son las histológicas, histoquímicas, moleculares y bioquímicas para entender la fisiología de las especies en estudio (Lazo *et al.*, 2007; Galaviz *et al.*, 2015). Si bien el utilizar únicamente una de las herramientas como los análisis bioquímicos, estos solo reflejan es una parte del proceso de digestión. Sin embargo, la determinación de la actividad de las enzimas digestivas ha sido la forma más popular de estimar la capacidad digestiva (Yúfera *et al.*, 2018). Estas han sido utilizadas ampliamente como indicadores de la madures del sistema digestivo en la etapa larvaria y en estudios de adaptación a la alimentación exógena, con el fin optimizar los protocolos de alimentación en la etapa larvaria (Zambonino-Infante y Cahu, 2001; Zambonino-Infante *et al.*, 2008; Gisber *et al.*, 2009; Suzer *et al.*, 2013). También se han utilizado como posibles indicadores de las condiciones nutricionales en las distintas etapas de crecimiento y la influencia a los cambios de alimentación como en *Maja brachydactyla* (Rotllant *et al.*, 2010) y en *Hippocampus reidi* (Novelli *et al.*, 2016). Sin embargo, los estudios de requerimientos nutricionales (proteína y lípidos), no se suele evaluar el grado de influencia que pueden tener los niveles de inclusión de los nutrientes en las dietas, sobre la expresión molecular y la actividad enzimática para tomarse como criterios del estado nutricional de los peces que generen los nutrientes o los alimentos suministrados. Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo es determinar en la etapa larvaria de *A. trimaculatus*, el requerimiento nutricional de proteínas y lípidos mediante un diseño experimental bifactorial, utilizando los análisis de las enzimas digestivas para la evaluación y ser utilizados como indicadores nutricionales de los nutrientes proteicos y lipídicos. Dichos resultados aportan información necesaria en la formulación de los alimentos de esta especie nativa, además de ser utilizadas como indicadores nutricionales.

7.2.3.- MATERIAL Y MÉTODOS

7.2.3.1.- Obtención de larvas y sistema de recirculación

Las larvas de *A. trimaculatus* se obtuvieron del lote de reproductores del Laboratorio de Nutrición y Producción Acuícola del Centro de Investigaciones Costeras de la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas (UNICACH). Los reproductores se alimentaron a saciedad aparente con alimento comercial Silver Cup® Pedregal (32% de proteína y 5% de lípidos) tres veces al día, la temperatura del sistema se mantuvo a 28 °C en fotoperiodo natural hasta conseguir desove natural. Obtenida la puesta y cuando las larvas obtuvieron el nadado libre, se trasladaron a un sistema de recirculación con tanques de fibra de vidrio circulares con capacidad de 180 L, los cuales están conectados a una bomba de recirculación tipo Jacuzzi 2 hp, filtros de arena sílica, sistema de UV y un biofiltro. En este sistema, se les dio talla a los individuos alimentándolos con Silver Cup® Pedregal (45% de proteína y 16% de lípidos) tres veces al día. El experimento se corrió en este mismo sistema, midiéndose a diario (10:00 hrs) los parámetros fisicoquímicos. Los cuales, mantuvieron durante el bioensayo a una temperatura de 31.64 ± 0.76 °C, oxígeno disuelto en 6.19 ± 0.47 mg/L y el pH en 6.73 ± 0.46 . Las mediciones se realizaron con un multiparametro YSI® modelo profesional. El nivel de nitrito resultó en 0.00 mg/L, los nitratos en 61.18 ± 20.27 mg/L y el amonio en 0.21 ± 0.10 mg/L; los cuales se midieron con los kits API® Aquarium Pharmaceuticals producto de catálogo #26, #LR1800 y #LR8600 respectivamente.

7.2.3.2.- Diseño experimental

Se realizó un diseño bifactorial aleatorizado (4 x 2) con 35, 40, 45, y 50% de proteína y con 16 y 22% de lípidos; obteniéndose un total de ocho alimentos que se probaron por triplicado durante 60 días. El experimento se realizó en un sistema de recirculación, sembrándose 30 peces por replica (720 larvas en total) de un peso húmedo de 0.16 ± 0.02 g.

7.2.3.3.- Formulación y preparación de dietas

La formulación y la composición proximal de las dietas semi-purificadas se muestran en la Tabla 1. Las dietas experimentales se formularon con el software MIXIT-WIN V.5 (Agricultural Software Consultants Inc., San Diego, CA, USA) usando como fuentes principales de proteína caseína y harina de pescado, mientras que las lipídicas fueron aceite de pescado y lecitina de

soya. Todos los ingredientes secos y molidos en polvo fino, se pesaron y mezclaron mediante una batidora Blazer® mixer B10C durante 30 min. Posteriormente se adicionaron los aceites y el agua destilada para formar una masa blanda, la cual se pasó por un peletizador TORO-REY® (molino para carne). Los gránulos o pellets obtenidos se secaron a 45°C en un horno TERLAB® BTC-9100 por un periodo de 48 hrs. Después se molieron y tamizaron en 0.5, 1.0, 1.5 mm para ajustar la partícula del alimento al tamaño de la boca de los animales, y por último se almacenaron en bolsas de plásticos a 4°C hasta su posterior uso.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

Tabla 1: Ingredientes y composición proximal de las dietas semi-purificadas para el requerimiento de proteínas y lípidos en larvas de *A. trimaculatus*.

Lípido (%)	L16				L22			
Proteína (%)	P35	P40	P45	P50	P35	P40	P45	P50
Caseína ¹	29.6	36.1	42.6	49.1	29.6	36.1	42.6	49.1
Harina de sorgo ²	42.8	36.1	29.4	22.7	32.8	26.1	19.4	12.7
Aceite de pescado ³	7.5	7.7	7.8	8.0	15.0	15.2	15.3	15.5
Lecitina de soya ⁴	2.5	2.6	2.6	2.7	5.0	5.1	5.1	5.2
Harina de pescado ³	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
Grenetina ⁵	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
L-lisina HCl ⁶	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
L-metionina HCl ⁷	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Premezcla de vitaminas y minerales ⁸	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5
Vitamina C ⁸	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Betaína ⁹	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004
Análisis proximales en composición seca (g . 100 g dry matter)								
Proteína	36.4	41.9	45.6	50.8	36.2	42.0	46.2	49.5
Lípido	16.2	17.3	17.0	15.9	22.0	22.3	21.7	21.6
Cenizas	10.4	10.3	9.1	9.3	7.3	7.4	7.5	6.9
ELN ¹⁰	37.0	30.5	28.3	24.0	34.5	28.3	24.6	22.0

¹Grupo Lamesa, México D.F., México; ²Pedregal, Toluca, Edo. Mex., ³Proteínas Marinas y Agropecuarias, Guadalajara, Jalisco, México; ⁴Productos Realeza, México D.F., México; ⁵Pilsac, Villahermosa, Tabasco; ⁶Sigma-Aldrich # catalogo L5626; ⁷Sigma-Aldrich # catalogo M9625; ⁸Rovimix® para peces tropicales Guadalajara, Jalisco, México; ⁹Sigma-Aldrich # catalogo L3501; ¹⁰Extracto libre de nitrógeno.

7.2.3.4.- Alimentación y biometría

Durante el experimento las larvas se alimentaron de acuerdo a un porcentaje de la biomasa total y las biometrías se realizaron cada 15 días. El ajuste del porcentaje alimentación se realizó posterior a cada biometría, en donde inicialmente se alimentó con un 20% de la biomasa, en la segunda biometría se ajustó a un 15%, posteriormente se alimentó en un 13% y los últimos 15

días se alimentó con un 10%. La cantidad de alimento diario a suministrar se dividió en tres raciones, proporcionándose a las 08:00, 13:00 y 18:00 hrs. Para realizar la biometría, las larvas se pesaron (peso húmedo) en una balanza DENVER® TP-323.

7.2.3.5.- Índices de crecimiento

Los índices zootécnicos que se midieron en este bioensayo son: la tasa de crecimiento absoluta (SGR) = $[(\ln \text{ peso final} - \ln \text{ peso inicial}) / \text{días}] \times 100$; la ganancia en peso (GP) = $[(\text{Peso final} - \text{peso inicial}) / \text{peso inicial}] \times 100$; el factor de conversión alimenticia (FCR) = $\text{Alimento ingerido (g)} / \text{peso ganado (g)}$; la tasa de eficiencia proteica (PER) = $\text{Peso ganado (g)} / \text{proteína ingerida (g)}$; la tasa de eficiencia lipídica (LER) = $\text{Peso ganado (g)} / \text{Lípidos ingeridos (g)}$ y la supervivencia (%) = $(\text{Numero de peces finales} / \text{Numero de peces iniciales}) \times 100$.

7.2.3.6.- Toma de muestra para análisis

Todos los peces utilizados para la obtención de las muestras se sacrificaron por medio de shock térmico. Al finalizar el bioensayo de cada unidad experimental se muestrearon seis individuos para extraer completamente el sistema digestivo, pesándose el estómago e intestino por separado realizando todo el procedimiento en frío. Una vez obtenidas las muestras, estas se conservaron a -20°C hasta realizar los análisis bioquímicos. En el caso de los análisis químicos proximales se tomaron 12 individuos, se liofilizaron y molieron hasta homogenizar la partícula (polvo) conservándose a 4 °C hasta su posterior análisis. Paralelamente las muestras de los alimentos consistieron en 30 g de cada dieta, moliéndose en polvo y conservándose a 4 °C hasta su posterior análisis.

7.2.3.7.- Análisis bioquímicos

Las muestras de estómago e intestino se homogenizaron en frío en una proporción de 200 mg/ml, en buffer glicina-HCl 100 mM L⁻¹ pH 2 y buffer tris-HCl 30 mM L⁻¹ + CaCl₂ 12.5 mM L⁻¹ pH 7.5 respectivamente. El homogenizado se centrifugó a 16 000g por 30 min a 4 °C y se extrajo el extracto multienzimático, el cual se almacenó a -20 °C hasta realizarse los análisis bioquímicos. La concentración de proteína soluble en los extractos multienzimáticos se realizó mediante la técnica de Bradford, (1976), usando albúmina bovina sérica como estándar. La

actividad proteasas ácidas se midió usando la técnica de Anson, (1938), con hemoglobina al 1% como sustrato, en una solución glicina-HCl 100 mM L⁻¹ pH 2.0. La actividad proteasas alcalinas se medió con la técnica descrita por Kunitz, (1947) modificada por Walter, (1984), usando como sustrato caseína al 1% en solución tris-HCl 100 mM L⁻¹ + CaCl₂ 20 mM L⁻¹ pH 9.0. La actividad tripsina se midió con la técnica de Erlanger *et al.*, (1961) usando como sustrato BAPNA (N- α -benzoyl-DL-arginine p-nitroanilide) al 3.5 mM L⁻¹, en solución de tris-HCl 100 mM L⁻¹ + CaCl₂ 10 mM L⁻¹ pH 8. La actividad quimotripsina se midió por la técnica de DelMar *et al.*, (1979) usando como sustrato SAAPNA (N-succinyl-ala-ala-pro-phe p-nitroanilide) al 0.1 mM L⁻¹ en solución tris-HCl 100 mM L⁻¹ + CaCl₂ 10 mM L⁻¹ pH 7.8. La actividad leucina-aminopeptidasa se midió con la técnica descrita por Maraux *et al.*, (1973), usando como sustrato leucina p-nitroanilida al 1 mM L⁻¹, en solución fosfato sódico monobásico 50 mM L⁻¹ pH 7.2. La actividad de lipasa se medió con la técnica descrita por Versaw *et al.*, (1989), usando como sustrato β -naftil caprilato a 100 mM L⁻¹. La actividad α -amilasa se midió usando la técnica de Somoyi-Nelson descrito por Robyt y Whelan, (1968) usando como sustrato almidón al 2% en solución fosfato de sodio y citrato de sodio 100 mM L⁻¹ + NaCl 50 mM L⁻¹ pH 7.5. La actividad fosfatasa alcalina se midieron de acuerdo a la técnica de Bergmeyer, (1974), usando como sustrato 4-nitrofenilfosfato 2% en solución glicina-NaOH 100 mM L⁻¹ a pH 10.1. Todas las actividades de los extractos se expresaron empleando las siguientes ecuaciones: 1) Unidad por ml = (Δ 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.

7.2.3.8.- Análisis proximales

Los análisis químicos proximales se realizaron en la Facultad de Ciencias Marinas de la Universidad Autónoma de Baja California (UABC), de acuerdo a las metodologías establecidas por la AOAC, (2005). Los niveles de proteína se determinaron con ayuda de un destilador Kjeldahl semiautomática VELP® científica UDK 139. En el caso de la extracción de lípidos totales se utilizó éter de petróleo y el equipo FOSS® SOXTEC ST 243. Para la humedad se utilizó una estufa de flujo laminar Taisite labsciences® WGL-65B y en cenizas se utilizó la mufla Ecoshel® ECO-7L. El extracto libre de nitrógeno se consideró como la diferencia del total de la ración analizada.

7.2.3.9.- Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos se realizaron en el software STATISTICA V.8 (StatSoft, Tulsa, OK, USA) usando un nivel de significancia de $p < 0.05$ en todas las pruebas. Los análisis que cumplieron con los postulados de normalidad y homocedasticidad se les aplicó la prueba estadística de ANOVA; cuando existió diferencia significativa se aplicó la prueba de Scheffe para encontrar diferencia entre los tratamientos. En los índices zootécnicos se aplicó la prueba estadística de Kruskal-Wallis y la prueba posteriori de Nemenyi. El análisis de conglomerados (cluster) y de componentes principales se utilizó el software STATGRAPHICS Centurión XVI. En la actividad de las enzimas digestivas en las larvas se aplicó un análisis multivariado por conglomerados (promedio de las variables por grupo) seleccionando el método del vecino más cercano, en donde el número de conglomerados se generó aleatoriamente por el software. La actividad de cada enzima se consideró una variable diferente, y luego, la similitud del perfil enzimático de las larvas alimentadas en cada dieta se analizó en conjunto con todas las variables. Las cuales se ocuparon para realizar el análisis de componentes principales.

7.2.4.- RESULTADOS

7.2.4.1.- Crecimiento e índices de eficiencia

Las larvas de *A. trimaculatus* aceptaron con facilidad todos los alimentos e incrementaron en más de 20 veces el peso inicial al finalizar el experimento; lográndose una supervivencia mayor del 85% en los distintos tratamientos. Los mejores pesos húmedos de las larvas se consiguieron con el suministro de los alimentos que contenían 22% de lípidos, observándose también un incremento en el crecimiento con el aumento (45 y 50%) de la proteína (Fig. 1).

2D Graph 1

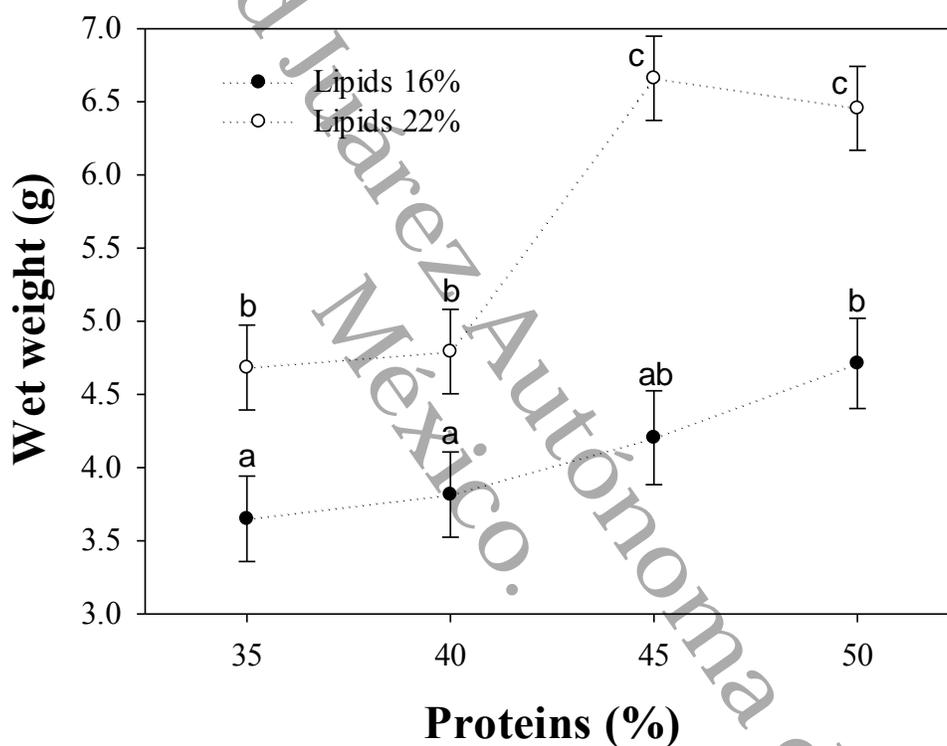


Figura 1. Interacción del crecimiento en peso húmedo (Media \pm Error estándar) de larvas de *A. trimaculatus* con los diferentes niveles de proteína y lípidos. Letras minúsculas indican diferencias significativas entre las dietas ($n=3$, $p<0.05$).

Los resultados de los índices de crecimiento y la utilidad del alimento se resumen en la tabla 2, donde se observa una influencia significativa ($p<0.05$) del nivel de proteína, presentado un mayor crecimiento y eficacia del uso de alimento independientemente del nivel de lípidos al aumentar la cantidad de proteína. De igual forma, esto se observó en el nivel de lípidos, en donde

un nivel más elevado de este nutriente se produce los mismos efectos independientemente del nivel proteico. Al considerar conjuntamente ambos nutrientes resultó evidente que la combinación de elevada de proteína (45-50%) y de lípidos (22%) determinaron los mejores resultados. Los cuales, representan entre un 30 y 40% en mejora en el índice SGR, y entre un 20 y 40% en el FCR con respecto al resto de los tratamientos.

Tabla 2. Índices de crecimiento en larvas de *A. trimaculatus* alimentas con dietas semi-purificadas en distintos porcentajes de proteínas y lípidos (Media \pm D.S, n=3, p<0.05).

DIETS	¹ SGR (%/day)	² WG (%)	³ FCR	⁴ Survival (%)
P35	5.25 \pm 0.15 ^a	2246.5 \pm 276.6 ^a	1.85 \pm 0.05 ^a	96 ^{ab}
P40	5.32 \pm 0.06 ^a	2336.6 \pm 85.3 ^a	1.78 \pm 0.03 ^a	98 ^c
P45	5.86 \pm 0.08 ^b	3418.2 \pm 282.8 ^b	1.60 \pm 0.11 ^b	92 ^a
P50	5.93 \pm 0.09 ^b	3460.7 \pm 284.3 ^b	1.53 \pm 0.08 ^b	95 ^{ab}
L16	5.33 \pm 0.07 ^a	2368.5 \pm 100.0 ^a	1.81 \pm 0.05 ^a	92 ^a
L22	5.85 \pm 0.12 ^b	3362.5 \pm 364.4 ^b	1.57 \pm 0.09 ^b	98 ^b
P35-L16	5.10 \pm 0.11 ^a	2037.2 \pm 135.8 ^a	1.90 \pm 0.02 ^a	95 ^{bc}
P40-L16	5.17 \pm 0.10 ^a	2132.2 \pm 132.8 ^a	1.78 \pm 0.01 ^a	98 ^{bc}
P45-L16	5.38 \pm 0.02 ^a	2425.6 \pm 34.7 ^a	1.88 \pm 0.12 ^a	85 ^a
P50-L16	5.66 \pm 0.05 ^{ab}	2878.9 \pm 96.8 ^{ab}	1.68 \pm 0.05 ^{ab}	90 ^{ab}
P35-L22	5.39 \pm 0.19 ^a	2455.8 \pm 417.3 ^a	1.80 \pm 0.09 ^a	97 ^{bc}
P40-L22	5.46 \pm 0.02 ^a	2541.1 \pm 37.7 ^a	1.78 \pm 0.05 ^a	98 ^{bc}
P45-L22	6.34 \pm 0.14 ^c	4410.7 \pm 531.0 ^c	1.31 \pm 0.10 ^c	98 ^{bc}
P50-L22	6.20 \pm 0.13 ^{bc}	4042.5 \pm 471.8 ^{bc}	1.38 \pm 0.12 ^{bc}	100 ^c

¹SGR = Specific growth rate (%/day): [(ln final weight – ln initial body weight) / days] x 100. ²WG = Weight gain (%): [(final body weight – initial body weight) / (Initial mean weight)] x 100. ³FCR = Feed conversion ratio: (feed intake, g dry matter) / (fish weight gain, g). ⁴Survival (%): (final fish number / initial fish number) x 100. P=Proteins; L=Lipids; Lowercase letters in the columns indicate significant differences between treatments.

Los índices de eficiencia proteica y de eficiencia lipídica de las larvas de los tratamientos se muestra en la figura 2, donde las tasas de eficiencia proteica (PER) mostraron valores más altos en las dietas que contenían 22% de lípidos y la mayor eficiencia de proteína se encontró en la dieta P45-L22 encontrándose claramente una diferencia significativa ($p < 0.05$) con las dietas de 16% de lípidos. El índice de eficiencia lipídica va de 2.24 a 3.62 siendo más altas en las dietas

2D Graph 3

con
mej
P50

eta. El
mentos

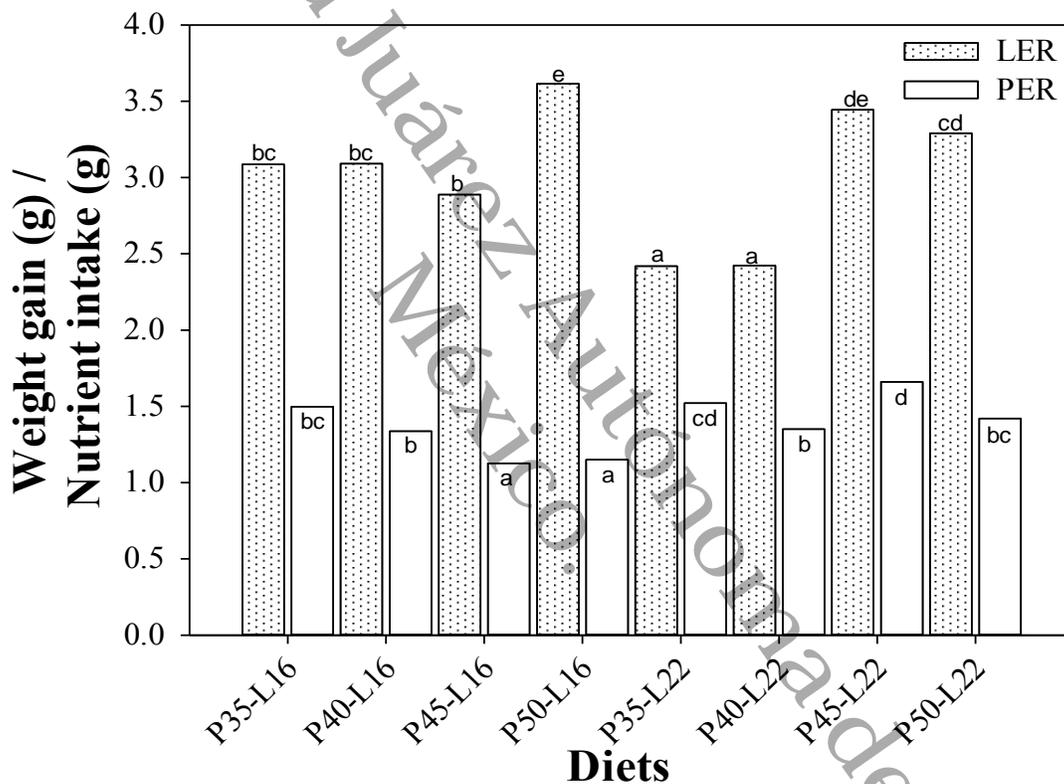


Figura 2. Índices de crecimiento (Media \pm Error estándar) de larvas de *A. trimaculatus* alimentadas con las dietas semi-purificadas con distintos porcentajes de proteínas y lípidos. LER = Lipids efficiency ratio: (fish wet weight gain, g) / (lipids intake, g). PER = Protein efficiency ratio: (fish wet weight gain, g) / (protein intake, g). P = Proteins; L = Lipids; Letras minúsculas en las columnas indican diferencias significativas entre tratamientos ($n=3$, $p < 0.05$).

