

Centro de Investigación Científica y de Educación
Superior de Ensenada, Baja California



**Programa de Posgrado en Ciencias
en Acuicultura**

**Efecto de la suplementación en dieta de la inulina, el β -
glucano y el quitosano sobre la capacidad digestiva y la
inmunidad no específica de la totoaba (*Totoaba macdonaldi*)**

Tesis

para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
Maestro en Ciencias

Presenta

Sara Isabel Enciso Contreras

Ensenada, Baja California, México

2016

Tesis defendida por

Sara Isabel Enciso Contreras

y aprobada por el siguiente comité

Dr. Juan Pablo Lazo Corvera
Co Director de tesis

Dr. Óscar Basilio del Río Zaragoza
Co Director de tesis

Dra. Fabiola Lafarga de la Cruz

Dr. Axayácatl Rocha Olivares



Dr. Benjamín Barón Sevilla
Coordinador del Posgrado en Acuicultura

Dra. Rufina Hernández Martínez
Directora de Estudios de Posgrado

Resumen de la tesis que presenta **Sara Isabel Enciso Contreras** como requisito necesarios para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Acuicultura

Efecto de la suplementación en dieta de la inulina, el β -glucano y el quitosano sobre la capacidad digestiva y la inmunidad no específica de la totoaba (*Totoaba macdonaldi*)

Resumen aprobado por:

Dr. Juan Pablo Lazo Corvera
Co Director de tesis

Dr. Óscar Basilio del Río Zaragoza
Co Director de tesis

La totoaba (*Totoaba macdonaldi*) es una especie marina endémica del Golfo de California, México en peligro de extinción y considerada actualmente con potencial en la acuicultura, debido a que se ha logrado exitosamente la reproducción en cautiverio, mediante la manipulación de varios factores ambientales y el uso de hormonas. En los últimos años en la acuicultura se han dedicado grandes esfuerzos para mejorar la eficiencia del crecimiento de los organismos mediante la formulación y la optimización de las dietas, incorporando además de sus componentes principales, como las proteínas y los lípidos, aditivos como los prebióticos, los cuales han tomado gran importancia en el cultivo de organismos acuáticos, debido a que se ha demostrado que mejoran el equilibrio de la flora intestinal y la capacidad de la respuesta inmune; lo que se refleja en un mejor desarrollo y crecimiento de los organismos. Es por esto que el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de tres prebióticos: la inulina, el β -glucano y el quitosano sobre el crecimiento, la capacidad digestiva y la actividad inmune no específica de la totoaba. Con este fin se elaboraron cuatro dietas isoproteicas e isolipídicas a tres de las cuales se les adiciono un prebiótico (inulina 1%, β -glucano 0.1% y quitosano 0.5%) y una sin prebiótico. Cada tratamiento se evaluó por triplicado y para ello se colocaron 15 juveniles en cada tanque con un peso promedio de 58.8 ± 3.5 g. Los peces fueron alimentados dos veces al día, a saciedad aparente durante un periodo de 56 días. Al final del bioensayo, el crecimiento, el índice hepatosomático y la eficiencia alimenticia no resultaron en diferencias significativas ($P > 0.05$) entre los tratamientos. En la composición proximal del musculo se obtuvieron diferencias significativas en el porcentaje de cenizas, las cuales tuvieron un aumento en el tratamiento con β -glucano. En la digestibilidad de la dieta se observó un aumento significativo en la dieta con inclusión de inulina al 1%. En cuanto a la actividad de las enzimas digestivas se observó un efecto significativo en la actividad específica ($U \mu g P$) de la lipasa y en la actividad total (UA) de tripsina donde se cuantificó un mayor aumento en los alimentados con inulina lo que ayuda a explicar en parte la mayor digestibilidad de la dieta que contenía este prebiótico. Sin embargo, para la amilasa no se obtuvieron diferencias significativas entre los tratamientos. De los parámetros del sistema inmune no específico evaluados se registraron diferencias significativas en las proteínas totales a través del tiempo, se un aumento de estas a los 15 días, en todos los tratamientos. El número de leucocitos aumento significativamente a través del tiempo con valores más altos en el tratamiento que incluía β -glucano. En el estallido respiratorio se obtuvieron diferencias significativas, observándose un aumento a los 35 y 45 días en los tratamientos con quitosano e inulina. Para el porcentaje de fagocitosis no se obtuvieron diferencias significativas. Con base en los resultados se

concluye que al incluir inulina al 1% en la dieta de la totoaba, se mejora la digestibilidad de la dieta, debido en parte al incremento de las enzimas tripsina y lipasa. Sin embargo, aunque la inclusión de los tres prebióticos puede mejorar ciertos parámetros de la respuesta inmune no específica en esta especie, se recomienda hacer más estudios que incluyan aspectos morfofuncionales del tracto digestivo para relacionar y comprender mejor estos resultados.

Palabras clave: Totoaba, capacidad digestiva, sistema inmune.

Abstract of the thesis presented by **Sara Isabel Enciso Contreras** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Aquaculture

Effect of supplementation in diet inulin, β -glucan and chitosan on the digestive capacity and non-specific immunity totoaba (*Totoaba macdonaldi*)

Abstract approved by

Dr. Juan Pablo Lazo Corvera
Co Director de tesis

Dr. Óscar Basilio del Río Zaragoza
Co Director de tesis

Totoaba (*Totoaba macdonaldi*) is an endemic marine species from the Gulf of California, Mexico endangered and currently considered potential in aquaculture, because it has successfully captive breeding, by manipulating various environmental factors and the use of hormones. In recent years in aquaculture have made efforts to improve the efficiency of the growth of organisms through the development and optimization of diets, also incorporating its major components, such as proteins and lipids, additives like prebiotics, which have become very important in the cultivation of aquatic organisms, because it has been shown to improve the balance of the intestinal flora and the ability of the immune response; this is reflected in a better development and growth of organisms. That is why the objective of this study was to assess the effect of three Prebiotics: inulin, β -glucan and chitosan on growth, digestive capacity and non-specific immune activity totoaba. For this purpose four diets isolipídicas isoproteic and three of which were added a prebiotic (inulin 1%, 0.1% β -glucan and chitosan 0.5%) and no prebiotic was prepared. Each treatment was evaluated in triplicate and placed in each tank 15 juveniles of an average weight of 58.8 ± 3.5 g. The fish were fed twice daily to satiation apparent for a period of 56 days. At the end of the bioassay growth, hepatosomatic rate and feed efficiency no statistical difference ($P > 0.05$) between treatments were obtained. In the proximal composition of muscle significant differences ($P < 0.05$) they were obtained in the percentage of ash, which had an increase in treatment with β -glucan. In a significant increase digestibility it was obtained only in the inclusion of inulin. In the enzymatic activity was a significant effect on the specific activity (U mg P) lipase and total activity (UA) trypsin where a further increase in fed inulin was reported, whereas amylase no differences were obtained significant between treatments. For non-specific immune system were reported significant differences in total protein over time, an increase in these 15 days, in all treatments it was obtained. The number of leukocytes increased significantly over time and the interaction between time and diet, which perform better in treatment with β -glucan was obtained. In the respiratory burst significant differences were obtained, with an increase to 35 and 45 days treatment with chitosan and inulin. For phagocytosis no statistically significant differences were obtained. Based on the results it is concluded that by including inulin 1% in the diet of the totoaba, this will have a higher digestibility due to increased enzymes trypsin and lipase. Moreover, the inclusion of the three prebiotics can improve certain parameters of non-specific immune response, so it is recommended to morphofunctional studies of the digestive tract to relate and understand these results.

Keywords: Totoaba, digestive capacity, immune system.

Dedicatoria

A mis padres, por todo el apoyo en estos años de desarrollo profesional.

A mis hermanos, hermana y todos mis hermosos sobrinos, gracias por hacer mis días
más divertidos.

Y a mis compañeros de aventuras José y Mateo

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por haberme brindado el apoyo económico para llevar a cabo mis estudios de maestría.

Al Posgrado en Acuicultura del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE), por haberme aceptado en sus instalaciones y permitir realizar mis estudios de maestría.

A mis Codirectores de tesis Dr. Juan Pablo Lazo Corvera y Dr. Óscar Basilio del Río Zaragoza por brindarme su conocimiento, su paciencia y apoyo. ¡GRACIAS!

A mis sinodales Dra. Fabiola Lafarga de la Cruz y Dr. Axayácatl Rocha Olivares, muchas gracias por sus comentarios y apoyo.

Al Dr. Benjamín Barón Sevilla y Dra. Mónica Hernández Rodríguez por su apoyo a pesar de no tener ninguna responsabilidad en mi trabajo. ¡GRACIAS!

A la Dra. Carmen Paniagua y Dr. Miguel Ángel del Río por el apoyo y paciencia en la parte estadística, muchísimas gracias.

A Uvinai Salgado, técnico del laboratorio de peces marino, por ayudarme con el buen desarrollo de mis bebes totoabas. ¡GRACIAS!

A Abelardo Campos técnico del departamento de acuicultura, muchas gracias por el apoyo y tiempo brindado.

A Fernando Barreto estudiante de doctorado en el instituto de investigaciones Oceanológicas (IIO), gracias por todo el apoyo y conocimiento compartido.

A Denisse Chávez mi compañera de clases y de laboratorio que ahora es una gran amiga, gracias por el apoyo y la diversión durante toda la maestría.

A mis compañeros de laboratorio Pablo, Jorge, Bernardo y Noemí gracias por el apoyo durante el trabajo de laboratorio y gracias por la paciencia... algún día superare mi apego por el orden y la limpieza.

A mis compañeros de muestreo Fernando, Clelia, Denisse y Candy, muchísimas gracias, sin ustedes jamás lo habría logrado.

A mis compañeros de generación Denisse, Romi, Stefanny, Humberto, Fer, Candy, Miriam, Caro, Lucia y Yessica fue toda una aventura y placer estar con ustedes estos años.

Tabla de contenido

Resumen en español	ii
Resumen en inglés.....	iv
Dedicatoria.....	v
Agradecimientos	vi
Lista de figuras.....	x
Lista de tablas	xi
Capítulo 1. Introducción	1
1.1 Generalidades de la especie.....	1
1.2 Acuicultura	3
1.3 Requerimientos nutricionales	4
1.4 Requerimientos nutricionales de la totoaba	5
1.5 Probióticos, prebióticos y simbióticos.....	7
1.5.1 Inulina.....	8
1.5.2 β -glucano.....	8
1.5.3 Quitosano.....	9
1.6 Actividad digestiva	11
1.7 Sistema inmune	13
1.8 Sistema inmune no específico	14
Capítulo 2. Justificación	16
Capítulo 3. Hipótesis.....	17
Capítulo 4. Objetivos.....	18
4.1 Objetivo general.....	18
4.1 Objetivos particulares.....	18
Capítulo 5. Materiales y métodos.....	19
5.1 Formulación y elaboración de la dieta.....	19
5.2 Peces y condiciones	20
5.3 Diseño experimental	21
5.4 Muestreo	22
5.5 Crecimiento y eficiencia de la utilización del alimento.....	23

5.5.1 Tasa de crecimiento específico (TCE)	23
5.5.2 Tasa de conversión alimenticia (TCA)	24
5.5.3 Tasa de eficiencia proteica (TEP)	24
5.5.4 Tasa de conversión proteica (TCP)	24
5.6 Análisis químico proximal.....	25
5.7 Coeficiente de digestibilidad aparente (% CDA)	25
5.8 Actividad enzimática	26
5.8.1 Extracto enzimático.....	26
5.8.2 Tripsina	27
5.8.3 Lipasa	28
5.8.4 Amilasa	28
5.8.5 Proteínas solubles	29
5.7.6 Calculo de la actividad total y especifica.....	29
5.9 Análisis inmunológicos.....	30
5.9.1 Obtención de suero.....	30
5.9.2 Proteínas totales en suero	31
5.9.3 Recuento total de leucocitos.....	31
5.9.4 Estallido respiratorio	32
5.9.5 Fagocitosis.....	32
6. Análisis estadístico.....	34
Capítulo 6. Resultados.....	35
6.1 Crecimiento, supervivencia e índice hepatosomático (IHS)	35
6.2 Utilización del alimento y eficiencia alimenticia	35
6.3 Composición proximal del músculo.....	36
6.4 Coeficiente de digestibilidad aparente (% CDA)	37
6.5 Actividad enzimática	38
6.5.1 Tripsina	38
6.5.2 Lipasa	39
6.5.3 Amilasa	39
6.6 Actividad inmune innata	40
6.6.1 Proteínas totales en suero	40
6.6.2 Número de leucocitos	40
6.6.3 Estallido respiratorio	41
6.6.4 Fagocitosis.....	43

Capítulo 7. Discusión	44
7.1 Crecimiento	44
7.2 Eficiencia alimenticia e índice hepatosomático	45
7.3 Composición proximal del músculo.....	48
7.4 Coeficiente de digestibilidad aparente (CDA%)	49
7.5 Actividad enzimática	49
7.5.1 Tripsina	50
7.5.2 Lipasa	51
7.5.3 Amilasa	51
7.6 Actividad inmune no específica.....	54
7.6.1 Proteína totales en suero	54
7.6.2 Conteo de leucocitos	55
7.6.3 Estallido respiratorio	57
7.6.4 Fagocitosis.....	58
Capítulo 8. Conclusión	60
Capítulo 9. Recomendaciones	62
Referencias bibliográficas	63

Lista de figuras

Figura	Página
1. Ejemplar adulto de totoaba (<i>Totoaba macdonaldi</i>). Tomado de Arvizu y Chávez (1972).....	1
2. Mapa donde se muestra la zona de distribución de la totoaba (<i>Totoaba macdonaldi</i>). Tomado de Arvizu y Chávez (1972).....	2
3. Muestra el tracto digestivo de un pez provisto de estómago. Tomado de Sanz (2009).....	10
4. Digestibilidad aparente de juveniles de totoaba (<i>Totoaba macdonaldi</i>) alimentados con cuatro dietas experimentales (basal, inclusion de 0.1% de β -glucano, 0.5% de quitosano e 1% de inulina). Las letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$).....	33
5. Estallido respiratorio de juveniles de totoaba (<i>Totoaba macdonaldi</i>) a través del tiempo 80-60 días) alimentados con cuatro dietas experimentales (basal, inclusion de 0.1% de β -glucano, 0.5% de quitosano e 1% de inulina). Las letras <i>a,b,c</i> indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre el tiempo. Las letras <i>x,y,z</i> indican diferencias ($P < 0.05$) entre las dietas.....	38
6. Fagocitosis en porcentaje de juveniles de totoaba (<i>Totoaba macdonaldi</i>) a través del tiempo (0-60 días) alimentados con cuatro dietas experimentales (basal, inclusion de 0.1% de β -glucano, 0.5% de quitosano e 1% de inulina). Las letras <i>a,b,c</i> indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre el tiempo.....	39

Lista de tablas

Tabla	Página
1. Porcentaje de ingrediente por Dieta.....	18
2. Desempeño de los juveniles de <i>Totoaba macdonaldi</i> alimentados con cuatro dietas (basal, inclusion de 0.1% de β -glucano, 0.5% de quitosano e 1% de inulina). Los valores representan la media \pm D.E.....	31
3. Eficiencia alimenticia de juveniles de totoaba alimentados con cuatros dietas experimentales (basal, inclusion de 0.1% de β -glucano, 0.5% de quitosano e 1% de inulina). Los valores representan la media \pm DE.....	32
4. Composición proximal del músculo de juveniles de totoaba (<i>Totoaba macdonaldi</i>) previo a iniciar el experimento. Los valores representan la media \pm DE.....	32
5. Composición proximal del músculo de juveniles de totoaba (<i>Totoaba macdonaldi</i>) alimentados con cuatro diferentes dietas (basal, inclusion de 0.1% de β -glucano, 0.5% de quitosano e 1% de inulina). Los valores representan la media \pm DE.....	32
6. Actividad total (UA) y actividad específica (μ g P) de la cuantificación de tripsina, lipasa y amilasa en juveniles de totoaba (<i>Totoaba macdonaldi</i>) alimentados con cuatro dietas diferentes (basal, inclusion de 0.1% de β -glucano, 0.5% de quitosano e 1% de inulina).. Los valores muestran la media \pm DE. Las letras indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre tratamientos	35
7. Cuantificación de proteínas totales en suero (g/dl) a través del tiempo (0-60 días) de juveniles de totoaba (<i>Totoaba macdonaldi</i>) alimentados con cuatro dietas diferentes (basal, inclusion de 0.1% de β -glucano, 0.5% de quitosano e 1% de inulina).. Los valores muestran la media \pm la DE. Las letras indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre el tiempo.....	36
8. Producción de leucocitos ($\times 10^3$ celulas por mm^3) de juveniles de totoaba (<i>Totoaba macdonaldi</i>) alimentados con cuatro dietas diferentes (basal, inclusion de 0.1% de β -glucano, 0.5% de quitosano e 1% de inulina). Los valores muestran la media \pm la DE. Los superíndices <i>a,b</i> indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre el tiempo. Los superíndices <i>x,y</i> indican diferencias ($P < 0.05$) entre las dietas	37
9. Estallido respiratorio de juveniles de totoaba (<i>Totoaba macdonaldi</i>) alimentados con cuatro dietas diferentes (Basal, inclusión de 0.1% de β -glucano, 0.5% de quitosano y 1% de inulina). Los valores muestran la media \pm la DE. Los superíndices <i>a,b</i> indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre el tiempo. Los superíndices <i>x,y</i> indican diferencias ($P < 0.05$) entre las dietas.....	38

Capítulo 1. Introducción

1.1 Generalidades de la especie

La totoaba (*Totoaba macdonaldi*) (Figura 1) es una especie que pertenece a la familia Sciaenidae, en el orden de los Perciformes. Esta especie alcanza las mayores tallas de la familia Sciaenidae (Flanagan & Hendrickson, 1976, tomado de Villarreal-Rodarte, 2011), llegando a medir 2 m de longitud y a pesar 100 kg. En cuanto a los hábitos alimenticios, es totalmente carnívora; en sus primeras etapas se alimenta de pequeños crustáceos como anfípodos, misidáceos y camarones (Rosales-Juárez y Ramírez-González, 1987), y en su etapa adulta se alimenta de sardinas, cangrejos y pequeños calamares (Román-Rodríguez, 1990).



Figura 1. Ejemplar juvenil de totoaba (*Totoaba macdonaldi*).

La totoaba es una especie marina, endémica del Golfo de California, México (Cisneros-Mata, Montemayor-Lopez, & Román-Rodríguez, 1995) se distribuye desde el delta del río Colorado hasta bahía Concepción en Baja California Sur y desde el delta del río Colorado hasta la desembocadura del río Fuerte en el estado de Sonora (Arvizu y Chávez, 1972) (Figura 2).

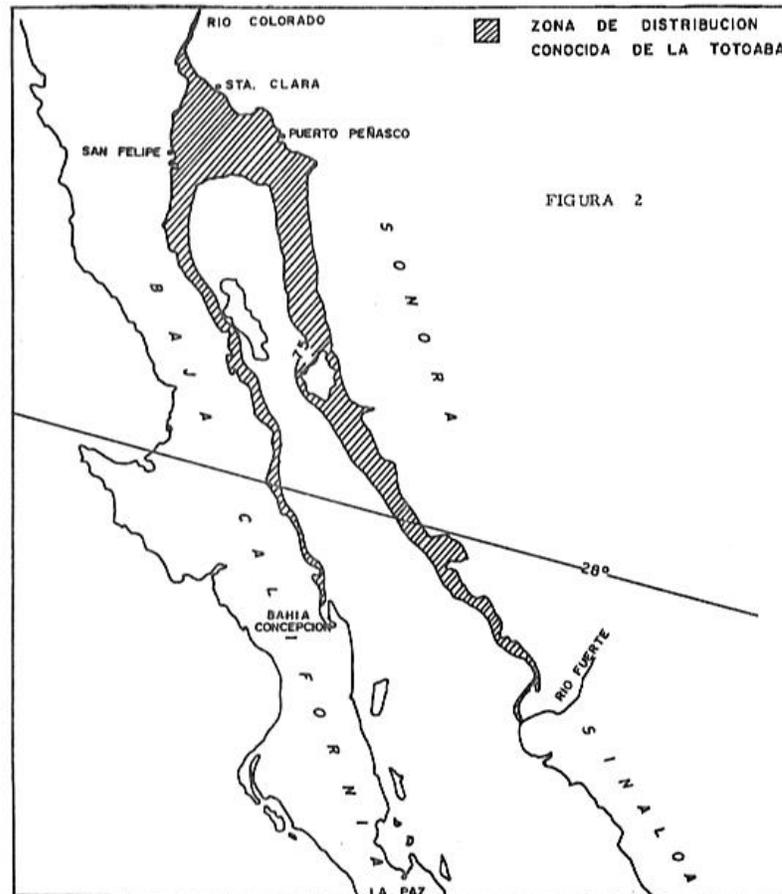


Figura2. Zona de distribución de la totoaba (*Totoaba macdonaldi*). Tomado de Arvizu y Chávez (1972).

En las primeras décadas del siglo XX la totoaba era muy abundante en el Golfo de California, lo que conllevó a varios asentamientos humanos en el alto Golfo de California (lugar donde la totoaba se reproduce y desova naturalmente) con el propósito de realizar pesca comercial y deportiva de esta especie (Flanagan & Hendrickson, 1976). Años más tarde la sobrepesca para comercializar su “buche” (vejiga natatoria) en Asia, llevaría a un fuerte decremento de la población (Flanagan & Hendrickson, 1976), por lo que, en 1975 se declaró veda para la captura de esta especie (Diario Oficial de la Federación, 1975). En 1976, fue declarada especie en peligro de extinción por la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestre (CITES) (True, 2012), y en 1991 por el gobierno de México (SEMARNAT, 2010). Actualmente es una de las especies reportadas en CITES como especies en peligro crítico (CITES, 2014).

Debido a esto, diferentes instituciones académicas y gubernamentales comenzaron a realizar estudios sobre la reproducción de la especie en cautiverio con el objetivo principal de conservar y repoblar la especie (SEMARNAT, 2008).

Una de estas instituciones académicas pionera en el estudio de esta especie fue la Universidad Autónoma de Baja California, la cual en 1993 inició un proyecto que consistía en desarrollar la biotecnología para el cultivo de la totoaba, lo cual se logra 15 años después (True, 2012). Debido a este logro biotecnológico y a sus altas tasas de crecimiento, la totoaba es considerada como una especie con gran potencial para la acuicultura nacional (Rueda-López, Lazo, Reyes, & Viana, 2011) y (Minjarez-Osorio, González-Félix, & Perez-Velazquez, 2012).

1.2 Acuicultura

La acuicultura es la técnica que permite aumentar la producción de animales y plantas acuáticas para consumo humano, por medio de cierto control de los organismos, de su ambiente y la alimentación (Idyll, 1974). Actualmente es el sector de producción de alimentos con un crecimiento más acelerado y representa ya, casi el 50% de los productos pesqueros mundiales destinados a consumo humano (SOFIA, 2014).

En el año 2012, la producción mundial de especies acuáticas comestibles cultivadas fue de 66.6 millones de toneladas con un valor económico de 137,700 millones de dólares, lo que representó el 41.9% de la producción mundial de especies comestibles (SOFIA, 2014). Por lo tanto se considera a la acuicultura como uno de los sectores alimentarios con mayor importancia en la actualidad.

El principal objetivo de la acuicultura es obtener un buen desarrollo y crecimiento de los organismos bajo condiciones de cultivo, para cumplir con este objetivo intervienen una serie de factores dentro de los cuales uno de los más importantes es la buena nutrición y alimentación (Tacón, 1989).

La dieta debe satisfacer los requerimientos nutricionales específicos para cada especie, proporcionando un balance adecuado de proteínas, lípidos, carbohidratos, vitaminas y minerales (Tacon, 1989).

1.3 Requerimientos nutricionales

El estudio de los requerimientos nutricionales principales en la dieta de los peces, se ha basado en estudios conducidos originalmente en animales terrestres. Por lo que, la mayoría de la información disponible sobre los requerimientos nutricionales de las especies acuáticas, se obtiene de ensayos de alimentación realizados en laboratorio, en donde los animales son mantenidos en condiciones controladas (Tacon, 1989).

Uno de los nutrientes principales para todos los organismos son las proteínas, estas son moléculas orgánicas complejas, compuestas por carbono, hidrogeno, oxígeno y nitrógeno y en algunas está presente el azufre y el fosforo y en menor medida el hierro y el cobre. Estos elementos químicos que constituyen a las proteínas se encuentran distribuidos en unidades estructurales llamados aminoácidos (Hortolá, 1998).

Los aminoácidos son de gran importancia en el desarrollo de los organismos, debido a que se requieren para la síntesis de proteínas, ya que estas a su vez conformarán los tejidos durante el crecimiento, son componentes esenciales en muchas moléculas bioactivas y suplirán además parte de la energía requerida para el metabolismo (Rønnestad, Thorsen, & Finn, 1999). Las proteínas son consideradas como el constituyente más importante de cualquier célula y representan el grupo químico más abundante en el cuerpo de los animales, con excepción del agua. En promedio, el cuerpo del pez contiene 75% de agua, 16% de proteína, 6% de lípidos y 3% de cenizas (Tacon, 1989). Debido a la importancia mencionada con anterioridad, y a que son esenciales para la síntesis de musculo, las proteínas representan el mayor porcentaje en las dietas.

El segundo nutriente principal en una dieta son los lípidos, estos pueden ser divididos en dos grandes grupos: los fosfolípidos y los triglicéridos. La importancia de ambos grupos de lípidos radica en que los fosfolípidos constituyen la estructura de las membranas celulares y los triglicéridos son los lípidos empleados como fuente de energía (Huss, 1999) que será utilizada en los procesos metabólicos para cumplir con el buen funcionamiento fisiológico del pez. Los lípidos son los compuestos más energéticos dentro de una dieta, con un valor energético, igual a 9.5 Kcal/g, mientras que el de las proteínas es 5.6 Kcal/g y los carbohidratos 4.1 Kcal/g (Tacon, 1989). Debido a este alto valor energético los nutriólogos incluyen a los lípidos en la dietas con la intención de que sean utilizados como energía metabólica, y que las proteínas sean utilizadas principalmente para la síntesis de musculo y otros órganos (Tacon, 1989).

1.4 Requerimientos nutricionales de la totoaba

En el caso de la totoaba se han realizado estudios para determinar sus requerimientos nutricionales. Por ejemplo, López, et al., (2006) compararon la composición proximal y el perfil de ácidos grasos en el tejido muscular y vísceras de juveniles silvestres y cultivados de la totoaba, y obtuvieron como resultado que el ácido graso 20:4n-6 y la razón n-3/n-6 en el músculo de las totoabas silvestres eran mayores que los encontrados en las totoabas cultivadas. También observaron que el nivel del ácido graso 18:2n-6 en el tejido muscular y vísceras de los peces cultivados fue significativamente mayor que el encontrado en organismos silvestres o en el alimento balanceado utilizado, por lo que los autores sugieren una posible acumulación de este ácido graso de la fuente alimenticia, debido probablemente a la incapacidad de alargar y desaturar los PUFAs C18 a HUFAs C20/22, por lo que concluyen que la dieta natural de la totoaba parece contener una gran cantidad de HUFAs tipo n-3 y n-6.

Por otra parte Rueda-López et al., (2011) evaluaron el efecto de la relación Energía: Proteína en la dieta para juveniles de totoaba, utilizando seis dietas, con tres niveles de proteína (43, 48 y 52%) y dos niveles de lípidos (8.5 y 18%). Estos autores observaron que se obtuvo un mayor crecimiento en peso en los peces alimentados con la dieta que

contenía un alto contenido proteico (52%) y un bajo nivel de lípidos (8.5%) y recomiendan estos niveles de nutrientes. Así mismo observaron que los organismos no obtuvieron un buen desempeño con la dieta que contenía un alto nivel de lípidos (18%), por lo que recomiendan no utilizar niveles altos de lípidos en la dieta para la totoaba.

Llegar a conocer el requerimiento de los principales nutrientes para las especies de interés se facilita el éxito del cultivo comercial ya que un organismo alimentado con una dieta que satisfaga sus requerimientos nutricionales produce un buen desarrollo, estado de salud y crecimiento del pez. No obstante es importante tomar en cuenta factores externos a la alimentación como el ambiente y espacio donde se cultivan los organismos.

En el cultivo de peces a densidades altas, los organismos tienden a estresarse mucho y pueden volverse más susceptibles a enfermedades y a ser infectados por parásitos. A través de la profilaxis, en los últimos años se ha trabajado con el uso de aditivos en el alimento, los cuales tienen como finalidad promover la salud y el bienestar de los organismos (Tuohy, Rouzaud, Bruck & Gibson, 2005).

Un grupo de suplementos o aditivos a las dietas con gran potencial son los probióticos, prebióticos y simbióticos. Estos, tienen la capacidad de promover el equilibrio de la microbiota intestinal y estimulan la inmunidad no específica, lo que resulta en una reducción de la carga bacteriana patógena y en general una mejora de la salud del organismos (Williams, Verstegen, & Tamminga, 2001).

El buen funcionamiento de la respuesta inmune previene o disminuye el posible uso de antibióticos en los cultivos de peces. Con la finalidad de contrarrestar las enfermedades generadas por la vulnerabilidad de estos organismos bajo las condiciones de cultivo, es que actualmente se utilizan los suplementos o aditivos que estimulan el sistema inmune innato y la microbiota intestinal benéfica previniendo así la necesidad de utilizar antibióticos.

1.5 Probióticos, prebióticos y simbióticos

Los probióticos han tenido diferentes definiciones a lo largo de los años y estas varían de acuerdo a cada autor y área en que son utilizadas. Por ejemplo, Merrifield et. al., (2010) define a los probióticos empleados en la Acuicultura como; “cualquier célula microbiana incorporada a través de la dieta o a través del agua de cultivo, que posteriormente beneficia al organismo o consumidor”.

Es importante tomar en cuenta una serie de requisitos para que un microorganismo sea considerado un probiótico: este no debe ser toxico o patógeno, con identificación taxonómica exacta, producir sustancias antimicrobianas, modular respuestas inmunes, entre otras, pero es importante mencionar que no es necesario cumplir con todos los requisitos para ser utilizado como probiótico (Gaggia, Mattarelli, & Biavati, 2010)

Los microorganismos más utilizados en la alimentación animal son: *Aspergillus orizae*, *A. ninger*, *Bacillus cereus*, *B. Licheniformis*, *B. subtilis*, *Lactobacillus acidophilus*, *L. amylovorus*, *L. brevis*, *Bifidobacterium lactis*, entre otros. Importante mencionar que en la alimentación de organismos terrestres el uso de probióticos ha sido ampliamente estudiado y utilizado, sin embargo en la acuicultura aún está en desarrollo (Gaggia et al., 2010).

Lamentablemente los probióticos al ser organismos vivos presentan algunas limitaciones para ser incorporados en la dieta, ya que en el proceso de fabricación se aplica calor y debido a que son organismos vivos que no toleran bien el proceso de la elaboración del alimento. Además son organismos vivos que pueden representar problemas en ciertos países relacionados con la introducción de especies exóticas.

En cuanto a los prebióticos, son sustancias o ingredientes no digeribles que afectan beneficiosamente al organismo estimulando selectivamente el crecimiento y/o la actividad de ciertas especies bacterianas benéficas (Manning & Gibson, 2004).

Al igual que los probióticos, los prebióticos, deben contar con algunas características para ser considerados como tal: por ejemplo el no ser hidrolizado ni absorbido en el intestino,

ser un sustrato selectivo para una o un número ilimitado de bacterias beneficiosas, ser capaces de aumentar la actividad de la microflora intestinal, entre otras (Manning & Gibson, 2004). Así mismo, para considerarse funcionales como aditivos en la dieta, estos deben ser no digeribles, presentar estabilidad química, no requerir refrigeración para su conservación y deben ser de fácil y rápida incorporación en los alimentos (Cerezuela-Cabrera, 2012).

Estos compuestos provocan diferentes reacciones en el tracto gastrointestinal, tales como: hiperplasia del epitelio en el intestino delgado, estimulación de la secreción de hormonas peptídicas intestinales, actúan como sustrato para la microflora intestinal, entre otras (Gaggia *et al.*, 2010).

Los prebióticos más utilizados en la acuicultura son los carbohidratos no digeribles (Cerezuela, Cuesta, Meseguer, & Esteban, 2008) principalmente los fructanos, la inulina y la oligofruktosa, sustancias derivadas de las raíces de la achicoria (Bosscher, Van Loo, & Franck, 2006).

1.5.1 La inulina

La inulina ha sido uno de los prebióticos más estudiados, debido a que afecta positivamente el crecimiento, la conversión alimenticia, la microbiota intestinal y la resistencia contra las bacterias patógenas de los organismos que la consumen. Por ejemplo; Ortiz *et al.* (2013), incorporaron a la dieta de la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) 5 y 10 g de inulina por kg de dieta y observaron a las 4 y 8 semanas un aumento en la ganancia en peso y en la absorción intestinal. Por otra parte Ibrahim *et al.* (2012) utilizaron este mismo prebiótico a una concentración de 5 g de inulina por kg en la dieta para tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*) y observaron un aumento en la tasa de crecimiento, la ganancia en peso, y algunos parámetros de la respuesta inmune no específica de los peces como el estallido respiratorio y la actividad de la lisozima. El estallido respiratorio es un proceso que se lleva en algunas células blancas (células de defensa) que tiene como finalidad desintegrar cualquier partícula extraña o posible

patógeno que entre al cuerpo de los organismos, estas partículas o posibles patógenos son destruidos por medio de sustancias oxidativas o lisozimas. La lisozima es una enzima con función antimicrobica, que además de ser producida por algunas células de defensa, es producida en el mucus de los peces, en este caso actúa cuando un parasito se adhiere a la piel de los peces.

Existe una gran variedad de especies acuícolas de importancia comercial con las cuales se ha evaluado la incorporación de la inulina en su dieta y en la mayoría se han obtenido resultados favorables, pero hay otros carbohidratos en los cuales también se han obtenido resultados positivos, uno de estos es el β -glucano.

1.5.2. B-Glucano

El β -glucano, es un polímero de glucosas (un polisacárido) que se localiza en la pared celular de algunas plantas como la avena, la cebada, las algas marinas y en la pared celular de bacterias, hongos y levaduras (Caruffo *et al.*, 2013). El β -glucano derivado de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* es el más utilizado como prebiótico en las dietas de peces (Caruffo *et al.*, 2013). En México, el primer estudio publicado en peces marinos fue el realizado por Del Rio Zaragoza *et al.* (2011). Los autores evaluaron en la dieta del pargo lunarejo (*Lutjanus guttatus*) diferentes concentraciones de β -glucano y observaron a las dos semanas que una suplementación en la dieta de 0.5 g de β -glucano por kg genero un aumento en las respuestas del sistema inmune no especifico como: el número de células fagocíticas (monocitos y neutrófilos), en el estallido respiratorio y en la actividad del óxido nítrico. Al final del experimento a las seis semanas observaron que se vio favorecido el crecimiento del pargo lunarejo con esta misma concentración. Tres años más tarde Guzmán-Villanueva *et al.* (2014) hicieron evaluaron este prebiótico en la dieta de la dorada (*Spaurus aurata*) a una concentración de 1 y 2 g de β -glucano por Kg de dieta y observaron a las cuatro y seis semanas un aumento en crecimiento y en algunas enzimas digestivas como la tripsina y la aminopeptidasa.

1.5.3. Quitosano

Otro prebiótico utilizado en los últimos años como aditivo en dietas, es el quitosano. Este compuesto es un producto des-acetilado de la quitina (Shanthi Mari *et al.*, 2014). La quitina es el segundo polisacárido más abundante en la naturaleza después de la celulosa, es un polisacárido insoluble, no tóxico, biodegradable y se encuentra en el exoesqueleto de los crustáceos y los insectos (Lourthu *et al.*, 2014).

Hay pocos estudios sobre este compuesto incorporado a dietas de organismos acuáticos (Esteban *et al.*, 2000; Esteban *et al.*, 2001). Sin embargo, en los últimos años han aumentado las investigaciones evaluando este prebiótico como aditivo en las dietas de peces. Por ejemplo, Gen *et al.* (2011) y Lin *et al.* (2012) añadieron 6 y 2 g de quitosano por kg de dieta en cobia (*Rachycentron canadum*) y carpa (*Cyprinus carpio koi*) respectivamente y observaron un aumento en parámetros del sistema inmune innato; la actividad de la lisozima, la actividad fagocítica, y el estallido respiratorio. a las ocho semanas de haber iniciado su alimentación en ambas especies.

Por otro lado, los simbióticos son una combinación de probióticos y prebióticos que afecta beneficiosamente al organismo, ya que mejoran la supervivencia de los microorganismos vivos (probióticos) en el tracto gastrointestinal de los organismos (Collins & Gibson, 1999). Los probióticos y prebióticos al combinarse como simbióticos pueden tener un efecto sinérgico, mejorando el efecto que tienen al administrarse por separado (Cerezuela, Guardiola, Meseguer, & Esteban, 2012). Cabe mencionar que en acuicultura el uso de simbióticos es escaso.

La relevancia del uso de estos aditivos, en particular de los prebióticos, es para promover el bienestar animal, a través de la estimulación de dos actividades importantes para el buen desarrollo y crecimiento de los organismos en cultivo; la modulación de la microflora intestinal (actividad digestiva y bacterias benéficas) y la actividad inmune (Tuohy *et al.*, 2005).

1.6 Actividad digestiva en peces

El tracto digestivo de los peces presenta una estructura tubular que comienza en la boca y termina en el ano. Se caracteriza por presentar cuatro zonas diferenciadas: cavidad oral, que se encuentra asociada a la cavidad faríngea o branquial; digestivo anterior, compuesto por el esófago, estómago y píloro; digestivo medio, presenta los ciegos pilóricos; y el digestivo posterior, que finaliza en el ano (Figura 3) (Sanz, 2009).

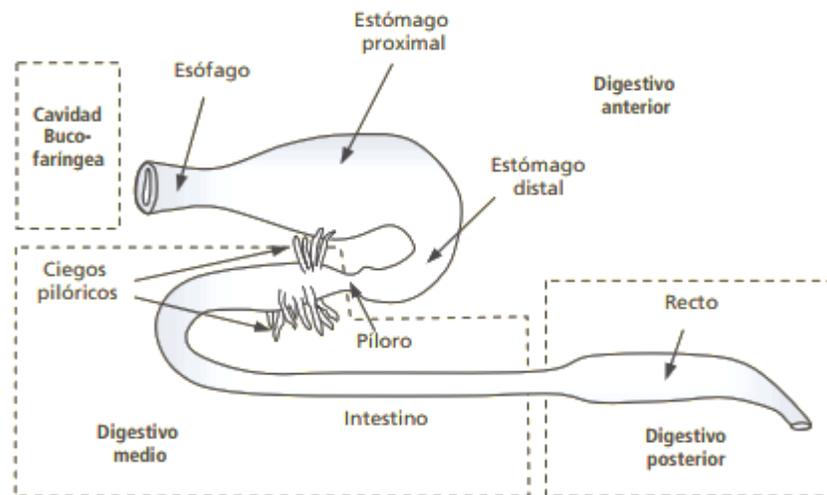


Figura 3. Tracto digestivo de un pez provisto de estómago. Tomado de Sanz (2009).

Las cuatro zonas diferenciadas en el tracto digestivo cumplen con funciones importantes, pero en el estómago e intestino es donde se lleva a cabo la mayor parte de la digestión y la absorción de los nutrientes una vez digeridos solo en el intestino (Sanz, 2009).

En la mayoría de las especies el estómago está recubierto de células que secretan ácidos, como el ácido clorhídrico (HCl), este ácido puede realizar la hidrólisis de los alimentos, además de contribuir a la digestión enzimática ajustando el pH para que actúe la pepsina (Sanz, 2009).

El proceso de digestión del alimento se lleva a cabo en diferentes pasos, en donde intervienen un conjunto de enzimas digestivas las cuales son producidas principalmente en el estómago y páncreas, incluso en las paredes celulares del intestino. Las enzimas se encuentran presentes en distintas partes del tubo digestivo para llevar a cabo su función específica como la hidrólisis de las biomoléculas; proteínas, lípidos y carbohidratos a nutrientes esenciales; aminoácidos, ácidos grasos y maltosa, para su posterior absorción.

Las enzimas digestivas se encargan de la degradación del alimento, reducen este a sus moléculas más simples (i.e., amino ácidos y ácidos grasos) para su mejor absorción y posterior utilización como sustratos en los procesos metabólicos (Zambonino-Infante & Cahu, 2001).

Las enzimas más importantes en la digestión alcalina son las que participan en el intestino; las proteasas (tripsina, quimiotripsina, colágenasa y elastasa). Estas enzimas son secretadas por el páncreas en forma de zimógenos, es decir en su forma inactiva y son activadas en el interior del intestino mediante la acción de la enteroquinasa (enzima secretada por la pared intestinal) y tripsina (Sanz, 2009). La tripsina es un enzima de suma importancia debido a que es la encargada de la hidrólisis de las proteínas (componente principal de la dieta en los peces carnívoros), participa también en la activación de proenzimas y pre hormonas y son encargadas junto con otras enzimas de romper los enlaces peptídicos, liberando así los aminoácidos libres, dipéptidos y tripéptidos para su posterior absorción (Rust et al, 2003).

Otra enzima que actúan en la digestión dentro del intestino son las lipasas, estas enzimas son secretadas por el páncreas y activadas por las sales biliares. Digieren lípidos neutros catalizando la hidrólisis de las uniones éster-carboxilo, pero también hidroliza otras grasas como los ésteres de colesterol (Sanz, 2009). La digestión de los lípidos es de suma importancia ya que constituyen la principal fuente de energía y los ácidos grasos productos de la digestión y absorción de los lípidos son utilizados para formar parte de las membranas celulares y el tejido nervioso (Sargent, McEvoy, & Bell, 1997).