7.2.4.2.- Análisis de la composición proximal

La composición proximal en materia seca del cuerpo de las larvas alimentadas con los distintos piensos experimentales se detalla en la figura 3. En donde se observa que el valor del contenido promedio de proteína es aproximadamente del 52% y de lípidos del 37%. En el caso, de las cenizas oscila alrededor del 8% y del ELN se considera aproximadamente el 1%. En todos los

(2D Graph 2 l de las]

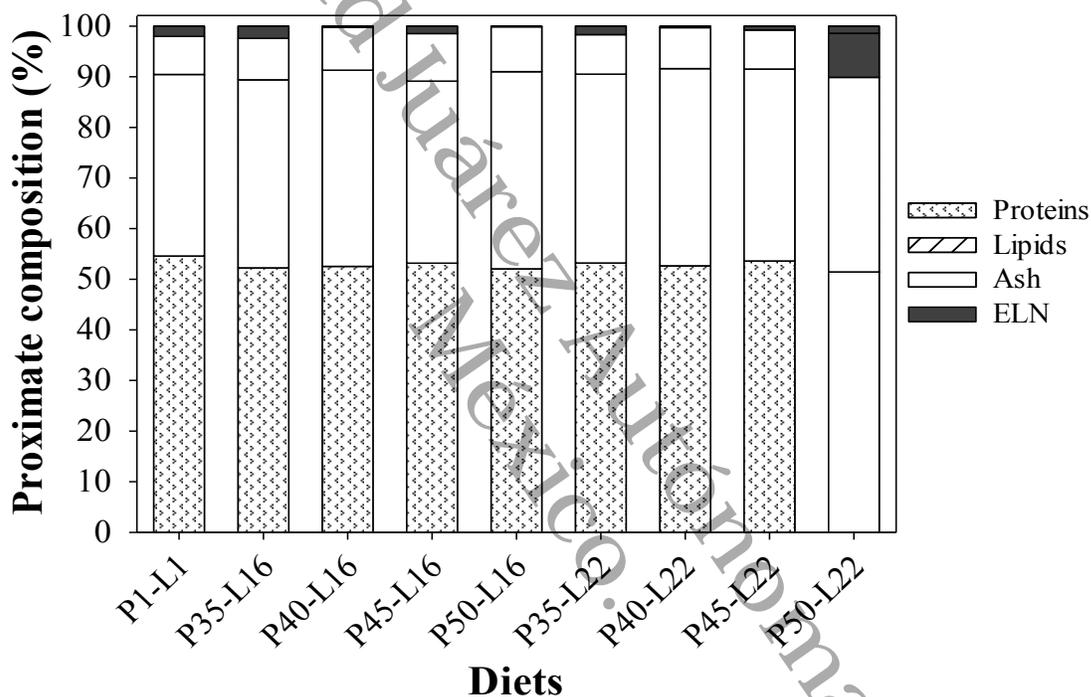


Figura 3. Análisis proximal de la composición corporal (Media \pm Error estándar) de larvas de *A. trimaculatus* alimentadas con las dietas semi-purificadas para el requerimiento de proteínas y lípidos (% de materia en peso seco, n=3; P1-L1=Larvas inicial).

7.2.4.3.- Actividad enzimática digestiva

La actividad de las enzimas digestivas analizadas en las larvas alimentadas con los distintos piensos experimentales al finalizar el experimento se muestra en la tabla 3. En la mayoría de los casos se encontró diferencias significativas ($p < 0.05$) entre la actividad enzimática de los diferentes tratamientos, observándose ligeras tendencias posiblemente influenciadas al porcentaje de proteína y lípidos incluidos en los alimentos.

Tabla 3. Actividades enzimáticas digestivas (Media \pm Desviación estándar) de las de las larvas *A. trimaculatus* alimentadas con los distintos piensos experimentales (Letras minúsculas en la columnas indican diferencias significativas; n=6, p<0.05).

Dieta	Acid	Alkaline	Trypsin	Chymotrypsin	L-aminopeptidase	Lipase	α -amylase	Alkaline
	protease	protease	Trypsin	Chymotrypsin	L-aminopeptidase	Lipase	α -amylase	phosphatase
	mU mg	mUx10 ⁻² mg	mUx10 ⁻⁷ mg	mUx10 ⁻⁷ mg	mUx10 ⁻⁷ mg protein	mU mg	mUx10 ⁻² mg	mUx10 ⁻⁷ mg
	protein	protein	protein	protein		protein	protein	protein
P35-L16	42.12 \pm 6.45 ^a	80.57 \pm 7.48 ^a	2.87 \pm 0.08 ^a	55.32 \pm 1.21 ^b	0.46 \pm 0.01 ^a	1.67 \pm 0.09 ^{ab}	52.83 \pm 4.90 ^a	0.40 \pm 0.05 ^{bcd}
P40-L16	26.09 \pm 4.33 ^b	93.31 \pm 10.36 ^{ab}	2.61 \pm 0.25 ^a	54.91 \pm 2.02 ^b	0.43 \pm 0.01 ^b	1.78 \pm 0.08 ^a	37.86 \pm 3.92 ^b	0.51 \pm 0.10 ^{def}
P45-L16	24.26 \pm 1.63 ^b	133.47 \pm 11.37 ^d	2.69 \pm 0.44 ^a	66.22 \pm 4.87 ^d	0.41 \pm 0.01 ^{bc}	1.66 \pm 0.11 ^{ab}	23.01 \pm 5.07 ^{de}	0.30 \pm 0.05 ^{ab}
P50-L16	22.13 \pm 0.94 ^b	96.03 \pm 2.84 ^{ab}	2.53 \pm 0.13 ^a	57.16 \pm 2.44 ^{bc}	0.39 \pm 0.02 ^{cd}	1.64 \pm 0.09 ^{ab}	32.00 \pm 2.95 ^{bc}	0.35 \pm 0.07 ^{abc}
P35-L22	26.60 \pm 2.33 ^b	85.94 \pm 9.24 ^{ab}	1.44 \pm 0.28 ^{bc}	48.15 \pm 1.82 ^a	0.26 \pm 0.00 ^e	1.41 \pm 0.15 ^c	16.86 \pm 3.81 ^e	0.54 \pm 0.03 ^f
P40-L22	22.97 \pm 3.39 ^b	98.37 \pm 12.95 ^{bc}	1.78 \pm 0.18 ^b	61.34 \pm 1.43 ^c	0.37 \pm 0.02 ^d	1.39 \pm 0.14 ^c	22.43 \pm 2.81 ^{de}	0.52 \pm 0.09 ^{ef}
P45-L22	24.13 \pm 5.15 ^b	102.45 \pm 3.14 ^{bc}	1.50 \pm 0.09 ^{bc}	55.61 \pm 3.05 ^b	0.23 \pm 0.01 ^f	1.53 \pm 0.05 ^{bc}	29.68 \pm 5.95 ^{cd}	0.29 \pm 0.02 ^a
P50-L22	22.24 \pm 2.55 ^b	115.09 \pm 11.58 ^c	1.12 \pm 0.11 ^c	57.22 \pm 1.31 ^{bc}	0.20 \pm 0.03 ^f	1.41 \pm 0.08 ^c	39.16 \pm 1.60 ^b	0.42 \pm 0.04 ^{cde}

El incremento de la ingesta de proteína en las larvas promueven patrones opuestos en la

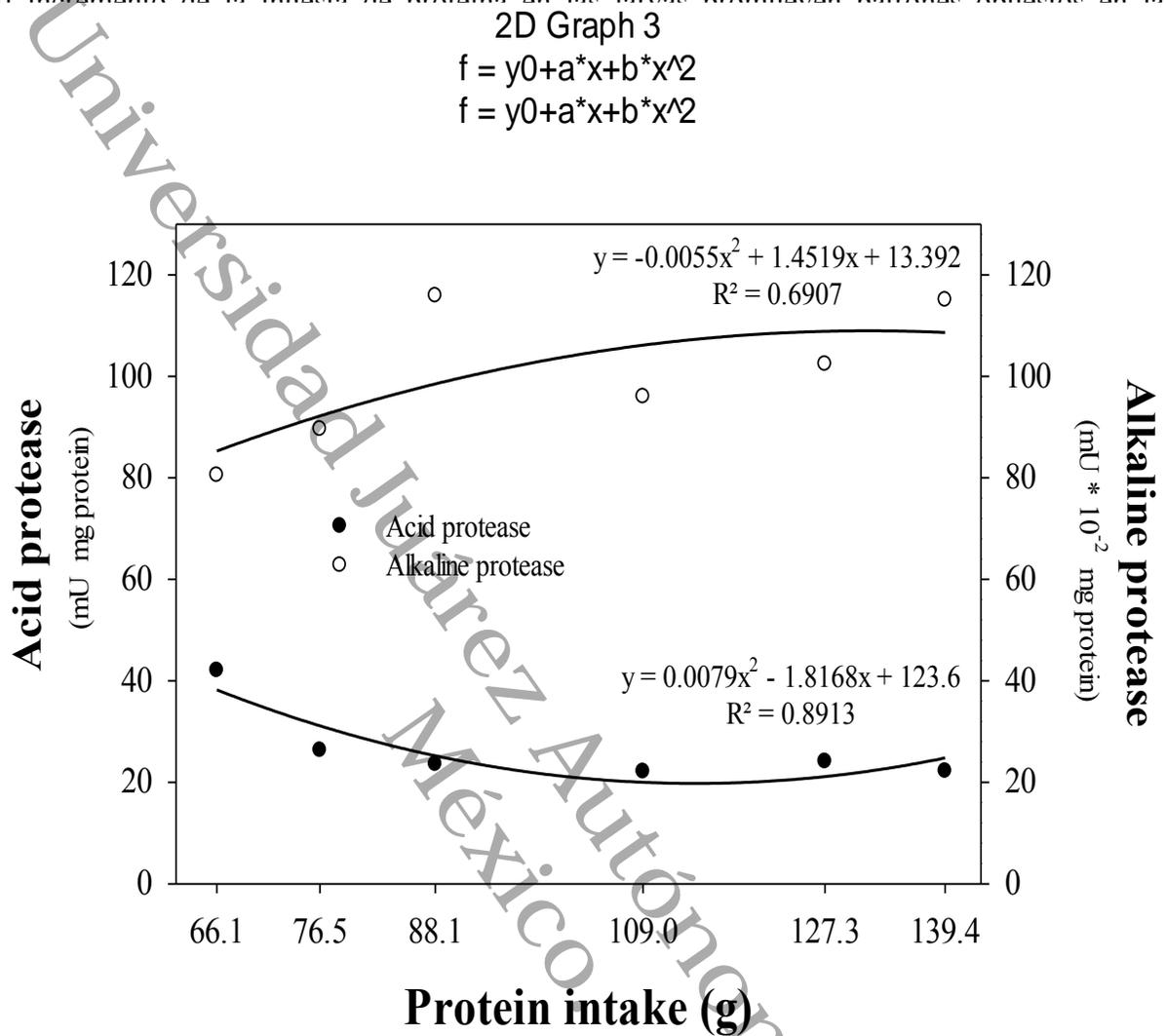


Figura 4. Tendencia de la actividad de las enzimas digestivas de proteasas ácidas y alcalinas (Media ± Error estándar) en las larvas de *A. trimaculatus* de las distintas cantidades de ingesta de proteína (y=Unidades por mg de proteína, x= gramos de proteína ingerida).

La similitud entre los perfiles de enzimas digestivas que presentaban los distintos grupos experimentales se detalla en la figura 5. En donde se observa que las larvas alimentadas con las dietas P45-L22 y P50-L22 presentan una mayor similitud y ambas son parecidas con el bloque formado por los larvas alimentadas con las dietas P45-L16 y 50-L16, en tanto que aquellas que recibieron las dietas P35-L16 y P35-L22 mostraron perfiles enzimáticos claramente diferentes.

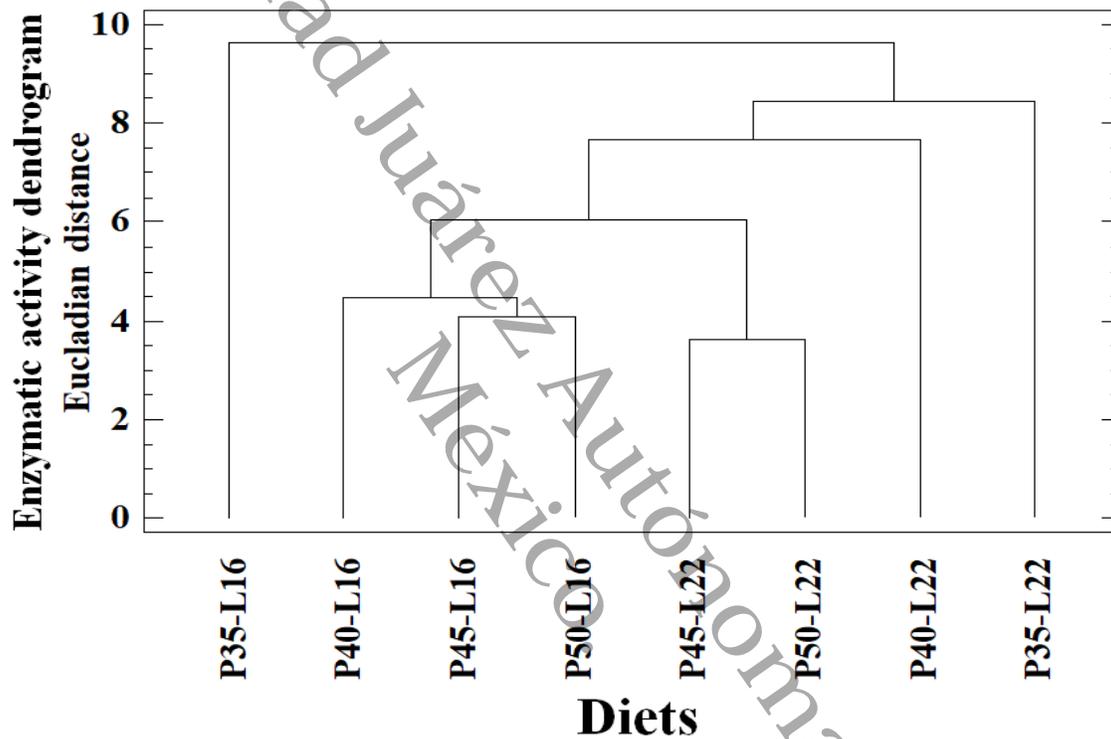


Figura 5. Dendrograma de análisis de agrupamiento jerárquico de la actividad enzimática de larvas de *A. trimaculatus* de las distintas dietas.

La evaluación del perfil enzimático mediante el análisis de componentes se muestra en la figura 6. En el cual se representa un 72.45% de la varianza, en donde el componente I explica un 48.84% y el componente II un 23.61%. La actividad enzimática de tripsina (0.52), leucina aminopeptidasa (0.48) y lipasa (0.48) son las más influyentes en el componente I; mientras que en el componente II son la quimotripsina (0.65) y la fosfatasa alcalina (-0.49). Encontrándose la separación de los perfiles enzimáticos de las larvas alimentadas con 16 y 22% de lípidos, así

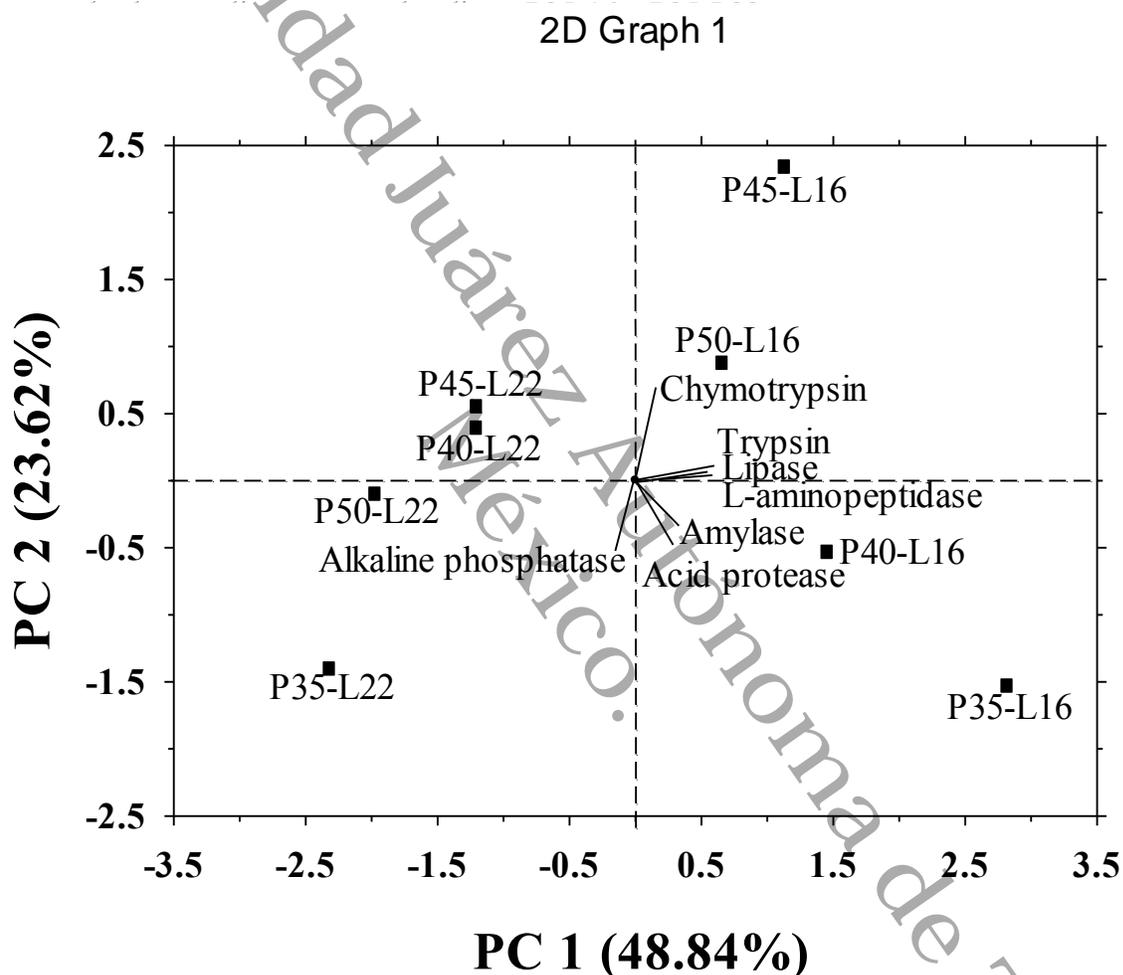


Figura 6. Bigráfico del análisis de componentes principales de la actividad de las enzimas digestivas en larvas de *A. trimaculatus* al finalizar el bioensayo con las distintas dietas.

Col 1 vs Col 2

7.2.5.- DISCUSSION

7.2.5.1.- Crecimiento e índices de eficiencia

El presente estudio pone en manifiesto que el crecimiento de larvas de *A. trimaculatus* es influenciado por diferentes niveles de proteínas y lípidos en la dieta. En donde el mejor crecimiento lo promueve el alimento con 45% de inclusión proteína con el máximo de lípidos, dieta P45-L22. En la etapa larvaria los porcentajes de inclusión proteínas en la dieta oscilan del 40 al 60% en larvas de ciclidos. Este mismo contenido de proteína (45%) también ha generado buenos crecimientos en larvas de ciclidos en *Oreochromis niloticus* (Abdel-Tawwab *et al.*, 2010) y en *Cichlasoma urophthalmus* (Martínez-Palacios *et al.*, 1996); mientras que en *Petenia splendida* (Uscanga-Martínez *et al.*, 2012) el óptimo resultó en 52%. Estos tres estudios las dietas son isocalóricas con un porcentaje de inclusión del 6, 10 y 15% de lípidos respectivamente. También en otras especies de agua dulce como en *Menidia estor* (Martínez-Palacios *et al.*, 2007) y *Pseudobagrus ussuriensis* (Wang *et al.*, 2013); se reporta como óptimos para el crecimiento la inclusión del 45% de proteína en la dieta e incluso mayor como en *Sander lucioperca* (Schulz *et al.*, 2007) del 52% proteína. En larvas de peces marinos los porcentajes van de 50 hasta 68%, considerándose óptimos de 60% en larvas de *Argyrosomus regius* (Saavedra *et al.*, 2016); en algunos casos no se encuentra diferencia significativa en el crecimiento con más de 50% (*Pagellus bogaraveo*; Silva *et al.*, 2006) o de 55% (*Solea senegalensis*; Yúfera *et al.*, 2005) de inclusión de proteína en la dieta. Por lo que podría considerarse que un porcentaje igual o mayor al 45% de proteína tiende a ser característico de hábitos alimenticios de peces carnívoros (Álvarez-González *et al.*, 2001). Por otra parte, las larvas alimentadas con los piensos que contenían 22% de lípidos, presentaron un mejor crecimiento que los alimentados con 16%, independientemente del porcentaje de proteína; siendo la dieta P45-L22 la que generó mejor crecimiento. En muchas investigaciones de lípidos los rangos se han centrado en un rango entre 5 al 20% reportado buenos resultados al utilizar porcentajes menores de lípidos dietarios a los encontrados en este estudio; en larvas de *Epinephelus coioides* se reporta un óptimo de 15.99% (Li *et al.*, 2016); en larvas de *Oreochromis niloticus* entre 8 a 11.5% (Qiang *et al.*, 2017) y en juveniles de *Sebastes schlegelii* entre 15 a 19% (Cho *et al.*, 2015). En el presente estudio, las larvas de *A. trimaculatus* presentaron el mejor crecimiento con las dietas que contenían 16% de lípidos si está incluida un 55% de proteína (P55-L16), pero cuando la inclusión es del 22% de lípidos el mejor crecimiento resultó con la

dieta con 45% de proteína (P45-L22), lo que indicaría que en el primer caso parte de la proteína se estaría utilizando con fines energéticos. Esta variación de nutrientes (lípidos y proteína) se ha descrito en juveniles de *Sebastes schlegeli* en donde el mejor crecimiento se consiguió utilizando las dietas que contenían 15% de lípidos y 50% de proteína, en cambio cuando se incrementa el porcentaje de lípidos a 19%, el mejor crecimiento se conseguía con 45% de proteína (Cho *et al.*, 2015). Los lípidos ayudan en los procesos fisiológicos como en la formación de la membrana celular (fosfolípidos) y en la absorción de nutrientes solubles en lípidos, además son utilizados para fines energéticos y hacen un aporte importante de ácidos grasos en los peces (Storebakken, 2002; Sargent *et al.*, 2002; Bowyer *et al.*, 2013). Por lo tanto cuando estos nutrientes cubren la demanda energética, la proteína puede ser solo utilizada para fines de crecimiento y no para efectos energéticos. Con ello, se podría permitir un ahorro de proteína en los alimentos y por consiguiente una posible disminución en los costos de producción (Kumar *et al.*, 2018). Sin embargo, este efecto de ahorro de proteína no siempre se ponen de manifiesto, como se ha demostrado en especies tales como *Polydactylus sexfilis* al utilizar dietas con un rango de lípidos entre 10 y 14% de lípidos (Deng *et al.*, 2011) y en juveniles del híbrido *Epinephelus fuscoguttatus* × *E. lanceolatus* entre 7 y 14% de lípidos (Rahimnejad *et al.*, 2015). En ambos casos no se encontró ninguna influencia de los lípidos para disminuir la proteína, indicando la posibilidad que el rango de lípidos probado debió ser muy reducido y no se puede apreciar este efecto de ahorro de proteína. También existe la posibilidad que algunas especies la demanda energética es dependiente de las proteínas, porque no tener la capacidad de oxidar los lípidos para utilizarlos como fuentes energéticas. En las larvas de *A. trimaculatus* se puede observar que requieren de elevado contenido de lípidos y estos posiblemente son utilizados en fines energéticos, entre otros procesos.