Al igual que las lipasas y proteasas, las amilasas, son enzimas presentes en el intestino que participa en la digestión de los alimentos. Las amilasas son producidas principalmente por el páncreas y son estas las encargadas de digerir los carbohidratos presentes en la dieta, como el almidón (Sanz, 2009).

Generalmente los peces carnívoros no son capaces de digerir bien los polisacáridos, aunque en todas las especies de peces hasta ahora estudiadas se ha observado una actividad tipo amilasa que tiene origen pancreático (Sabapathy & Teo, 1993). Esta amilasa es la α -amilasa que hidroliza enlaces α -glucosídicos a lo largo de la cadena del polímero hidrocarbonado.

La concentración de todas estas enzimas varía dependiendo de los hábitos alimenticios de los peces, por ejemplo; en los herbívoros y omnívoros los niveles de amilasas tienden a ser mayores que en los carnívoros, y en estos la concentración de pepsina es mayor, pero la concentración de proteasas alcalinas menor; por otra parte los herbívoros y detritívoros presentan concentraciones mayores de tripsina (Sanz, 2009).

1.7 Sistema inmune

La función esencial del sistema inmune en todos los vertebrados es la defensa contra las infecciones (Olabuenaga, 2000). El sistema inmunitario de los peces es similar al de vertebrados superiores, aunque presenta algunas diferencias. En todos los vertebrados, incluidos los peces, la respuesta inmunitaria puede ser de dos tipos: innata (también conocida como natural o inespecífica) y adaptativa (también conocida como adquirida o específica) (Abbas, Lichman & Pober, 2002). La primer respuesta es la que poseen todos los seres vivos desde el nacimiento, formado por componentes celulares y humorales, y la segunda respuesta involucra la producción de anticuerpos a través de un reconocimiento específico del antígeno, donde también participan elementos celulares (Olabuenaga, 2000).

La actividad relativa de estos tipos de respuestas depende de su adaptación evolutiva. La importancia de la respuesta adaptativa se va haciendo mayor en organismos más complejos, por lo tanto en peces la respuesta inmune innata está más desarrollada que la adaptativa, en contraste con lo que ocurre en vertebrados superiores que es menos desarrollada (Tort, Balasch, & Mackenzie, 2003). Es por esto que el enfoque que se le dio en el presente estudio está dirigido hacia el sistema inmune no específico.

1.8 Sistema inmune no específico

La respuesta inmune no específica está mediada en peces por una serie de factores que constituyen la respuesta humoral y celular.

Las respuestas humorales del sistema inmune inician con la secreción del mucus, que tiene una función protectora previniendo la colonización de parásitos, bacterias y hongos, a través de una continua pérdida y reemplazo del mismo mucus (Ourth, 1980). El mucus está presente en la piel, intestino y branquias, y su compuesto principal es la mucina. En la respuesta humoral, además del mucus hay diversos mecanismos de defensa que incluye la participación de componentes del suero, como la proteína C-reactiva, la transferrina, la lisozima, las aglutininas, las citoquinas, el sistema del complemento, péptidos antimicrobianos, carbohidratos, entre otros (Olabuenaga, 2000; Magnadottir, 2006)

En cuanto a la respuesta celular del sistema inmune innato en peces, participan los leucocitos como: los monocitos-macrófagos, los linfocitos, los granulocitos, los trombocitos y las células citotóxicas naturales (Manning, 1998).

Las células citotóxicas en peces cumplen con una papel funcional similar que las células “natural killer” (NK) presentes en vertebrados superiores. Su función es ejercer una toxicidad inespecífica de diferentes células blanco sin un previo reconocimiento (Evans, Graves, Cobb & Dawe, 1984).

En cuanto al resto de las células que participan en la respuesta inmune inespecífica se clasifican cómo; granulocitos y agranulocitos (fagocitos mononucleares) y a su vez estos se dividen en dos categorías: la primera que incluye a los neutrófilos, los eosinófilos y los basófilos y en la segunda los monocitos-macrófagos (Ellis, 1977). El principal mecanismo de defensa que presentan, es un proceso de ingestión y digestión de material extraño particulado, a este proceso se le llama fagocitosis (Mac Arthur & Fletcher 1985).

Otro proceso importante que involucra a las células fagocíticas es el estallido respiratorio, proceso seguido de la fagocitosis. El estallido respiratorio es un mecanismo que consiste en la liberación de especies reactivas de oxígeno (ROS); peróxido de hidrogeno, aniones superóxido y radicales hidroxilo, todas estas con la capacidad de degradar a las partículas fagocitadas por los macrófagos y neutrófilos (fagocitos) (Abbas et al., 2012, tomado de Carbone & Faggio, 2016).

Este proceso implica la reducción de oxígeno (O_2) a su radical anión (O_2^-). Esta reacción es catalizada por una enzima (oxidasa NADPH) y genera la producción de anión superóxido (O_2^-) el cual genera una matriz de ROS, la cual produce peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radical hidroxilo (OH^\cdot) y ácido hipocloroso ($HClO^\cdot$). Todos estos radicales de oxígeno presentan efectos antimicrobianos potentes (Carbone & Faggio, 2016).

Capítulo 2. Justificación

El fortalecimiento de los mecanismos de defensa de los peces a través de la administración de prebióticos, puede conferir protección frente a diferentes patógenos, lo que conlleva a disminuir el posible uso de antibióticos. El suministro de estos aditivos en la dieta puede activar el sistema inmune innato y mejora el equilibrio de la flora intestinal lo que favorece la digestión y/o absorción de nutrientes. La suma de estos factores resulta en un mejor desarrollo y crecimiento de los organismos, especialmente en aquellos organismos con potencial de cultivo, como la totoaba (*Totoaba macdonaldi*). Este tipo de estudios constituyen un punto de partida para futuras investigaciones en esta especie, debido a que hay poca información en relación a la fisiología de esta especie.

Es por ello que en este proyecto se evaluó el efecto de tres prebióticos (inulina, β -glucano y quitosano) sobre el crecimiento, la actividad digestiva y la actividad inmune no específica de la totoaba (*Totoaba macdonaldi*).

Capítulo 3. Hipótesis

1. La inulina, el β -glucano o el quitosano incorporados en la dieta, aumentan el crecimiento de la *Totoaba macdonaldi*.
2. La inulina, el β -glucano o el quitosano incorporados en la dieta, mejoran la capacidad digestiva de la *Totoaba macdonaldi*.
3. La inulina, el β -glucano o el quitosano incorporados en la dieta, aumentan la inmunidad no específica de la *Totoaba macdonaldi*.

Capítulo 4. Objetivos

4.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de la inulina, el β -glucano o el quitosano sobre el crecimiento, la capacidad digestiva y la inmunidad no específica en la totoaba (*Totoaba macdonaldi*).

4.1 Objetivos particulares

1. Evaluar el efecto de la inulina, el β -glucano o el quitosano en supervivencia y eficiencia de la utilización del alimento (crecimiento y digestibilidad) en la *Totoaba macdonaldi*.
2. Evaluar el efecto de la inulina, el β -glucano o el quitosano en la actividad de las enzimas digestivas (lipasa, tripsina y amilasa) en la *Totoaba macdonaldi*.
3. Evaluar el efecto de la Inulina, el β -glucano o el quitosano en la inmunidad no específica (leucocitos, proteínas totales, estallido respiratorio y actividad fagocítica) en la *Totoaba macdonaldi*.

Capítulo 5. Materiales y métodos

5.1 Formulación y elaboración de la dieta

Se formularon cuatro dietas (Tabla 1) isoproteicas (48%) e isolipídicas (11%) que lograran satisfacer los requerimientos nutricionales de la totoaba, con base en lo reportado por Rueda-López et al., (2011). Una de las dietas fue la basal y/o control y a las restantes se les adiciono un prebiótico (0.1% β -glucano, 0.5% quitosano o 1% inulina). Las concentraciones utilizadas de los prebióticos se basan en lo reportado para algunas especies de peces; trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*; Ortiz et al., 2013), pargo lunarejo (*Lutjanus guttatus*; Del Rio-Zaragoza et al., 2011) y cobia (*Rachycentron canadum*, Geng et al., 2011).

Las dietas se elaboraron en el Laboratorio de Investigaciones y Desarrollo de Alimentos para la Acuicultura del Instituto de Investigaciones Oceanológicas (IIO) de la Universidad Autónoma de Baja California (UABC). Los ingredientes (macroingredientes y microingredientes) secos se pesaron en una balanza (TOR REY, modelo EQ-10/20) y se incorporaron en una mezcladora (Robot-coupe, USA, modelo R60) por al menos 8 minutos (intervalos de 2 minutos). Primero se mezclaron todos los ingredientes secos, después se agregó el aceite de pescado, la grenetina previamente disuelta en agua y por último la cantidad de agua necesaria para obtener la consistencia adecuada (i.e., 30% de la cantidad total de dieta). Posteriormente se hizo pasar la mezcla por un molidor de carne con un diámetro de orificio de 5 mm marca TOR-REY. Los “pellets” producidos se secaron durante 24 horas a 65°C en un horno con flujo de aire (Hafo series 1600). Las dietas secas se trituraron de forma manual hasta obtener un tamaño de partícula uniforme, se empaquetaron en bolsas de plástico y se almacenaron a -20° C hasta su posterior utilización.

Tabla 1. Porcentaje de ingrediente por Dieta

INGREDIENTES	TRATAMIENTO			
	Base	Inulina	Beta-glucano	Quitosano
Harina de soya	5	4	4	4
Harina de ave	10	9.7	9.7	9.4
Harina de pescado	47	48	48	48
Harina de maíz	6.5	6.5	6.5	6.5
Aceite de pescado	4	4	4	4
Trigo entero	12.3	11.6	11.6	11.6
Almidón	4	4	4.9	4.8
Gelatina	5	5	5	5
Rovimix (mezcla vit. y min.)	5	5	5	5
Stay c	1	1	1	1
Benzoato de sodio	0.2	0.2	0.2	0.2
*Inulina	0	1	0	0
**B-glucano	0	0	0.1	0
***Quitosano	0	0	0	0.5
BHT	0.01	0.01	0.01	0.01
ANÁLISIS PROXIMAL (%)				
Proteína	49.5	47.5	47.7	48.4
Lípidos	8.0	8.2	8.2	8.6
Humedad	3.3	4.1	2.7	4.1
Cenizas	13.1	12.8	12.9	12.5

*Inulina de agave 100% orgánica. Gyves organic food, corp. **Beta 1,3 glucan, extracto de pared celular de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*). *** Quitosano, Sigma-aldrich CAS 9012-76-4.

5.2 Peces y condiciones

Los huevos de totoaba fueron donados por el Centro Reproductor de Especie Marinas del Estado de Sonora (CREMES). Una vez eclosionados se cultivaron las larvas utilizando el protocolo del Laboratorio de Peces de Marinos, del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE). Las larvas se alimentaron con rotíferos (3-17 días después de la eclosión DDE) y con Artemia (17-42 DDE) enriquecidos con HUFAs n-3. Es importante mencionar que el destete (transición de alimento vivo a alimento formulado comercial) se realizó cuando los organismos

alcanzaron un mes de edad. El primer alimento comercial que se utilizó fue Othoime B1 (250-360 μ m) y conforme los organismos aumentaron en talla, el diámetro del alimento se incrementó. Una vez alcanzado los 3g, los juveniles fueron alimentados con un alimento comercial para peces marinos (Skreting). Una vez que los organismos alcanzaron una talla de 50-65 g se trasladaron a un sistema de recirculación para llevar a cabo el bioensayo.

5.3 Diseño experimental

El bioensayo se llevó a cabo en un sistema de recirculación de agua de mar filtrada, compuesto por 12 tanques con una capacidad de 200 lt, un biofiltro (Bubble bead filter, # 5232586), una lámpara UV (Pentair aquatics, USA modelo QL-25), una bomba y 12 lámparas led de 3 watts (una en cada tanque) para simular el fotoperiodo 12:12.

El experimento se realizó bajo condiciones controladas; la temperatura se mantuvo entre 22 y 24 °C. Para mantener dicha temperatura el sistema de recirculación se cubrió con plástico negro y se colocó un calentador ambiental a 28° C y dos calentadores sumergibles (28° C cada uno) en el tanque de compensación. La concentración de oxígeno disuelto se mantuvo ~6 mg L⁻¹ y la salinidad 33.5 \pm 0.5 UPS.

En cada tanque se colocaron 15 organismos con un peso entre los 53 y 66 g y se utilizaron tres tanques para el control y tres tanques para cada uno de los tratamientos:

- Control: organismos alimentados con dieta formulada, sin aditivo.
- Tratamiento 1: organismos alimentados con dieta formulada, inclusión de 1 g de β -glucano por kg de dieta.
- Tratamiento 2: organismos alimentados con dieta formulada, inclusión de 5 g de quitosano por kg de dieta.
- Tratamiento 3: organismos alimentados con dieta formulada, inclusión de 10 g de inulina por kg de dieta.

Los organismos se mantuvieron en un periodo de aclimatación de 10 días. En este tiempo hubo un periodo de transición de alimento comercial (AC) a alimento experimental (AE). La transición se realizó con la dieta basal, tanto en el control como en los tratamientos.

La transición se dio de la siguiente manera; el primer día se alimentaron con 75% AC – 25% AE, el tercer día 50% AC - 50% AE, el quinto día 25% AC – 75% AE y el sexto día 100 % AE. El décimo día inicio el bioensayo con las cuatro dietas.

En cuanto a protocolo de alimentación, los organismos fueron alimentados dos veces al día a saciedad aparente y el experimento tuvo una duración de 8 semanas (60 días).

5.4 Muestreo

La toma de muestras se llevó a cabo a los 0, 15, 30, 45 y 60 días de iniciado el experimento. En cada muestreo se tomaron 3 organismos por tanque.

Previo a la toma de muestra los peces fueron anestesiados por inmersión en agua de mar que contenía 100-250 mg de tricaina metano sulfonato (MS-222). Una vez anestesiados los peces se midieron con un ictiometro y se pesaron en una balanza (Rhino, modelo BAPO-10). Posteriormente se colocaron sobre una bandeja de plástico con la cabeza orientada hacia la izquierda para extraer sangre de la vena caudal por medio de jeringas plásticas de 1 ml. Una vez extraída la sangre se dividió en dos tubos; un tubo Microtainer PST™ con Heparina-Litio como anticoagulante y en un tubo eppendorf de 1 ml sin anticoagulante, ambos tubos se refrigeraron inmediatamente.

Posteriormente se sacrificaron los organismos con una punción cerebral para dar inicio a la disección. Para esto se realizó un corte con una tijera de punta recta en la región abdominal; desde el ano hasta la intersección branquial se abrió la cavidad abdominal del pez dejando los órganos expuestos y se retiró cuidadosamente el intestino, este se limpió, se quitó el exceso de heces para colocarlo en una bolsa de plástico previamente

etiquetada y se almacenaron en un ultracongelador ThermoScientific a -80°C para su posterior análisis.

Finalmente se removió la piel de los organismos muestreados y se extrajo todo el musculo, se colocó en una bolsa previamente etiquetada y se almaceno en un ultracongelador a -80° C para su posterior análisis.

5.5 Crecimiento y eficiencia de la utilización del alimento

Para evaluar el crecimiento y la utilización del alimento se tomaron los datos de las biometrías realizadas en cada muestreo, los datos de peso inicial, peso final, peso ganado, alimento consumido, proteína consumida y proteína corporal de cada organismo.

5.5.1 Tasa de crecimiento específico (TCE)

Para estimar el crecimiento de los organismos a través del tiempo se tomaron los datos de peso de cada organismo y el tiempo de duración del experimento.

$$TCE = \frac{\ln Pf - \ln Pi}{\text{Tiempo días}} * 100 \quad (1)$$

Dónde:

$\ln Pf$ = logaritmo de peso final

$\ln Pi$ = logaritmo de peso inicial

5.5.2 Tasa de conversión alimenticia (TCA)

La tasa de conversión alimenticia se calculó para cada organismo por medio de la siguiente ecuación.

$$TCA = \frac{\text{Alimento consumido (g)}}{\text{Peso ganado (g)}} \quad (2)$$

5.5.3 Tasa de eficiencia proteica (TEP)

La tasa de eficiencia proteica se calculó para cada organismo por medio de la siguiente formula.

$$TEP = \frac{\text{Peso ganado (g)}}{\text{Proteína consumida (g)}} \quad (3)$$

5.5.4 Tasa de conversión proteica (TCP)

La tasa de conversión proteica se calculó para cada organismo por medio de la siguiente formula.

$$TCP = \frac{(\text{Peso final} * 0.4) * PCF - (\text{Peso inicial} * 0.4) * PCI}{\text{Proteína consumida (g)}} * 100 \quad (4)$$

Donde:

PCF= proteína corporal (musculo) final

PCI= proteína corporal (musculo) inicial

0.4= 40% del total del peso del pez es músculo (en corvinas)

5.6 Análisis químico proximal

Se analizó la composición química proximal de las dietas y del músculo de los organismos antes de iniciar el experimento y al finalizar. Los análisis químicos realizados fueron para determinar el porcentaje de proteínas, lípidos, humedad y cenizas. El análisis de proteínas se llevó a cabo por medio del método micro-kjeldahl (Ma & Zuazago, 1942), el cual es considerado un método indirecto debido a que el resultado que nos proporciona es de los elementos nitrogenados de las muestras, es decir la cantidad de nitrógeno y con este resultado determinamos la cantidad de proteína al multiplicarlos por 6.25 (factor de proteína).

La cuantificación de lípidos se llevó a cabo por el método de Goldfish, donde los lípidos se estiman por gravimetría después de ser extraídos con éter de petróleo. En cuanto a la humedad se determinó secando las muestras a 100° C durante 4 hr en una estufa Lindeberg/Blue M, modelo BF51842PBFMC-1. Por último las cenizas se estimaron incinerando las muestras a 550° C durante 4 hr (A.O.A.C., 1990).

5.7 Coeficiente de digestibilidad aparente (% CDA)

Para este análisis, fue necesario recolectar heces del tanque, donde se tuvo especial cuidado de no coleccionar heces que hubiesen iniciado el proceso de lixiviación.

El coeficiente de digestibilidad aparente (CDA) fue calculado para cada una de las dietas experimentales y el control. Para esto se determinó tanto en dieta como en heces las cenizas insolubles en ácido clorhídrico basándose en el protocolo descrito por Montañón-Vargas et al. (2002).

El método consistió en hervir las cenizas de cada muestra en 10ml de ácido clorhídrico 2N, utilizando vasos de precipitado de 25ml cubiertos por una tapa de vidrio de reloj para evitar la evaporación. Luego de 5 minutos, la solución fue filtrada por medio de papel filtro (Whatman 43, diámetro 110mm) previamente incinerado y pesado, con ayuda de una bomba de vacío y el residuo del vaso se enjuagó con agua hirviendo. Posteriormente el papel filtro se secó en una estufa (Lindeberg/Blue M, modelo BF51842PBFMC-1) durante 1 hora a 100° C, se sacó y se dejó enfriar para finalmente pesar y obtener la diferencia del papel filtro sin cenizas y con cenizas.

Para determinar el porcentaje de las cenizas insolubles en ácido clorhídrico (CIA) se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{CIA (\%)} = \frac{\text{Peso de ceniza insoluble (g)}}{\text{Peso de la materia seca (g)}} \times 100 \quad (5)$$

Para determinar el coeficiente de digestibilidad aparente de la materia seca (CDA), se utiliza la siguiente ecuación:

$$\text{CDA (\%)} = \left[100 - \frac{(\% \text{ cenizas insolubles en dieta})}{\% \text{ cenizas insolubles en heces}} \right] \times 100 \quad (6)$$

5.8 Actividad enzimática

5.8.1 Extracto enzimático

Para obtener el extracto enzimático de las muestras (intestinos) se tomaron del ultracongelador y se descongelaron en frío, posteriormente se pesaron en una balanza analítica (Precisa 92SM-202A) y se colocaron rápidamente en un tubo falcon previamente aclimatado en frío para homogenizarlos con una solución Tris-HCl 20 mM, pH 7.5, en una relación 1:10. El homogenizado se llevó a cabo con la ayuda de un homogeneizador de

tejidos Polytron (Kinematica AG, System PT1200C). Posteriormente se centrifugaron a 16 000g durante 30 minutos a 4°C en una centrifuga Eppendorf 5810 R. El sobrenadante se repartió en alícuotas de 1000 μ l y se almacenaron a -80°C hasta su posterior análisis.

5.8.2 Tripsina

La actividad de la tripsina se cuantifico siguiendo la metodología propuesta por Erlanger et al., (1961). Esta metodología emplea como sustrato BAPNA (N α -BENZOYL-DL-ARGININE p-NITROANILIDE, Sigma-aldrich, lote 98H0682) y como buffer Tris-HCl 0.05 M conteniendo CaCl₂ 0.02 M, pH 8.2 a una temperatura de reacción de 25° C.

Buffer + Sustrato: para la preparación del sustrato se pesaron 4.35 mg de BAPNA y se disolvieron en 100 μ l de DMSO. El día del ensayo se llevó esta solución a 10 ml de buffer Tris-HCl 0.05 M con CaCl₂ 0.02 M y un pH 8.2

El análisis se llevó a cabo en celdas de 1 ml, por lo que fue necesario realizarlo en baño maría (BIO-RAD, cap. 6 litros), el cual se precalentó a 25° C, se colocaron las celdas en una gradilla dentro del baño y se agregaron 714 μ l de buffer + sustrato, 129 μ l de agua destilada y 100 μ l de homogenizado, se dejó reaccionar durante 10 minutos y posteriormente se agregaron 143 μ l de ácido acético para detener la reacción y se dejó reposar para que las proteínas se precipitaran. Debido a que las muestras estaban muy turbias se pasaron a un tubo eppendorf de 1 ml y se centrifugaron (centrifuga eppendorf 5417 R) a 10,640 g durante 10 min, posteriormente se colocó el sobrenadante en una celda en un espectrofotómetro (HACH, DR 5000) y se registró la absorbancia a 410 nm.

Como blanco se utilizó cada muestra de homogenizado de intestino y previo a agregarlas se colocó el ácido acético para que no se llevara a cabo ninguna reacción.

Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

5.8.3 Lipasa

Para cuantificar la actividad de la lipasa se utilizó la metodología descrita por Gjellesvik et al., (1991). Esta metodología emplea como sustrato 4-nitrofenil-miristato (4NFM) 0.56 mM (Sigma-aldrich, lote # BCBP9506V), buffer Tris-HCl 0.15 mM, pH 8.5 y taurocolato de sodio 15 mM, a una temperatura de reacción de 37° C.

Buffer + sustrato: pesar 0.0039 g de 4NFM y disolverlo en 1 ml de DMSO. El día del ensayo llevar esta solución a 20 ml de buffer Tris-HCl 0.15 mM, pH 8.5 con taurocolato de sodio 15 mM.

El análisis se realizó en un lector de microplacas (Varioskan LUX, modelo LL152103). En cada pozo de la microplaca se colocaron 10 µl de homogenizado y posteriormente 150 µl de buffer + sustrato, rápidamente se colocó en el lector donde se incubo durante 3 minutos a 25° C, posterior a los 3 minutos se realizaron 10 lecturas cada 5 minutos a 405 nm.

Como blanco se utilizó agua destilada.

Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

5.8.4 Amilasa

Para cuantificar la actividad de la amilasa se siguió la metodología descrita en el Manual de Análisis Enzimáticos de Worthington Biochemical Corporation (Manual I.U. B.: 3.2.1.1 siguiendo la metodología de Bernfeld, (1951). Esta metodología emplea como sustrato almidón 1% (Sigma-Aldrich, lote # SLBN6520V) y buffer fosfato 0.02 M, pH 6.9 conteniendo NaCl 0.006 M. Además de incluir en la reacción ácido dinitrosalicílico con hidróxido de sodio 2N y tartrato potásico sódico tetrahidratado.

Buffer + sustrato: el día del ensayo disolver 1 g de almidón comercial en 100 ml de buffer fosfato 0.02 M, pH 6.9 con NaCl 0.006M

El análisis se llevó a cabo en tubos de vidrio de 5 ml, los cuales se colocaron en un baño maría (BIO-RAD, cap. 6 litros) a 25° C, se agregaron 100 µl de homogenizado, se incubaron durante 4 min y posteriormente se agregaron 100 µl del buffer + sustrato, se incubo por 3 min y se agregaron 200 µl de ácido dinitrosalicílico, se incubaron por 5 minutos en agua hirviendo, los tubos se sacaron del baño maría y una vez que se enfriaron se les agrego 2 ml de agua destilada. Finalmente se tomó 1 ml de esta solución y registró la absorbancia en un espectrofotómetro (HACH, DR 5000) a 540 nm.

Como blanco se utilizó agua destilada como muestra y se siguió el mismo protocolo.

Todos los ensayos se realizaron por triplicado, incluyendo los blancos.

5.8.5 Proteínas solubles

Con la finalidad de cuantificar la concentración de proteínas solubles de los homogenizados y determinar así la actividad específica, se utilizó el método de Bradford. Este consistió en colocar en posos de microplaca 150 µl de homogenizado y 150 µl de solución Bradford (BIO RAD, Protein assay; Hercules, CA, U.S.). Se utilizó suero de albúmina bovina (BIO RAD, U.S.) como estándar. A temperatura ambiente se registró la absorbancia en el lector de microplaca (Varioskan LUX, modelo LL152103) a 595 nm.

5.7.6 Calculo de la actividad total y especifica

La actividad enzimática se expresó como unidad actividad total (UA) y actividad específica (U/µg P), donde 1 U de actividad enzimática se definió como el incremento de 0.1 unidades de absorbancia por minuto para tripsina, lipasa y amilasa.

La actividad total (UA) de tripsina, lipasa y amilasa se calculó con la siguiente fórmula

$$UA = \frac{\Delta Abs}{FD} * FDH * \frac{1}{\text{...}} \quad (7)$$

min

CE

Donde:

FD= Vol. total de la reacción/vol. utilizado como muestra

FDH= Vol. total del homogenizado /vol. utilizado de la muestra

CE= coeficiente de extinción (0.1 unidades de absorbancia por minuto)

La actividad específica (U μ g Proteína) para las tres enzimas se calculó empleando la siguiente formula;

$$U \mu g P = \frac{UA}{\mu g P/Pez} \quad (8)$$

5.9 Análisis inmunológicos

5.9.1 Obtención de suero

Para la obtención de suero se tomó el tubo de sangre sin anticoagulante y se dejó reposar alrededor de dos horas, posteriormente se centrifugo (Centrifuga Eppendorf 5417 R) por 10 minutos a 5° C y 5214 g, se tomó el sobrenadante (suero) y se colocó en otro tubo eppendorf de 500 μ l previamente marcado, se cubrió con parafilm y se almacenó a -80°C para su posterior análisis.

5.9.2 Proteínas totales en suero

La determinación cuantitativa de las proteínas totales en suero se realizó con un kit comercial de la marca RANDOX basado en el método de Biuret.

Previo al análisis las muestras de suero se retiraron del ultracongelador a -80°C y se descongelaron en frío.

El análisis se llevó a cabo en celdas de 1 ml, a las cuales se les agregó 20 μl de muestra de suero y 1 ml de Reactivo Biuret (R1; hidróxido sódico, tartrato sodio-potasio, yoduro potásico y sulfato cúprico), se mezclaron y se incubaron durante 30 minutos a $20-25^{\circ}\text{C}$, posteriormente en un espectrofotómetro (HACH, DR 5000) se registró la absorbancia a 546 nm. Para cada muestra se realizó un blanco y un patrón; para el blanco se utilizó agua destilada y para el patrón una proteína específica para cada lote (para cada kit).

Todos los ensayos se realizaron por triplicado

5.9.3 Recuento total de leucocitos

El recuento total de leucocitos se llevó a cabo utilizando la solución descrita por Natt-Herrick (1952), citado por Del Río-Zaragoza (2004) como medio de dilución y tinción de las células sanguíneas. El conteo se realizó en una cámara de Neubauer y para iniciar se tomaron 20 μl de sangre del tubo con anticoagulante Heparina-Litio y se agregaron 4 ml de colorante Natt-Herrick para tener una relación 1:200, se mezclaron y se dejaron reposar en frío durante 15 horas aproximadamente. Posteriormente con una pipeta Pasteur se agregó una gota a cada lado de la cámara de Neubauer y se dejó reposar por cinco minutos para que se sedimentara la muestra, finalmente se realizó el recuento con un microscopio Leica DMSL. El recuento se realizó en ambos extremos de las cámaras y en los cuatro cuadros más grandes utilizando una magnificación de 40X.

El número de leucocitos se calculó con la siguiente fórmula:

$$\text{No. De cel. Blancas } \mu\text{l}^{-1} = \frac{\text{Total de No. De cel. Blancas contadas}}{8} \times 200 \quad (9)$$

5.9.4 Estallido respiratorio

El estallido respiratorio se analizó siguiendo la metodología propuesta por Ibrahim et al., (2010). La metodología consistió en tomar 0.1 ml de sangre del tubo con anticoagulante heparina-litio y colocarla en pocillos de placas de microtitulación, se añadió la misma cantidad de Nitroazul de tetrazolium, NBT (Sigma-Aldrich, CAS 298-83-9) al 0.2% y se incubo durante 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente se tomó una muestra (50 μl) de la suspensión de las células sanguíneas con NBT y se colocaron en un tubo eppendorf y se le agrego 1 ml de N, N-dimetil formamida, se centrifugo (Centrifuga Eppendorf 5417 R) durante 5 minutos a 3000 rpm (958 g), el sobrenadante se pasó a una celda de cuarzo y se midió la absorbancia en un espectrofotómetro (HACH, DR 6000) a 620 nm.

5.9.5 Fagocitosis

La actividad fagocítica se cuantificó utilizando del método propuesto por Quezada-Rodríguez, (2012). Esta técnica consiste en contar el número de células que han fagocitado partículas de látex, posterior a la incubación y la tinción de dichas células sanguíneas.

Suspensión de microesferas de látex: se agitaron vigorosamente las microesferas de 2 μm (SIGMA, L9529-1ML) y se mezclaron 0.3 ml en 10 ml de PBS en un frasco de vidrio.

Primero se tomaron 100 μl de sangre del tubo con anticoagulante de heparina-litio y se mezclaron con 50 μl de la suspensión de microesferas en una microplaca y esta se colocó en una incubadora (Presicion, # 699050594) durante 2 horas a 37 °C, se agito cada 20 minutos. Posteriormente se tomó y deposito 4 μl de sangre sobre un portaobjeto y se realizó un frotis sanguíneo el cual se dejó secar al aire. Se fijó con metanol y se cubrió la

totalidad de la película con colorante Giemsa y se dejó reposar por 5 minutos, se agregaron 10 gotas de tiosulfato de sodio dejando actuar por 5 minutos. El frotis se lavó con unas gotas de agua destilada y se dejó secar al aire. Para el montaje se colocó una gota de resina sobre la tinción y posteriormente un cubreobjetos (se dejó solidificar la resina por lo menos 24 horas).

Una vez que el frotis estuvo listo se llevó al microscopio compuesto y se observaron y contaron las células de interés (leucocitos como; monocitos y neutrófilos) en el objetivo de 100X con aceite de inmersión. Se observaron 100 campos de cada frotis o hasta contar 100 leucocitos.

El porcentaje de fagocitosis se definió como el número de células que fagocitaron o que presentan fagosomas con la microesferas de látex y adherencia de las mismas sobre el número total de células contadas.

6. Análisis estadístico

Los datos obtenidos se expresan como la media \pm la desviación estándar (DE). Previo a iniciar los análisis estadísticos se aplicó a cada grupo de datos la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk's W , en aquellos casos que no cumplieron, fueron transformados por raíz cuadrada.

Para los datos de crecimiento, enzimáticos y digestibilidad se realizó un diseño completamente aleatorizado (DCA), donde a los datos obtenidos se les aplicó un análisis de varianza ANOVA de una vía con nivel de significancia de $P < 0.05$.

Para los análisis de inmunología se aplicó un análisis factorial de dos vías con una significancias de $P < 0.05$, donde los factores eran el tiempo y el prebiótico.

Para los datos obtenidos en porcentaje menores a 20% y mayores a 80% se realizó una transformación de arcoseno de raíz cuadrada de los datos de acuerdo a (Steel & Torrie, 1988).

Capítulo 6. Resultados

6.1 Crecimiento y supervivencia

No se encontraron diferencias significativas en el alimento consumido, en el porcentaje de peso ganado y en la tasa de crecimiento específico (TCE) entre los juveniles de totoaba alimentados con las cuatro dietas experimentales (Tabla 2).

En cuanto a la supervivencia de los organismos durante el experimento fue del 100% en los cuatro tratamientos.

Tabla 2. Desempeño de los juveniles de *Totoaba macdonaldi* alimentados con cuatro dietas (basal, inclusion de 0.1% de β -glucano, 0.5% de quitosano e 1% de inulina). Los valores representan la media \pm D.E.

	Tratamiento				P ANOVA
	Basal	β -glucano	Quitosano	Inulina	
Peso inicial (g)	59.2 \pm 6.5	55.7 \pm 2.8	60.0 \pm 1.90	58.8 \pm 1.0	0.5396
Peso final (g)	124.2 \pm 2.1	119.9 \pm 4.6	124.8 \pm 10.7	125.6 \pm 2.5	0.6822
Alimento consumido (g)	63.3 \pm 2.4	64.9 \pm 4.1	63.8 \pm 1.7	65.3 \pm 1.0	0.7609
Ganancia en peso (g)	62.0 \pm 6.8	63.7 \pm 4.6	67.8 \pm 16.0	66.7 \pm 3.2	0.9400
TCE	1.3 \pm 0.19	1.3 \pm 0.09	1.2 \pm 0.18	1.3 \pm 0.05	0.9477
% Peso ganado	109.1 \pm 21.3	115.5 \pm 11.8	113.4 \pm 11.8	113.4 \pm 7.0	0.9823
% Supervivencia	100%	100%	100%	100%	

Tasa de crecimiento específico (TCE)

6.2 Eficiencia alimenticia e indice hepato somatico

No encontraron diferencias significativas entre los tratamientos en la eficiencia de utilización del alimento (TCA) y el índice hepato somático. Así mismo no se encontraron

diferencias significativas en los índices de la utilización de la proteína, TEP y el % TCP (Tabla 3) entre los juveniles de totoaba alimentados con las cuatro dietas.

Tabla 3. Eficiencia alimenticia de juveniles de totoaba alimentados con las cuatro dietas experimentales. Los valores representan la media \pm DE.

	Tratamiento				<i>P</i> ANOVA
	Basal	β -glucano	Quitosano	Inulina	
TCA	1.0 \pm 0.13	1.0 \pm 0.06	0.98 \pm 0.24	0.98 \pm 0.05	0.9904
TEP	2.0 \pm 0.28	2.0 \pm 0.13	2.1 \pm 0.4	2.1 \pm 0.11	0.9904
IHS	2.4 \pm 0.29	2.3 \pm 0.20	2.3 \pm 0.17	2.2 \pm 0.46	0.7507

Tasa de conversión alimenticia (TCA), Tasa de eficiencia proteica (TEP), Índice hepatosomático (IHS).

6.3 Composición proximal del músculo

En la tabla 4 se observa la composición proximal del músculo de juveniles de totoaba previo a iniciar el bioensayo. Se encontraron diferencias significativas al final del bioensayo en el contenido de cenizas del musculo en los peces alimentados con la dieta adicionada con B-glucano (Tabla 5). Por otra parte no se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de proteínas, lípidos y humedad en el musculo de los organismos bajo los diferentes tratamientos.

Tabla 4. Composición proximal del músculo de juveniles de totoaba (*Totoaba macdonaldi*) previo a iniciar el experimento. Los valores son porcentaje y representan la media \pm DE.

Proteína	Lípidos	Humedad	Cenizas
80.13 \pm 1.6	3.8 \pm 0.5	78.80 \pm 0.70	5.8 \pm 0.10

Tabla 5. Composición proximal del músculo de juveniles de totoaba (*Totoaba macdonaldi*) alimentados con cuatro diferentes dietas. Los valores y representan la media \pm DE.

	Tratamiento				<i>P</i> ANOVA
	Basal	β -glucano	Quitosano	Inulina	
Proteína (%)	84.2 \pm 2.2	82.8 \pm 1.7	83.1 \pm 1.4	82.4 \pm 0.9	0.5800
Lípidos (%)	3.6 \pm 0.3	4.3 \pm 0.6	3.4 \pm 0.6	3.2 \pm 0.6	0.2646
Humedad (%)	62.9 \pm 1.2	62.7 \pm 4.0	64.1 \pm 1.7	62.9 \pm 3.2	0.9331
Cenizas (%)	5.1 \pm 0.2 ^{ab}	5.43 \pm 0.0 ^b	4.91 \pm 0.1 ^a	4.89 \pm 0.1 ^a	0.0219

6.4 Coeficiente de digestibilidad aparente (% CDA)

Se encontraron diferencias significativas en los coeficientes de digestibilidad aparente de la materia seca entre las dietas (Figura 4). Los valores más altos de digestibilidad de la dieta se encontraron en los organismos alimentados con la dieta que incluía inulina. En los tratamientos restantes los valores fueron más bajos y no se encontraron diferencias significativas entre ellos, pero cabe mencionar que la dieta que presentó menor digestibilidad fue la de los peces alimentados con la dieta que contenía β -glucano.

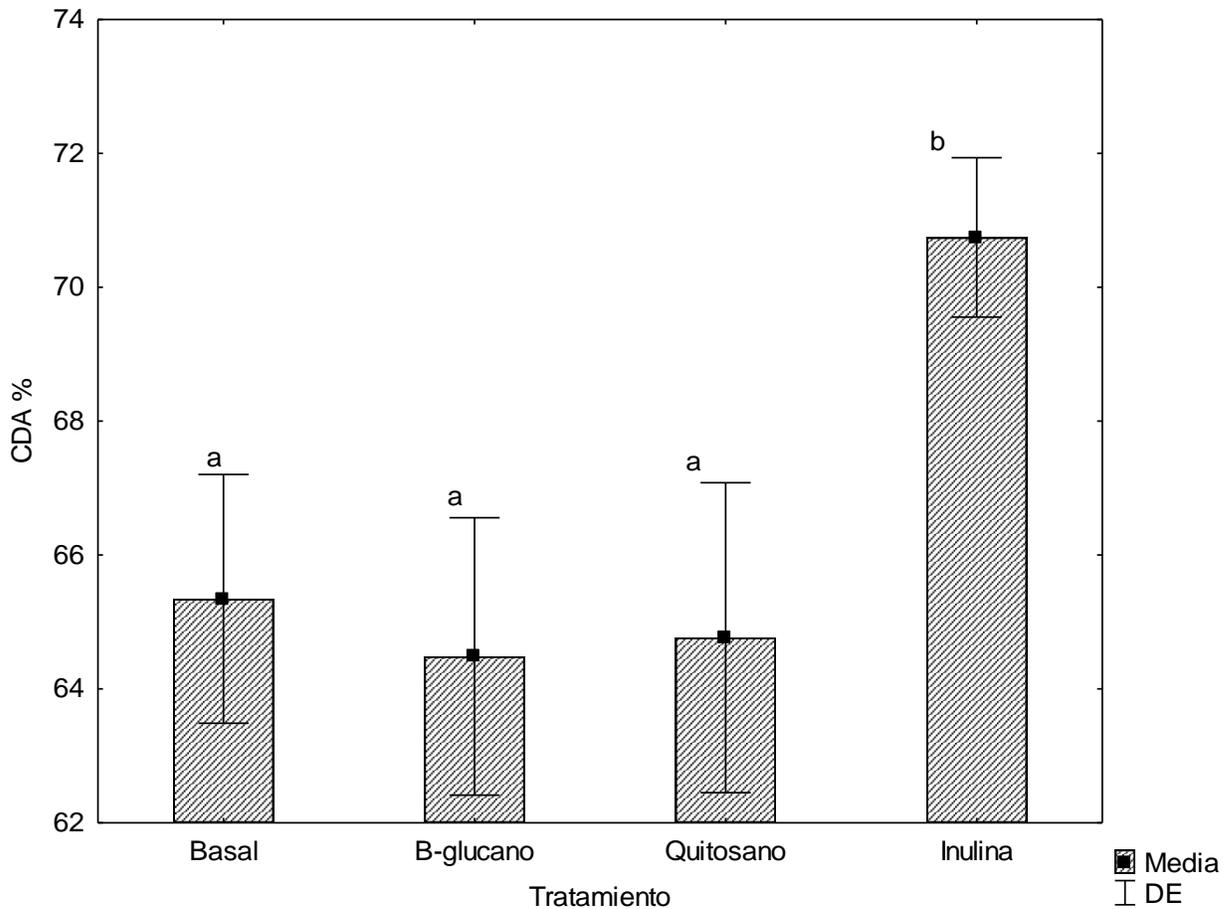


Figura 4. Digestibilidad aparente de juveniles de totoaba (*Totoaba macdonaldi*) alimentados con cuatro dietas experimentales (Basal, inclusión del 0.1% de β -glucano, 0.5% de quitosano y 1% de inulina). Las letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

6.5 Actividad enzimática

6.5.1 Tripsina

Se encontraron diferencias significativas en actividad total de la tripsina. Se observó una actividad significativamente mayor de la tripsina en los juveniles de totoaba alimentados con la dieta que contenía inulina, seguida por la de los juveniles alimentados con B-glucano y por último las actividades más bajas en los peces alimentados con quitosano y la dieta basal (Tabla 6). En cuanto a la actividad específica no se registraron diferencias significativas entre los tratamientos, aunque si se observó un ligero aumento en la actividad de esta enzima en los juveniles alimentados con la dieta que incluía inulina en comparación con la dieta basal.