Los índices SGR, WG y FCR se vieron influenciados por el incremento de los niveles de proteína y lípidos. Los índices menos eficientes lo presentaron las larvas alimentadas con la dieta P35-L16 y los mejores las larvas alimentadas con la dieta P45-L22 (Tabla 2). Los índices de la dieta P45-L22 no presentan diferencia estadística significativas ($p > 0.05$) con la dieta P50-L22, pero si son afectados negativamente en la reducción del crecimiento por el aumento la proteína. Por lo tanto, un alto contenido de proteína en los alimentos afecta el crecimiento, incrementar los costos y son menos amigable con el medio ambiente, por el aumento de la

excreción de amoníaco de los peces (Salhi *et al.*, 2004; Ali & Jauncey, 2005). Los valores de SGR y WG de larvas de *A. trimaculatus* encontrados en este experimento son más altos a los descritos en *Petenia splendida* (Uscanga-Martínez *et al.*, 2012), *Pseudobagrus ussuriensis* (Wang *et al.*, 2013) y *Oreochromis niloticus* (Qiang *et al.*, 2017); mientras que el FCR se encuentra dentro de un rango similar al de *Oreochromis niloticus* (Abdel-Tawwab *et al.*, 2010; Gao *et al.*, 2011) y en *Pseudobagrus ussuriensis* (Wang *et al.*, 2013). El índice FCR es influenciado por varios factores como el requerimiento nutricional de la especie, los hábitos alimenticios, la formulación de los alimentos, las condiciones de cultivo, entre otras, por lo que es difícil encontrar una referencia fiable. No obstante, los valores más cercanos a 1.0 se determinaron en las larvas alimentadas con las dietas P45-L22 y P50-L22, las que también mostraron los mejores crecimientos. Por otra parte, no se observó ningún efecto claro del nivel proteico en la supervivencia de las larvas, pero si una cierta relación con el nivel de los lípidos, observándose una mejora en supervivencia del 92 al 98% al aumentar los lípidos del 16 al 22% respectivamente. Autores como Ai *et al.*, (2008) y Zheng *et al.*, (2010), mencionan que el óptimo de lípidos se ha relacionado con el aumento a la supervivencia y un buen crecimiento, lo que coincide con lo encontrado para en larvas de *A. trimaculatus*.

En las larvas alimentadas con una inclusión del 16% de lípidos en las dietas, el índice LER (indicativo de una mayor eficiencia lípidos) tiende a incrementarse al aumentar el porcentaje de proteínas en los alimentos. Mientras que el índice PER (indicativo de una mayor eficiencia proteínas) presenta una ligera tendencia a disminuir y es igual en los alimentos con 45 y 50% de proteína. Este efecto del PER se ha descrito en otros trabajos, lo cual podría deberse a un exceso de la proteína o a una deficiencia de energía en los alimentos, en ambos casos la proteína puede ocuparse para fines energéticos (Okorie *et al.*, 2007; Ng *et al.*, 2008; Mohseni *et al.*, 2013; Cho *et al.*, 2015). En nuestro caso posiblemente las dietas con 16% de lípidos no estén cubriendo la demanda de energía de las larvas y probablemente una parte de la proteína se está destinando para fines energéticos. En cambio, en las larvas alimentadas con 22% de lípidos los valores del PER tienden hacer más altos, sin presentar ninguna tendencia clara con el aumento de la proteína. Esto pone en manifiesto que el uso de las proteínas es influenciado por los niveles de inclusión de los lípidos en los alimentos (Mohanta *et al.*, 2013). No obstante cuando se tiene cubierta la demanda energética, los altos niveles de proteína también afectan los valores del

índice PER, esto es observado en las larvas alimentadas con 50% de proteína (P50-L22). Resultados similares del exceso de proteína se han descrito en juveniles de *Sebastes schlegeli* (Cho *et al.*, 2015). También existen casos, que la influencia de los nutrientes (proteínas o lípidos) no generan diferencias significativas de los índices de eficiencia, como en juveniles de *Siniperca scherzeri*, en donde posiblemente los alimentos podrían estar por arriba del requerimiento nutricional mínimo de la especie (Sankian *et al.*, 2017). En nuestro estudio se encontró que las larvas alimentadas con altos niveles de lípidos (22%) y de proteínas (45 y 50%), se promueve un mejor crecimiento en las larvas y elevados valores en los índices de eficiencia, considerándose la dieta P45-L22 como la más adapta para esta especie.

7.2.5.2.- Análisis de la composición proximal

La composición proximal del cuerpo de las larvas alimentadas con los distintos alimentos experimentales, no se encontró diferencias significativas entre los tratamientos. Esta ausencia de diferencia significativa en la composición corporal de los peces en los ensayos, donde se utilizan alimentos con distintos niveles de proteínas y de lípidos ya ha sido reportado en otras especies, tales como en juveniles de *Paralabrax maculatofasciatus*, (Álvarez-González *et al.*, 2001); larvas de *Seriola dumerili* (Takakuwa *et al.*, 2006), en larvas *Tor mahseer* (Ng *et al.*, 2008), en juveniles *Salvelinus fontinalis* (Amin *et al.*, 2014) y en juveniles *Siniperca scherzeri* (Sankian *et al.*, 2017). Esto se suele atribuir a diferentes causas como por ejemplo a un periodo corto exposición de las dietas y por tanto no alcanza a generar cambios en la composición de los organismos. También a los diferentes estadios de desarrollo, la composición nutricional de las dietas, o en su caso las dietas suministradas están por arriba del requerimiento mínimo nutricional. Finalmente, en algunos casos se comenta de la influencia de diferentes factores abióticos como son las condiciones de cultivos (Shearer, 1994; Álvarez-González *et al.*, 2001; Takakuwa *et al.*, 2006; Ng *et al.*, 2008; Amin *et al.*, 2014; Sankian *et al.*, 2017). En algunos estudios, no se ha encontrado cambios en la composición del cuerpo de los peces, pero si en algunos órganos (hígado, musculo, entre otros) que suelen ser más susceptibles a reflejar la composición y deposición de los nutrientes de la dieta en los peces. En caso los experimentos realizados en la etapa larvaria, el tamaño de los peces muchas veces limita o dificulta realizar este tipo de análisis a estos órganos.

7.2.5.3.- *Actividad enzimática digestiva*

Los valores de la actividad enzimática digestiva determinadas en larvas de *A. trimaculatus* alimentadas con las distintas dietas experimentales que se muestran en la tabla 3. Son similares a los perfiles de actividad enzimática descritos en trabajos anteriores para la misma especie (Toledo-Solis *et al.*, 2015, 2016). En los cuales se describe una digestión en la que participan el estómago e intestino, con características de hábitos alimenticios de un omnívoro con tendencia a la carnivoría. En este experimento los valores promedio de actividades de proteasas ácidas y alcalinas mostraron relaciones opuestas con la ingesta de la proteína total. La presencia de una menor actividad de las proteasas ácidas en larvas que consumieron más proteína, posiblemente refleja un uso más intensivo de dichas enzimas. Las cuales podrían estar ligadas a una mayor demanda por el procesado digestivo de este nutriente, ya que no podría ser compensada por la limitada capacidad de producción del estadio larvario (Zambonino-Infante & Cahu, 2001; Lazo *et al.*, 2011). Por otro lado, podría influenciar que al momento del muestreo no se hubiesen regenerado los niveles de actividad de las proteasas ácidas (Novelli *et al.*, 2016; Yúfera *et al.*, 2018). Por el contrario, los valores de actividad de las proteasas alcalinas de las larvas parecen indicar que existe una capacidad de producción de acorde a los niveles de ingesta de proteína, reflejándose una relación directa entre la actividad medida en las larvas y el consumo promedio de proteína total. En el resto de las actividades enzimáticas, se presenta en algunos casos diferencias significativas entre los distintos grupos de larvas experimentales, pero no se mostraron tendencias claras inducidas por las variaciones de la ingesta de proteínas o lípidos. Dado que esta variabilidad suele ser un problema para la integración o interpretación de los resultados. Se llevó a cabo una evaluación global de las variaciones en los perfiles enzimáticos utilizando los análisis multivariantes, similar a los realizados en *Maja brachydactyla* por Rotllant *et al.*, (2010) y en *Hippocampus reidi* por Novelli *et al.*, (2016). El análisis de conglomerados o cluster indica que las larvas que obtuvieron mayor crecimiento (P45-L22 y P50-L22) presentan entre si una mayor similitud en sus perfiles de actividad enzimática, siendo a su vez parecidas al grupo de larvas alimentadas con las dietas P40-L16, P45-L16 y P50-L16. En cambio, los perfiles enzimáticos de las larvas que obtuvieron un bajo rendimiento en el crecimiento con las dietas P35-L16 y P35-L22, mostraron mayores diferencias del resto de los grupos. Por lo tanto, en este experimento parecer ser que los perfiles de actividad enzimática de las larvas pueden reflejar los estados fisiológicos y condiciones nutricionales, los cuales tienden

a ser similares de acuerdo a las características nutricionales proporcionadas por los alimentos. Coincidiendo en que los análisis de actividad enzimática pueden ser utilizados como posibles indicadores de las condiciones nutricionales o bien como indicadores del estado de madurez del sistema digestivo en los peces (Moyano *et al.*, 1996; Cara *et al.*, 2007; Rotllant *et al.*, 2010).

El análisis de componentes principales permitió segregar a los grupos experimentales en función a las variables de las actividades enzimáticas de mayor relevancia. Observándose una clara separación entre los perfiles enzimáticos de las larvas alimentadas con una inclusión del 16 y 22% de lípidos en los alimentos. Esta agrupación ó separación de los perfiles de actividad enzimática se adjudica a la actividad de la enzima lipasa, por la posible influencia de la variación de los lípidos en las dietas. Además en esta agrupación intervienen la actividad de dos proteasas (tripsina y L-aminopeptidasa) que agrupan en el mismo sentido, las cuales podrían estar influenciadas por la inclusión de las proteínas. También se presenta una mayor similitud entre los perfiles enzimáticos de las larvas alimentadas con una inclusión del 22% lípidos en las dietas. Esto podría indicar que este grupo de larvas comparte estados nutricionales parecidos y en mejores condiciones, a los perfiles enzimáticos de las larvas alimentadas con 16% de lípidos. En los cuales se registran una mayor variabilidad en la agrupación de los perfiles enzimáticos de las larvas. En este grupo (L16), se observa una clara separación del perfil enzimático de las larvas alimentadas con la dieta P45-L16 por la enzima quimotripsina. En esta dieta las larvas presentaron los valores más elevados de dicha enzima y la mortalidad más alta del experimento, así como la ratio tripsina-quimotripsina más baja del grupo de dietas L16. Esta ratio se ha relacionado con los estados nutricionales en las larvas, en donde si se presenta una disminución o estancamiento podría indicar condiciones nutricionales inadecuadas. Debido a que en condiciones normales la secreción de tripsina va en aumento a la demanda de la hidrólisis de proteínas, pero si hay una restricción en cantidad o calidad de los alimentos, se producirá relativamente menos tripsina frente a una secreción constante de quimotripsina (Moyano *et al.*, 1996; Cara *et al.*, 2003; Moyano, 2006). Por otra parte, en este análisis de componentes se observa que los perfiles enzimáticos de las larvas alimentadas con 35% de proteína en las dietas (P35-L22 y P35-L16), son separados claramente por la influencia de los altos niveles de la actividad de las proteasas ácidas. Los cuales tienen a ser más altos cuando se presenta una menor cantidad de ingesta de la proteína. Por lo tanto, son las enzimas tripsina, L-aminopeptidasa y

lipasa las que tienden a correlacionar positivamente en ambos componentes; las cuales ponen en manifiesto la influencia de las variaciones de los nutrientes en las dietas experimentales. De estas dos proteasas, la tripsina ha sido una de la más estudiada por su importancia que tiene en la digestión de proteínas en la alimentación en las larvas (Ueberschär, 1993; Srivastava *et al.*, 2002); además se ha demostrado que la actividad enzimática se correlaciona con el contenido alimenticio del sistema digestivo en larvas (Rønnestad *et al.*, 2013; Navarro-Guillén *et al.*, 2015). La L-aminopeptidasa se ha estudiado menos, esta es asociada a terminar la digestión de las proteínas a nivel luminal para la liberación de los aminoácidos (Lazo *et al.*, 2007; Su-Hua *et al.*, 2011). Mientras que la enzima lipasa pancreática lleva a cabo la digestión de lípidos exógenos para la liberación de ácidos grasos (Tengjaroenkul *et al.*, 2002; Comabella *et al.*, 2006; Álvarez-González *et al.*, 2008). En cambio, las proteasas ácidas en nuestro estudio tienden a correlacionar a decrecer en función a la ingesta de proteína y la enzima quimotripsina podría reflejar variaciones por deficiencias nutricionales y condiciones fisiológicas que ocasionaron la mortalidad. Por su parte, la fosfatasa alcalina y la amilasa posiblemente son influenciadas por el resto de los nutrientes que componen las dietas experimentales. Aunque no están relacionadas directamente con la variación de los nutrientes de interés del experimento, son consideradas en los análisis enzimáticos para tener un contexto representativo de las condiciones nutricionales de las larvas. Debido a que no existe un índice universal que permita discriminar las condiciones nutricionales en las distintas etapas de crecimiento (Rotllant *et al.*, 2010). Por ello, los índices nutricionales deben definirse para cada etapa de crecimiento y bajo las condiciones experimentales para cada una de las especies en estudio.

7.2.6.- CONCLUSIÓN

Las larvas de *A. trimaculatus* podrían tener requerimientos nutricionales próximos a 45% de proteína y 22% de lípidos, debido a que cuando se alimentaron con estos porcentajes se registró un buen crecimiento y los mejores índices de eficiencias de alimento. Por lo tanto, la influencia de los elevados contenidos de lípidos en los alimentos genera un mayor aprovechamiento de las proteínas y supervivencia en la etapa larvaria. Los análisis de actividad enzimática, en las larvas ayudan a reflejar las condiciones nutricionales generadas por los distintos niveles de inclusión de las proteínas y lípidos en los alimentos experimentales. Por lo tanto, los análisis de las enzimas digestivas podrían ser utilizados como indicadores de las condiciones nutricionales de las larvas, cuando se evalúa la inclusión de algún tipo de nutrientes en los alimentos.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

7.2.7.- REFERENCIAS

Abdel-Tawwab M., Ahmad M. H., Khattab Y. A. E., Shalaby A. M. E. (2010). Effect of dietary protein level, initial body weight, and their interaction on the growth, feed utilization, and physiological alterations of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). *Aquaculture*. Vol. 298:267-274.

Ai Q. H., Zhao J. Z., Mai K. S., Xu W., Tan B. P., Ma H. M., Liufu Z. G. (2008). Optimal dietary lipid level for large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) larvae. *Aquaculture Nutrition*. Vol. 14:515-522.

Ali M. Z., Jauncey K. (2005). Approaches to optimizing dietary protein to energy ratio for African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). *Aquaculture Nutrition*. Vol. 11: 95-101.

Alvarez-González C. A., Civera-Cerecedo R., Ortiz-Galindo J. L., Dumas S., Moreno-Legorreta M., Grayeb-Del Alamo T. (2001). Effect of dietary protein level on growth and body composition of juvenile spotted sand bass, *Paralabrax maculatofasciatus*, fed practical diets. *Aquaculture*. Vol. 194:151-159.

Álvarez-González C. A., Moyano-López F. J., Civera-Cercedo R., Carrasco-Chávez V., Ortiz-Galindo J., Dumas S. (2008). Development of digestive enzyme activity in larvae of spotted sand bass *Paralabrax maculatofasciatus*. I Biochemistry analysis. *Fish Physiol Biochem*. Vol. 34:373-384.

Álvarez-Lajonchère L., Chávez-Sánchez M. C., Reina-Cáñez M. A., Camacho-Hernández M. A., Abdo-de la Parra M. I., García-Aguilar N. (2011). Evolución de la escala experimental a la piloto para las tecnologías de producción de juveniles de peces marinos en la unidad Mazatlán del CIAD. Cap 1 en: Avances en Acuicultura y Manejo Ambiental. Ruiz Luna A, Berlanga Robles C y Betancourt Lozano M. Trillas (eds) 17-38 pp.

Amin M. N., Carter C. G., Katersky Barnes R. S., Adams L. R. (2014). Protein and energy nutrition of brook trout (*Salvelinus fontinalis*) at optimal and elevated temperatures. *Aquaculture Nutrition*. Vol. 22:527-540.

Anson M. L. (1938). The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin. *J. Gen Physiol*. Vol. 22:79-89

AOAC. (2005). Official methods of analysis of AOAC International. AOAC International.

Bergmeyer H. V. (1974). Phosphatases methods of enzymatic analysis, vol 2. Academic Press, New York.

Bowyer J. N., Qin J. G., Stone D. A. J. (2013). Protein, lipid and energy requirements of cultured marine fish in cold, temperate and warm water. *Reviews in Aquaculture*. Vol. 5:10-32.

Bradford M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem*. Vol. 72:248-254.

Cara J. B., Moyano F. J., Cardenas S., Fernandez-Diaz C., Yúfera M. (2003). Assessment of digestive enzyme activities during larval development of white bream. *J Fish Biol*. Vol. 63:48-58.

Cara J. B., Moyano F. J., Zambonino J. L., Alarcón F. J. (2007). The whole amino acid profile as indicator of the nutritional condition in cultured marine fish larvae. *Aquaculture Nutrition*. Vol. 13:94-103.

Chatzifotis S., Panagiotidou M., Divanach P. (2012). Effect of protein and lipid dietary levels on the growth of juvenile meagre (*Argyrosomus regius*). *Aquacult Int*. Vol. 20:91-98.

Cho S. H., Kim H. S., Myung S. H., Won-Gwan J., Choi J., Sang-Min L. (2015). Optimum dietary protein and lipid levels for juvenile rockfish (*Sebastes schlegeli*, Hilgendorf 1880). *Aquaculture Research*. Vol. 46:2954-2961.

Comabella Y., Mendoza R., Aguilera C., Carrillo O., Hurtado A., García-Galano T. (2006). Digestive enzyme activity during early larval development of the Cuban gar *Atractosteus tristoechus*. *Fish Physiol Biochem*. Vol. 32:147-157.

Dávila-Camacho C. A., Galaviz-Villa I., Lango-Reynoso F., Castañeda-Chávez M. R., Quiroga-Brahms C., Montoya-Mendoza J. (2018). Cultivation of native fish in Mexico: cases of success. *Reviews in Aquaculture*. Doi: 10.1111/raq.12259.

Del Mar E. G., Largman C., Broderick J. W., Geokas M. C. (1979). A sensitive new substrate for chymotrypsin. *Anal Biochem*. Vol. 99:316-320.

Deng D. F., Ju Z.Y., Dominy W., Murashige R., Wilson R. P. (2011). Optimal dietary protein levels for juvenile Pacific threadfin (*Polydactylus sexfilis*) fed diets with two levels of lipid. *Aquaculture*. Vol. 316:25-30.

DOF (2013). Carta Nacional Acuícola. Actualización 2ª. Edición. Secretaría de Agricultura Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. 33–112 pp. Accessed 05 de Enero del 2019.

Erlanger B., Kokowsky N., Cohen W. (1961). The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Arch Biochem Biophys*. Vol. 95:271-278.

Espinós F. J., Tomás A., Pérez L. M., Balasch S., Jover M. (2003). Growth of dentex fingerlings (*Dentex dentex*) fed diets containing different levels of protein and lipid. *Aquaculture*. Vol. 218:479-490.

Galaviz M. A., López L. M., García-Gasca A., Álvarez-González C. A., True C. D., Gisbert E. (2015). Digestive system development and study of acid and alkaline protease digestive

capacities using biochemical and molecular approaches in totoaba (*Totoaba macdonaldi*) larvae. *Fish Physiol Biochem.* Doi 10.1007/s10695-015-0073-6.

Gao W., Liu Y. J., Tian L. X., Mai K. S., Liang G. Y., Yang H. J., Huai M. Y., Luo W. J. (2011). Protein-sparing capability of dietary lipid in herbivorous and omnivorous freshwater finfish: a comparative case study on grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) and tilapia (*Oreochromis niloticus* x *O. aureus*). *Aquaculture Nutrition.* 17:2-12.

Gisbert E., Giménez G., Fernández I., Kotzamanis Y., Estévez A. (2009). Development of digestive enzymes in common dentex *Dentex dentex* during early ontogeny. *Aquaculture.* Vol. 287:381-387.

Günther A. (1867). On the fishes of the states of Central America, founded upon specimens collected in fresh and marine waters of various parts of that country by Messrs. Salvin, Godman and Capt. J. M. Dow. *Proc. Zool. Soc. London.* Vol. 1866(3): 600-604.

Hamre K., Yúfera M., Rønnestad I., Boglione C., Conceição L. E. C., Izquierdo M. (2013). Fish larval nutrition and feed formulation: knowledge gaps and bottlenecks for advances in larval rearing. *Rev. Aquac.* Vol. 5:S26-S58.

Kissil G. W., Lupatsch I., Higgs D. A., Hardy R. W. (1997). Preliminary evaluation of rapeseed protein concentrate as an alternative to fish meal in diets for gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh.* Vol. 49:135-143.

Kumar S., Sahu N. P., Ranjan A. (2018). Feeding de-oiled rice bran (DORB) to Rohu, *Labeo rohita*: Effect of varying dietary protein and lipid level on growth, body composition, and insulin like growth factor (IGF) expression. *Aquaculture.* Vol. 492:59-66.

Lazo J., Mendoza R., Holt G. J., Aguilera C., Arnold C. R. (2007). Characterization of digestive enzymes during larval development of red drum (*Sciaenops ocellatus*). *Aquaculture.* Vol. 265:194-205.

Lazo J. P., Darias M. J., Gisbert E. (2011). Ontogeny of the digestive tract. In: Holt G.J. (eds) Larval Fish Nutrition. John Wiley & Sons, Inc. 3-46 pp.

Li S., Mai K., Xu W., Yuan Y., Zhang Y., Zhou H., Ai Q. (2016). Effects of dietary lipid level on growth, fatty acid composition, digestive enzymes and expression of some lipid metabolism related genes of orange spotted grouper larvae (*Epinephelus coioides* H.). *Aquaculture Research*. Vol. 47:2481-2495.

Maraux S., Louvard D., Baratti J. (1973). The aminopeptidase from hog-intestinal brush border. *Biochim Biophys Acta*. Vol. 321:282-295.

Martínez-Palacios C. A., Harfush-Melendez M., Chavez-Sánchez C. (1996). The optimum dietary protein level for the Mexican cichlid *Cichlasoma urophthalmus* (Gunther): a comparison of estimates derived from experiments using fixed-rate feeding and satiation feeding. *Aquaculture Nutrition*. Vol. 2:11-20.

Martínez-Palacios C. A., Ríos-Durán M. G., Ambríz-Cervantes L., Jauncey K. J., Ross L. G. (2007). Dietary protein requirement of juvenile Mexican Silverside (*Menidia estor* Jordan 1879), a stomachless zooplanktophagous fish. *Aquaculture Nutrition*. Vol. 13:304-310.

McGoogan B. B., Gatlin D. M. (2000). Dietary manipulations affecting growth and nitrogenous waste production of red drum, *Sciaenops ocellatus* II. Effects of energy level and nutrient density at various feeding rates. *Aquaculture*. Vol. 182:271-285.

Miller R. R., Minckley W. L., Norris S. M. (2005). Freshwater fishes of México. The Chicago University. Press, Illinois. 490 pp.