6.5.2 Lipasa

Se observaron diferencias significativas en la actividad de la lipasa reportada como actividad específica. Se observa en la tabla 6 que los juveniles alimentados con la dieta que incluía inulina presentaron una mayor actividad de esta enzima. Así mismo se encontró una actividad específica de lipasa más baja en los peces alimentados con la dieta que contenía quitosano. Por otra parte en la actividad total de la lipasa no se registraron diferencias significativas entre los tratamientos, aunque si observó un ligero aumento en la dieta con inulina comparada con los otros tratamientos.

6.5.3 Amilasa

No se registraron diferencias significativas en la actividad total y en la actividad específica de la amilasa. Sin embargo, aunque no estadísticamente significativo, se observan en la tabla 6 valores más altos para los juveniles de totoaba alimentados con las dietas con la inclusión de algún prebiótico.

Tabla 6. Actividad total (UA) y actividad específica ($\mu\text{g P}$) de la actividad de tripsina, lipasa y amilasa en juveniles de totoaba (*Totoaba macdonaldi*) alimentados con cuatro dietas diferentes (Basal, inclusión de 0.1% de β -glucano, 0.5% de quitosano y 1% de inulina). Los valores muestran la media \pm DE. Las letras indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre tratamientos.

	Tratamiento				P ANOVA
	Basal	β -glucano	Quitosano	Inulina	
Tripsina (UA)	60.4 \pm 2.9 ^a	88.6 \pm 6.2 ^b	66.4 \pm 15.9 ^a	103.1 \pm 4.4 ^c	0.0000
Tripsina ($\mu\text{g P}$)	0.14 \pm 0.02	0.14 \pm 0.05	0.13 \pm 0.01	0.21 \pm 0.03	0.1468
Lipasa (UA)	366.1 \pm 29.8	391.7 \pm 163.2	218.6 \pm 54.8	539.7 \pm 145.7	0.0767
Lipasa ($\mu\text{g P}$)	0.98 \pm 0.09 ^{ab}	0.84 \pm 0.26 ^{ab}	0.46 \pm 0.11 ^a	1.05 \pm 0.14 ^b	0.0197
Amilasa (UA)	108.2 \pm 45.5	150.3 \pm 26.4	158.8 \pm 28.7	157.8 \pm 41.9	0.3415
Amilasa ($\mu\text{g P}$)	0.24 \pm 0.04	0.29 \pm 0.06	0.33 \pm 0.04	0.31 \pm 0.03	0.1638

7.6 Respuesta inmune innata

6.6.1 Proteínas totales en suero

No se registraron diferencias significativas en el nivel de las proteínas totales en suero a través del tiempo (Tabla 9). Sin embargo se observa un aumento en las proteínas totales del suero de los juveniles de totoaba de los cuatro tratamientos en el día 14, todos alrededor de 3.1 g/dl. No se encontraron diferencias significativas ($P > 0.05$) en los valores de proteínas totales en suero entre tratamientos y no hubo interacción de estos dos factores.

Tabla 7. Proteínas totales en suero (g/dl) a través del tiempo (0-60 días) de juveniles de totoaba (*Totoaba macdonaldi*) alimentados con cuatro dietas diferentes (Basal, inclusión de 0.1% de β -glucano, 0.5% de quitosano y 1% de inulina). Los valores muestran la media \pm la DE. Las letras indican diferencias significativas ($P < 0.05$) a través del tiempo.

Tiempo (Días)	Tratamiento			
	Basal	β -glucano	Quitosano	Inulina
0	2.76 \pm 0.65 ^a	2.72 \pm 0.65 ^a	2.72 \pm 0.65 ^a	2.72 \pm 0.65 ^a
14	3.13 \pm 0.29 ^b	3.04 \pm 0.40 ^b	3.20 \pm 0.14 ^b	3.17 \pm 0.60 ^b
28	2.67 \pm 0.45 ^a	2.36 \pm 0.44 ^a	2.36 \pm 0.26 ^a	2.60 \pm 0.45 ^a
42	2.86 \pm 0.46 ^a	2.31 \pm 0.40 ^a	2.57 \pm 0.14 ^a	2.37 \pm 0.16 ^a
54	2.51 \pm 0.43 ^a	2.40 \pm 0.50 ^a	2.36 \pm 0.30 ^a	2.18 \pm 0.21 ^a
P ANOVA				
<i>Tiempo</i>	0.0001			
<i>Dieta</i>	0.3375			
<i>Tiempo* Dieta</i>	0.9775			

6.6.2 Número de leucocitos

Se encontraron diferencias significativas en el recuento de células blancas (leucocitos) entre los tratamientos para los factores dieta y tiempo, pero no hubo interacción de estos (Tabla 10). Se observó que a través del tiempo el número de leucocitos en juveniles de totoaba aumentaron del día 0 al día 15, 30, 45 y 60, pero entre los últimos muestreos no

se encontraron diferencias significativas. En cuanto a las dietas, los organismos alimentados con dieta basal presentaron un menor número de leucocitos, mientras que los alimentados con inclusión de β -glucano presentaron los valores más altos, y para los organismos alimentados con quitosano e inulina las células blancas se agruparon entre el valor más alto y el más bajo.

Tabla 8. Número de leucocitos ($\times 10^3$ células por mm^3) de juveniles de totoaba (*Totoaba macdonaldi*) alimentados con cuatro dietas diferentes (Basal, inclusión de 0.1% de β -glucano, 0.5% de quitosano y 1% de inulina). Los valores muestran la media \pm la DE. Los superíndices *a,b* indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre el tiempo. Los superíndices *x,y* indican diferencias ($P < 0.05$) entre las dietas.

Tiempo (Día)	Tratamiento			
	Basal	β -glucano	Quitosano	Inulina
0	10,7 \pm 0.7 ^{ax}	10.7 \pm 0.7 ^{ax}	10.7 \pm 0.7 ^{ax}	10.7 \pm 0.7 ^{ax}
14	16.2 \pm 3.7 ^{bx}	16.2 \pm 4.3 ^{by}	15.2 \pm 2.1 ^{bx}	15.1 \pm 1.2 ^{bx}
28	16.3 \pm 2.7 ^{bx}	16.3 \pm 2.7 ^{by}	16.5 \pm 2.5 ^{bx}	17.2 \pm 2.9 ^{bx}
42	15.6 \pm 1.8 ^{bx}	19.1 \pm 3.3 ^{by}	19.0 \pm 3.3 ^{bx}	15.9 \pm 2.8 ^{bx}
54	15.0 \pm 1.9 ^{bx}	19.3 \pm 3.3 ^{by}	16.4 \pm 2.2 ^{bx}	16.0 \pm 1.3 ^{bx}
P ANOVA				
<i>Tiempo</i>	0.0000			
<i>Dieta</i>	0.0224			
<i>Tiempo*Dieta</i>	0.1235			

6.6.3 Estallido respiratorio

Se encontraron diferencias significativas en el estallido respiratorio entre los tratamientos y además hubo una interacción significativa entre los factores y en cada uno de éstos (dieta y tiempo). Se observó en la figura 5 que los juveniles de totoaba alimentados con la dieta que incluía quitosano e inulina a los 30 y 45 días mostraron mayor actividad, comparado con los organismos alimentados con las otras dietas a través del tiempo.

Tabla 9. Estallido respiratorio de juveniles de totoaba (*Totoaba macdonaldi*) alimentados con cuatro dietas diferentes (Basal, inclusión de 0.1% de β -glucano, 0.5% de quitosano y 1% de inulina). Los valores muestran la media \pm la DE. Los superíndices *a,b* indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre el tiempo. Los superíndices *x,y* indican diferencias ($P < 0.05$) entre las dietas.

Tiempo (Días)	Tratamiento			
	Basal	β -glucano	Quitosano	Inulina
0	0.31 \pm 0.05 ^{ax}			
15	0.46 \pm 0.07 ^{bx}	0.46 \pm 0.06 ^{bx}	0.48 \pm 0.05 ^{by}	0.48 \pm 0.03 ^{bxy}
30	0.40 \pm 0.04 ^{cx}	0.50 \pm 0.02 ^{cx}	0.62 \pm 0.09 ^{cy}	0.64 \pm 0.02 ^{cxy}
45	0.56 \pm 0.01 ^{cx}	0.44 \pm 0.01 ^{cx}	0.60 \pm 0.04 ^{cy}	0.55 \pm 0.04 ^{cxy}
60	0.46 \pm 0.07 ^{bx}	0.45 \pm 0.09 ^{bx}	0.45 \pm 0.06 ^{by}	0.41 \pm 0.04 ^{bxy}

P ANOVA

Tiempo 0.0000

Dieta 0.0000

Tiempo*Dieta 0.0000

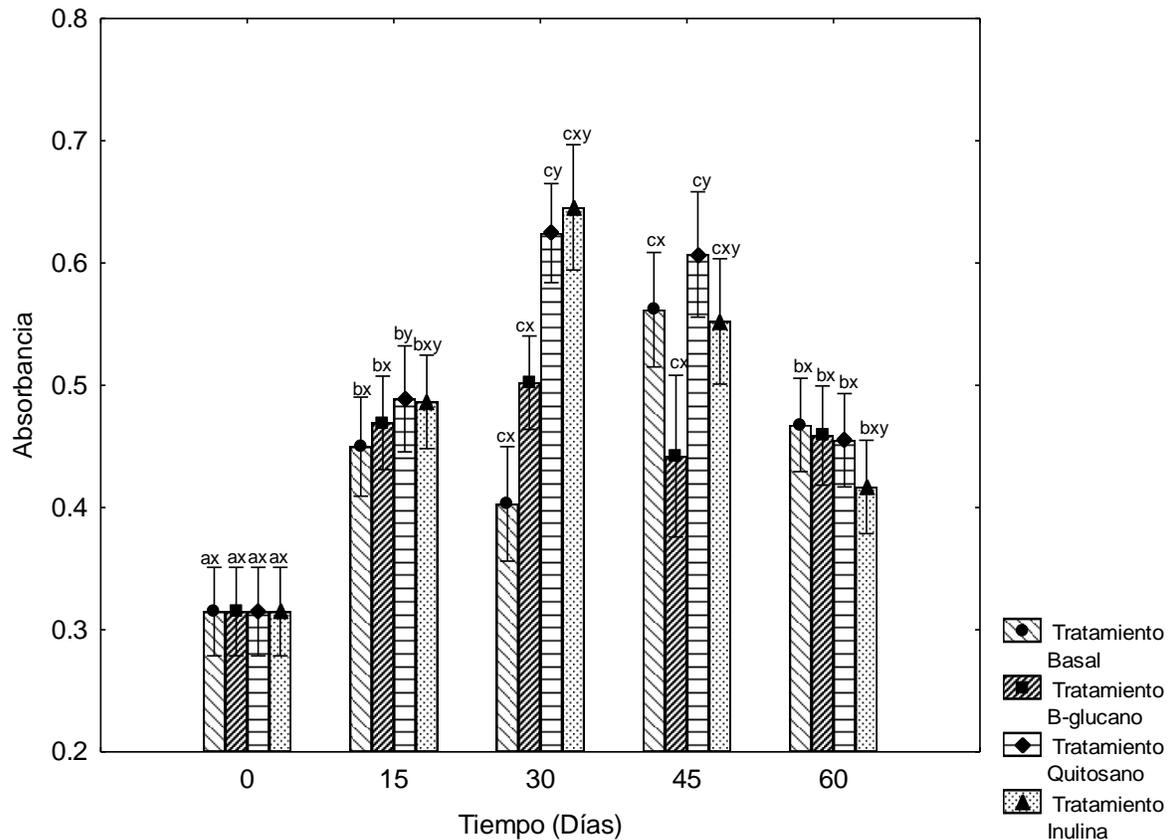


Figura 5. Estallido respiratorio de juveniles de totoaba (*Totoaba macdonaldi*) a través del tiempo (0-60 días) alimentados con cuatro dietas experimentales (Basal, inclusión de 0.1% de β -glucano, 0.5% de quitosano y 1% de inulina). Las letras *a,b,c* indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre el tiempo. Las letras *x,y,z* indican diferencias ($P < 0.05$) entre las dietas.

6.6.4 Fagocitosis

No se encontraron diferencias significativas ($P < 0.05$) en el porcentaje de fagocitosis entre los juveniles de totoaba alimentados con las diferentes dietas experimentales a través del tiempo (Figura 6), no se encontró una interacción significativa de ambos factores. Sin embargo se observa un aumento importante de este proceso en la dieta que contenía inulina a los 30 y 60 días.

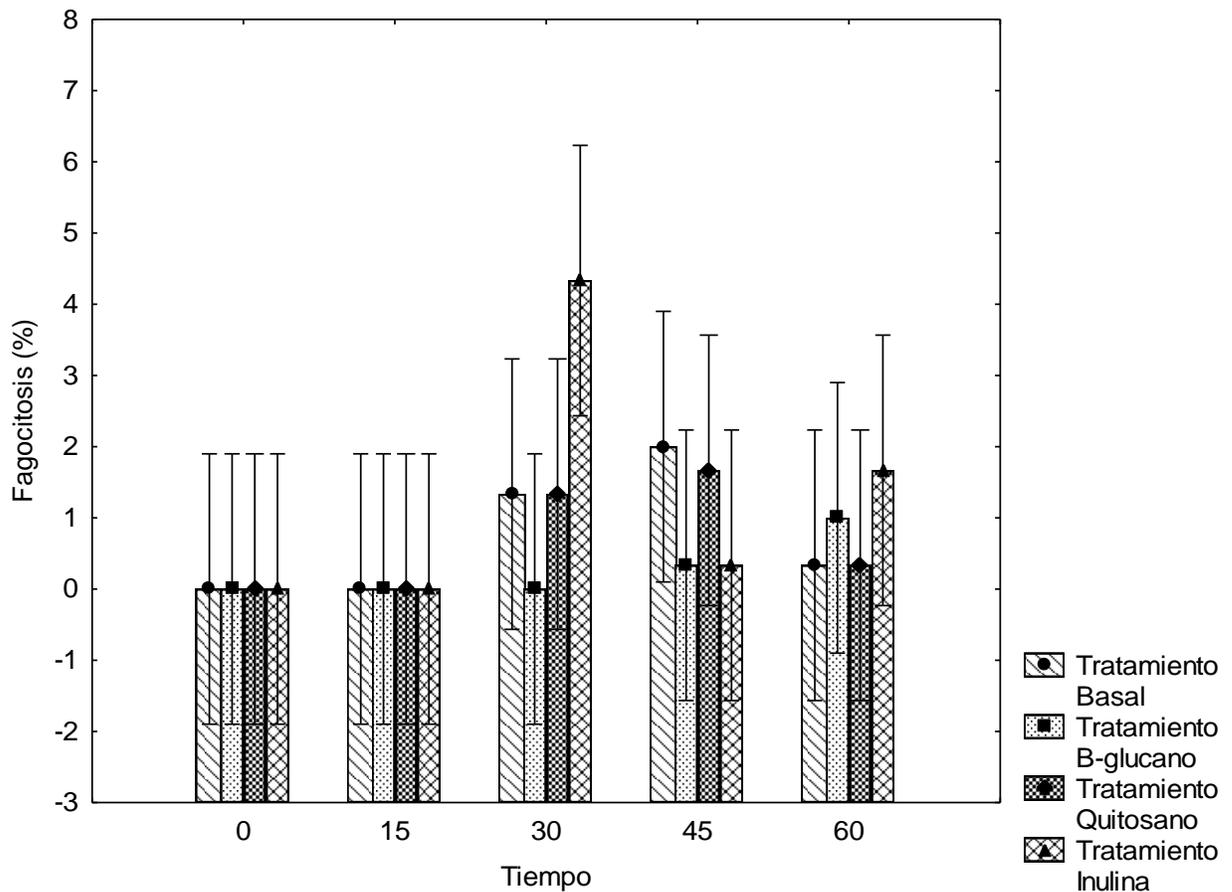


Figura 6. Porcentaje de fagocitosis en juveniles de totoaba (*Totoaba macdonaldi*) a través del tiempo (0-60 días) alimentados con cuatro dietas experimentales (Basal, inclusión de 0.1% de β -glucano, 0.5% de quitosano y 1% de inulina).

Capítulo 7. Discusión

7.1 Crecimiento

Uno de los factores más importantes para lograr un cultivo exitoso de peces es contar con una dieta adecuada, que además de satisfacer sus requerimientos nutricionales esenciales proporcione a los organismos el fortalecimiento de los mecanismos de defensa y una mejora en el equilibrio de la flora intestinal, favoreciendo la digestión y/o absorción de nutrientes. En este sentido para obtener dietas con estas características se ha trabajado con aditivos en el alimento, tales como los prebióticos, ya que, el uso de estos confiere prevención frente a diferentes patógenos, lo que conlleva a disminuir el posible uso de antibióticos debido a que mantiene alerta el sistema inmune innato, además de mejorar la flora intestinal benéfica mejorando la digestión y absorción de nutrientes. La suma de estos mecanismos resulta en un mejor desarrollo y crecimiento de los organismos, especialmente en aquellos organismos con potencial de cultivo y con importancia para la acuicultura nacional como la totoaba (*Totoaba macdonaldi*).

En el presente estudio no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($P > 0.05$) en el porcentaje de peso ganado entre los juveniles de totoaba al incluir prebióticos en la dieta. Resultados similares fueron reportado por Buentello, Neill, & Gatlin, (2010), quienes realizaron un estudio evaluando la inclusión de FOS en forma de inulina al 1% en la dieta de la corvina (*Sciaenops ocellatus*) y observaron que a las 4 semanas el porcentaje de peso ganado no presentó diferencias significativas respecto al porcentaje de la dieta control. En contraste, Guzmán-Villanueva, Ascencio-Valle, Macías-Rodríguez, & Tovar-Ramírez, (2014) incluyeron β -glucano al 0.1 y 0.2% en la dieta de pargo lunarejo (*Lutjanus guttatus*) donde se observó a las seis semanas un aumento significativo en el porcentaje de peso ganado (56.79 ± 7.64 y $46.09 \pm 9.61\%$) en las dietas con el prebiótico comparado con el porcentaje obtenido en la dieta control ($15.83 \pm 4.24\%$). Por otra parte Lin, Pan, Luo, & Luo, (2011) adicionaron quitosano al 2% en la dieta de juveniles de carpa koi (*Cyprinus carpio koi*) y observaron después de 8 semanas un aumento significativo en el porcentaje de peso ganado ($149.7 \pm 1.54\%$) comparado con el obtenido en la dieta control ($129.4 \pm 1.58\%$).

En el presente trabajo no se obtuvo un efecto significativo de los prebióticos en la tasa de crecimiento específico (TCE g/día) sobre los juveniles de totoaba alimentados con dietas adicionadas con prebióticos. Los valores de TCE en los organismos que consumieron prebióticos fue de $\sim 1.26 \pm 0.10$ g/día, mientras que los alimentados con la dieta control presentan un TCE de 1.3 ± 0.19 g/día. Estos resultados coinciden con lo reportado por Ta'ati et al. (2011) los cuales evaluaron el uso de prebióticos en la dieta del esturión beluga (*Huso huso*) y a las 8 semanas no encontraron diferencias significativas en la TCE de los organismos alimentados con las dietas suplementadas con prebióticos. Contrario a estos resultados, Geng et al., (2011) obtuvieron diferencias significativas en la TCE de juveniles de cobia (*Rachycentrum canadum*) al ser alimentados con diferentes concentraciones (0.3 y 0.6%) de quitosano, reportando un valor más alto (2.13 ± 0.05 g/día) en los juveniles alimentados con la dieta que contenía 0.6% del prebiótico. Estos resultados coinciden con Lin et al., (2011) quienes encontraron diferencias significativas en la TCE de juveniles de carpa koi (*Cyprinus carpio koi*) al adicionar a la dieta de estos organismos 0.5% de β -glucano, obteniendo una TCE significativamente mayor comparada con la dieta control.

7.2 Eficiencia alimenticia e indice hepatosomatico (IHS)

En cuanto a la tasa de conversión alimenticia (TCA) de los juveniles de totoaba no se observó un efecto significativo en los organismos alimentados con las dietas experimentales que contenían prebióticos comparados con los de la dieta control. El valor más bajo se registró en los organismos alimentados con la dieta con inclusión de inulina. Esto coincide con lo reportado por Ortiz et al., (2013) quienes adicionaron a la dieta de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) dos concentraciones de inulina (5 y 10 g kg⁻¹) y observaron a los 49 días que la TCA no presentó diferencias entre los tratamientos, aun así, reportaron el valor más bajo en los organismos alimentados con la dieta que contenía 0.5% de inulina. Igualmente, los datos reportados por Lin et al. (2011) coinciden con los del presente trabajo debido a que no observaron un efecto significativo en la TCA de la carpa koi (*Cyprinus carpio koi*) alimentadas durante 8 semanas con una dieta que contenía 0.5% de β -glucano. Sin embargo, en otro estudio por Lin et al. 2012 trabajando

con la misma especie pero adicionando 0.2% de quitosano a la dieta, reportaron una disminución significativa en la TCA (1.55) comparado con la dieta control, con la cual obtuvieron un TCA de 1.82.

Es bien sabido que los prebióticos aumentan la altura de las microvellosidades del intestino en especies con hábitos alimenticios similares a la totoaba como la corvina (*Sciaenops ocellatus*). Este aumento en las microvellosidades se correlaciona positivamente con la absorción de nutrientes lo que conduce a una mejor digestibilidad, mejorando así el rendimiento y la utilización del alimento (Zhou, Buentello, & Gatlin, 2010). Por lo tanto en este estudio se esperaba observar mejores tasas de conversión alimenticia. Sin embargo, es importante reconocer que en este tipo de estudios el “prebiótico” no es el único factor involucrado. Por su parte, Ringø et al. (2010) sugieren que las variaciones entre estudios puede deberse a que solamente se considera como única variable el prebiótico y se deja a un lado otros factores externos a la dieta, tales como la biología de la especie, especialmente en la microbiota natural, factores como el ciclo estacional y el entorno circundante de los organismos en experimentación, entre otras. Todos estos factores pueden contribuir a enmascarar cualquier efecto positivo que pudiese tener el prebiótico y no observar resultados positivos de su uso.

En cuanto a la tasa de eficiencia proteica (TEP) no se encontró un efecto significativo de los prebióticos en los juveniles de totoaba obteniendo prácticamente los mismos valores (entre 2.0 y 2.1) en los cuatro tratamientos. Estos resultados coinciden con los reportado por Zhou et al., (2010) quienes evaluaron diferentes prebióticos, uno de ellos FOS en forma de inulina en la dieta de la corvina (*Sciaenops ocellatus*) y a las 8 semanas no observan diferencias significativas en la TEP, con valores de 1.6 para la dieta control y valores promedio de 1.5 para el resto de los tratamientos. Por otra parte, Ebrahimi et al., (2012) adicionaron a la dieta de la carpa común (*Cyprinus carpio*) diferentes concentraciones de un prebiótico comercial (Immunogen®) y reportan diferencias significativas en la TEP en las dietas con 0.15 y 0.25% de inclusión del prebiótico comparadas con una dieta control sin el prebiótico.

Al igual que la tasa conversión alimenticia, en la eficiencia proteica se esperaban mejores resultados en los organismos que fueron alimentados con dietas que incluían prebióticos

ya que se ha reportado cambios en la flora intestinal que pudiesen ayudar a una mejor digestión de la dieta y una mayor eficiencia proteica. Sin embargo no fue así, y quizá sea por las mismas razones que sugieren Ringø et al. (2010), quienes además de reconocer que en este tipo de estudios existes otros factores además de la dieta que pudieran enmascarar los efectos positivos de los prebióticos. Al comparar varios los resultados de varios estudios con diferentes prebióticos en diferentes especies, se observan que cada especie responde de una manera diferente a los prebióticos. Lo que lleva a sugerir que el efecto de los prebióticos suele ser especie-específico y es importante evaluar su efecto en cada especie de interés.

En cuanto al índice hepatosomático (IHS) no se encontraron diferencias significativas de los juveniles de *T. macdonaldi* entre las dietas con adición de prebiótico ($\sim 2.3 \pm 0.27$) comparado con el valor de los organismos alimentados con la dieta control (2.4 ± 0.29). De manera similar, Zhou, Buentello, & Gatlin, (2010) adicionaron a la dieta de juveniles de la corvina roja (*Sciaenops ocellatus*) diferentes prebióticos y a las 8 semanas no observaron diferencias en el IHS de los peces alimentados con sus dietas. A diferencia del presente estudio y el de Zhou et al., 2010, Ta'ati, Soltani, Bahmani, & Zamini, (2011) obtuvieron un aumento en el IHS de juveniles de esturión beluga (*Huso huso*) al agregar a su dieta dos prebióticos comerciales; Immunoster® e Immunowall®, en dos concentraciones diferentes cada uno (1 y 3%). En ambos prebióticos y en las dos concentraciones el IHS presentaron un aumento significativo con respecto a la dieta control. Las diferencias en los valores de IHS se deben a un cambio en el tamaño y/o composición del hígado. Estos cambios pueden ser causados por la energía en dieta sobre todo un relación E:P muy alta y/o enfermedades asociadas al hígado. Un alto porcentaje de lípidos en la dieta puede provocar un IHS más alto ya que si no son utilizados como fuente de energía se pueden depositar en el hígado, aumentando el tamaño de este y convirtiéndolo en un hígado graso con un aspecto blanquecino. Este factor (hígados grasos de color pálido) se observó en el presente estudio sobre todo en los organismos al inicio del experimento ya que previo al ensayo fueron alimentados con una dieta comercial para peces marinos con un alto contenido lipídico (16%) con respecto al requerimiento estimado para esta especie (8-9%) por Rueda López et al, (2011). Al inicio del experimento los organismos tenían un IHS de 2.7 ± 0.56 . Después de ocho semanas de ingerir las dietas experimentales, con un porcentaje lipídico más adecuado

para la especie los valores de IHS disminuyeron, sugiriendo que las dietas experimentales tenían una mejor relación E/P que la dieta comercial para peces marinos. Sin embargo, los prebióticos no tuvieron un efecto positivo en este parámetros ya que el IHS de los peces alimentados con la dieta control fue similar a los peces alimentados con prebióticos.

Sin embargo, los valores del IHS de los juveniles de totoaba reportados en el presente estudio coinciden con los valores obtenidos por Villarreal Rodarte, (2011) en la misma especie, a pesar de que el tamaño de los organismos era muy diferente (50-66g vs 1.3g). No obstante López, Maricela, Bañuelos-Vargas, Galaviz, & True, (2015) obtuvieron valores de IHS ligeramente menores para la totoaba que los reportados por Villarreal Rodarte, (2011).

7.3 Composición proximal del músculo

No se encontraron diferencias significativas en la composición proximal del musculo con excepción del contenido de cenizas. Se observó un aumento significativo en los juveniles de totoaba alimentados con la dieta que contenía β -glucano. Es probable que este efecto no sea atribuible a un factor del prebiótico, si no al análisis en sí, donde alguna escama o huesos presentes en la muestra pudieran haber influenciado el resultado de este análisis. Sin embargo, los valores de los otros nutrientes del musculo son similares a los reportados por Rueda-López et al. (2011) y por López et al., Durazo, True & Viana (2006) para la misma especie. Resultados similares fueron reportados por Reza, Abdolmajid, Abbas & Abdolmohammad (2009) quienes no observaron diferencias significativas en la composición del musculo (proteínas, lípidos y humedad) de juveniles de esturión beluga (*Huso huso*) después de ocho semanas de ser alimentados con dietas que incluían inulina al 1, 2 y 3%. Estos resultados coincide con lo reportado por Ortiz et al. (2013) quienes evaluaron el efecto de los fructooligosacáridos (FOS) y la inulina al 0.5 y 1% en la dieta de juveniles de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) por un periodo de 49 días y no encontraron diferencias significativas entre tratamientos en la composición del musculo de esta especie. Por su parte, Rossi et al., (2015) evaluaron incluir el prebiótico comercial

GroBiotic-A® al 2% en la dieta de la corvina (*Sciaenops ocellatus*) por un periodo de 15 semanas y no obtuvieron diferencias significativas en la composición del musculo de los organismos alimentados con y sin prebiótico. Estos resultados sugieren que por lo general los prebióticos no tienen un efecto en la composición proximal del musculo en diferentes especies cuando son alimentadas con prebióticos.

7.4 Coeficiente de digestibilidad aparente (CDA%)

Uno de los efectos más importantes atribuidos a los prebióticos, son la modulación de la flora intestinal del organismo que puede resultar en un aumento en la capacidad digestiva de este. Para evaluar este efecto, en el presente estudio se estimó el coeficiente de digestibilidad aparente (CDA) de las dietas y se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos observando un mayor CDA en los peces alimentados con la dieta que contenía inulina ($70.7 \pm 1.1\%$). No se encontraron diferencias significativas entre los otros tratamientos y el control. Estos resultados concuerdan con los reportados por Burr, Hume, Neill & Gatlin (2008) quienes obtuvieron diferencias significativas en la digestibilidad de juveniles de la corvina (*Sciaenops ocellatus*) al ser alimentados con dietas que contenían un prebiótico comercial GroBiotic®-A, MOS, inulina y GOS. Estos autores reportaron la mejor digestibilidad la dieta que incluía GroBiotic-A®, una digestibilidad intermedia en las dietas que incluían MOS y GOS, mientras que la menor digestibilidad se presentó en la dieta basal. Estos resultados difieren con lo reportado por Grisdale-Helland, Helland & Gatlin (2008) quienes evaluaron incluir 1% de varios prebióticos (MOS, GOS y FOS) en la dieta de juveniles de salmón (*Salmo salar*) y después de 4 meses no observaron ninguna diferencia significativa en la digestibilidad de las dietas. Los autores proponen que el aumento de la digestibilidad se debe a que la comunidad microbiana produjo un aumento en las enzimas digestivas, aunque no lo evaluaron directamente. Sin embargo aún no se conoce el mecanismo preciso que relacione los prebióticos con una mejor digestibilidad, y de acuerdo a Ringø et al. (2010) se necesitan más estudios para confirmar esta hipótesis. En el presente estudio, se evaluó la actividad enzimática de las principales enzimas digestivas para intentar elucidar

uno de los mecanismos de acción del incremento en la digestibilidad de la dieta al usar los prebióticos.

7.5 Actividad enzimática

7.5.1 Tripsina

Se encontraron diferencias significativas en actividad total (UA) de la tripsina entre los tratamientos. Se observó un aumento significativo de la actividad de esta enzima en los juveniles de totoaba alimentados con la dieta que contenía inulina (103.1 ± 4.4) y la menor actividad en la dieta basal (60.4 ± 2.9). La actividad específica ($U \mu g^{-1}$ de proteína) de esta enzima no presentó diferencias significativas entre tratamientos pero se observa claramente un aumento en los organismos alimentados con inulina (0.21 ± 0.03) respecto a los peces alimentados con las otras dietas. El incremento en la actividad total de la tripsina en los peces alimentados con dietas suplementadas con inulina ayuda a explicar la mayor digestibilidad de la dieta obtenida en este tratamiento y respalda la hipótesis propuesta por el laboratorio de Gatlin y sus colaboradores en varios de sus estudios (ver sección anterior).

Resultados similares fueron reportados por Xu & Lin (2009) quienes suplementaron una dieta basal para la carpa plateada de Prusia (*Carassius auratus gibelio*) con tres niveles de inclusión (0.15, 2.1 y 3.2%) de xilooligosacáridos (XOS) obteniendo un aumento significativo en la actividad específica de las proteasas totales en la dieta suplementada con 2.1% del prebiótico. Semejante a estos resultados, Guzmán-Villanueva et al. (2014) adicionaron a la dieta del huachinango del Pacífico (*Lutjanus peru*) dos niveles de β -glucano (0.1 y 0.2%) y a las dos semanas observaron un aumento en la actividad específica de tripsina en los organismos alimentados con la dieta suplementada al 0.1%. En otro estudio realizado por Refstie et al. (2006) en el que agregaron a la dieta para el salmón (*Salmo salar*) inulina al 7.5% y algunos antibióticos. No observaron diferencias significativas en la actividad total de las enzimas digestivas cuando estimaron su actividad en todo el intestino, pero si encontraron un aumento significativo en la actividad de la

tripsina en el intestino distal. Por otra parte, Anguiano, et al., (2012) realizaron un estudio en la corvina dorada (*Sciaenops ocellatus*) y en el híbrido de la lobina rayada (*Morone chrysops* x *M. saxatilis*) donde alimentaron a los juveniles de la corvina con una dieta basal y con diferentes dietas que contenían MOS, FOS, TOS y GoBiotic®-A al 1%, mientras que los juveniles del robalo rayado híbrido fueron alimentados con una dieta basal y con dos niveles de inclusiones de GroBiotic®-A (1 y 2%). A las ocho semanas no obtuvieron diferencias significativas en cuanto a la actividad específica de tripsina en ambas especies.

7.5.2 Lipasa

Al cuantificar la actividad de la lipasa se encontraron diferencias significativas en la actividad específica (U μg^{-1} de proteína). La mayor actividad específica de esta enzima se registró en los juveniles de totoaba alimentados con la dieta que incluía inulina (1.05 ± 0.14) y la menor actividad en los organismos alimentados con suplementación de quitosano (0.46 ± 0.11). En cuanto a la actividad total (UA) no se registró un efecto significativo, sin embargo se observó un aumento de esta enzima en los organismos alimentados con inulina (539.7 ± 145.7) comparando con la dieta basal (366.1 ± 29.8). Estos resultados difieren con lo reportado por Guerreiro et al. (2016) quienes suplementaron la dieta de la dorada (*Sparus aurata*) con el prebiótico FOS y después de ocho semanas no observaron diferencias significativas en la actividad específica de la lipasa entre los organismos alimentados con y sin el prebiótico. De manera similar, Anguiano et al. (2012) reportan no haber encontrado diferencias significativa en la actividad específica de la lipasa en juveniles de corvina (*Sciaenops ocellatus*) y en juveniles de robalo rayado híbrido (*Morone chrysops* x *M. saxatilis*) alimentados con los diferentes prebióticos (MOS FOS, TOS y GoBiotic®-A). En contraste, Azari et al. (2011) obtuvieron diferencias significativas en la actividad específica de lipasa en juveniles de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) a las 12 semanas de ser alimentados con prebióticos GoBiotic®-A y Aqualase al 1 y 2%, donde registraron un aumento en la actividad de lipasa en los organismos alimentados con una dieta suplementada con GoBiotic®-A al 2%.

7.5.3 Amilasa

Al cuantificar la actividad de la amilasa no se obtuvieron diferencias significativas en actividad total (UA) ni en la actividad específica (U μ g⁻¹ de proteína) de los juveniles de totoaba alimentados con los prebióticos (β -glucano, quitosano e inulina). Sin embargo es importante mencionar que se observa un aumento notable en la actividad total de esta enzima al usar prebióticos (la actividad de los organismos alimentados con prebiótico fue $\sim 155 \pm 31$ mientras que la de los organismos que no consumieron prebióticos fue de 108.2 ± 45.5). En contraste con estos resultados, Refstie et al. (2006) obtuvieron diferencias significativas en la actividad total de la amilasa en juveniles de salmón (*Salmo salar*) alimentados con una dieta suplementada con inulina. Así mismo, sus resultados coinciden con los reportados por Xu et al. (2009) quienes encontraron un efecto significativo en la actividad específica de la amilasa de juveniles del carpa plateada de Prusia (*Carassius auratus gibelio*) alimentados con tres niveles (0.15, 2.1 y 3.2%) de xilooligosacáridos (XOS). Este efecto se vio reflejado en los organismos que consumieron la dieta con 2.1% de XOS. Por otra parte Anguiano et al. (2012) realizaron un trabajo en la corvina dorada (*Sciaenops ocellatus*) y en el híbrido de la lobina rayada (*Morone chrysops* x *M. saxatilis*) donde suplementaron las dietas de los juveniles de corvina dorada con MOS FOS, TOS y GoBiotic®-A al 1%, mientras que los juveniles de robalo rayado híbrido fueron alimentados con dos inclusiones de GoBiotic®-A (1 y 2%), después de ocho semanas no observaron efecto significativos en la actividad específica de la amilasa en los juveniles de la corvina, mientras que en el robalo rayado híbrido si encontraron un aumento significativo en ambas concentraciones evaluadas de GoBiotic®-A. Esto coincide con los resultados de este trabajo y los obtenidos en el híbrido de la lobina. Por su parte Azari et al. (2011) reportaron diferencias en la actividad específica de la amilasa en juveniles de trucha arcoíris al ser alimentados con una dieta que tenía inclusión de GoBiotic®-A al 2%.

De manera general, el efecto positivo de los prebióticos sobre la actividad de las enzimas digestivas puede deberse en parte al aumento de las microvellosidades provocado por los prebióticos, esto es debido a que algunas bacterias reconocen sitios de unión en el prebiótico en lugar de la mucosa intestinal, y actúan como sustrato para las bacterias benéficas, lo que provoca el aumento de estas y una reducción en la colonización de

bacterias patógenas intestinales. Por lo tanto, además de una incidencia de infección menor, hay un aumento en la absorción de nutrientes disponibles, este mecanismo afecta directamente a la recuperación de la mucosa intestinal y al aumento de longitud de las vellosidades (Ganguly, Dora, Sarkar, & Chowdhury, 2013), lo que se correlaciona positivamente con la absorción de nutrientes (Zhou et al., 2010).

Li & Gatlin, (2005) contribuyen a sustentar esta hipótesis debido a que encuentran que los polisacáridos empleados como prebióticos estimulan el crecimiento de la microbiota del sistema digestivo benéfica en peces. Por otra parte y complementando esta conclusión. Dimitroglou et al., (2011) sugieren que algunas poblaciones de bacterias contribuyen a modificar la actividad de las enzimas digestivas del organismo a través de la capacidad de producir y liberar enzimas digestivas exógenas.

Por otra parte las diferencias en el efecto positivo de los prebióticos entre especies, se pueden explicar debido a que es posible que el efecto de los prebióticos sobre las enzimas digestivas este estrechamente relacionado con la fisiología y morfología del tracto gastrointestinal (GIT) de cada especie. Por ejemplo las diferencias entre peces carnívoros (corvina, híbrido de la lobina rayada, la dorada, entre otros) y peces herbívoros/omnívoros como los ciprinidos, donde estos últimos tienen una mayor longitud intestinal y un más lento paso del bolo alimenticio dentro de estos hacen que el paso de los prebiótico a través del GIT se más lento y pueda tener mayor efecto (Anguiano et al., 2012).

Sin embargo esta hipótesis no concuerda con el efecto observado en el presente estudio donde se observó un aumento en la actividad de la tripsina y la lipasa al incluir inulina en la dieta de un pez carnívoro (totoaba). Estos resultados coinciden con lo reportado por Guzmán-Villanueva, Ascencio-Valle, Macías-Rodríguez & Tovar-Ramírez (2014) quienes obtuvieron efectos positivos en la actividad enzimática del pargo (*Lutjanus peru*) al alimentarlo con dietas que incluyan β -glucano. Los autores sugieren que este efecto se debe a la influencia del β -glucano que posiblemente altero la microbiota intestinal, sin embargo proponen realizar un estudio detallado sobre la microbiota previo y posterior a la alimentación con este prebiótico para evaluar los cambios en la población de bacterias en el intestino.

Dando que aún no hay consenso sobre los efectos de los prebióticos y los mecanismos de acción así como las diferentes hipótesis que se presentan en la literatura, se propone realizar más estudios minuciosos en los efectos directos sobre la microbiota del sistema digestivo e intentar cuantificar los cambios de esta.

7.6 Actividad inmune no específica

7.6.1 Proteína totales en suero

No se encontraron diferencias significativas en la cuantificación de las proteínas totales en suero de juveniles de totoaba alimentados con los diferentes prebióticos. Sin embargo si hubo un efecto significativo en todos los tratamientos a través del tiempo, independiente de la dieta. En todos los tratamientos los valores totales de las proteínas en suero registraron un aumento a valores cercanos a los $3.1 \pm 0.29 \text{ g dL}^{-1}$ a los 14 días de haber iniciado el bioensayo. Sin embargo para el día 28, los valores de proteína total regresaron a niveles cercanos a los iniciales de $2.49 \pm 0.40 \text{ g dL}^{-1}$. En contraste, Reyes-Becerril et al. (2014) evaluaron la suplementación de un probiótico (*Lactobacillus sakei*), un prebiótico (inulina al 1%) y un simbiótico (*Lactobacillus sakei* + 1% inulina) en la dieta de la cabrilla sardinera (*Mycteroperca rosácea*) durante ocho semanas. Los autores reportan no haber encontrado un efecto significativo a través del tiempo en las proteínas totales del suero, pero si un efecto de los suplementos evaluados. Por su parte, Reza, et al., (2009) encontraron diferencias significativas a las ocho semanas de alimentar al esturión beluga (*Huso huso*) con una dieta suplementada con inulina al 1, 2 y 3%. Los autores reportan haber observado una disminución de las proteínas totales en suero, encontrado el menor valor en la dieta con una concentración de 2% de inulina ($0.93 \pm 0.11 \text{ g dL}^{-1}$), mientras que el valor mayor se presentó en la dieta basal ($1.23 \pm 0.07 \text{ g dL}^{-1}$). De manera similar, Ebrahimi et al. (2012) suplementaron la dieta basal de la carpa común (*Cyprinus carpio*) con un prebiótico comercial Immunogen® al 0.05, 0.1, 0.15 y 1.25% por un periodo de ocho semanas. Los autores reportan haber encontrado un efecto significativo de los prebióticos sobre la cuantificación de las proteínas totales en suero, donde observaron un aumento en las proteínas de los organismos alimentados con 0.15 y 1.25%, mientras

que con 0.05 y 0.1% los valores disminuyeron, en comparación con el control. En contraste, Mouriño et al. (2012) reportan no haber encontrado algún efecto significativo en las proteínas totales en suero en un híbrido del género *Pseudoplatystoma* alimentado con dietas suplementadas con inulina al 0.5% después de 15 días de experimentación.