Mohanta K. N., Subramanian S., Korikanthimath V. S. (2013). Effect of dietary protein and lipid levels on growth, nutrient utilization and whole-body composition of blue gourami, *Trichogaster trichopterus* fingerlings. *J Anim Physiol An N*. Vol. 97:126-136.

Mohseni M., Pourkazemi M., Hossensi M. R., Hassani M. H. S., Bai S. C. (2013). Effects of the dietary protein levels and the protein to energy ratio in sub-yearling Persian sturgeon, *Acipenser persicus* (Borodin). *Aquaculture Research*. Vol. 44:378-387.

Moyano F. J., Díaz M., Alarcón F. J., Sarasquete M. C. (1996). Characterization of digestive enzyme activity during larval development of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Fish Physiol Biochem*. Vol. 15:121-130.

Moyano F. J. (2006). Bioquímica Digestiva en Especies Acuicultivadas: Aplicaciones en Nutrición. En editores: Cruz, S.E., Ricque, M.R., Tapia, S.M., Nieto, L.M.G., Villareal, C.D.A., Puello, C.A.C., y García, O.A. Avances en Nutrición Acuícola VIII. VIII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 15–17 Noviembre. Universidad Autónoma de Nuevo León, México. ISBN 970-694-333-5.

Navarro-Guillén C., Moyano F. J., Yúfera M. (2015). Diel food intake and digestive enzyme production patterns in *Solea senegalensis* larvae. *Aquaculture*. Vol. 435:33-42.

Ng W. K., Abdullah N., De Silva S. S. (2008). The dietary protein requirement of the Malaysian mahseer, *Tor tambroides* (Bleeker), and the lack of protein-sparing action by dietary lipid. *Aquaculture*. Vol. 284:201-206.

Novelli B., Otero-Ferrer F., Diaz M., Socorro J. A., Caballero M. J., Molina-Domínguez L., Moyano F. J. (2016). Digestive biochemistry as indicator of the nutritional status during early development of the long snouted seahorse (*Hippocampus reidi*). *Aquaculture*. Vol. 464:196-204.

NRC (National Research Council). (2011). Nutrient Requirements of Fish and Shrimp. The National Academies Press, Washington D.C. 376 pp.

Okorie E., Kim Y., Lee S., Bae J., Yoo J. H., Han K., Bai S. C., Park G., Choi S. (2007). Reevaluation of the dietary protein requirements and optimum dietary protein to energy ratios in Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Journal of the World Aquaculture Society*. Vol. 38:418-426.

Olivotto I., Planas M., Simões N., Holt G., Avella M., Calado R. (2011). Advances in breeding and rearing marine ornamentals. *J. World Aquacult. Soc.* Vol. 42:135-166.

Qiang J., He J., Yang H., Yi-Lan S., Yi-Fan T., Xu P., Zhi-Xiang Z. (2017). Dietary lipid requirements of larval genetically improved farmed tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), and effects on growth performance, expression of digestive enzyme genes, and immune response. *Aquaculture Research*. Vol. 48:2827-2840.

Rahimnejad S., Bang I.C., Park L. Y., Sade A., Choi J., Lee S. M. (2015). Effects of dietary protein and lipid levels on growth performance, feed utilization and body composition of juvenile hybrid grouper, *Epinephelus fuscoguttatus* × *E. lanceolatus*. *Aquaculture*. 446:283-289.

Řičan O., Piálek L., Dragová K., Novák J. (2016). Diversity and evolution of the Middle American cichlid fishes (Teleostei: Cichlidae) with revised classification. *Vertebrate Zoology*. Vol. 66(1):1-102.

Robyt J. F., Whelan W. J. (1968). The α -amylase. In: Radley JA (ed) Starch and its derivatives. Chapman and Hall, London. Vol. 430–497 pp.

Rønnestad I., Yúfera M., Ueberschär B., Ribeiro L., Sæle Ø., Boglione C. (2013). Feeding behaviour and digestive physiology in larval fish: current knowledge, and gaps and bottlenecks in research. *Rev Aquac.* Vol. 5:S59-S98.

Ross L. G., Martínez-Palacios C. A., Morales E. J. (2008). Developing native fish species for aquaculture: the interacting demands of biodiversity, sustainable aquaculture and livelihoods. *Aquaculture Research*. Vol. 39:675-683.

Rotllant G., Moyano F. J., Andrés M., Estévez A., Díaz M., Gisbert E. (2010). Effect of delayed first feeding on larval performance of the spider crab *Maja brachydactyla* assessed by digestive enzyme activities and biometric parameters. *Mar Biol.* Vol. 157:2215-2227.

Saavedra M., Conceição L. E. C., Pousão-Ferreira P., Dinis M. T. (2006). Amino acid profiles of *Diplodus sargus* (L., 1758) larvae: implications for feed formulation. *Aquaculture.* Vol. 261:587-593.

Saavedra M., Grade A., Candeias-Mendes A., Pereira T. G., Teixeira B., Yúfera M., Conceição L. E. C., Mendes R., Pousão-Ferreira P. (2016). Different dietary protein levels affect meagre (*Argyrosomus regius*) larval survival and muscle cellularity. *Aquaculture.* Vol. 450:89-94.

Salhi M., Bessonart M., Chediak G., Bellagamba M., Carnevia D. (2004). Growth, feed utilization and body composition of black catfish, *Rhamdia quelen* fry fed diets containing different protein and energy levels. *Aquaculture.* Vol. 231:435-444.

Sankian Z., Khosravi S., Yi-Oh K., Sang-Min L. (2017). Effect of dietary protein and lipid level on growth, feed utilization, and muscle composition in golden mandarin fish *Siniperca scherzeri*. *Fisheries and Aquatic Sciences.* Vol. 20:2-6.

Sargent J. R., Tocher D. R., Bell J. G. (2002). The lipids, In: Halver, J.E., Hardy, R.W. (Eds.), *Fish Nutrition*, 3rd edn. Academic Press, San Diego, 181-246 pp.

Schulzi C., Böhm M., Wirth M., Rennert B. (2007). Effect of dietary protein on growth, feed conversion, body composition and survival of pike perch fingerlings (*Sander lucioperca*). *Aquaculture Nutrition.* Vol. 13:373-380.

Shearer K.D. (1994). Factors affecting the proximate composition of cultured fishes with emphasis on salmonids. *Aquaculture.* Vol. 119:63-88.

Silva P., Andrade C.A.P., Timóteo F.A. (2006). Dietary protein, growth, nutrient utilization and body composition of juvenile blackspot seabream, *Pagellus bogaraveo* (Brunnich). *Aquacult. Res.* Vol. 37:1007-1014.

Srivastava A. S., Kurokawa T., Suzuki T. (2002). mRNA expression of pancreatic enzyme precursors and estimation of protein digestibility in first feeding larvae of the Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* Vol. 132:629-635.

Storebakken T. (2002). Atlantic salmon, *Salmo salar*. In: Webster CD, Lim CE (eds) Nutrient Requirements and Feeding of Finfish for Aquaculture, CABI Publishing, Wallingford, Oxon, UK. 79–102 pp.

Su-Hua C., Min-Jie C., Jian-Zhen H., Guo-Ping W. (2011). Identification of a puromycin-sensitive aminopeptidase from zebrafish (*Danio rerio*). *Comparative Biochemistry and Physiology.* Vol. 159:10-17.

Suzer C.H., Kamacı O., Coban D., Yildirim S., Firat K., Saka S. (2013). Functional changes in digestive enzyme activities of meagre (*Argyrosomus regius*; Asso, 1801) during early ontogeny. *Fish Physiol Biochem.* Vol. 39:967-977.

Takakuwa F., Fukada H., Hosokawa H., Masumoto T. (2006). Optimum digestible protein and energy levels and ratio for greater amberjack *Seriola dumerili* (Risso) fingerling. *Aquaculture Research.* Vol. 37:1532-1539.

Tengjaroenkul B., Smith B. J., Smith S. A., Chatreewongsin U. (2002). Ontogenic development of the intestinal enzymes of cultured Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L. *Aquaculture.* Vol. 211:241-251.

Tocher D. R. (2010). Fatty acid requirements in ontogeny of marine and freshwater fish. *Aquac. Res.* Vol. 41:717-732.

Toledo-Solís F. J., Márquez-Couturier G., Uscanga-Martínez A., Guerrero-Zárate R., Perales-García N., Martínez-García R., Álvarez-González C. A. (2016). Partial characterization of digestive proteases of the three-spot cichlid *Cichlasoma trimaculatum* (Günter 1867). *Aquaculture Nutrition*. Vol. 22:1230-1238.

Toledo-Solís F. J., Uscanga-Martínez A., Guerrero-Zárate R., Márquez-Couturier G., Martínez-García R., Camarillo-Coop S., Perales-García N., Rodríguez-Valencia W., Gómez-Gómez M.A., Álvarez-González C. A. (2015). Changes on digestive enzymes during initial ontogeny in the three-spot cichlid *Cichlasoma trimaculatum*. *Fish Physiol Biochem*. Vol. 41:267-279.

Ueberschär B. (1995). The use of tryptic enzyme activity measurement as a nutritional condition index: laboratory calibration data and field application. In: Pittman, K.B., R.S., Verreth, J. (Eds.), *Mass Rearing of Juvenile Fish: a symposium held in Bergen, 21–23 June 1993* ICES Marine Science Symposia. ICES, Copenhagen. 119-129 pp.

Uscanga-Martínez A., Álvarez-González C. A., Contreras-Sánchez W. M., Márquez-Couturier G., Civera-Cerecedo R., Nolasco-Soria H., Hernández-Llamas A., Goytortúa-Bores E., Moyano F.J. (2012) Protein requirement in masculinized and non-masculinized juveniles of Bay Snook *Petenia splendida*. *Hidrobiológica*. Vol. 22:219-228.

Uscanga-Martínez A., Velázquez-Velázquez E., Gómez-Gómez M. A., Perales-García N., Rodríguez-Valencia W., Toledo-Solís F. J., López-Tapia C. L., Álvarez-González C. A., Aguilar-López E. (2015). Avances en el cultivo de la mojarra tahuina *Cichlasoma trimaculatum* (Actinopterygii: Perciformes: Cichlidae) en la Reserva de la Biosfera La Encrucijada, Chiapas. En: Velázquez-Velázquez E., Romero-Berny E.I., Rivera-Velázquez G. (Eds.) *Reserva de la Biósfera La Encrucijada, dos décadas de investigación para su conservación*. Colección Jaguar. Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas.

Versaw W., Cuppett S.L., Winters D. D., Williams L. E. (1989). An improved colorimetric assay for bacterial lipase in nonfat dry milk. *J Food Sci*. Vol. 54:232-254.

Violante G. J. (1995). Contribución al conocimiento de la biología de la mojarra nativa *Cichlasoma trimaculatum* (Gunter, 1868), en la laguna de Tres Palos Guerrero, México, y determinación del desarrollo larvario y requerimientos proteicos en condiciones de laboratorio. Tesis de maestría, pp. 70. Facultad de ciencias marinas, Universidad de Colima, Manzanillo, Colima, México.

Walter H. E. (1984). Proteinases: methods with hemoglobin, casein and azocoll as substrates. In: Bergmeyer HJ (ed) *Methods of enzymatic analysis*, vol V. Verlag Chemie, Weinham. 270-277 pp.

Wang Y. Y., Ma G. J., Shi Y., Liu D. S., Guo J. X., Yang Y. H., Chen C. D. (2013). Effects of dietary protein and lipid levels on growth, feed utilization and body composition in *Pseudobagrus ussuriensis* fingerlings. *Aquaculture Nutrition*. Vol. 19:390-398.

Wu X. Y., Gatlin D. M. (2014). Effects of altering dietary protein content in morning and evening feedings on growth and ammonia excretion of red drum (*Sciaenops ocellatus*). *Aquaculture*. Vol. 434:33-37.

Xu S., Zhang X., Liu P. (2018). Lipid droplet proteins and metabolic diseases. *BBA - Molecular Basis of Disease*. Vol. 1864:1968-1983.

Yáñez-Arancibia A. (1978). Taxonomía, Ecología y Estructura de las Comunidades de Peces en Lagunas Costeras con Bocas Efímeras del Pacífico de México, 1–306. Centro de Ciencias del Mar y Limnología, Universidad Autónoma de México, Publicaciones Especiales 2, Distrito Federal, México.

Yúfera M., Fernandez-Díaz C., Pascual E. (2005). Food microparticles for larval fish prepared by internal gelation. *Aquaculture*. Vol. 248:253-62.

Yúfera M., Moyano F. J., Martínez-Rodríguez G. (2018). The Digestive Function in Developing Fish Larvae and Fry. From Molecular Gene Expression to Enzymatic Activity. In: Yúfera M. (eds) *Emerging Issues in Fish Larvae Research*. Springer, Cham. 51-86 pp.

Zambonino-Infante J. L., Cahu C. L. (2001). Ontogeny of the gastrointestinal tract of marine fish larvae. *Comp Biochem Physiol* 130C:477-487.

Zambonino-Infante J. L., Gisbert E., Sarasquete C., Navarro I., Gutiérrez J., Cahu C. L. (2008). Ontogeny and physiology of the digestive system of marine fish larvae. In: Cyrino JEP, Bureau D, Kapoor BG (eds) *Feeding and digestive functions of fishes*. Oxford & IBH Publishing Co. Pvt. Ltd., New Delhi. 281-348 pp.

Zhang Y., Sun Z., Wang A., Ye C., Zhu X. (2017). Effects of dietary protein and lipid levels on growth, body and plasma biochemical composition and selective gene expression in liver of hybrid snakehead (*Channa maculata* ♀ × *Channa argus* ♂) fingerlings. *Aquaculture*. Vol. 468:1-9.

Zheng K., Zhu X., Han D., Yang Y., Lei W., Xie S. (2010). Effects of dietary lipid levels on growth, survival and lipid metabolism during early ontogeny of *Pelteobagrus vachelli* larvae. *Aquaculture*. Vol. 299:121-127.

7.3.- Capítulo III. Evaluación *in vitro* de la biodisponibilidad potencial de proteínas y lípidos en los ingredientes de los alimentos para la mojarra tahuina (*Amphilophus trimaculatus*)

Toledo-Solís F.J.¹, Saenz de Rodrigáñez M.², Díaz M.³, Martínez-García R.¹, Peña E.^{1,4}, Álvarez-González C.A.¹

¹Laboratorio de Acuicultura Tropical, División Académica de Ciencias Biológicas, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, 0.5 km Carretera Villahermosa-Cárdenas, C.P. 86039 Villahermosa, TAB, Mexico.

²Colección de Ictiología, Instituto de Ciencias Biológicas, Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas. CP. 29039. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, Mexico.

³Universidad de Almería, CEIMAR, Dept. Biología Aplicada, Escuela Politécnica Superior. Edificio CITE II-B, Campus universitario de la Cañada, 04120 Almería, Spain.

⁴Cátedra Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología-UJAT, Villahermosa, Tabasco, México

7.3.1.- RESUMEN

En el desarrollo del cultivo de peces nativos, como *Amphilophus trimaculatus*, es importante disponer de un conjunto de ingredientes proteicos y lipídicos apropiados para la elaboración de alimentos que permitan optimizar el cultivo a costos accesibles. Para ello, se evaluó la digestibilidad *in vitro* utilizando extractos enzimáticos de juveniles de *A. trimaculatus* por medio del pH-stat. La digestión de los ingredientes proteicos se realizó en condiciones ácidas y alcalinas, cuantificándose el total de aminoácidos libres al finalizar las hidrólisis. En los ingredientes lipídicos la digestibilidad se evaluó solamente en condiciones alcalinas. Las enzimas digestivas de los peces mostraron una mayor afinidad por las materias primas de origen animal; siendo de los ingredientes proteicos la harina de carne de res, la harina de pescado y la harina ave premium las que presentaron una mejor digestibilidad. Por su parte, los ingredientes lipídicos que podrían ser utilizados son los aceites de origen de pescado. No se descarta la posibilidad de integrar utilizar ingredientes de origen vegetal, como la soya o algunos cereales; así como aceites vegetales de oliva, maíz o soya. Es necesario complementar este estudio *in*

vitro con los análisis de digestibilidad *in vivo*, a fin de determinar los porcentajes de inclusión en los alimentos, así como los costos de los mismos para desarrollar de una fórmula optimizada para el cultivo de *A. trimaculatus*.

PALABRAS CLAVES: Digestibilidad *in vitro*, *A. trimaculatus*, pH-stat, Proteínas, Lípidos.

7.3.2.- INTRODUCCIÓN

Los alimentos de las especies piscícolas cultivadas, deben diseñarse considerando sus características biológicas (hábitos alimenticios, requerimientos nutricionales, fisiología digestiva, etc.), con el fin de obtener una asimilación eficiente de nutrientes y promover el mejor rendimiento posible (Moyano *et al.*, 2014; Peña *et al.*, 2017). En este sentido, las proteínas y los lípidos son considerados nutrientes prioritarios para el crecimiento y desarrollo de los peces (Tocher, 2010; Chatzifotis *et al.*, 2012; Wu and Gatlin, 2014; Xu *et al.*, 2018). Los cuales, han sido mayormente proporcionado por la harina y el aceite de pescado, situación que ha cambiado en los últimos años debido a que su disponibilidad ha disminuido por causa de la demanda creciente que ha incrementado enormemente su costo de adquisición (FAO, 2014; Castillo-Lopez *et al.*, 2016; Tibbetts *et al.*, 2017). Es por ello, que en los alimentos de las especies en cultivo y especialmente los que están en fase de desarrollo, se buscan alternativas para reemplazar la harina y el aceite de pescado por diferentes ingredientes de origen animal y vegetal (Tacon and Metian, 2008; Desai *et al.*, 2012; Castillo-Lopez *et al.*, 2016). Dada la gran variabilidad en el perfil de nutrientes de estos ingredientes en función de su origen, lote de producción o tecnología de procesado (Lemos & Tacon, 2011; Tibbetts *et al.*, 2011b), resulta fundamental establecer algún tipo de evaluación nutricional fiable y estandarizada adaptada a las condiciones de la especie de interés. En este sentido se aplican los ensayos de digestibilidad *in vivo* (Cho *et al.*, 1982) e igualmente sus alternativas *in vitro*.

Los ensayos de digestibilidad *in vitro*, dado su bajo costo, ausencia de restricciones éticas y relativa sencillez de ejecución, se emplean rutinariamente para una evaluación preliminar que permita la selección de ingredientes en función de su valor nutritivo potencial, tanto en

diferentes especies de animales terrestres como en acuáticos (Boissen & Eggum, 1991; Hamdan *et al.*, 2009; Moyano *et al.*, 2014). El pH-stat es una metodología ampliamente utilizada en la evaluación *in vitro* de la bioaccesibilidad de proteína y lípidos en nutrición animal y humana (McClements & Li, 2010; Williams *et al.*, 2012; Wooster *et al.*, 2014; Mat *et al.*, 2018), la cual ha sido adaptada para su empleo en especies acuícolas en varios estudios (Tibbetts *et al.*, 2011a; Li *et al.*, 2011; Peña *et al.*, 2017). El fundamento de la técnica se basa en cuantificar el grado de hidrólisis de los ingredientes a partir del consumo de ácido o base requeridos para mantener constante el pH de la reacción, el cual varía como resultado de la hidrólisis de los enlaces peptídicos de una proteína o de los enlaces ésteres de los lípidos por parte de las enzimas digestivas. Los ingredientes que dispongan de una mejor bioaccesibilidad para la acción enzimática tendrán elevados grados de hidrólisis, lo que se correlaciona con una mayor biodisponibilidad potencial de los nutrientes para ser asimilados por el organismo. En diversos estudios realizados en especies piscícolas, las medidas de hidrólisis de ingredientes proteicos por pH-stat, se han complementado con la cuantificación de los aminoácidos liberados durante dicha hidrólisis. De esta manera, estos estudios proporcionan una visión más completa sobre la biodisponibilidad potencial de los mismos, ayudando a la selección de ingredientes. Tal es el caso de *Atractosteus tropicus* (Frías-Quintana *et al.*, 2010), *Gadus morhua* (Tibbetts *et al.*, 2011b), *Cichlasoma urophthalmus* (Cuenca-Soria *et al.*, 2013), *Oncorhynchus mykiss*, *Rachycentron canadum*, and *Oreochromis niloticus* (Yasumaru & Lemos, 2014) y del pargo *Lutjanus guttatus* (Peña *et al.*, 2017).

En otro orden de ideas, la mojarra tahuina (*Cichlasoma trimaculatum* Günther, 1867), la cual nombrada recientemente por Řičan *et al.*, (2016) como *Amphilophus trimaculatus*, es una de las especie de cíclidos nativos con valor comercial en la costa del Pacífico Sur de México. Esta especie eurihalina de hábitos omnívoros con tendencia carnívora, cumple con muchos de los criterios de selección de las especies con potencial acuícola (Yáñez-Arancibia, 1978; Violante 1995; Miller *et al.*, 2005; Álvarez-Lajonchère *et al.*, 2011). A pesar de haberse logrado reproducir en cautiverio y de haberse investigado distintos aspectos de su fisiología digestiva en larvas y juveniles (Uscanga-Martínez *et al.*, 2015; Toledo-Solís *et al.*, 2015, 2016), se siguen desconociendo muchos aspectos prácticos de su nutrición en diferentes etapas de cultivo. Uno de ellos, es la selección de los ingredientes apropiados para la elaboración de fórmulas que

puedan optimizar el crecimiento a un costo accesible. Con dicho propósito y para garantizar la factibilidad de dichas formulas, se evaluaron un amplio número de materias primas, tanto proteicas como lipídicas, que podrán ser utilizadas en la formulación de los alimentos para esta especie. Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo es realizar una evaluación de la calidad nutritiva potencial de diferentes ingredientes proteicos y lipídicos disponibles en la región, con el fin de encontrar candidatos óptimos para las fórmulas de juveniles de *A. trimaculatus*, empleando para ello la metodología pH-stat y la cuantificación de aminoácidos libres totales.

México.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.

7.3.3.- MATERIALES Y METODOS

7.3.3.1.- Ingredientes proteicos y lipídicos

Se evaluaron un total de 16 harinas proteicas, así como 8 ingredientes lipídicos, tanto de origen animal como vegetal, obtenidos de diferentes proveedores (Tablas 1 y 2).

Tabla 1. Ingredientes proteicos de origen animal y vegetal la digestibilidad *in vitro* en juveniles de *A. trimaculatus*.

No	Ingredientes proteicos	Abreviatura	Proteína (%)	Humedad (%)
1	Caseína ¹	Cas	90.0	2.0
2	Hemoglobina ¹	Hm	90.0	2.0
3	Gluten de maíz ⁴	CGM	61.5	9.4
4	Gluten de trigo ²	WGM	75.0	10.0
5	Harina de ave Premium ⁵	FWM	65.0	4.5
6	Harina de cabeza de camarón ⁵	SHM	28.0	5.0
7	Harina de calamar ⁵	SM	75.0	5.0
8	Harina de carne de res ⁴	MBM	43.7	6.6
9	Harina de carne y viseras de pollo ⁴	PM	60.0	5.1
10	Harina de pescado ⁵	FM	66.0	6.8
11	Harina de sangre de res ⁷	BBM	64.0	5.0
12	Harina de sorgo ³	SGM	8.9	14.0
13	Harina de soya ⁴	SBM	46.8	11.6
14	Harina de trigo ³	WM	12.4	12.8
15	Hidrolizado de pescado ⁶	HFM	72.0	8.0
16	Pasta de soya ³	SB	49.2	6.02

1) Sigma-Aldrich. 2) Glútenes de México S.A. de C.V. Estado de México, México. 3) Empresa GALMEX S.A. en Villahermosa, Tabasco, México. 4) Planta de alimentos Consorcio Súper en Guadalajara, Jalisco, México. 5) Proteínas Marinas y Agropecuarias S.A. de C.V., Guadalajara, Jalisco, México. 6) CCP Noruega. 7) Rastro de Texcoco, Estado de México, México.