Las proteínas totales en el suero de los peces son generalmente de dos tipos; albuminas y globulinas, las albuminas están presentes en el suero en mayor proporción que las globulinas (Kumar et al., 2005) y tienen como función transportar proteínas, ácido grasos, hormonas, entre otras moléculas (Peters, 1995) mientras que las globulinas son proteínas de defensa, como por ejemplo las inmunoglobulinas. La concentración de proteínas totales en suero puede proporcionar información relacionada con alguna deficiencia nutricional o algún efecto en la respuesta inmune no específica. Cuando se observa un aumento en los valores de proteínas totales en suero suele estar relacionado con una respuesta inmunológica y sugiere un probable aumento en globulinas. Las globulinas están relacionadas con el proceso de inflamación, por otra parte una disminución en las proteínas totales en suero puede estar asociada a una disminución de la albumina sérica, y puede indicar alguna deficiencia nutricional (Bush, 2004).

Se sugiere que el aumento de proteínas totales obtenido a los 15 días de iniciado el bioensayo en este estudio podría indicar que los organismos estuvieron bajo estrés. Es bien sabido que cualquier tipo de estrés provoca una alteración en los parámetros del sistema inmune. Esta hipótesis se estableció debido a que un aumento de proteínas totales se le atribuye un aumento de las globulinas, proteínas relacionadas con la defensa del cuerpo. Se cree que al sentirse amenazado el organismo se desencadenó un aumento en la producción de las proteínas (globulinas). Sin embargo no hubo un efecto del prebiótico ya que todos los tratamientos respondieron de manera similar.

7.6.2. Conteo de leucocitos

Se encontraron diferencias significativas en el tiempo y en el tipo de prebiótico suplementado, pero no en la interacción entre estos factores. El número de células

blancas tuvo un aumento significativo en todos los tratamientos a las dos semanas de haber iniciado el bioensayo y se mantuvo a niveles similares a partir de este momento. En cuanto al efecto del prebiótico suplementado, los organismos alimentados con la inclusión de β -glucano o el quitosano presentaron una mayor producción de estas células a partir del día 42 comparados con los alimentados con la dieta basal. Estos resultados son favorables para el organismo porque un aumento en el número de leucocitos nos indica que hay la suficiente producción de células para combatir a microorganismos o posibles patógenos en caso de ser necesario, esto debido a que en el número total de leucocitos el mayor porcentaje es de neutrófilos (Alberts, *et. al*, 2002), células con una alta capacidad de defensa. Estas células presentan un mecanismo de ingestión y digestión de material extraño particulado bastante eficiente, conocido como fagocitosis (Mac Arthur & Fletcher 1985).

Finalmente, Dalmo & Bogwald, (2008) sugieren que el β -glucano estimula directamente los leucocitos, lo que coincide con los resultados obtenidos en el presente estudio. Además de estimular la fagocitosis y algunos parámetros más del sistema inmune innato como el estallido respiratorio.

Los resultados obtenidos en este estudio coinciden con lo reportado por Del Rio-Zaragoza et al., (2011) los cuales adicionaron β -glucano al 0.05, 0.1 y 0.5% a la dieta basal de juveniles de pargo (*Lutjanus guttatus*) y a las tres semanas observaron un aumento significativo en el número de leucocitos de los organismos alimentados con 0.05 y 0.1%. Por otra parte los resultados reportados por Lin et al. (2011) coinciden con estos resultados. Estos autores adicionaron a la dieta de la carpa común (*Cyprinus carpio*) 0.5% de β -glucano y 0.2% de quitosano por separado, y observaron una aumento de los leucocitos en ambos tratamientos comparados con los del control. Sin embargo, al comparar entre estos dos grupos (con prebióticos), los que peces alimentados con β -glucano registraron un mayor número de leucocitos, en menor tiempo que los suplementados con quitosano.

Contrario a estos resultados, Gopalakannan & Arul (2006) no observaron un efecto significativo en el conteo de células blancas de juveniles de carpa (*Cyprinus carpio*) al suplementar sus dietas con 1% de quitosano, aun después de 30, 60 y 90 días de

experimentación. Por su parte, Reza et al. (2009) suplementaron diferentes dietas con inulina (1, 2 y 3%) y alimentaron juveniles de esturión beluga (*Huso huso*) durante ocho semanas. Al cuantificar los leucocitos observaron un aumento significativo en los organismos alimentados con dietas suplementadas con 1% de inulina y una disminución en los peces de los tratamientos con 2 y 3 %. Así mismo, Lin et al. (2012) coinciden con estos resultados al obtener diferencias significativas en el conteo de leucocitos de carpa koi (*Cyprinus carpio koi*) al incluir en su dieta quitosano al 2% después de alimentarlos durante ocho semanas.

7.6.3 Estallido respiratorio

Los valores determinados para el estallido respiratorio en los juveniles de totoaba alimentados con dietas suplementadas con los prebióticos resultaron con diferencias significativas en cuanto al tiempo, el tipo de prebiótico, y en la interacción entre estos factores. Los valores del estallido respiratorio tuvieron un aumento significativo en las dietas que contenían quitosano e inulina a los 30 y 45 días después de iniciado el bioensayo. Posteriormente en ambos tratamientos este parámetro disminuyó en el día 60. Es importante mencionar que los valores del estallido respiratorio de los organismos alimentados con la dieta basal registraron aumento significativo en el día 45, y para los peces alimentados con dietas suplementadas con β -glucano los valores se mantuvieron prácticamente iguales durante todo el bioensayo. Un aumento en el estallido respiratorio indica una mayor capacidad de degradar a posibles patógenos incluso microbios, lo que conduce a una mejor capacidad del organismo frente a estas amenazas (Jørgensen & Robertsen, 1995). Este proceso es llevado a cabo por los leucocitos, específicamente por macrófagos y neutrófilos, responsables de degradar estas partículas mediante las especies reactivas de oxígeno producidas en el proceso de estallido respiratorio.

Del Rio-Zaragoza et al. (2011) llevaron a cabo un estudio con el pargo (*Lutjanus guttatus*) alimentando a estos peces durante cinco semanas con dietas suplementadas con β -glucano al 0.05, 0.1 y 0.15% y reportan resultados favorables al presentar diferencias significativas en la producción de sustancias oxidativas mediante el proceso de estallido

respiratorio. De manera similar Lin et al. (2011) evaluaron suplementar la dieta de la carpa koi (*Cyprinus carpio koi*) con β -glucano al 0.5% y quitosano al 0.2%, y alimentaron a los peces durante 56 días. A los 7 y 21 días observaron un aumento de este parámetro en los organismos alimentados con β -glucano, mientras que los alimentados con quitosano observaron un aumento a los 14 y a los 56 días. Estos resultados coinciden con los reportados por Gopalakannan & Arul, (2006), quienes añadieron quitosano al 1% en la dieta de la carpa común (*Cyprinus Carpio*) y por Ai et al. (2007) quienes reportan un aumento en el estallido respiratorio de juveniles de corvina (*Pseudocirrus crocea*) al alimentarlas con dietas suplementadas con β -glucano al 0.09%.

Contrario a los resultados obtenidos en las especies anteriores, se llevó a cabo una investigación por Buentello et al. (2010), quienes adicionaron a la dieta de la corvina dorada FOS, MOS, TOS y GoBiotic-A® al 1% y a las cuatro semanas de alimentación con estos prebióticos no observaron efectos significativos sobre los valores del estallido respiratorio. De igual manera Zhou et al., (2010) suplementaron la dieta de la corvina (*Sciaenops ocellatus*) con Previda™, Bio-MOS®, GOS y FOS al 1 % y después de ocho semanas de alimentación reportaron una reducción en los valores del estallido respiratorio de los organismos alimentados con FOS, mientras que los alimentados con el resto de los prebióticos no presentaron ningún efecto significativo.

7.6.4 Fagocitosis

En el presente estudio el porcentaje de fagocitosis en juveniles de totoaba alimentados con dietas suplementadas con los prebióticos no presentó diferencias significativas en el tiempo, en el tipo de prebiótico y no hubo interacción entre ambos factores. Sin embargo se observó un ligero aumento en el porcentaje de fagocitosis a las cuatro y seis semanas de haber iniciado el bioensayo y para la semana ocho se registró una reducción en estos valores. Un aumento en el porcentaje de fagocitosis indica una respuesta favorable para los peces debido a que es un proceso que representa la primera línea de defensa celular en vertebrado e invertebrados (Chi et al., 2014 y Roth & Kurtz, 2009) y consiste en que células como macrófagos y neutrófilos (fagocitos) fagocitan partículas, como bacterias,

células rojas o cualquier partícula ajena al huésped, debido a que los fagocitos tienen la capacidad de reconocer y decodificar moléculas o iones (ligandos) presentes en la superficie de su objetivo de fagocitosis (Carbone & Faggio, 2016). Durante este proceso se producen algunas sustancias antimicrobianas con la finalidad de destruir a la partícula fagocitada, algunos de estos productos son especies reactivas de oxígeno (ROS), incluyendo el anión superóxido, peróxido de hidrógeno y radicales hidroxilo. Estas sustancias participan en el estallido respiratorio (Esteban, Cuesta, Chaves-Pozo, & Meseguer, 2015). Es decir, los mecanismos de defensa; fagocitosis y estallido respiratorio actúan de manera conjunta con la finalidad de defender a los organismos de cualquier amenaza.

Diversos estudios estudiando la fagocitosis en peces coinciden con lo reportado por Guzmán-Villanueva et al. (2014) quienes suplementaron la dieta de la dorada con β -glucano al 0.1% y no encontraron un efecto significativo durante las cuatro primeras semanas. Contrario a estos resultados, Del Rio-Zaragoza et al. (2011) obtienen diferencias significativas en el porcentaje de fagocitosis en juveniles de pargo lunarejo (*Lutjanus guttatus*) al incluir en su dieta 0.5% de β -glucan. Los autores reportan haber registrado este efecto solamente en la primera semana. Por otra parte, Lin et al. (2011) reportan diferencias significativas en los valores de fagocitosis en juveniles de carpa koi (*Cyprinus carpa koi*) alimentados con dietas suplementadas con β -glucano y quitosano al 0.5 y 0.2% respectivamente. Los autores reportan haber registrado este aumento en el porcentaje de fagocitosis en ambos grupos de peces desde los 21 días, aunque la mayor actividad se registró en los peces alimentados con β -glucano. Por su parte, Geng et al. (2011) coinciden con estos resultados al registrar un aumento en el porcentaje de fagocitosis en juveniles de cobia (*Rachycentron canadum*) después de ser alimentados con dietas suplementadas con 0.3 y 0.6% de quitosano durante ocho semanas.

Los resultados descritos con anterioridad incluyendo los obtenidos en este trabajo sugieren que los prebióticos en los peces estimulan el sistema inmune innato debido a que estas sustancias (los prebióticos) presentan secuencias repetidas de glucosa, ribosa, ácidos grasos, entre otras (Dalmo & Bogwald, 2008). Estas secuencias se conocen como Partículas Moleculares Asociadas a Microorganismos (MAMPs) y se encuentran de manera natural en organismos microbianos como bacterias, pero están ausentes en las

células eucariotas (Piñeros *et al.*, 2012) y es debido a esta ausencia que se convierten en partículas desconocidas para el organismo y el sistema inmune lo detecta como una partícula extraña o un posible patógeno.

Por otra parte, en el caso de los microorganismos que pueden generar alguna enfermedad o daño en el huésped producen ciertas sustancias conocidas como Partículas Moleculares Asociadas a Patógenos (PAMPs) (Patiño, 2009. Tomado de Dalmo & Bogwald, 2008). Los PAMPs son capaces de unirse a receptores de células del sistema inmune como monocitos, macrófagos, neutrófilos, y por algunas células que no están implicadas en la inmunidad, como las células del tejido específico epitelial y endotelial. Estos receptores se conocen con PRRs (Receptores de Reconocimiento de Patógenos) y son los que inician la respuesta inmune innata a través de la detección de agentes infecciosos como las bacterias PAMPs (Carbone & Faggio, 2016) o bien con la detección de los MAMPs a pesar de no ser dañinos para el huésped. Todos los PRRs poseen un dominio de proteína que les permite reconocer los PAMPs y a los MAMPs junto con un dominio de proteína que interactúa con las moléculas de señalización para la activación de los mecanismos del sistema inmune innato.

Por último, es importante mencionar que a pesar de existen hipótesis sobre el mecanismo acción y los efectos positivos que se presentan por la administración de prebióticos en la dietas de peces sobre el sistema inmune innato, existen varios estudios en los cuales no se observan estos efectos positivos. Existen varios factores que pudieran ayudar a explicar estos hechos. Por ejemplo, la naturaleza y composición de la dieta basal, el nivel de inclusión del prebiótico, el tipo de prebiótico, al período de adaptación, la estructura química del prebiótico, el origen del prebiótico. Así mismo las características de los organismos utilizados en los bioensayos (especie, edad, etapa de la producción) y/o a las condiciones ambientales del experimento (Reza *et al.*, 2009).

Capítulo 8. Conclusión

- Los prebióticos: β -glucano, quitosano e inulina añadidos en la dieta de la totoaba (*Totoaba macdonaldi*) no afectaron significativamente el crecimiento, el índice hepatosomático y la eficiencia alimenticia.
- La composición del músculo de la totoaba se vio afectado solamente en el porcentaje de cenizas, donde se obtiene un aumento en los juveniles de totoaba alimentados con inclusión de β -glucano.
- El coeficiente de digestibilidad aparente de la dieta fue significativamente mayor en los peces alimentados con la dieta que contenía inulina al 1%. Este aumento se relaciona con un aumento significativo en la actividad total de la tripsina y en la actividad específica de la lipasa en los organismos alimentados con el mismo prebiótico.
- La actividad específica (UA) y actividad total ($U\mu g P$) de amilasa no se vio afectada estadísticamente por los prebióticos.
- Se observó un aumento significativo de las proteínas totales en suero de juveniles de totoaba a los 14 días de iniciado el bioensayo en todos los tratamientos.
- Se observó un efecto significativo a través del tiempo en el estallido respiratorio. Se cuantificó una mayor actividad en los organismos alimentados con inulina y quitosano a los 30 y 45 días respectivamente.
- El número de leucocitos de la totoaba fue afectado significativamente por la suplementación en dieta de inulina, β -glucano y quitosano. Sin embargo, se obtuvo una respuesta más temprana (partir de 15 días de iniciar con la alimentación) en los peces alimentados con β -glucano.
- Los prebióticos evaluados no tuvieron un efecto significativo en el porcentaje de fagocitosis de los juveniles de totoaba.

Capítulo 9. Recomendaciones

- Los juveniles de totoaba que consumieron la dieta con inulina al 1% presentaron efectos positivos en la capacidad digestiva, por lo que se sugiere evaluar concentraciones más elevadas de β -glucano y quitosano, para observar su posible efecto en esta especie.
- Evaluar las microvellosidades del intestino antes y después del bioensayo, para observar el efecto de los prebióticos en el intestino de los peces.
- Estandariza la técnica de fagocitosis para esta especie, debido a que se presentaron algunas complicaciones como la coagulación de sangre antes de montar el frotis.

Referencias bibliográficas

- Abbas, A., Lichman, A., Pober, J. (2002). *Propiedades generales de las respuestas inmunitarias. Inmunología Celular y Molecular*. España, Madrid. McGraw-Hill-Interamericana, (pp 1–16).
- Ai, Q., Mai, K., Zhang, L., Tan, B., Zhang, W., Xu, W., & Li, H. (2007). Effects of dietary β -1, 3 glucan on innate immune response of large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea*. *Fish and Shellfish Immunology*, 22 (4), 394–402.
- Akhter, N., Wu, B., Memon, A. M., & Mohsin, M. (2015). Probiotics and prebiotics associated with aquaculture: A review. *Fish & shellfish immunology*, 45 (2), 733-741.
- Bruce Alberts, Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, and Peter Walter (2002). Leukocyte functions and percentage breakdown. *Molecular Biology of the Cell* (4th ed.). Nueva York: Garland Science.
- Álvarez-González, C.A. (2003). *Actividad enzimática digestiva y evaluación de dietas para el deteste de larvas de la cabrilla arenera Paralabrax maculatofasciatus (Percoideis: Serranidae)*. Tesis de Doctorado en Ciencias Marinas. Instituto Politécnico Nacional. 179 p.
- Anguiano, M., Pohlenz, C., Buentello, A., and Gatlin, D. M. (2012). The effects of prebiotics on the digestive enzymes and gut histomorphology of red drum (*Sciaenops ocellatus*) and hybrid striped bass (*Morone chrysops* × *M. saxatilis*). *British Journal of Nutrition*, 1–7.
- Arvizu, J., y Chávez, H. (1972). Sinopsis sobre la biología de la tobaba, *Cynoscion macdonaldi* Gilbert, 1890. FAO Fisheries Synopsi No. 108 SAST -Totoaba -1, 70 (37), 016, 08.
- Azari, A. H., Hashim, R., Rezaei, M. H., Baei, M. S., Roohi, A., and Darvishi, M. (2011). The Effects of Commercial Probiotic and Prebiotic Usage on Growth Performance , Body Composition and Digestive Enzyme Activities in Juvenile Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Department of Marin Chemistry Science and Technology , 14, 26–35.
- Bosscher, D., Van Loo, J., Franck, A. (2006). Inulin and oligofructose as functional ingredients to improve bone mineralization. *International Dairy Journal*, 16 (10) 92–109.
- Bowyer, J. N., Qin, J. G., Smullen, R. P., Adams, L. R., Thomson, M. J., & Stone, D. A. (2013). The use of a soy product in juvenile yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*) feeds at different water temperatures: 2. Soy protein concentrate. *Aquaculture*, 410, 1-10.
- Buentello, J. A., Neill, W. H., & Gatlin, D. M. (2010). Effects of dietary prebiotics on the growth, feed efficiency and non-specific immunity of juvenile red drum *Sciaenops ocellatus* fed soybean-based diets. *Aquaculture Research*, 41(3), 411–418.
- Burr, G., Hume, M., Neill, W. H., & Gatlin, D. M. (2008). Effects of prebiotics on nutrient

- digestibility of a soybean-meal-based diet by red drum *Sciaenops ocellatus* (Linnaeus). *Aquaculture Research*, 39(15), 1680–1686.
- Bush, A.O. (1997). Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis et al. Revisited. *J. Parasitol.* 83(4): 575-583. Bush, B.M. (2004).
- Carbone, D., & Faggio, C. (2016). Importance of prebiotics in aquaculture as immunostimulants. Effects on immune system of *Sparus aurata* and *Dicentrarchus labrax*. *Fish and Shellfish Immunology*, 54, 172–178.
- Caruffo, M., López, P., Navarrete, N., Díaz, A., Navarrete, P. (2013). Uso de β -glucanos como inmunestimulantes en acuicultura. *Idualimentos*. Laboratorio de Biotecnología, INTA, Universidad de Chile.
- Cerezuela, R., Cuesta, A., Meseguer, J., & Angeles Esteban, M. (2008). Effects of inulin on gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) innate immune parameters. *Fish & Shellfish Immunology*, 24(5), 663–8.
- Cerezuela-Cabrera, R. (2012). *Nuevos probióticos y prebióticos para la dorada (Sparus aurata L.)* Tesis de Doctorado. Universidad de Murcia, 220 pp.
- Cerezuela, R., Guardiola, F. A., Meseguer, J., & Esteban, M. ángeles. (2012). Increases in immune parameters by inulin and *Bacillus subtilis* dietary administration to gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) did not correlate with disease resistance to *Photobacterium damsela*. *Fish and Shellfish Immunology*, 32(6), 1032–1040.
- Chi, C., Jiang, B., Yu, X. B., Liu, T. Q., Xia, L., & Wang, G. X. (2014). Effects of three strains of intestinal autochthonous bacteria and their extracellular products on the immune response and disease resistance of common carp, *Cyprinus carpio*. *Fish and Shellfish Immunology*, 36(1), 9–18.
- Cisneros-Mata, M. a, Montemayor-Lopez, G., & Román-Rodríguez, M. J. (1995). Life of *Totoaba macdonaldi* History and Conservation. *Conservation Biology*, 9(4), 806 – 814.
- CITES (2014). Apéndices I, II y III. Recuperado el 4 de mayo 2016 de: <http://www.cites.org/sites/default/files/esp/app/2013/S-Appendices-2013-0612.pdf>
- Collins, M. D., & Gibson, G. R. (1999). Probiotics , prebiotics , and synbiotics : approaches for modulating the microbial ecology of the gut 1 , 2. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 69, 1052–1057
- Cuesta, A., Esteban, M.A., Meseguer, J., (1999). Natural cytotoxic activity of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) leucocytes. Assessment by flow cytometry and microscopy. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 71, 161–171.
- Dalmo, R. A., & Bogwald, J. (2008). β -Glucans As Conductors of Immune Symphonies. *Fish and Shellfish Immunology*, 25(4), 384–396.
- Del Río-Zaragoza, O. B. (2004). *Efecto del estrés térmico sobre los parámetros sanguíneos de la Tilapia Oreochromis mossambicus (Peters, 1852) (PISCES:*

CICHLIDAE). Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, 142 p.