Tabla 2. Ingredientes lipídicos de origen animal y vegetal para la digestibilidad *in vitro* en juveniles de *A. trimaculatus*.

No	Lipid ingredients	Abbreviation
1	Salmon oil ¹	SALM
2	Fish oil ¹	FISH
3	Beef bait ²	BEEF
4	Cod liver oil ³	COD
5	Olive oli (Ybarra) ⁴	OLIV
6	Corn oil (Maceite) ⁵	CORN
7	Soy oil (Nutrioli) ⁶	SOY
8	Safflower oil (Oléico) ⁷	SAFF

1) Proteínas Marinas y Agropecuarias S.A. de C.V., Guadalajara, Jalisco, México. 2) Unión Ganadera de Tabasco, Villahermosa, Tabasco. 3) Farmacia París S.A. de C.V. Villahermosa, Tabasco. 4) Ybarra Comercial de México, S.A. de C.V. México D.F. 5) Promotora de Productos y Mercados Mexicanos, S.A. de C.V., Guadalajara, Jalisco. 6) Ragasa, Proteínas Naturales S.A. de C.V. Guadalupe, Nuevo León. 7) Oléico® Coral Internacional S.A. de C.V. San Luis Potosí, San Luis Potosí.

7.3.3.2.- Material biológico y preparación de extractos enzimáticos

Los juveniles de *A. trimaculatus* se obtuvieron del Laboratorio de Nutrición y Producción Acuícola del Centro de Investigaciones Costeras de la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas. Los peces se mantuvieron en sistemas de recirculación y se alimentaron a saciedad aparente con alimento Silver Cup® Pedregal (32% de proteína y 5% de lípidos) tres veces al día. Se sacrificaron 21 juveniles con peso húmedo de 42.21 ± 15.18 g mediante una sobredosis de MS-222. Enseguida se realizó una disección en frío para extraer estómagos e intestinos utilizados para la preparación de los extractos enzimáticos. Estos se homogenizaron por separado en frío con agua destilada en una relación 200 mg/ml (p/v) usando un homogenizador eléctrico Ultra Turrax® Ika T18 Basic. Después fueron sometidos a pulsos de ultrasonidos mediante un disruptor sónico (Ultrasonic FS-250N; Thermo scientific®) por un tiempo total de 48 segundos, en intervalos de 8s a una frecuencia de 65 Hz. Los extractos de estómago se ajustaron a pH 3.4 y los de intestino a pH 7.9, centrifugándose a 16,000 g a 4 °C por 30 min en una centrifuga Eppendorf® 5810-R, con rotor F45-3011. Se recuperó el sobrenadante y se almacenaron alícuotas en tubos eppendorf de 0.5 ml a -20 °C hasta su posterior utilización.

7.3.3.3.- Proteína soluble y actividad enzimática de los extractos

La concentración de proteína soluble en los extractos se determinó de acuerdo a la metodología descrita por Bradford, (1976) utilizando albúmina bovina sérica como estándar. La actividad total de las proteasas ácidas se midió en los extractos de estómago utilizando hemoglobina al 1% como sustrato en una solución glicina-HCl 100 mM L⁻¹ pH 2.0 (Anson, 1938). La actividad total de las proteasas alcalinas en extractos intestinales se midió con la técnica descrita por Kunitz, (1947) modificada por Walter, (1984), usando como sustrato caseína al 1% en solución tris-HCl 100 mM L⁻¹ + CaCl₂ 20 mM L⁻¹ pH 9.0. La actividad de lipasa se midió con la técnica descrita por Versaw *et al.*, (1989), usando como sustrato β-naftil caprilato a 100 mM L⁻¹. Todas las actividades obtenidas se expresaron empleando las siguientes ecuaciones: 1) Unidad por ml = (Δabs 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.

7.3.3.4.- Determinación del grado de hidrólisis (GH)

Las medidas de hidrólisis proteica o lipídica se llevaron a cabo utilizando un pH-Stat Titrand 902 (Metrohm®, Suiza). La determinación del grado de hidrólisis para los ingredientes proteicos vegetales y animales se realizó de acuerdo a la metodología propuesta por Saunders *et al.*, (1972), modificado por Dimes y Haard, (1994), evaluándose bien bajo condiciones que simulaban la digestión ácida estomacal o bien la digestión alcalina intestinal. En la evaluación de cada ingrediente se utilizaron 8 mg de proteína suspendidos en 5 ml de agua destilada con agitación continua, a una temperatura constante de 37 °C. La digestión de la fase ácida duro 900 seg y se utilizaron 10 µl de extracto de estómago (87 U/ml de actividad). La reacción se corrió a un pH 3.5 y cada 100 seg se cuantifico el consumo de HCl al 0.1N para mantener ajustado el pH de reacción. La digestión de la fase alcalina duro 2700 seg y se utilizaron 110 µl de extracto de intestino (30.5 U/ml de actividad). La reacción se corrió a un pH 8.0 y cada 300 seg se cuantifico el consumo de NaOH 0.1N para mantener ajustado el pH. Para cada ingrediente se realizó un blanco con agua destilada con objeto de evaluar la autohidrólisis y todos los ensayos se realizaron por triplicado.

El grado de hidrólisis de la reacción se expresó en porcentaje y se calculó mediante la ecuación: $GH (\%) = (h / h_{tot}) * 100$, en donde: h= número de enlaces peptídicos hidrolizados y h_{tot}= número

de enlaces peptídicos totales del sustrato proteico. El número de enlaces peptídicos hidrolizados se calcula con la ecuación: $h = b * Nb * (1/\alpha) * (1/MP)$ en donde: b = consumo en ml de HCl o NaOH, Nb = normalidad de HCl o NaOH, α = constante de disociación de los grupos α -NH₂ y MP = masa de proteína en la mezcla de reacción. Por otra parte, los valores de GH se expresaron como porcentaje relativo utilizando como referencia los datos obtenidos para la hemoglobina en la fase ácida y la caseína en la fase alcalina, y que en ambos casos fueron considerados 100%.

7.3.3.5.- Determinación total de aminoácidos libres (TFA)

Al finalizar todas las digestiones, se tomaron 60 μ l de muestra de la mezcla las cuales se congelaron a -20 °C hasta su posterior análisis para cuantificar la liberación total de aminoácidos (Total Free Amino acids; TFA). La determinación se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Church *et al.*, (1983) basada en la conjugación del grupo amino terminal de los aminoácidos con *o*-phthaldialdehyde (OPA). La solución OPA se preparó con 25 ml de tetraborato sódico 100 mM, 5 ml de SDS 20%, 16.4 mg de OPA disuelto en 1 ml de metanol, 400 μ l de β -mercaptoetanol y se ajustó el volumen de 100 ml con agua destilada. Las muestras colectadas en la digestión se descongelaron y se centrifugaron a 16 000 g por 15 min a 25°C. Se tomaron 10 μ l del sobrenadante y se colocaron en la microplaca, en donde se mezcló con 190 μ l del reactivo OPA. Se incubó y agitó por 3 min a temperatura ambiente, leyéndose a 340 nm en un Fluoroskan ascent FL Thermo® scientific. Para la cuantificación se usó una curva patrón de L-leucina. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

7.3.3.6.- Velocidad de hidrolisis (VH)

En el caso de los ingredientes lipídicos, el parámetro evaluado fue la velocidad de hidrolisis durante la digestión alcalina, de acuerdo a la metodología propuesta por Nolasco *et al.*, (2006). Las emulsiones contenían 2 g del aceite, 2.5 g de goma arábica y 47.5 ml de agua destilada; mezclándose por 10 min con un homogenizador IKA T18 basic 5 rpm. Posteriormente se tomaron 5 ml de la emulsión, se mezclaron con 7 ml de tauricolato de sodio a 20 mM, 2 ml de NaCl a 1 mM, 1 ml de CaCl₂ a 20 mM y se ajustó a un pH 8.0. En las reacciones se utilizaron 200 μ l de extracto de intestino (212 U/ml de actividad), a una temperatura de 37 °C durante 30 min en agitación constante. El consumo de NaOH 0.1 N para mantener constante el pH de la reacción se registró cada 300 seg. Todos los ensayos se realizaron por triplicado, realizando los

blancos con agua destilada para medir el nivel de autohidrólisis en ausencia del extracto enzimático. La cuantificación de la velocidad de hidrolisis se calculó de acuerdo a la ecuación: $VH = ((P-T) * (Cp) / (Ct * E)) / 1000$, en donde P = Consumo de NaOH del lípido problema (ml/min), T = Consumo de NaOH del lípido testigo (ml/min), Cp = Concentración de NaOH, Ct = Volumen de la enzima (ml), E = Concentración de la proteína (enzima) en mg/ml. 1000 = factor de corrección.

7.3.3.7.- Análisis estadístico

Los valores de GH de los ingredientes proteicos y los de VH de los ingredientes lipídicos fueron previamente transformados por el arcoseno (\sqrt{x}) y se analizaron mediante un ANOVA. Cuando, se presentó diferencias significativas se aplicó la prueba a pots-hoc de Tukey, para encontrar la diferencia entre los ingredientes. Todos los análisis estadísticos se ejecutaron en el software STATGRAPHICS Centurión XVI, con un nivel de significancia de $p < 0.05$.

7.3.4.- RESULTADOS

7.3.4.1.- Digestibilidad *in vitro* de harinas proteicas (GH)

El grado de hidrólisis de las harinas vegetales y animales por las proteasas de *A. trimaculatus* tanto en digestión ácida como alcalina se resume en la figura 1. En condiciones ácidas, los valores de GH se situaron en un rango <2.5% y diferentes proteínas de origen animal presentaron valores superiores a la hemoglobina (control), destacando las harinas de carne de res (MBM), de pescado (FM), de ave premium (FWM) y de cabeza de camarón (SHM). Por otro lado, en condiciones alcalinas los valores de GH se situaron en un rango más estrecho <1.5% y sólo la harina de sorgo (SGM) presentó valores de GH similares a la caseína (control). En conjunto, las harinas de soya (SBM) y de sangre de res (BBM) presentaron valores aceptables bajo ambas condiciones de hidrólisis, mientras que las harinas derivadas de cereal (WGM y WM) p

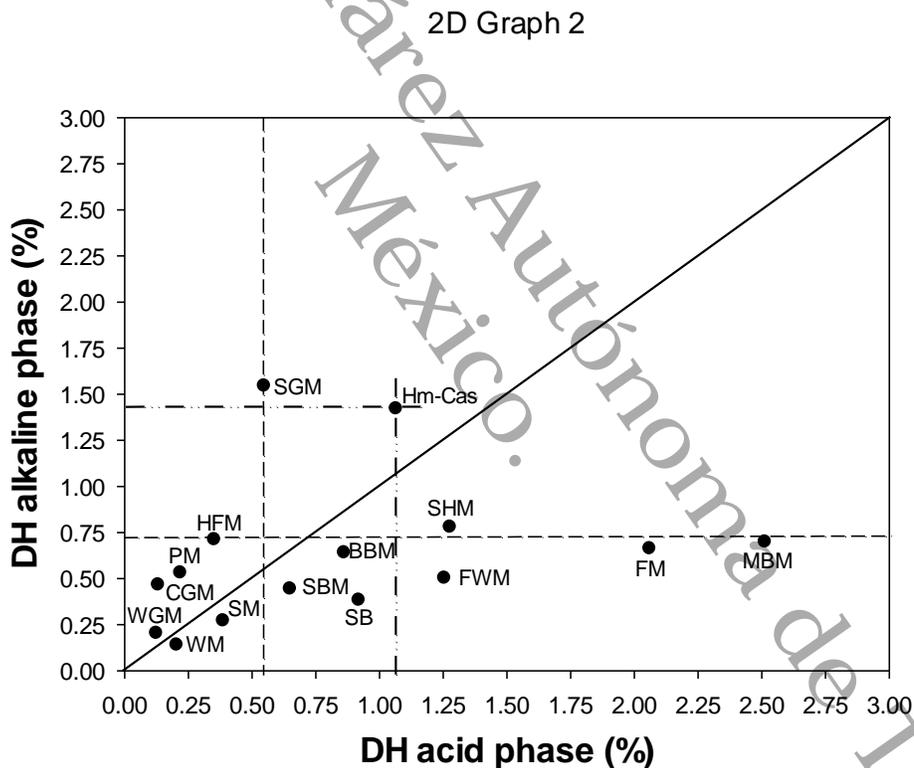


Figura 1. Digestibilidad *in vitro* de la digestión ácida y alcalina de harinas proteicas.

Harinas proteicas

Legend: WGM=Harina de trigo duro, WM=Harina de trigo blando, CGM=Harina de maíz, PM=Harina de carne y viseras de pollo, SM=Harina de calamar, SBM=Harina de soya, SB=Pasta de soya, SHM=Harina de cabeza de camarón, SM=Harina de calamar, MBM=Harina de carne de res, BBM=Harina de sangre de res, FM=Harina de pescado, HFM=Hidrolizado de pescado, FWM=Harina de ave premium, PM=Harina de carne y viseras de pollo.

Los valores de GH de las proteínas vegetales y animales, representados como porcentaje respecto a los controles de hemoglobina (hidrólisis ácida) o caseína (hidrólisis alcalina) se muestran en la figura 2. En conjunto se aprecia que para un mismo tipo de ingrediente los valores de GH bajo condiciones ácidas resultaron mayores que al ser hidrolizado en condiciones alcalinas, siendo particularmente destacables las diferencias en los casos antes mencionados de MBM, FM, SHM y FWM. Por contraste, las proteínas de sorgo (SGM), gluten de maíz (CGM) y soya (SBM) mostraron mayor susceptibilidad a la hidrólisis en condiciones alcalinas.

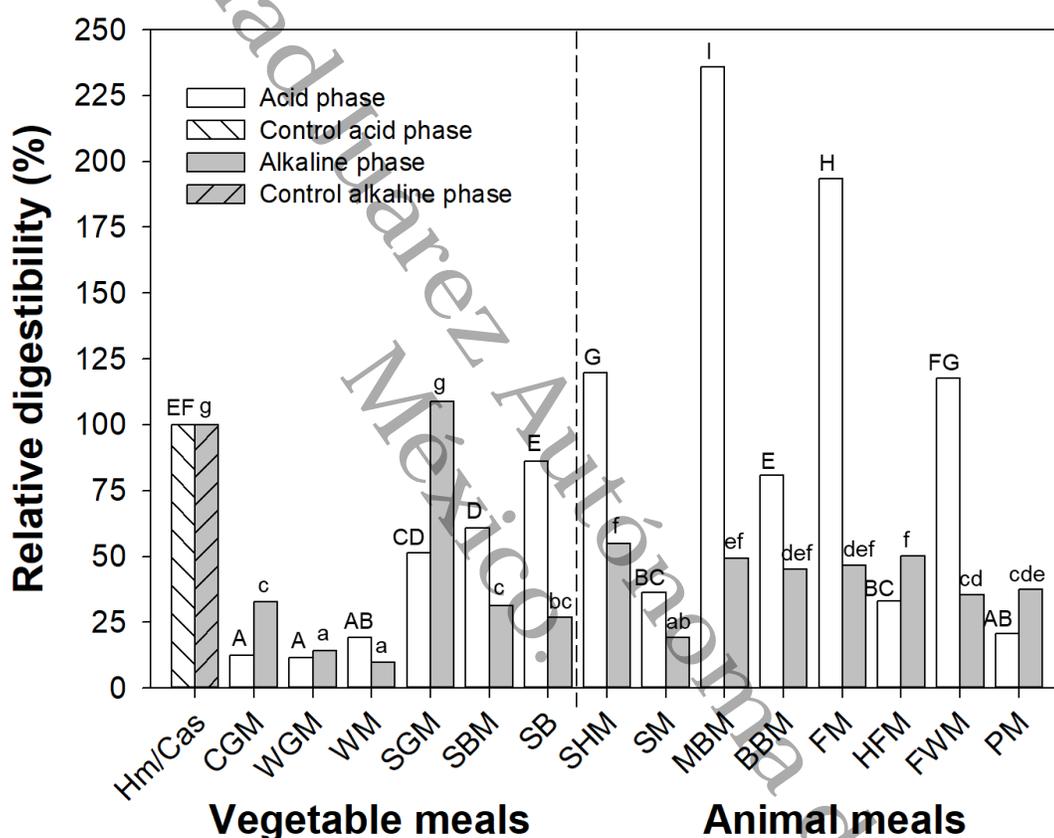


Figura 2. Digestibilidad relativa de las harinas vegetales y animales en las fases ácidas y alcalinas de la digestión de juveniles de *A. trimaculatus*. Hm/Cas = Hemoglobina/Caseína, CGM=Gluten de maíz, WGM=Gluten de trigo, WM=Harina de trigo, SGM=Harina de sorgo, SBM=Harina de soya, SB=Pasta de soya, SHM=Harina de cabeza de camarón, SM=Harina de calamar, MBM=Harina de carne de res, BBM=Harina de sangre de res, FM=Harina de pescado, HFM=Hidrolizado de pescado, FWM=Harina de ave premium, PM=Harina de carne y viseras de pollo.

Los ingredientes proteicos presentan una menor cantidad de TFA en la digestión ácida frente a la alcalina, pero no existe una relación entre los valores de TFA y de GH (Fig. 3). Esta es diferente en función del tipo de hidrólisis (ácida y alcalina) y el origen de los ingredientes

proteicos. Por lo tanto, los de origen vegetal presentan patrones bajos de TFA y son muy similares en ambos tipos de hidrólisis (ácidas y alcalinas). En donde, las proteínas con valores elevados de TFA y bajo GH (CGM y WGM) y los que presentan el patrón contrario (valores bajos de TFA y elevados de GH) como SBM en la hidrólisis ácida, mantienen los mismos patrones en la hidrólisis alcalina. Por el contrario, en los ingredientes de origen animal no se mantiene un patrón equivalente, de manera que ingredientes que presentan valores bajos de TFA y elevados de GH en hidrólisis ácida (MBM, FWM, SHM) muestran valores elevados de TFA y bajos GH en la hidrólisis alcalina.

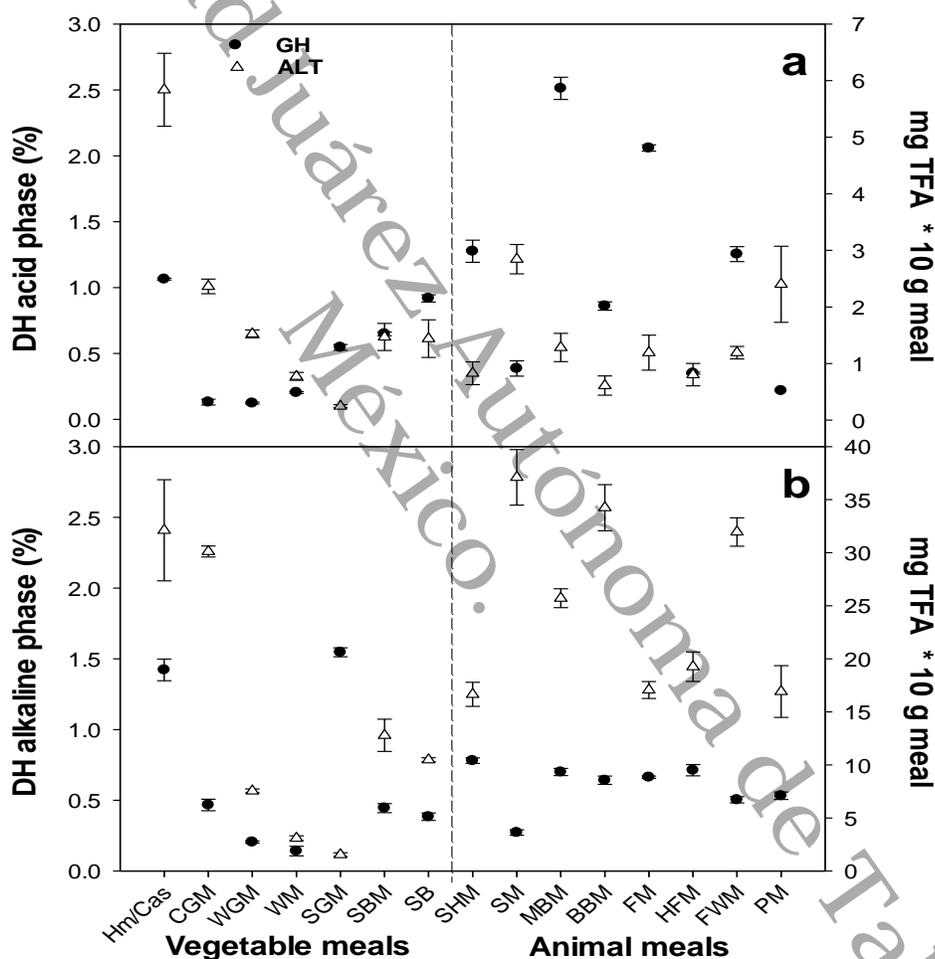


Figura 3. Grado de hidrólisis y total de aminoácidos libres de ingredientes proteicos en condiciones ácidas (a) y alcalinas (b) de juveniles de *A. trimaculatus*. Hm/Cas = Hemoglobina/Caseína, CGM=Gluten de maíz, WGM=Gluten de trigo, WM=Harina de trigo, SGM=Harina de sorgo, SBM=Harina de soya, SB=Pasta de soya, SHM=Harina de cabeza de camarón, SM=Harina de calamar, MBM=Harina de carne de res, BBM=Harina de sangre de res, FM=Harina de pescado, HFM=Hidrolizado de pescado, FWM=Harina de ave premium, PM=Harina de carne y viseras de pollo.

Los valores de TRA se normalizaron para la hidrólisis ácida y alcalina con respecto a los controles de hemoglobina y caseína respectivamente (fig. 4). En donde, se puede evidenciar que la liberación de aminoácidos es baja para todos los ingredientes en la hidrólisis ácida, a excepción del gluten (CGM) que resulta significativamente mayor para algunas de las proteínas de origen animal durante la hidrólisis alcalina. En esta hidrólisis destacan las elevadas cantidades de TRA producidas por las harinas de calamar (SM), sangre de res (BBM) y harina de ave premium (FWM).

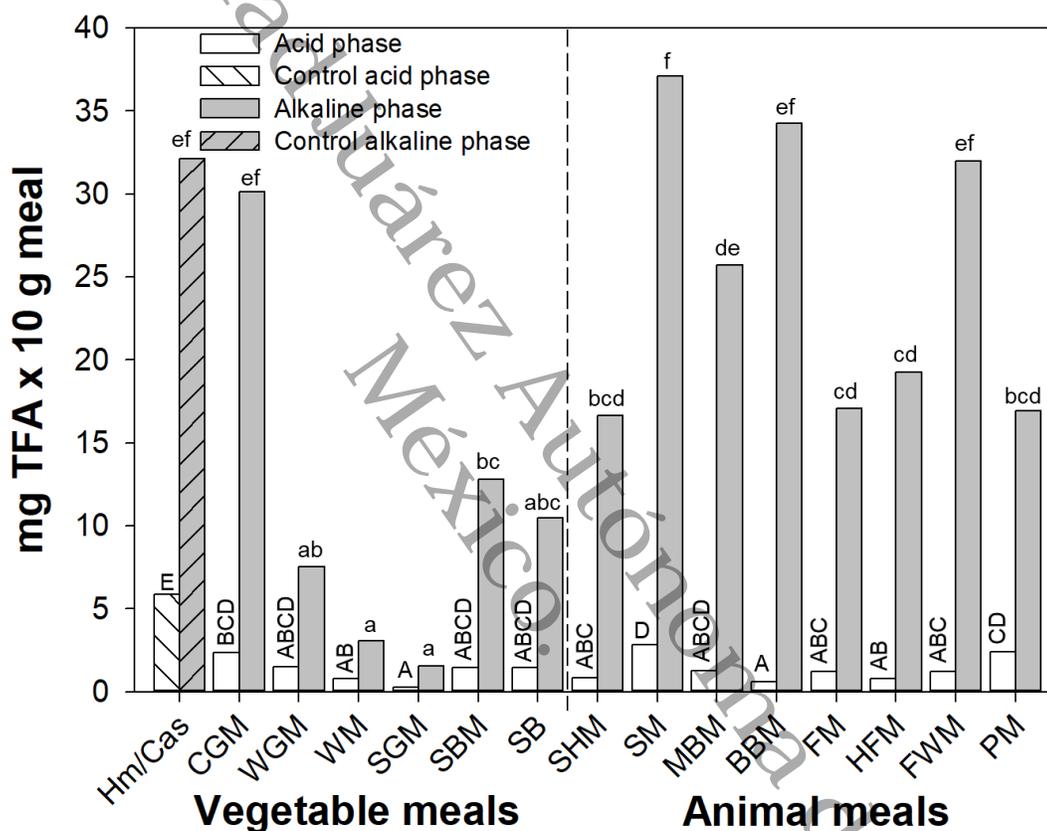


Figura 4. Total de aminoácidos libres de las harinas vegetales y animales en la fase ácida y alcalina de la digestión de juveniles de *A. trimaculatus*. Hm/Cas = Hemoglobina/Caseína, CGM=Gluten de maíz, WGM=Gluten de trigo, WM=Harina de trigo, SGM=Harina de sorgo, SBM=Harina de soya, SB=Pasta de soya, SHM=Harina de cabeza de camarón, SM=Harina de calamar, MBM=Harina de carne de res, BBM=Harina de sangre de res, FM=Harina de pescado, HFM=Hidrolizado de pescado, FWM=Harina de ave premium, PM=Harina de carne y viseras de pollo.