- Del Rio-Zaragoza, O. B., Fajer-Ávila, E. J., & Almazán-Rueda, P. (2011). Influence of β -glucan on innate immunity and resistance of *Lutjanus guttatus* to an experimental infection of dactylogyrid monogeneans. *Parasite Immunology*, 33(9), 483–94.
- Del Rio-Zaragoza, O.B., Fajer-Ávila, E.J., Rueda-Almazán, P. (2011). Influence of β -glucan on innate immunity and resistance of *Lutjanus guttatus* to an experimental infection of dactylogyrid monogeneans. *Parasite Immunology*, 33, 483-494.
- Diario Oficial de la Federación, (1975). Acuerdo que establece veda total para la totoaba. 1o. de agosto de 1975. Recuperado el 23 noviembre del 2015 de: http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4786520&fecha=01/08/1975
- Dimitroglou, A., Merrifield, D. L., Carnevali, O., Picchiatti, S., Avella, M., Daniels, C., ... Davies, S. J. (2011). Microbial manipulations to improve fish health and production--a Mediterranean perspective. *Fish & Shellfish Immunology*, 30(1), 1–16.
- Ebrahimi, G. H., Ouraji, H., Khalesi, M. K., Sudagar, M., Barari, A., Zarei Dangesaraki, M., & Jani Khalili, K. H. (2012). Effects of a prebiotic, Immunogen??, on feed utilization, body composition, immunity and resistance to *Aeromonas hydrophila* infection in the common carp *Cyprinus carpio* (Linnaeus) fingerlings. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 96(4), 591–599.
- Ellis, A., (1977). The leucocytes of fish: a review. *Journal of Fish Biology*, 11(5), 453-491.
- Esteban, A., Mulero, V., Cuesta, A., Ortuno, J., Meseguer, J. (2000). Effects of injecting chitin particles on the innate immune responses of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish Shellfish Immunology*, 10, 543–55
- Esteban, M. Á., Cuesta, A., Chaves-Pozo, E., & Meseguer, J. (2015). Phagocytosis in Teleosts. Implications of the New Cells Involved. *Biology*, 4(4), 907–22.
- Esteban, M.A., Cuesta, A., Ortuno, J., Meseguer, J. (2001). Immunomodulatory effects of dietary intake of chitin on gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) innate immune response. *Fish Shellfish Immunology*, 1, 303–315
- Evans, D. L., Graves, S. S., Cobb, D., & Dawe, D. L. (1984). Nonspecific cytotoxic cells in fish (*Ictalurus punctatus*). II. Parameters of target cell lysis and specificity. *Developmental & Comparative Immunology*, 8 (2), 303-312.
- FAO, 2014. Estado Mundial de la Pesca y la Acuicultura. Recuperado el 28 de abril del 2016 de: <http://www.fao.org/3/7870db4d-2558-4714-9c56-0cf49f010f3e/i3720s.pdf>
- Gaggia, F., Matarrelli, P., Biavati, P. (2010). Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. *International Journal of Food Microbiology*, 141, 15–28
- Ganguly, S., Dora, K. C., Sarkar, S., & Chowdhury, S. (2013). Supplementation of prebiotics in fish feed: A review. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 23(2), 195–199.

- Geng, X., Dong, X.H., Tan, B.P., Yang, Q., Chi, S.Y., Liu, H.Y., Liu, X.Q. (2011). Effects of dietary chitosan and *Bacillus subtilis* on the growth performance, non-specific immunity and disease resistance of cobia, *Rachycentron canadum*. *Fish & Shellfish Immunology*, 31(3), 400-406.
- Gibson, G.R., Roberfroid, M.B. (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *The Journal of Nutrition* 125, 1401–1412.
- Gloria Edith Villarreal Rodarte. (2011). *Efecto de la concentración de HUFAs n-3 en la dieta sobre el crecimiento, supervivencia, eficiencia alimenticia e índice de condición de juveniles de Totoaba macdonaldi*. Tesis de maestro en ciencias. Centro de Investigacion Científica y de Educacion Superior de Ensenada.
- Gopalakannan, A., & Arul, V. (2006). Immunomodulatory effects of dietary intake of chitin, chitosan and levamisole on the immune system of *Cyprinus carpio* and control of *Aeromonas hydrophila* infection in ponds. *Aquaculture*, 255(1-4), 179–187.
- Grisdale-Helland, B., Helland, S. J., & Gatlin, D. M. (2008). The effects of dietary supplementation with mannanoligosaccharide, fructooligosaccharide or galactooligosaccharide on the growth and feed utilization of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 283(1-4), 163–167.
- Guerreiro, I., Serra, C. R., Enes, P., Couto, A., Salvador, A., Costas, B., & Oliva-Teles, A. (2016). Effect of short chain fructooligosaccharides (scFOS) on immunological status and gut microbiota of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) reared at two temperatures. *Fish & Shellfish Immunology*, 49, 122–131.
- Guzmán-Villanueva, L. T., Tovar-Ramírez, D., Gisbert, E., Cordero, H., Guardiola, F. A., Cuesta, A. Esteban, M. A. (2014). Dietary administration of B-1,3/1,6-glucan and probiotic strain *Shewanella putrefaciens*, single or combined, on gilthead seabream growth, immune responses and gene expression. *Fish and Shellfish Immunology*, 39(1), 34–41.
- Guzmán-Villanueva, L. T., Ascencio-Valle, F., Macías-Rodríguez, M. E., & Tovar-Ramírez, D. (2013). Effects of dietary β -1,3/1,6-glucan on the antioxidant and digestive enzyme activities of Pacific red snapper (*Lutjanus peru*) after exposure to lipopolysaccharides. *Fish Physiology and Biochemistry*, 40 (3), 827–37.
- Hortolà, P. (1998). *Datación por racemización de aminoácidos: principios, técnicas y aplicaciones*. Barcelona. Edición Universitat Barcelona.
- Ibrahim, M. D., Fathi, M., Mesalhy, S., & Abd El-Aty, a M. (2010). Effect of dietary supplementation of inulin and vitamin C on the growth, hematology, innate immunity, and resistance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fish & Shellfish Immunology*, 29(2), 241–6
- Ibrahim, M.D., Fathi, M., Mesalhy, S., Ebd El-Aty, A.M. (2012). Effect of dietary supplementation of inulin and vitamin c on the growth, hematology, innate immunity, and resistance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fish & shellfish immunology*, 29 (2), 241-246.

- Idyll, C.P. (1974). Capacitación en Acuicultura: México. Progr. de Invest. y Fom. Pesq. México/ PNUD/FAO. Contribuciones al estudio de las pesquerías de México. CEPM: 12. Recuperado el 3 de mayo del 2016 de: <http://www.fao.org/3/contents/0b81ecb6-20f5-5fb4-b65c6793e9b48c02/ac596s00.htm>
- Jagadeeswara, P., Sheehan, J.P., Craig, F.E., Troyer, D., (1999). Identification and characterization of zebrafish thrombocytes. *British Journal of Haematology* 107, 731–738.
- Jørgensen, J. B., & Robertsen, B. (1995). Yeast β -glucan stimulates respiratory burst activity of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) macrophages. *Developmental & Comparative Immunology*, 19(1), 43-57.
- Kawakami, H., Shinohar. N., Sakai, M. (1998). The non-specific immunostimulation and adjuvant effects of *Vibrio anguillarum* bacterin, M-glucan, chitin and Freund's complete adjuvant against *Pasteurella pesticide* infection in yellowtail. *Fish Pathology*, 33, 287–292.
- Kumar, S., Sahu, N. P., Pal, A. K., Choudhury, D., Yengkokpam, S., & Mukherjee, S. C. (2005). Effect of dietary carbohydrate on haematology, respiratory burst activity and histological changes in *L. rohita* juveniles. *Fish & shellfish immunology*, 19(4), 331-344.
- Lazo, J. (2000). Conocimiento actual y nuevas perspectivas en el desarrollo de dietas para larvas de peces marinos. *Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*, 19-22.
- Li, P., & Gatlin, D. M. (2005). Evaluation of the prebiotic GroBiotic®-A and brewers yeast as dietary supplements for sub-adult hybrid striped bass (*Morone chrysops* x *M. saxatilis*) challenged in situ with *Mycobacterium marinum*. *Aquaculture*, 248(1-4), 197–205.
- Lin, S., Mao, S., Guan, Y., Luo, L., Luo, L., & Pan, Y. (2012). Effects of dietary chitosan oligosaccharides and *Bacillus coagulans* on the growth, innate immunity and resistance of koi (*Cyprinus carpio koi*). *Aquaculture*, 342 (343), 36–41.
- Lin, S., Pan, Y., Luo, L., & Luo, L. (2011). Effects of dietary β -1,3-glucan, chitosan or raffinose on the growth, innate immunity and resistance of koi (*Cyprinus carpio koi*). *Fish and Shellfish Immunology*, 31(6), 788–794.
- Lin, S.M., Mao, S.H., Guan, Y., Luo, L., Luo, L., Pan, Y. (2012). Effects of dietary chitosan oligosaccharides and *Bacillus coagulans* on the growth, innate immunity and resistance of koi (*Cyprinus carpio koi*). *Aquaculture*, 342, 36-41.
- López, L. M., Durazo, E., True, C. D., & Viana, M. T. (2006). Nota de Investigación / Research Note Composición proximal y perfil de ácidos grasos de juveniles silvestres y cultivados de *Totoaba macdonaldi* Proximate composition and fatty acid profile of wild and cultured juvenile *Totoaba macdonaldi*. *Ciencias Marinas*, 32, 303–309.
- López, L. M., Maricela, F.-I., Bañuelos-Vargas, I., Galaviz, M. A., & True, C. D. (2015).

Effect of fishmeal replacement by soy protein concentrate with taurine supplementation on growth performance, hematological and biochemical status, and liver histology of totoaba (*Totoaba macdonaldi*). *Fish Physiology Biochemistry*, 41(1).

- Lourthu, S.S.M., Chandrasekar, J., Sannasi, M.A., Govintharaj, Y., Ramasamy, T., Jesu, A., Pitchaimuthu, M., Chellam, B., Ramasamy, H. (2014). Protective effect of chitin and chitosan enriched diets on immunity and disease resistance in *Cirrhina mrigala* against *Aphanomyces invadans*. *Fish & Shellfish Immunology*, 39, 378-385.
- Ma, T. S., & Zuazago, G. (1942). Micro-Kjeldahl method for organic nitrogen.
- MacArthur, J. I., & Fletcher, T. C. (1985). Phagocytosis in fish. *In Fish immunology* (pp. 29-46). Academic Press London.
- Magnadóttir, B. (2006). Innate immunity of fish (overview). *Fish and Shellfish Immunology*, 20, 137–151.
- Manning, M. J. (1998). 6 Immune defence systems. *Biology of farmed fish*, 1, 180.
- Manning, T.S., Gibson, G.R., (2004). Microbial-gut interactions in health and disease. Prebiotics. Best Practice and Research. *Clinical Gastroenterology* 18, 287–298.
- Merrifield D.L., Dimitroglou A., Foey A., Davies S.J, Baker R.T.M., Bogwald J. (2010). The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids. *Aquaculture*, 302, 1–18
- Meseguer, J., Esteban, M.A., Agulleiro, B., (1991). Stromal cells, macrophages and lymphoid cells in the head- kidney of sea bass (*Dicentrarchus labrax L.*). An ultrastructural study. *Archives of Histology and Cytology* 54, 299–309.
- Meseguer, J., López-Ruiz, A., Esteban, M.A., (1994). Cytochemical characterization of leucocytes from the seawater teleost, gilthead seabream (*Sparus aurata L.*). *Histochemistry*, 102, 37-44.
- Meseguer, J., Esteban, M.A., Mulero, V., (1996). Nonspecific cell-mediated cytotoxicity in the seawater teleosts (*Sparus aurata* and *Dicentrarchus labrax*): ultrastructural study of target cell death mechanisms. *The Anatomical Record*, 244, 499–505.
- Meseguer, J., Esteban, M.A., Rodríguez, A., (2002). Are thrombocytes and platelets true phagocytes? *Microscopy Research and Technique*, 57, 491–497.
- Minjarez-Osorio, C., González-Félix, M.L., Pérez-Velásquez, M., (2012). Biological performance of *Totoaba macdonaldi* in response to dietary protein level. *Acuaquaculture*, 362, 50-54.
- Montaño-Vargas, J., Shimada, A., Vásquez, C., & Viana, M.T., (2002). Methods of measuring feed digestibility in the green abalone (*Haliotis fulgens*). *Aquaculture* 213, 339–346.
- Mouriño, J. L. P., do Nascimento Vieira, F., Jatobá, A. B., da Silva, B. C., Jesus, G. F. A., Seiffert, W. Q., & Martins, M. L. (2012). Effect of dietary supplementation of inulin and

- W. cibaria on haemato-immunological parameters of hybrid surubim (*Pseudoplatystoma* sp). *Aquaculture Nutrition*, 18(1), 73–80.
- Olabuenaga, S., E., (200). Fish immune system. Gayana (Concepc.). *Concepción*, 64 (2) 205-215, 2000. Recuperado el 30 de abril del 2016 de: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S071765382000000200010&lng=es&nrm=iso
- Ortiz, L. T., Rebolé, a., Velasco, S., Rodríguez, M. L., Treviño, J., Tejedor, J. L., & Alzueta, C. (2013). Effects of inulin and fructooligosaccharides on growth performance, body chemical composition and intestinal microbiota of farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture Nutrition*, 19(4), 475–482.
- Ourth, D.D. (1980). Secretory IgM, lysozyme and lymphocytes in the skin mucus of the channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Dev. Comp. Immunol.* 4, 65-74.
- Peters Jr, T. (1995). *All about albumin: biochemistry, genetics, and medical applications*. Academic press 235p.
- Piñeros, V., Mónica, A., Barragan, R., Iang, S., Mocha, E., & Pedro, R. (2012). Inmunoestimulantes en teleosteos : Probióticos , β -glucanos y LPS. *Orinoquia*, 16, 46–62.
- Refstie, S., Bakke-McKellep, A. M., Penn, M. H., Sundby, A., Shearer, K. D., & Kroghdahl, Å. (2006). Capacity for digestive hydrolysis and amino acid absorption in Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed diets with soybean meal or inulin with or without addition of antibiotics. *Aquaculture*, 261(1), 392-406.
- Reza, A., Abdolmajid, H., Abbas, M., & Abdolmohammad, A. K. (2009). Effect of dietary prebiotic inulin on growth performance, intestinal microflora, body composition and hematological parameters of juvenile beluga, *Huso huso* (Linnaeus, 1758). *Journal of the World Aquaculture Society*, 40(6), 771–779.
- Ringø, E., Olsen, R. E., Gifstad, T., Dalmo, R. A., Amlund, H., Hemre, G. I., & Bakke, A. M. (2010). Prebiotics in aquaculture: A review. *Aquaculture Nutrition*, 16(2), 117–136.
- Roberfroid, M.B. (2005). Introducing inulin-type fructans. *The British Journal of Nutrition* 93 (1), 13–25.
- Román-Rodríguez, M. (1990). Alimentación de *Totoaba macdonaldi* (Gilbert) (Pisces: Sciaenidae) en la parte norte del alto golfo de California. *Ecológica*, 1 (2), 1-9
- Rønnestad, I., Thorsen, A., Nigél, R., (1999). Fish larval nutrition: a review of recent advances in the roles of amino acids. *Aquaculture*, 177 (1-4), 201-216.
- Rosales-Juárez, F., y Ramírez-González, E. (1987). Estado actual sobre el conocimiento de la *Totoaba* (*Cynoscion macdonaldi* Gilbert 1980). Secretaria de Pesca, México.
- Rossi, W., Tomasso, J. R., & Gatlin, D. M. (2015). Production performance and non-specific immunity of cage-raised red drum, *Sciaenops ocellatus*, fed soybean-based diets. *Aquaculture*, 443, 84–89.
- Roth, O., & Kurtz, J. (2009). Phagocytosis mediates specificity in the immune defence of

- an invertebrate, the woodlouse *Porcellio scaber* (Crustacea: Isopoda). *Developmental and Comparative Immunology*, 33(11), 1151–1155.
- Rueda-López, S., Lazo, J. P., Reyes, G. C., & Viana, M. T. (2011). Effect of dietary protein and energy levels on growth, survival and body composition of juvenile *Totoaba macdonaldi*. *Aquaculture*, 319(3-4), 385–390.
- Rueda-López, S., Lazo, J.P., Correa-Reyes, G., Viana, M.T., (2011). Effect of dietary protein and energy levels on growth, survival and body composition of juvenile *Totoaba macdonaldi*. *Aquaculture*, 319, 385-390.
- Sabapathy, U., Teo, L.H. (1993). A quantitative study of some digestive enzymes in the rabbitfish, *Siganus canaliculatus* and the sea bass, *Lates calcarifer*. *Journal of fish biology*, 42 (4), 595-602.
- Sanz, F. (2009). *La nutrición y alimentación en piscicultura*. Fundación Observatorio Español de Acuicultura. Madrid, 803 p.
- Secombes, C. J. (1996). The nonspecific immune system: cellular defenses. *The fish immune system: organism, pathogen and environment*, 63-103.
- SEMARNAT (2008). Un logro más... la recuperación de la Totoaba (*Totoaba macdonaldi*). Recuperado el 28 de mayo del 2015 de:
http://www.semarnat.gob.mx/archivosanteriores/temas/gestionambiental/vidasilvestre/Documents/Proyecto_Cultivo_Totoaba.pdf
- Smith, V.J., Fernandes, J.M., Jones, S.J., Kemp, G.D., Tatner, M.F. (2000). Antibacterial proteins in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Fish and Shellfish Immunology* 10, 243–260.
- Steel, R.G.D., Torrie, J. H. (1988). Bioestadística: principios y procedimientos. Segunda edición U.S.A. McGraw-Hill p.p. 226-229.
- Song, S. K., Beck, B. R., Kim, D., Park, J., Kim, J., Kim, H. D., & Ringø, E. (2014). Prebiotics as immunostimulants in aquaculture: a review. *Fish & shellfish immunology*, 40(1), 40-48.
- Tacon, A.G.J. (1989). Apoyo a las actividades regionales de acuicultura en América Latina y el Caribe”, *aguila ii* (gcp/rla/102/ita). Brasil. Tomado de FAO, documento del campo no. 4. Recuperado el 3 de junio del 2015 de:
<http://www.fao.org/docrep/field/003/ab492s/ab492s00.htm>
- Ta'ati, R., Soltani, M., Bahmani, M., & Zamini, A. A. (2011). Effects of the prebiotics Immunoster and Immunowall on growth performance of juvenile beluga (*Huso huso*). *Journal of Applied Ichthyology*, 27(2), 796–798.
- Tort, L., Balasch, J., Mackenzie, S. (2003). Fish immune system. A crossroads between innate and adaptive responses. *Inmunología*, 22, 277–286.

- True C.D., 2012. *Desarrollo de la biotecnia en cultivo de Totoaba macdonaldi*. Tesis Doctorado en Ciencias en Oceanografía Costera. Universidad Autónoma de Baja California, 121 p.
- Tuohy, K.M., Rouzaud, G.C.M., Brück, W.M., Gibson, G.R. (2005). Modulation of the human gut microflora towards improved health using prebiotics assessment of efficacy. *Current Pharmaceutical Design*, 11, 75–90.
- Ta'ati, R., Soltani, M., Bahmani, M., & Zamini, A. A. (2011). Effects of the prebiotics Immunoster and Immunowall on growth performance of juvenile beluga (*Huso huso*). *Journal of Applied Ichthyology*, 27(2), 796–798.
- Valdez-Muñoz, C., Aragón-Noriega, E. A., Ortega-Rubio, A., Salinas-Zavala, C. A., Arreola-Lizárraga, J. A., Hernández-Vázquez, S., & Morales, L. F. B. (2010). Distribución y abundancia de juveniles de *Totoaba macdonaldi* y la salinidad del hábitat de crianza. *Interciencia*, 35 (2), 136-139.
- Villarreal-Rodarte, G.E. (2011). *Efecto de la concentración de hufas n-3 en la dieta sobre el crecimiento, supervivencia, eficiencia alimenticia e índice de condición en juveniles de Totoaba macdonaldi*. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, 62 p.
- Xu, B., Wang, Y., Li, J., & Lin, Q. (2009). Effect of prebiotic xylooligosaccharides on growth performances and digestive enzyme activities of allogynogenetic crucian carp (*Carassius auratus gibelio*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 35(3), 351–357.
- Zambonino-Infante, J. L., & Cahu, C. L. (2001). Ontogeny of the gastrointestinal tract of marine fish larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicology & Pharmacology: CBP*, 130(4), 477–487. [http://doi.org/10.1016/S1532-0456\(01\)00274-5](http://doi.org/10.1016/S1532-0456(01)00274-5)
- Zhou, Q.-C., Buentello, J. A., & Gatlin, D. M. (2010). Effects of dietary prebiotics on growth performance, immune response and intestinal morphology of red drum (*Sciaenops ocellatus*). *Aquaculture*, 309(1-4), 253–257. <http://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.09.003>