Para tener una selección más factible de las materias primas, se realizó una clasificación de los distintos ingredientes proteicos utilizando los valores de GH y TRA (Tabla 3). Para ello se establecieron dos categorías alto/bajo considerando altos los valores de GH > 1.5% y los de TRA > 18.98 mg/10 g harina. De este modo se identificaron ingredientes con elevados valores de ambos índices, indicativos tanto de una alta bioaccesibilidad de la proteína a la acción de las enzimas como generadores de una alta biodisponibilidad de aminoácidos como MBM, FWM y BBM. En el extremo opuesto, se encontrarían ingredientes con baja susceptibilidad a la hidrólisis o la liberación de aminoácidos, tales como SBM, WM y WGM.

Tabla 3. Selección de los ingredientes proteicos de acuerdo a los valores de GH (bioaccesibilidad) y TFA (biodisponibilidad), para la formulación de alimentos específicos de juveniles de *A. trimaculatus*.

(GH – TFA)	GH (ALTO)	GH (BAJO)
ALT (ALTO)	MBM (4.06 - 27.00) Hm/Cas (2.84 - 37.95) FWM (2.18 - 33.15) BBM (1.79 - 34.85)	HFM (1.18 - 20.06) PM (0.82 - 19.31) SM (0.79 - 39.95) CGM (0.64 - 32.48)
TFA (BAJO)	FM (3.41 - 18.25) SHM (2.48 - 17.48) SGM (2.28 - 1.79) SB (1.61 - 11.92)	SBM (1.31 - 14.26) WM (0.41 - 3.87) WGM (0.37 - 9.07)

Hm/Cas = Hemoglobina/Caseína, CGM = Gluten de maíz, WGM= Gluten de trigo, FWM = Harina de ave premium, SHM = Harina de cabeza de camarón, SM = Harina de calamar, MBM = Harina de carne de res, PM = Harina de carne y viseras de pollo, FM = Harina de pescado, BBM = Harina de sangre de res, SGM = Harina de sorgo, SBM = Harina de soya, WM = Harina de trigo, HFM = Hidrolizado de pescado, SB = Pasta de soya. La categoría alto corresponde valores de GH >1.42% y valores de TFA >18.98 mg ALT x 10 g de harina.

7.3.4.2.- Digestibilidad *in vitro* de aceites (VH)

La velocidad de hidrólisis de los aceites de origen vegetal y animal obtenida con los extractos enzimáticos de juveniles de *A. trimaculatus* se muestra en la figura 6. Para cada aceite se representa tanto el porcentaje de la VH medido en ausencia de enzima, el cual correspondería a la cantidad de ácidos grasos libres presentes en la muestra (blanco); como el porcentaje adicional resultante de la hidrólisis enzimática. Los valores del blanco se situaron en un rango amplio, siendo relativamente bajos para los aceites de oliva y salmón (<30% del VH total), pero muy elevados para los aceites de cártamo y sebo res (>50% VH total). En la mayoría de los valores de VH son significativamente más elevados en los aceites de origen animal que a los aceites de origen vegetal.

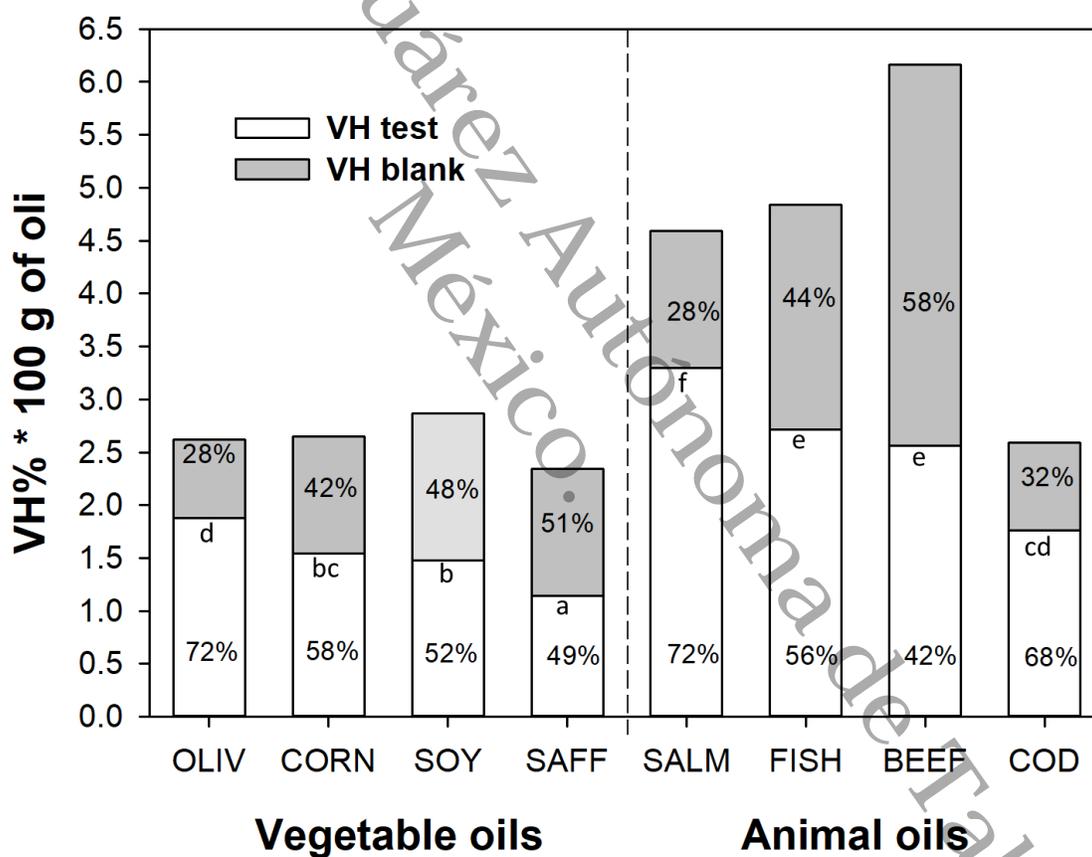


Figura 6. Velocidad de hidrólisis de aceites vegetales y animales en la digestión alcalina de juveniles de *A. trimaculatus*. OLIV=Olive oil (Ybarra); CORN=Corn oil (Maceite); SOY=Soy oil (Nutrioli); SAFF=Safflower oil (Oléico); SALM=Salmon oil1; FISH=Fish oil1; BEEF=Beef tallow; COD=Cod liver oil.

7.3.5.- DISCUSIÓN

7.3.5.1.- Digestibilidad *in vitro* de harinas proteicas (GH)

Los ensayos de digestibilidad *in vitro* con pH-stat se han aplicado desde hace varios años en la evaluación de ingredientes para ser utilizados en alimentos acuícolas en crustáceos como en *Litopenaeus vannamei* (Marina *et al.*, 1997; Ezquerro, 1998), *Farfantepenaeus paulensis* (Lemos *et al.*, 2004), moluscos *Haliotis midae* (Shipton & Britz, 2002) y también en peces *Oncorhynchus mykiss*, *Rachycentron canadum* and *Oreochromis niloticus* (Yasumaru & Lemos, 2014), *Lates calcarifer* (Lewis *et al.*, 2018). En la mayor parte de estos trabajos se simuló la etapa alcalina de la hidrólisis digestiva, obviándose el efecto que la hidrólisis ácida puede ejercer sobre las proteínas, circunstancia que puede ser relevante como se ha descrito con anterioridad (Alarcón *et al.*, 2002). Es por ello, que se planteó una evaluación comparada de la hidrólisis de los ingredientes en condiciones que simulaban la digestión ácida y alcalina, llevadas a cabo con enzimas de juveniles de *A. trimaculatus*. Esto con el objetivo de establecer hasta qué punto la ausencia de una digestión del estómago bien establecida, podría influir en la utilización nutritiva de una determinada proteína. De esta forma, en los ensayos de simulación digestiva con pH-stat, lo que se pone en manifiesto son las diferencias de la bioaccesibilidad de los sustratos (proteínas y lípidos) facilitada por la hidrólisis que realizan las enzimas digestivas de la especie en estudio. En el caso de las proteínas, esta susceptibilidad a la hidrólisis enzimática depende también de un cierto número de factores entre los que destacan:

La composición de aminoácidos: una proporción mayor o menor de aminoácidos polares influye fuertemente en la solubilidad y por tanto en la facilidad para exponer los enlaces peptídicos a la potencial acción de las enzimas (Jonge *et al.*, 2009). Igualmente, el contenido en aminoácidos susceptibles a la acción específica de las proteasas como de lisina y arginina para el caso de tripsina, y de aminoácidos aromáticos para la pepsina o quimotripsina (Belitz *et al.*, 2009); puede determinar una mayor posibilidad de fragmentación de la cadena proteica. Por otra parte, la gran diversidad de pKa que presentan los grupos carboxilo y amino en los diferentes aminoácidos, determinan una mayor predisposición a la precipitación de dicha proteína en función del pH y fuerza iónica del medio (Belitz *et al.*, 2009). En este sentido, en el presente estudio se ha comprobado que las hidrólisis realizadas en un medio ácido simulando la digestión del estómago del pez, se determinaron valores de GH elevados sobre todo en las materias primas

de origen animal. Siendo en algunos casos como la harina de carne de res (MBM), de pescado (FM), de cabeza de camarón (SHM) y de ave premium (FWM), valores superiores al control de hemoglobina. Una posible explicación es que bajo condiciones ácidas, se permite una mejor solubilidad de las proteínas, facilitando una mayor bioaccesibilidad para ser hidrolizadas por la enzima pepsina. Esta bioaccesibilidad también se ha encontrado en otras metodologías *in vitro* cuando se simula la digestión en condiciones ácidas, sobre todo en especies que presentan una actividad digestiva importante en el estómago (Hamdan *et al.*, 2009; Mat *et al.*, 2018). Cabe mencionar, que no todas las harinas de origen animal presentan buena bioaccesibilidad como son la harina de carne y vísceras de pollo (PM) y el hidrolizado de pescado (HFM).

En última instancia la solubilización de las materias primas, es influenciada por el pH, el punto isoeléctrico y la solución tamponada que se empleada en los ensayos (Amanda *et al.*, 2006; Morales *et al.*, 2013). Así como también a la proporción relativa de los diferentes tipos de proteína presentes en cada ingrediente. En las vegetelas, se han descrito que las albúminas presentan una mayor solubilidad en agua y las globulinas se solubilizan en presencia de iones (sales); ambas proteínas se encuentran mayoritariamente en las harinas de leguminosas (Osborne, 1924; Duranti, 2006; Vaz Patto *et al.*, 2015). Por su parte, las prolaminas y las glutelinas son mayoritarias en las harinas de cereales como harina de trigo, sorgo y maíz; las cuales son solubles en agua con alcohol y en soluciones ácidas o alcalinas respectivamente (Osborne, 1924; Duranti, 2006; Vaz Patto *et al.*, 2015). En el caso, de la harina y el gluten de trigo la proteína están compuesta mayoritariamente por prolaminas y glutelinas en aproximadamente 80% (Chavan *et al.*, 1989), lo cual podría explicar porque estos ingredientes presentaran peores valores de GH de todos los ingredientes (vegetales y animales) evaluados tanto la digestión ácida como en la alcalina, seguidos del gluten de maíz. Estos mismos ingredientes también han presentado bajos GHs en *Cichlasoma urophthalmus* (Cuenca-Soria *et al.*, 2013), la cual presenta una fisiología digestiva similar a *A. trimaculatus*. Por otra parte, el elevado valor de GH obtenido con la harina de sorgo (SGM) en la digestión alcalina resultó en principio sorprendente, dado que presenta igualmente una elevada proporción de prolaminas de 52% y glutelinas 34% (Amanda *et al.*, 2006; FEDNA, 2010). No obstante, precisamente los altos contenidos en ácidos glutámico y aspártico característicos de las prolaminas podrían explicar este resultado, ya que determinarían una elevada capacidad tampón debido a los valores

de pKa de estos aminoácidos (Belitz *et al.*, 2009), y por tanto un notable consumo de álcali (solución NaOH) que se traduciría en un valor alto de grado de hidrólisis. En contraste, el elevado contenido en albúminas y globulinas de aproximadamente 90% de la harina y la pasta de soya (Fukushima, 1991), podrían estar relacionados con los mejores valores de GH determinados para estos ingredientes.

El tratamiento térmico: en el caso de ingredientes que han sufrido algún tipo de tratamiento térmico, la rotura de puentes disulfuro modifica la estructura terciaria de las proteínas y en muchos casos reduce la accesibilidad de las enzimas a los lugares específicos de la cadena proteica donde podrían ejercer su acción hidrolítica. Por otra parte, de modo particularmente frecuente en los ingredientes de origen vegetal, el tratamiento térmico facilita la formación de compuestos de Maillard como resultado de la unión de algunos aminoácidos específicos (ej. Lisina) con residuos de azúcares (Martins *et al.*, 2001), lo que igualmente reduce el número de enlaces disponibles para hidrólisis por la tripsina. Esto podría explicar en cierta medida los bajos GHs de la harina de carne y viseras de pollo (PM), el hidrolizado de pescado (HFM) y harina de calamar (SM), ya que estas harinas pasan por un tratamiento térmico durante su proceso elaboración.

Presencia de factores anti-nutricionales: estos compuestos interfieren significativamente con la acción enzimática y por tanto con la digestión y la absorción de nutrientes (Francis *et al.*, 2001). En los productos proveniente de la soya se han documentado la presencia de inhibidores de proteasas como la tripsina, pero estos al ser termolábiles se han conseguido reducir con la exposición de las elevadas temperaturas durante el proceso de manufacturación de la harina o en la etapa de extrusión de los alimentos (Ebrahimi-Mahmoudabad & Taghinejad-Roudbaneh, 2011; Morales *et al.*, 2016; Peña *et al.*, 2017). Sin embargo, hay algunos que son termoestables como el ácido fítico (Storebakken *et al.*, 2000; Morales *et al.*, 2016) y en concentraciones elevadas pueden afectar la absorción de los minerales y la actividad de algunas enzimas digestivas, comprometiendo el crecimiento de los peces en cultivo (Barro *et al.*, 2002; Denstadli *et al.*, 2006; Fredlund *et al.*, 2006). Por lo tanto, los bajos valores de GHs en hidrólisis alcalina obtenidos con la harina de soya (SBM) y pasta de soya (SB) podría deberse a estos factores, pero este efecto no se detecta en la hidrólisis ácida. Este hecho coincide con lo descrito por

Morales *et al.*, (2016) en donde observa una posible inhibición de estos factores por el pH ácido y la predisposición a la actividad de la enzima pepsina. Esto indicaría que, en especies con una importante digestión estomacal como *Lutjanus argentiventris* y *Lutjanus novemfasciatus* (Alarcón *et al.*, 2001) y *Lutjanus guttatus* (Peña *et al.*, 2014) o en los propios juveniles de *A. trimaculatus* (Toledo *et al.*, 2015, 2016), se podría utilizar en bajas proporciones este tipo de ingredientes en los alimentos, ya que al pasar por el estómago se podría inactivar algunos de los factores de inhibición.

Las interacciones con otros componentes de la matriz alimentaria: la presencia en el alimento de carbohidratos fibrosos o de grasas, acomplejados física o químicamente con la fracción proteica, condiciona de manera importante la posibilidad de que las proteasas puedan ejercer su acción de manera rápida y eficaz, y también pueden ejercer un efecto tampón significativo. Este efecto podría explicar también el elevado GH medido en harina de sorgo (SGM), ya que se ha demostrado que las harinas vegetales con un elevado contenido de fibra presentan estas características y que en condiciones de evaluaciones *in vitro* podrían sobreestimarse la digestibilidad de estas materias primas (O'Hare *et al.*, 1984; Duodu *et al.*, 2003; Tibbetts *et al.*, 2011b).

7.3.5.2.- Relación entre GH ácido y alcalino

Idealmente, una proteína seleccionable como ingrediente debería mostrar un elevado GH tanto en condiciones ácidas como alcalinas. Sin embargo, ninguna de las harinas proteicas evaluadas en el presente estudio presentó dichas características. Como se indicaba anteriormente, en la mayoría de las harinas se registraron valores de GH más elevados en hidrólisis ácida frente a la hidrólisis alcalina. Por lo tanto, esto podría indicar que en esta especie, la digestión del estómago es un proceso de hidrólisis importante, para un mejor aprovechamiento de los ingredientes proteicos. Mientras que en la digestión alcalina podría estar más asociada a la hidrólisis de oligopéptidos y liberación de aminoácidos. Estas características, podrían ser próximas a los hábitos alimenticios descritos en otros estudios para esta especie (Miller *et al.*, 2005; Toledo *et al.*, 2015, 2016).

7.3.5.3.- Relación entre GH y TFA

Como se ha indicado con anterioridad, uno de los principales objetivos de los estudios de digestibilidad *in vitro* es determinar la susceptibilidad a la hidrólisis de las fracciones proteicas de los ingredientes, pero estos resultados, pueden complementarse con una estimación de la biodisponibilidad potencial de los aminoácidos liberados, siendo ambos indicadores importantes en la valoración global (Yasumaru & Lemos, 2014). Es por ello, que se estimó la cantidad de TFA en hidrólisis en ambas fases, resultando la ácida menor en valor absoluto con respecto a la obtenida en la fase alcalina. Esto resulta lógico, si se considera que los extractos enzimáticos utilizados para simular la digestión de estómago contenían pepsina, una endopeptidasa cuya acción principal es romper fracciones de péptidos (Belitz *et al.*, 2009), en tanto que los extractos utilizados para simular la digestión intestinal de *A. trimaculatus* contenían una mezcla enzimática de endopeptidasas (tripsina, quimotripsina) y exopeptidasas (carboxipeptidasas y aminopeptidasas) según resultados reportados por Toledo-Solís *et al.*, (2016). En la fase alcalina, la harina de ave premium (FWM) y la harina de carne de res (MBM) muestran elevadas cantidades de TFA y GHs alcalinos, datos que se asemejan a los obtenidos en especie con hábitos alimenticios similares (Cuenca-Soria *et al.*, 2013); pero en especies de hábitos carnívoros como en *Lutjanus guttatus* la tendencia no es tan evidente (Peña *et al.*, 2017). Por otra parte, la propia naturaleza de los ingredientes, así como los procesos industriales empleados en su obtención, pueden determinar la existencia de cantidades variables de aminoácidos libres, que en algunos casos pueden resultar elevadas. Tal sería el caso de las harinas de calamar (SM), sangre de res (BBM), hidrolizados de pescado (HFM) y gluten de maíz (CGM).

7.3.5.4.- Selección de harinas proteicas por GH y TFA

La integración de los valores GH y TFA nos podrían servir para hacer un ranquin de materias primas más específico y de calidad para la formulación de alimentos de los organismos acuáticos. En este ensayo, las harinas que se presentan los mejores valores para juveniles de *A. trimaculatus* son la harina de ave premium (FWM), la harina de carne de res (MBM), harina de pescado (FM) y la harina de sangre de res (BBM), siendo el resultado más óptimo en harinas vegetales los productos de soya. Todas estas harinas ya se han evaluado, obteniendo distintos resultados en la sustitución parcial de la harina de pescado de los piensos para algunas especies como *Cyprinus carpio* (Emre *et al.*, 2003); *Diplodus puntazzo* (Hernández *et al.*, 2007);

Lateolabrax japonicus (Hu *et al.*, 2013); *Epinephelus coioides* (Wang *et al.*, 2017) y *Ictalurus punctatus* (García-Pérez *et al.*, 2018). Sin embargo, si se buscan algunas harinas proteicas para formular alimentos en algunas etapas de desarrollo, donde no se disponga de una buena capacidad digestiva pero si de absorción, podrían considerarse harinas con baja bioaccesibilidad pero que al final promuevan un aporte elevado de TFA a los organismos. En este caso, estas podrían ser el hidrolizado de pescado (HFM), la harina de carne y viseras de pollo (PM), la harina de calamar (SM) y el gluten de maíz (CGM). En este caso, habría que tomar en cuenta el perfil de aminoácidos que aportaran dichas materias primas en los alimentos con el fin de aportar los aminoácidos esenciales para no comprometer el crecimiento y el desarrollo de los organismos en cultivo (Nunes *et al.*, 2014). Por su parte, las harinas con niveles bajos de GH y ALT podrán ser descartadas por el bajo aporte nutricional, o bien podrían ser utilizadas únicamente para balancear las fórmulas de los alimentos. Por tanto, todos estos criterios de selección de materias primas asociados a las metodologías *in vitro* son de un contexto nutricional. Por ello, se tendría que evaluar la factibilidad de los ingredientes en base a la disponibilidad y los costos para cada zona. Así como otros estudios sobre los porcentajes de inclusión de estos ingredientes en la dieta, la digestibilidad *in vivo* de estas harinas y sobre todo el crecimiento de los organismos en cultivo.

7.3.5.5.- Digestibilidad *in vitro* de aceites (VH)

Actualmente se realizan muchas investigaciones para remplazar el aceite de pescado por aceites de origen vegetal debido a la demanda creciente y los costos de adquisición de esta materia prima (Turchini *et al.*, 2009). En este sentido, resulta de gran importancia determinar para una especie en concreta qué fuentes lipídicas presentan una mayor bioaccesibilidad a nivel digestivo y por tanto, un mayor potencial de absorción y posterior uso metabólico. La simulación de la digestión de lípidos con este objetivo es una tarea relativamente compleja respecto al caso de las proteínas, ya que en la misma, intervienen un mayor número de factores. En la hidrólisis de los lípidos se precisa en generar, una superficie de contacto “interfase” entre las lipasas y el sustrato lipídico mediante agentes emulsionantes. En donde, si la capacidad emulsionante para generar la interface es deficiente, la digestión de los lípidos y la liberación de los ácidos grasos puede verse obstaculizada (Baeverfjord *et al.*, 2006). Por su parte, esta interface de contacto puede ser afectada por muchos factores, entre los que destacan las propiedades físicas de los

ingredientes lipídicos, la cantidad de fosfolípidos presente en los aceites, el tipo de sales biliares, la concentración y relación de CaCl_2 y NaCl_2 en la reacción, el tamaño de la micela, la estabilidad de la emulsión durante el proceso de hidrólisis, la temperatura, la velocidad de agitación, entre otros factores (Mun *et al.*, 2007; Hu *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2011; Chang and McClements, 2016).

Aunque la metodología pH-stat se ha utilizado ampliamente para simular la digestión de lípidos en humanos (Fatouros and Mullertz, 2008; Hur *et al.*, 2011; Day *et al.*, 2014; Li & McClements, 2014; Mat *et al.*, 2016), su aplicación equivalente para organismos acuáticos solo ha sido propuesta por Nolasco *et al.*, (2006). Es por ello que hasta el momento, no se ha reportado una evaluación de digestibilidad *in vitro* de lípidos mediante pH-stat, para generar un ranking de posibles aceites para la incorporación en alimentos de las especies acuáticas. Los pocos estudios que han evaluado la digestibilidad *in vitro* de lípidos, han sido de forma integrada en la matriz de los alimentos (Mat *et al.*, 2016) y la digestión de los lípidos en distintos segmentos del sistema digestivo con otra metodología *in vitro* (Koven *et al.*, 1997). Esto posiblemente es debido, en buena medida a la complejidad que implica considerar todos los factores mencionados en el párrafo anterior. No obstante, a pesar de la simplificación inherente al ensayo *in vitro*, los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran que lipasas de juveniles de *A. trimaculatus* presentan una mayor capacidad de hidrólisis de fuentes lipídicas de origen animal, en especial sobre los aceites de pescados, los cuales presentan un elevado contenido de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (Coppes Petricorena, 2015). En las condiciones *in vitro* descritas para este experimento el aceite de salmón presentó la bioaccesibilidad más alta con un VH de 3.30%, de este valor el 72% correspondería a la hidrólisis realizadas por las lipasas y el resto a los ácidos grasos libres presentes en la muestra. El valor equivalente para el aceite de pescado de VH sería del 2.71%, (correspondiente al 58% de la hidrólisis de las lipasas). Esto se explicaría considerándose que las lipasas de peces comúnmente, presentan mayor afinidad para hidrolizar triglicéridos que contengan ácidos grasos de cadena larga altamente insaturados (Gjellesvikst 1991; Gjellesvik *et al.*, 1994; Bakke *et al.*, 2011). Por otra parte, los aceites vegetales que presentaron una mayor bioaccesibilidad a las lipasas de esta especie son el aceite de oliva, el cual es rico en ácido oleico (Jamieson, 1927); seguido de los aceites de maíz y soya, los cuales son fuentes principales de ácido linoleico respectivamente (Beadle *et al.*, 1965; Liu, 1997). Esto

nos puede indicar, que al menos en esta especie, dichas fuentes muestran una mejor bioaccesibilidad para los ácidos grasos de la serie n-6. Estos pueden ser utilizados como sustrato por las elongasas y desaturasas para generar el ácido araquidónico para cubrir algunas de las necesidades fisiológicas (Sargent *et al.*, 2003). En última instancia, se recomiendan considerar dos factores importantes para precisar en los próximos ensayos de digestibilidad *in vitro* de lípidos en pH-stat, el tipo de emulgente para mejorar o aumentar interface y el tipo de la sal biliar con las que presenten una mayor afinidad las lipasas (Sarkar *et al.*, 2016; Ye *et al.*, 2018).

7.3.6.- CONCLUSION

La metodología del pH-stat permitió generar una ranquin mediante la digestibilidad de los ingredientes proteicos y lipídicos, que podrán ser utilizados en la elaboración de los alimentos específicos de juveniles de *A. trimaculatus*. En esta especie, las enzimas digestivas presentaron una mayor afinidad por las materias primas de origen animal. De los ingredientes proteicos que presentan una mejor digestibilidad *in vitro* son la harina de carne de res, la harina de pescado y la harina ave premium, entre otros. Por su parte, los ingredientes lipídicos que podrían ser utilizados son los aceites de origen de pescado. No se descarta la posibilidad de integrar ingredientes proteicos y lipídicos de origen vegetal, de los cuales se podrían seleccionar los productos de soya o de cereales, así como aceites vegetales de oliva, maíz o soya. En todos los casos, se tendrán que considerar otros factores como la disponibilidad de los ingredientes en la zona, los costos de adquisición, la digestibilidad *in vivo* y los porcentajes de inclusión en los alimentos para no afectar las propiedades que caracterizan el consumo de pescado.

7.3.7.- REFERENCIAS

Alarcón F. J., García-Carreño F. L., Navarrete-del-Toro M. A. (2001). Effect of plant protease inhibitors on digestive proteases in fish species, *Lutjanus argentiventris* and *L. novemfasciatus*. *Fish Physiology and Biochemistry*. Vol. 4: 179–189.

Alarcón F. J., Moyano F. J., Díaz M. (2002). Evaluation of different protein sources for aquafeeds by an optimized pH-Stat system. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. Vol. 82: 1–8.

Álvarez-Lajonchère L., Chávez-Sánchez M. C, Reina-Cáñez M. A., Camacho-Hernández M. A., Abdo-de la Parra M. I., García-Aguilar N. (2011). Evolución de la escala experimental a la piloto para las tecnologías de producción de juveniles de peces marinos en la unidad Mazatlán del CIAD. Cap 1 en: Avances en Acuicultura y Manejo Ambiental. Ruiz Luna A, Berlanga Robles C y Betancourt Lozano M. Trillas (eds). 17-38 pp.

Amanda G. M. A., Flores A. I., González S. A. F. (2006). Capítulo 3. Proteínas. En: Badui D.S. Química de los alimentos. Cuarta edición. Editorial Pearson Educación. Edo. de México, México. 190-194 pp.

Anson M. L. (1938). The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin. *J Gen Physiol*. Vol. 22:79–89.

Baeverfjord G., Refstie S., Krogedal P., Añsgard T. (2006). Low feed pellet water stability and fluctuating water salinity cause separation and accumulation of dietary oil in the stomach of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*. Vol. 261:1335–1345.

Bakke A. M., Glover G., Krogdahl A. (2011). Feeding, digestion and absorption of nutrients. In *The Multifunctional Gut of Fish*: Vol. 30. 57-110 pp.

Barros A., Alarcón F. J., Moyano F.J., Martínez T. F. (2002). Efecto de la suplementación con fitasa sobre la hidrólisis in vitro de la proteína en trucha arcoiris *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792). *Bol. Inst. Esp. Oceanogr.* Vol. 18 (1-4): 95-98.

Beadle J. B., Just D. E., Morgan R. E., Reiners R. A. (1965) Composition of Corn Oil. *The Journal of the American oil chemists' society* 42:90-95.

Belitz H. D., Grosch W., Schieberle P. (2009). Amino Acids, Peptides, Proteins. In: Food Chemistry. Springer, Berlin, Heidelberg. 12-15 pp.

Boissen S., Eggum B. O. (1991). Critical evaluation of *in vitro* methods for estimating digestibility in simple stomach animals. *Nutr Res Rev.* Vol. 4:141-162.

Bradford M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem.* Vol. 72:248-254.

Castillo-Lopez E., Espinoza-Villegas R. E., Viana M. T. (2016). *In vitro* digestion comparison from fish and poultry by-product meals from simulated digestive process at different times of the Pacific Bluefin tuna, *Thunnus orientalis*. *Aquaculture* Vol. 458:187–194.

Coppes Petricorena Z. (2015). Chemical Composition of Fish and Fishery Products. *Handbook of Food Chemistry*, 403–435. Doi: 10.1007/978-3-642-36605-5_12.

Cuenca-Soria C. A., Álvarez-González C. A., Ortiz-Galindo J. L., Guerrero-Zárate R., Perera-García M. A., Hernández-Gómez R. E., Nolasco-Soria H. (2013). Digestibilidad in vitro de ingredientes proteínicos para *Cichlasoma urophthalmus*. *Universidad y Ciencia.* Vol. 29(3):263-275.

Chang Y., McClements D. J. (2016). Influence of emulsifier type on the in vitro digestion of fish oil-in-water emulsions in the presence of an anionic marine polysaccharide (fucoidan): Caseinate, whey protein, lecithin, or Tween 80. *Food Hydrocolloids*. Vol. 61:92-101.

Chatzifotis S., Panagiotidou M., Divanach P. (2012). Effect of protein and lipid dietary levels on the growth of juvenile meagre (*Argyrosomus regius*). *Aquaculture International*. Vol. 20:91-98.

Chavan J. K., Kadam S. S., Beuchat L. R. (1989). Nutritional improvement of cereals by sprouting, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. Vol. 28(5):401-437. Doi: 10.1080/10408398909527508

Cho C. Y., Slinger S. J., Bayley H. S., (1982). Bioenergetics of salmonid species: energy intake, expenditure and productivity. *Comp. Biochem. Physiol.* Vol. 73B, 25–41.

Church F. C., Swaisgood H. E., Porter D. H., Catignani G. (1983). Spectrophotometric assay using o-phthaldehyde for determination of proteolysis in milk proteins. *Journal of Dairy Science*. Vol. 66: 1219–1227.

Day L., Golding M., Xu M., Keogh J., Clifton P. M., Wooster T. J. (2014). Tailoring the digestion of structured emulsions using mixed monoglyceride–caseinate interfaces. *Food Hydrocolloids*. Vol. 36:151–161. Doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.09.019.

Denstadli V., Skrede A., Krogdahl A., Sahlstrom S., Storebakken T. (2006). Feed intake, growth, feed in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed graded levels of phytic acid. *Aquaculture*. Vol. 256:365-376.

Desai A. R., Links M. G., Collins S. A., Mansfield G. S., Drew M. D., Van Kessel A. G., Hill J. E. (2012). Effects of plant-based diets on the distal gut microbiome of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*. Vol. 350:134–142.

Dimes L. E., Haard N. F. (1994). Estimation of protein digestibility-I. Development of an in vitro method for estimating protein digestibility in salmonids. *Comparative Biochemistry and Physiology*. Vol. 108A:349–362.

Duodua K. G., Taylor J. R. N., Belton P. S., Hamaker B. R. (2003). Factors affecting sorghum protein digestibility. *Journal of Cereal Science*. Vol. 38:117–131.

Duranti M. (2006). Grain legume proteins and nutraceutical properties. *Fitoterapia*. Vol. 77:67–82.

Ebrahimi-Mahmoudabad S. R., Taghinejad-Roudbaneh M. (2011). Investigation of electron beam irradiation effects on anti-nutritional factors, chemical composition and digestion kinetics of whole cottonseed, soybean and canola seeds. *Radiation Physics and Chemistry*. Vol. 80:1441–1447.

Emre Y., Sevgili H., Diler I. (2003). Replacing Fish Meal with Poultry By-Product Meal in Practical Diets for Mirror Carp (*Cyprinus carpio*) Fingerlings. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. Vol. 3:81-85.

Ezquerro J. M., García-Carreño F. L., Carrillo O. (1998). *In vitro* digestibility of dietary protein sources for white shrimp (*Penaeus vannamei*). *Aquaculture*. Vol. 163:123–136.

FAO (2014). Food and Agriculture Organization. The State of World Fisheries and Aquaculture 2014, Rome, Italy. 223 pp.

Fatouros D. G., Mullertz A. (2008). *In vitro* lipid digestion models in design of drug delivery systems for enhancing oral bioavailability. *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology*. Vol. 4:65–76.

FEDNA (2010). Tablas FEDNA de composición y valor nutritivo de alimentos para la fabricación de piensos compuestos (3ª edición). 2010. C. de Blas, G.G. Mateos y P. García-

Rebollar. F. Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal. Madrid. Pp. 502. (Consultado 23 de Octubre 2018. <http://www.fundacionfedna.org/tablas-fedna-composicion-alimentos-valor-nutritivo>).

Francis G., Makkar H. P. S., Becker K. (2001). Antinutritional factors present in plant derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish. *Aquaculture*. Vol. 199:197-227.

Fredlund K., Isaksson M., Rossander-Hulthen L., Almgren A., Sandberg A. S. (2006). Absorption of zinc and retention of calcium: dose-dependent inhibition by phytate. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. Vol. 20:49-57.

Frías-Quintana C. A., Álvarez-González C. A., Márquez-Coutrier G. (2010). Diseño de microdietas para el larvicultivo de pejelagarto *Atractosteus tropicus* (Gill 1863). *Universidad y Ciencia*. Vol. 26(2): 265-282.

Fukushima D. (1991). Recent progress of soybean protein foods: Chemistry, technology, and nutrition. *Food Reviews International*. Vol. 7(3): 323-351.

García-Meilán I., Ordóñez-Grande B., Valentin J. M., Hernández M. D., García B., Fontanillas R., Gallardo M. A. (2016). Modulation of digestive and absorptive processes with age and/or after a dietary change in gilthead sea bream. *Aquaculture*. Vol. 459:54-64.

García-Pérez O. D., Cruz-Valdez J. C., Ramírez-Martínez C., Villarreal-Cavazos D., Gamboa-Delgado J. (2018). Exploring the contribution of dietary protein from poultry by-product meal and fish meal to the growth of catfish *Ictalurus punctatus* by means of nitrogen stable isotopes. *Lat. Am. J. Aquat. Res.* Vol. 46(1): 37-44.

Gjellesvik D. R. (1991). Fatty acid specificity of bile salt-dependent lipase: enzyme recognition and super-substrate effects. *Biochim. Biophys. Acta—Lipids Lipid Metab.* Vol. 1086:167-172.

Gjellesvik D. R., Lorens J. B., Male R. (1994). Pancreatic carboxylester lipase from Atlantic salmon (*Salmo salar*) cDNA sequence and computer-assisted modelling of tertiary structure. *Eur. J. Biochem.* Vol. 226:603–612.

Günther A. (1867). On the fishes of the states of Central America, founded upon specimens collected in fresh and marine waters of various parts of that country by Messrs. Salvin, Godman and Capt. J. M. Dow. *Proc. Zool. Soc. London.* Vol. 1866(3): 600-604.

Hamdan M., Moyano F. J., Schuhardt D. (2009). Optimization of a gastrointestinal model applicable to the evaluation of bioaccessibility in fish feeds. *J. Sci Food Agric.* Vol. 89:1195-1201.

Hernández M. D., Martínez F. J., Jover M., García-García B. (2007). Effects of partial replacement of fish meal by soybean meal in sharpsnout seabream (*Diplodus puntazzo*) diet. *Aquaculture.* Vol. 263(1-4):159–167. Doi:10.1016/j.aquaculture.2006.07.040

Hu L., Yun B., Xue M., Wang J., Wu X., Zheng Y., Han F. (2013). Effects of fish meal quality and fish meal substitution by animal protein blend on growth performance, flesh quality and liver histology of Japanese seabass (*Lateolabrax japonicus*). *Aquaculture.* Vol. 372-375:52–61. Doi:10.1016/j.aquaculture.2012.10.025

Hu M., Li Y., Decker E. A., McClements D. J. (2010). Role of calcium and calcium-binding agents on the lipase digestibility of emulsified lipids using an *in vitro* digestion model. *Food Hydrocolloids.* Vol. 24:719-725.

Hur S. J., Lim B. O., Decker E. A., McClements D. J. (2011). *In vitro* human digestion models for food applications. *Food Chemistry.* Vol. 125:1–12.

Jamieson G. S. (1927). The Chemical Composition of Spanish Olive Oil. *Oil & Fat Industries.* Vol. 426-427.

Jonge L. H., Speka J. W., Van Laarc H., Dijkstra J. (2009). Effects of pH, temperature and osmolality on the level and composition of soluble N in feedstuffs for ruminants. *Animal Feed Science and Technology*. Vol. 153:249-262.

Koven W. M., Henderson R. J., Sargent J. R. (1997). Lipid digestion in turbot (*Scophthalmus maximus*): in-vivo and in-vitro studies of the lipolytic activity in various segments of the digestive tract. *Aquaculture*. Vol. 151(1-4), 155–171. Doi: 10.1016/s0044-8486(96)01484-6.

Lemos D., Navarrete del Toro A., Córdova-Murueta J. H., García-Carreño F. (2004). Testing feeds and feed ingredients for juvenile pink shrimp *Farfantepenaeus paulensis*: in vitro determination of protein digestibility and proteinase inhibition. *Aquaculture*. Vol. 239:307-321.

Lemos D., Tacon A. G. J. (2011). A rapid low-cost laboratory method for measuring the in vitro protein digestibility of feed ingredients and feeds for shrimp. *Aquacult. Asia Pac*. Vol. 7: 18-21.

Lewis M. J., Francis D. S., Blyth D., Moyano F. J., Smullen R. P., Turchini G. M., Booth M. A. (2018). A comparison of in-vivo and in-vitro methods for assessing the digestibility of poultry by-product meals using barramundi (*Lates calcarifer*); impacts of cooking temperature and raw material freshness. *Aquaculture*. Vol. 498:187-200.

Li Y., Hu M., McClements D. J. (2011). Factors affecting lipase digestibility of emulsified lipids using an in vitro digestion model: Proposal for a standardised pH-stat method. *Food Chemistry*. Vol. 126:498–505.

Li Y., McClements D. J. (2014). Modulating lipid droplet intestinal lipolysis by electrostatic complexation with anionic polysaccharides: Influence of cosurfactants. *Food Hydrocolloids*. Vol. 35:367–374. Doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.06.011.

Liu K. (1997). Chemistry and Nutritional Value of Soybean Components. In: Soybeans. Springer, Boston, MA. Doi: [10.1007/978-1-4615-1763-4_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-1763-4_2).

Marina E. J., Garcia-Carreño F. L., Civera R., Haard N. F. (1997). pH-stat method to predict protein digestibility in white shrimp (*Penaeus vannamei*). *Aquaculture*. Vol. 157:251-262.

Martins S. L. F. S., Jongen W. M. F., Van Boekel M. A. J. S. (2001). A review of Maillard reaction in food and implications to kinetic modelling. *Trends in Food Science & Technology*. Vol. 11:364-373.

Mat D. J. L., Le Feunteun S., Michon C., Souchon I. (2016). *In vitro* digestion of foods using pH-stat and the INFOGEST protocol: Impact of matrix structure on digestion kinetics of macronutrients, proteins and lipids. *Food Research International*. Vol. 88:226-233.

Mat D. J. L., Cattenoz T., Souchon I., Michon C., Feunteun S. L. (2018). Monitoring protein hydrolysis by pepsin using pH-stat: *In vitro* gastric digestions in static and dynamic pH conditions. *Food Chemistry*. Vol. 239:268-275.

McClements D. J., Li Y. (2010). Structured emulsion-based delivery systems: Controlling the digestion and release of lipophilic food components. *Advances in Colloid and Interface Science*. Vol. 159:213-228.

Miller R. R., Minckley W. L., Norris S. M. (2005). Freshwater fishes of México. The Chicago University Press, Illinois. 490 pp.

Morales G. A., Saenz de Rodrigañez M. A., Márquez L., Díaz M., Moyano F. J. (2013). Solubilisation of protein fractions induced by *Escherichia coli* phytase and its effects on *in vitro* fish digestion of plant proteins. *Animal Feed Science and Technology*. Vol. 181:54-64.

Morales G. A., Marquez L., Hernández A. J., Moyano F. J. (2016). Chapter 9 Phytase effects on protein and phosphorus bioavailability in fish diets: in Walk et al. (ed.) Phytate destruction consequences for precision animal nutrition. 129-166 pp. Doi: 10.3920/978-90-8686-836-0_9.

Moyano F. J., Saénz de Rodrigañez M. A., Díaz M., Tacon A. G. J. (2014). Application of in vitro digestibility methods in aquaculture: constraints and perspectives. *Reviews in Aquaculture*. 6:1-20 pp.

Mun S., Decker E. A., McClements D. J. (2007). Influence of emulsifier type on in vitro digestibility of lipid droplets by pancreatic lipase. *Food Research International*. Vol. 40:770-781.

Nolasco H., Martínez A. M., Hinojosa P., Civera-Cerecedo R., Vega-Villasante F. (2006). Digestibilidad in vitro de Lípidos Alimentarios para el Camarón. En: Editores: L. Elizabeth Cruz Suárez, Denis Ricque Marie, Mireya Tapia Salazar, Martha G. Nieto López, David A. Villarreal Cavazos, Ana C. Puello Cruz y Armando García Ortega. Avances en Nutrición Acuícola VIII .VIII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 15 - 17 Noviembre. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, México. ISBN 970-694-333-5.

Nunes A. J., Sa M. V., Browdy C. L., Vazquez A. M. (2014). Practical supplementation of shrimp and fish feeds with crystalline amino acids. *Aquaculture*. Vol. 431:20–27.

Nunes M. L., Bandarra N. M., Batista I. (2011). Health benefits associated with seafood consumption. In: Alasalvar C., Shahidi F., Miyashita K., Wanasundara U. (eds) Handbook of seafood quality, safety and health. Wiley-Blackwell, Ames, Iowa, USA. 369–379 pp.

O'Hare W. T., Curry M. C., Allen J. C. (1984). Effect of buffering capacity on a commonly used assay of protein digestibility. *J. Food Sci.* Vol. 49:498-499.

Osborne T. (1924). The Vegetable Proteins. Longmans, Green and Co, London. 125 pp.

Peña E., Hernández C., Ibarra-Castro L., Álvarez-González C. A. (2017). In vitro protein digestibility of different grow-outstages of spotted rose snapper (*Lutjanus guttatus*, Steindachner, 1869). *Aquaculture Nutrition*. Vol. 23:1204-1215.

Říčan O., Piálek L., Dragová K., Novák J. (2016). Diversity and evolution of the Middle American cichlid fishes (Teleostei: Cichlidae) with revised classification. *Vertebrate Zoology*. Vol. 66(1):1-102.

Sargent J. R., Tocher D. R., Bell J. G. (2003). The lipids. In: J. Halver. Fish Nutrition. Academic Press, New York, U.S.A. Vol. 3: 181-257.

Sarkar A., Ye A., Singh H. (2016). On the role of bile salts in the digestion of emulsified lipids. *Food Hydrocolloids*. Vol. 60:77–84. Doi:10.1016/j.foodhyd.2016.03.018.

Saunders R. M., Conner M. A., Booth A. N., Bickoff E. M., Kohler G. O. (1972). Measurement of digestibility of alfalfa concentrates by *in vivo* and *in vitro* methods. *Journal of Nutrition*. Vol. 103:530-535.

Shipton T. A., Britz P. J. (2002). Evaluation of an *in vitro* digestibility technique for the prediction of protein digestibility in the South African abalone, *Haliotis midae* L. *Aquaculture Nutrition*. Vol. 8:15-21.

Storebakken T., Shearer K. D., Roem A. J. (2000). Growth, uptake and retention of nitrogen and phosphorus, and absorption of other minerals in Atlantic salmon *Salmo salar* fed diets with fish meal and soy-protein concentrate as the main sources of protein. *Aquaculture Nutrition*. Vol. 6:103-108.

Tacon A. G. J., Metian M. (2008). Global overview on the use of fish meal and fish oil in industrially compounded aquafeeds: trends and future prospects. *Aquaculture*. Vol. 285:146-158.

Tibbetts S. M., Milley J. E., Ross N. W., Verreth J. A. J., Lall S. P. (2011a). *In vitro* pH-Stat protein hydrolysis of feed ingredients for Atlantic cod, *Gadus morhua*. 1. Development of the method. *Aquaculture*. Vol. 319:398–406.

Tibbetts S. M., Verreth J. A. J., Lall S. P. (2011b). *In vitro* pH-Stat protein hydrolysis of feed ingredients for Atlantic cod, *Gadus morhua*. 2. *In vitro* protein digestibility of common and alternative feed ingredients. *Aquaculture*. Vol. 319:407-416.

Tibbetts S.M., Yasumaru F., Lemos D. (2017). *In vitro* prediction of digestible protein content of marine microalgae (*Nannochloropsis granulata*) meals for Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Algal Research*. Vol. 21: 76-80.

Tocher D. R. (2010). Fatty acid requirements in ontogeny of marine and freshwater fish. *Aquac. Res.* Vol. 41:717-732.

Toledo-Solís F. J., Uscanga-Martínez A., Guerrero-Zárate R., Márquez-Couturier G., Martínez-García R., Camarillo-Coop S., Perales-García N., Rodríguez-Valencia W., Gómez-Gómez M. A., Álvarez-González C. A. (2015). Changes on digestive enzymes during initial ontogeny in the three-spot cichlid *Cichlasoma trimaculatum*. *Fish Physiol Biochem*. Vol. 41:267-279.

Toledo-Solís F. J., Márquez-Couturier G., Uscanga-Martínez A., Guerrero-Zárate R., Perales-García N., Martínez-García R., Álvarez-González C. A. (2016). Partial characterization of digestive proteases of the three-spot cichlid *Cichlasoma trimaculatum* (Günter 1867). *Aquaculture Nutrition*. Vol. 22:1230-1238.

Turchini G. M., Torstensen B. E., Wing-Keong N. (2009). Fish oil replacement in finfish nutrition. *Reviews in Aquaculture*. Vol. 1:10–57.

Uscanga-Martínez A., Velázquez-Velázquez E., Gómez-Gómez M. A., Perales-García N., Rodríguez-Valencia W., Toledo-Solís F. J., López-Tapia C. L., Álvarez-González C. A., Aguilar-López E. (2015). Avances en el cultivo de la mojarra tahuina *Cichlasoma trimaculatum* (Actinopterygii: Perciformes: Cichlidae) en la Reserva de la Biosfera La Encrucijada, Chiapas. En: Velázquez-Velázquez, E., Romero-Berny, E.I. y Rivera-Velázquez, G. (Eds.) Reserva de la Biósfera La Encrucijada, dos décadas de investigación para su conservación. Colección Jaguar. Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas.

Vaz Patta M. C., Amarowicz R., Aryee A. N. A., Boye J. I., Hyun-Jung C., Martín-Cabrejas M. A., Domoney C. (2015). Achievements and Challenges in Improving the Nutritional Quality of Food Legumes, *Critical Reviews in Plant Sciences* Vol. 34:1-3. Doi: 10.1080/07352689.2014.897907.

Versaw W., Cuppett S. L., Winters D. D., Williams L. E. (1989). An improved colorimetric assay for bacterial lipase in nonfat dry milk. *J. Food Sci.* Vol. 54:232-254.

Violante G. J. (1995). Contribución al conocimiento de la biología de la mojarra nativa *Cichlasoma trimaculatum* (Gunter, 1868), en la laguna de Tres Palos Guerrero, México, y determinación del desarrollo larvario y requerimientos proteicos en condiciones de laboratorio. Tesis de maestría, pp. 70. Facultad de ciencias marinas, Universidad de Colima, Manzanillo, Colima, México.

Walter H. E. (1984). Proteinases: methods with hemoglobin, casein and azocoll as substrates. In: Bergmeyer HJ (ed) *Methods of enzymatic analysis*, vol V. Verlag Chemie, Weinham, 270-277 pp.

Wang Y., Wang L., Zhang C., Song K. (2017). Effects of substituting fishmeal with soybean meal on growth performance and intestinal morphology in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*). *Aquaculture Reports*. Vol. 5:52–57. Doi:10.1016/j.aqrep.2016.12.005.

Williams H. D., Sassene P., Kleberg K., Bakala-N’Goma J. C., Calderone M., Jannin V., Igonin A., Partheil A., Marchaud D., Jule E., Vertommen J., Maio M., Blundell R., Benameur H., Carrière F., Müllertz A., Porter C. J. H., Pouton C. W. (2012). Toward the establishment of standardized in vitro tests for lipid-based formulations, part 1: Method parameterization and comparison of *in vitro* digestion profiles across a range of representative formulations. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. Vol. 101:3360–3380.

Wooster T. J., Day L., Xu M., Golding M., Oiseth S., Keogh J., Clifton P. M. (2014). Impact of different biopolymer networks on the digestion of gastric structured emulsions. *Food Hydrocolloids*. Vol. 36:102–114.

Wu X. Y., Gatlin D. M. (2014). Effects of altering dietary protein content in morning and evening feedings on growth and ammonia excretion of red drum (*Sciaenops ocellatus*). *Aquaculture*. Vol. 434:33-37.

Xu S., Zhang X., Liu P. (2018). Lipid droplet proteins and metabolic diseases. *BBA - Molecular Basis of Disease*. Vol. 1864:1968-1983.

Yáñez-Arancibia A. (1978). Taxonomía, Ecología y Estructura de las Comunidades de Peces en Lagunas Costeras con Bocas Efímeras del Pacífico de México, 1–306. Centro de Ciencias del Mar y Limnología, Universidad Autónoma de México, Publicaciones Especiales 2, Distrito Federal, México.

Yasumaru F., Lemos D. (2014). Species-specific in vitro protein digestion (pH-stat) for fish: method development and application for juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), cobia (*Rachycentron canadum*), and Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*. 426–427 pp.

Ye Z., Cao C., Liu Y., Cao P., Li Q. (2018). Digestion fates of different edible oils vary with their composition specificities and interactions with bile salts. *Food Research International*, Vol. 111: 281–290. Doi:10.1016/j.foodres.2018.05.040.

Zambonino Infante J. L., Cahu C. L. (2007). Dietary modulation of some digestive enzymes and metabolic processes in developing marine fish: Applications to diet formulation. *Aquaculture*. Vol. 268: 98–105 pp.

8.- DISCUSIÓN GENERAL

Todas las especies que actualmente se están produciendo, en su momento presentaron grandes retos en las distintas etapas para su cultivo. Una de las etapas más complicadas es el larvicultivo, la cual ha sido señalada en la mayoría de la especies como un cuello de botella para su incorporación a la industria acuícola (Olivotto *et al.*, 2011; Galaviz *et al.*, 2015). Uno de las principales causa de ello es la vulnerabilidad que presentan las larvas a factores ambientales, por lo que se busca conocer las condiciones físico-químicas adecuadas en los sistemas de cultivo. Sin embargo, en los últimos años han tomado peso los estudios de alimentación y nutrición, ya que la disponibilidad y viabilidad de las larvas depende enormemente del estado de desarrollando del sistema digestivo para efectuar el suministro de alimentos exógenos (Zambonino Infante *et al.*, 2008; Gisbert *et al.*, 2009).

Es por ello, que los primeros estudios que a realizarse son enfocados a describir y entender la funcionalidad de la fisiología digestiva de las larvas. Una de las herramientas utilizadas en estas etapas son los análisis histológicos, los cuales describen el desarrollo morfológico y la posible funcionalidad de los distintos órganos que componen el sistema digestivo (Treviño *et al.*, 2011). En el caso de las larvas de *A. trimaculatus*, el sistema digestivo muestran un patrón de desarrollo similar al descrito en otros cíclidos (Molina, 2008; Molina, 2010; Treviño *et al.*, 2011; Cuenca-Soria *et al.*, 2013), iniciándose de forma rudimentaria como un tubo recto y posteriormente se comienza a diferenciar en tres regiones principales como es la cavidad bucofaríngea, la esofágica y el intestino, lo cual coincide con el inicio de la alimentación exógena. También son observados los tejidos hepático y pancreático, los cuales son asociado a la transferencia de nutrientes del saco vitelino (Morrison *et al.*, 2001). Por su parte, el pronta diferenciación de los distintos órganos y la funcionalidad del sistema digestivo son consideradas estrategias reproductivas de las especies incubadoras de sustrato, debido a la vulnerabilidad que presentan las larvas al medio ambiente (Meijide & Guerrero, 2000; Fujimura & Okada, 2007; Molina, 2008). Añadido a esto, la lenta absorción las reservas del saco vitelino de esta especie, es una información que servirá para realizar estrategias de alimentación durante los primeros días de vida. Esta situación de la absorción de las reservas en el medio silvestre se ha considerado como estrategia, para evitar periodos de inanición si no se dispone de alimento en el medio natural

(Zavala, 2011). Lo cual podría ser una condición favorable, cuando se llevan acabado las pautas de alimentación en los protocolos de destete de esta especie.

En esta misma línea, las técnicas moleculares de expresión génica ayudan a comprender la funcionalidad del sistema digestivo en los primeros estadios de desarrollo, al obtener los patrones de expresión transcripcional de genes específicos de las enzimas digestivas (Galaviz *et al.*, 2012). En donde, los primeros niveles de expresión de los genes de precursores de enzimas digestiva posiblemente se debe a una programación genética para efectuar la digestión de las reservas vitelinas en los primeros días de desarrollo durante la ontogenia inicial (García-Gasca *et al.*, 2006; Yúfera *et al.*, 2018). Pero en otros casos, la expresión de genes enzimáticos son producidos por células u órganos específicos cuando estos comienzan a ser funcionales (Chi *et al.*, 2013; Yúfera *et al.*, 2018). En este caso, de la expresión de los genes estudiados durante la ontogenia inicial de *A. trimaculatus*, los patrones de la expresión son bajos durante los primeros días de desarrollo, pero estos suelen incrementarse considerablemente cuando se observa una clara diferenciación de los distintos órganos; y también se lleva a cabo una alimentación de tipo exógena con alimento vivo. Los picos máximos de expresión son próximos al día 15 dde, cuando ya no se muestran cambios estructurales en la morfología del sistema digestivo y se proporciona una alimentación exógena con alimento comercial.

Otra situación diferente, pero igualmente necesaria es profundizar en una formulación adecuada para esta especie, ya que los alimentos específicos podrán mejorar el crecimiento en esta etapa de cultivo. Para ello, uno de los primeros pasos es encontrar los requerimientos nutricionales en la etapa larvaria, los cuales apuntan hacer demandantes de lípidos y proteínas. El porcentaje de proteína encontrado es próximo a 45%, el cual coincide con los trabajos realizados en otras especies de ciclidos como *Oreochromis niloticus* (Abdel-Tawwab *et al.*, 2010) y en *Cichlasoma urophthalmus* (Martínez-Palacios *et al.*, 1996); con las cuales comparte hábitos de alimentación.

Por otra lado, en el caso de los lípidos, el porcentaje que presento los mejores crecimientos en combinación con el 45% de proteína resulto en 22% de lípidos. En la mayoría de los estudios realizados en otras especies, en larvas de *Epinephelus coioides* (Li *et al.*, 2016), *Oreochromis niloticus* (Qiang *et al.*, 2017) y en juveniles de *Sebastes schlegeli* (Cho *et al.*, 2015), los rangos

observados siempre fueron inferiores al resultado obtenido en *A. trimaculatus*. Esto nos podría indicar, que esta especie parece tener un mayor aprovechamiento de los lípidos, los cuales se enfocarían a fines energéticos, por lo tanto la proteína suministrada será mayormente aprovechada para fines estructurales. Con ello, se podría permitir un ahorro de proteína en los alimentos y por consiguiente una posible disminución en los costos de producción (Kumar *et al.*, 2018). Corroborando estos resultados, los índices de crecimiento, de eficiencia de alimento y por otra parte los perfiles de actividad enzimática, los cuales presentaron agrupación de similitud con los bloques que contenían los mismos porcentajes de inclusión de proteína y lípidos en los alimentos.

Por otra parte, conocer cuáles podrían ser los ingredientes utilizados para la formulación de los alimentos, puede ser de gran utilidad para estimar los costos de elaboración que tendrán los alimentos y si estos podrán ser accesibles. Es por ello, que se evaluaron ingredientes proteicos y lipídicos, por ser gran importancia en la nutrición de los peces y estar catalogados como los más costosos en la formulación de los alimentos (Wu and Gatlin, 2014; Kumar *et al.*, 2018; Xu *et al.*, 2018). Las evaluaciones se realizaron mediante digestibilidad *in vitro* con el pH stat, metodología ampliamente utilizada para diversas especies acuáticas con fines productivos (Tibbetts *et al.*, 2011; Moyano *et al.*, 2014). Los ingredientes proteicos con mejores resultados son las harinas de origen animal, destacando harina de pescado, de ave premium y de carne de res. Este tipo de preferencias de harinas o ingredientes se ha descrito sobre todo en especies que presentan una actividad digestiva importante en el estómago (Hamdan *et al.*, 2009; Mat *et al.*, 2018). Por otro, lado la mayoría de las harinas de origen vegetal, presentaron valores inferiores las harinas animales. Sin embargo, algunas como los productos de soya y de cereales, llegan a obtener valores prometedores que podrían hacer considerados como candidatos para integrarse en los alimentos de esta especie.

En lo que respecta a los ingredientes lipídicos, se observa una preferencia por los aceites de origen de pescado, los cuales presentan un elevado contenido de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (Coppes Petricorena, 2015). En el caso de los aceites vegetales, podrían ser integrados en menor proporción, los que son altos en ácidos grasos de la serie n-6; ya que estos,

pueden ser utilizados como sustrato por las elongasas y desaturasas para generar el ácido araquidónico para cubrir algunas de las necesidades fisiológicas (Sargent *et al.*, 2003).

Considerando los distintos aspectos en que se desarrollo de la presente investigación, esta contribuyen al entendimiento del desarrollo y funcionalidad de la fisiología digestiva en las primeras etapas de vida; información que será imprescindible para ajustar las prácticas de cultivo en el larvicultivo. Además aporta información fundamental para la elaboración de formulas de alimentos específicos, los cuales podrán aportar un mayor rendimiento en las etapas de cultivo. Por lo tanto, todo esto se podría considerar como un buen inicio en el aporte de la información que permita desarrollar el cultivo de *A. trimaculatus*.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

9.- CONCLUSIONES

1. El sistema digestivo de *A. trimaculatus* durante la ontogenia inicial presenta un desarrollo abrupto característico a lo descrito en otros cíclidos. En donde, desde el día 6 dde (5.82 ± 0.32 mm) se encuentran diferencias histológicas de los distintos órganos del sistema digestivo como estómago, intestino, páncreas e hígado. Para el día 15 dde (7.28 ± 0.26 mm) se observa un desarrollo completo del sistema digestivo. Las características morfológicas presente en esta especie parecen indicar que poseen hábitos omnívoros con tendencia carnívora (Capítulo I).
2. Los patrones de expresión génica de las enzimas digestivas durante la ontogenia inicial de *A. trimaculatus* en los primeros días son bajos, presentando una expresión significativa en el día 6 dde (5.82 ± 0.32 mm). Este evento se considera como un posible indicador de la funcionalidad de los distintos órganos del sistema digestivo. Por su parte, los puntos máximos de expresión de las enzimas estudiadas se presentan cerca del día 15 dde (7.28 ± 0.26 mm), indicando una digestión conjunta entre el estómago y el intestino, y el momento de la completa funcionalidad para llevar a cabo una alimentación exógena. Los patrones de expresión génica pueden verse influenciados por las pautas de alimentación (Capítulo I).
3. Las larvas de *A. trimaculatus* presentaron requerimientos nutricionales próximos a 45% de proteína y 22% de lípidos, ya que registraron los mejores índices de crecimiento y eficiencias de alimento con respecto al resto de las dietas. La influencia de los elevados contenidos de lípidos en los alimentos parece generar una mayor supervivencia y aprovechamiento de las proteínas para mejorar el crecimiento en la etapa larvaria. En este estudio los perfiles de actividad enzimática de las larvas, resultaron ser similares entre los bloques de los alimentos que contenían los mismos porcentajes de inclusión de proteínas y lípidos en los alimentos. Por lo tanto, se podrían utilizar estos análisis como posibles indicadores de las condiciones nutricionales de las larvas, cuando se evalúa la inclusión de algún tipo de nutrientes en los alimentos (Capítulo II).

4. El ensayo de digestibilidad *in vitro* por pH-stat, ponen también en manifiesto que el proceso de digestión de *A. trimaculatus*, es llevado a cabo en conjunto entre el estómago e intestino. En donde, las enzimas digestivas de juveniles presentaron una mayor afinidad por las materias primas de origen animal, destacando la harina de carne de res, harina de pescado y harina ave premium. En el caso de los ingredientes lipídicos que podrían ser utilizados son los aceites de origen de pescado. No se descarta la posibilidad de integrar ingredientes proteicos y lipídicos de origen vegetal, de los cuales se podrían seleccionar los productos de soya o de cereales; así como aceites vegetales de oliva, maíz o soya (Capítulo III).

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

10.- REFERENCIAS

Abdel-Tawwab M., Ahmad M. H., Khattab Y. A. E., Shalaby A. M. E. (2010). Effect of dietary protein level, initial body weight, and their interaction on the growth, feed utilization, and physiological alterations of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). *Aquaculture*. Vol. 298:267-274.

Chi L., Xu S., Xiao Z., Lin F., Ma D., Zhao C. Xiao Y., Liu Q., Li J. (2013). Pepsinogen A and C genes in turbot (*Scophthalmus maximus*): Characterization and expression in early development. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. Vol. 165(1), 58–65. Doi:10.1016/j.cbpb.2013.03.002

Cho S. H., Kim H. S., Myung S. H., Won-Gwan J., Choi J., Sang-Min L. (2015). Optimum dietary protein and lipid levels for juvenile rockfish (*Sebastes schlegeli*, Hilgendorf 1880). *Aquaculture Research*. Vol. 46:2954-2961.

Coppes Petricorena Z. (2015). Chemical Composition of Fish and Fishery Products. *Handbook of Food Chemistry*, 403–435. Doi: 10.1007/978-3-642-36605-5_12.

Cuenca Soria C. A., Alvarez-González C. A., Ortiz-Galindo J. L., Tovar-Ramírez D., Guerrero-Zárte R., Aguilar-Hernández S, Perera-García M. A., Hernández-Gómez R. and Gisbert E. (2013). Histological development of the digestive system of Mayan cichlid *Cichlasoma urophthalmus* (Günther 1862). *Appl. Ichthyol.* 1–9 pp. Doi 10.1111/jai.12307.

Fujimura K., Okada N. (2007). Development of the embryo, larva and early juvenile of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Pisces: Cichlidae). Developmental staging system. *Development, Growth & Differentiation*. Vol. 49(4). 301–324 pp. Doi:10.1111/j.1440-169x.2007.00926.x

Galaviz M. A., García-Ortega A., Gisbert E., López L.M., García-Gasca A. (2012). Expression and activity of trypsin and pepsin during larval development of the spotted rose snapper

Lutjanus guttatus. Facultad de Ciencias Marinas, Universidad Autónoma de Baja California. Ensenada B.C. México. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*. Vol. 161. 9–16 pp.

García-Gasca A., Galaviz M. A., Gutiérrez J. N., García O. A. (2006). Development of the digestive tract, trypsin activity and gene expression in eggs and larvae of the bullseye puffer fish *Sphoeroides annulatus*. *Aquaculture*. Vol. 251: 366-376.

Gisbert E., Giménez G., Fernández I., Kotzamanis Y., Estévez A. (2009). Development of digestive enzymes in common dentex *Dentex dentex* during early ontogeny. *Aquaculture*. Vol. 287:381-387.

Hamdan M., Moyano F. J., Schuhardt D. (2009). Optimization of a gastrointestinal model applicable to the evaluation of bioaccessibility in fish feeds. *J. Sci Food Agric*. Vol. 89:1195-1201.

Kumar S., Sahu N. P., Ranjan A. (2018). Feeding de-oiled rice bran (DORB) to Rohu, *Labeo rohita*: Effect of varying dietary protein and lipid level on growth, body composition, and insulin like growth factor (IGF) expression. *Aquaculture*. Vol. 492:59-66.

Li S., Mai K., Xu W., Yuan Y., Zhang Y., Zhou H., Ai Q. (2016). Effects of dietary lipid level on growth, fatty acid composition, digestive enzymes and expression of some lipid metabolism related genes of orange spotted grouper larvae (*Epinephelus coioides* H.). *Aquaculture Research*. Vol. 47:2481-2495.

Martínez-Palacios C. A., Harfush-Melendez M., Chavez-Sánchez C. (1996). The optimum dietary protein level for the Mexican cichlid *Cichlasoma urophthalmus* (Gunther): a comparison of estimates derived from experiments using fixed-rate feeding and satiation feeding. *Aquaculture Nutrition*. Vol. 2:11-20.

Mat D. J. L., Cattenoz T., Souchon I., Michon C., Feunteun S. L. (2018). Monitoring protein hydrolysis by pepsin using pH-stat: *In vitro* gastric digestions in static and dynamic pH conditions. *Food Chemistry*. Vol. 239:268–275.

Mejjide F. J., Guerrero G. A. (2000). Embryonic and larval development of a substrate brooding cichlid *Cichlasoma dimerus* (Heckel, 1840) under laboratory conditions. *J. Zool., Lond.* Vol. 252: 481 – 493.

Molina A. (2008). Desarrollo Larval de *Amphilophus rostratus* (Gill 1877) (Pises: Cichlidae) cultivados en laboratorio. Informe, Estación Piscícola. *Brenesia*. Vol. 70:47-52.

Molina A. (2010). Desarrollo Larval de *Amphilophus alfari* (Meek 1907) (Pisces: Cichlidae) cultivados en laboratorio. *Brenesia*. Vol. 73-74: 103-107.

Morrison C. M., Miyake T., Wright J. R. (2001). Histological study of the development of the embryo and early larva of *Oreochromis niloticus* (Pisces: Cichlidae). *Journal of Morphology*. Vol. 247(2), 172–195. Doi:10.1002/1097-4687(200102)247:2<172::aid-jmor1011>3.0.co;2-h.

Moyano F. J., Saénz de Rodrigañez M. A., Díaz M., Tacon A. G. J. (2014). Application of in vitro digestibility methods in aquaculture: constraints and perspectives. *Reviews in Aquaculture*. 6:1-20 pp.

Olivotto I., Planas M., Simões N., Holt G., Avella M., Calado R. (2011). Advances in breeding and rearing marine ornamentals. *J. World Aquacult. Soc.* Vol. 42:135-166.

Qiang J., He J., Yang H., Yi-Lan S., Yi-Fan T., Xu P., Zhi-Xiang Z. (2017). Dietary lipid requirements of larval genetically improved farmed tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), and effects on growth performance, expression of digestive enzyme genes, and immune response. *Aquaculture Research*. Vol. 48:2827-2840.

Sargent J. R., Tocher D. R., Bell J. G. (2003). The lipids. In: J. Halver. Fish Nutrition. Academic Press, New York, U.S.A. Vol. 3: 181-257.

Tibbetts S. M., Milley J. E., Ross N. W., Verreth J. A. J., Lall S. P. (2011). *In vitro* pH-Stat protein hydrolysis of feed ingredients for Atlantic cod, *Gadus morhua*. 1. Development of the method. *Aquaculture*. Vol. 319:398–406.

Treviño L., Álvarez-González C. A., Perales-García N., Arévalo-Galán L., Uscanga-Martínez A., Márquez-Couturier G., Fernández I., Gisbert E. (2011). A histological study of the organogenesis of the digestive system in bay snook *Petenia splendida* Günther, 1862 from hatching to the juvenile stage. *J. Appl. Ichthyol.* Vol. 27:73–82.

Wu X.Y., Gatlin D.M. (2014). Effects of altering dietary protein content in morning and evening feedings on growth and ammonia excretion of red drum (*Sciaenops ocellatus*). *Aquaculture*. Vol. 434:33-37.

Xu S., Zhang X., Liu P. (2018). Lipid droplet proteins and metabolic diseases. *BBA - Molecular Basis of Disease*. Vol. 1864:1968-1983.

Yúfera M., Moyano F. J., Martínez-Rodríguez G. (2018). The Digestive Function in Developing Fish Larvae and Fry. From Molecular Gene Expression to Enzymatic Activity. In: Yúfera M. (eds) *Emerging Issues in Fish Larvae Research*. Springer, Cham, 51-86 pp.

Zambonino Infante J. L., Gisbert E., Sarasquete C., Navarro I., Gutiérrez J., Cahu C.L. (2008). Ontogeny and physiology of the digestive system of marine fish larvae. *Journal of fish biology*. Vol. 75. 756-773. Doi 10.1111/j.1095-8649.2009.02318_2.x.

Zavala I. (2011). Chemical characterization of vitelline reserves consumption in teleost fish of indirect ontogeny. *REDVET. Revista electrónica de Veterinaria* Vol. 12:3, 1695-7504.