

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



**Maestría en Ciencias
en Acuicultura**

**Efecto de las macroalgas como ingrediente funcional en el
desempeño biológico, capacidad digestiva y respuesta inmune
de la totoaba, *Totoaba macdonaldi***

Tesis

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

Presenta:

Lorena Andrea Garnica Gómez

Ensenada, Baja California, México

2022

Tesis defendida por
Lorena Andrea Garnica Gómez
y aprobada por el siguiente Comité

Dr. Juan Pablo Lazo Corvera
Director de tesis

Dr. Benjamín Barón Sevilla

Dr. Oscar Sosa Nishizaki

Dr. José Antonio Mata Sotres



Dr. Roberto Cruz Flores
Coordinador del Posgrado en Acuicultura

Dr. Pedro Negrete Regagnon
Director de Estudios de Posgrado

Lorena Andrea Garnica Gómez © 2022

Queda prohibida la reproducción parcial o total de esta obra sin el permiso formal y explícito del autor y director de la tesis.

Resumen de la tesis que presenta **Lorena Andrea Garnica Gómez** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestra en Ciencias en Acuicultura.

Efecto de las macroalgas como ingrediente funcional en el desempeño biológico, capacidad digestiva y respuesta inmune de la totoaba, *Totoaba macdonaldi*

Resumen aprobado por:

Dr. Juan Pablo Lazo Corvera
Director de tesis

Actualmente la búsqueda de harinas vegetales, como la harina de soya, para reemplazar la harina de pescado en la dieta de peces carnívoros es necesaria para reducir costos de producción y minimizar la sobreexplotación de recursos pesqueros. Sin embargo, se sabe que un alto contenido de harina de soya para alimentar peces carnívoros bajo cultivo puede causar una inflamación subaguda no contagiosa del intestino, denominada enteritis. La enteritis es provocada por el contenido de factores antinutricionales de la harina, lo cual resulta en cambios fisiológicos, inmunológicos y problemas en la absorción de nutrientes, con una reducción del crecimiento de los peces. Actualmente se investigan nuevos ingredientes funcionales como los prebióticos que pueden prevenir los daños causados por la enteritis en peces carnívoros. Las macroalgas contienen polisacáridos que poseen las características de un prebiótico (i.e., benéficos para la microbiota intestinal), pero sus efectos suelen ser especie-específicos. El objetivo de este trabajo fue evaluar los efectos de las macroalgas, adicionadas a dietas con harinas vegetales sobre el crecimiento, eficiencia alimenticia, digestibilidad de las dietas, actividad enzimática (tripsina, lipasa y amilasa), respuestas inmunológicas (estallido respiratorio y conteo de leucocitos), cambios histológicos del intestino y expresión de genes relacionados con la respuesta inmune (*il8*, *igm*, *aqp8* y *hsp70*) en *Totoaba macdonaldi*, un pez endémico del Golfo de Baja California en peligro de extinción de importancia para la acuicultura en México. Para esto se elaboraron cuatro dietas isoproteicas (48%) e isolipídicas (13%). Dos consistieron en dietas comerciales formuladas con harina de macroalga local e ingredientes de origen vegetales (ALG1 y ALG2) y las otras dos se formularon con 26% de harina de soya (DPB0 y DPB3), pero una de ellas con 3% de prebiótico de macroalgas Mega Smart Kelp (DPB3). Al final del bioensayo los peces alimentados con las dietas DPB0 y DPB3 tuvieron un crecimiento significativamente mayor y una mejor eficiencia alimenticia comparados con los que fueron alimentados con las dietas comerciales. Asimismo, se observó una mayor digestibilidad de las dietas DPB0 y DPB3, una mejor condición del intestino distal y mayor expresión de genes relacionados con respuestas inmunes (i.e., inflamación) y fisiológicas (i.e., estrés celular). Estos resultados revelaron que las dietas ALG1 y ALG2 resultaron en un menor desempeño productivo de los juveniles y afectaron negativamente la salud intestinal de las totoabas, bajo experimentación, inclusive afectaron más que las dietas DPB0 y DPB3 que incluían harina de soya. Sin embargo, se requiere mayor investigación para dejar en claro si el mayor contenido de saponinas encontrado en las dietas comerciales u otros compuestos afectaron negativamente al intestino, las enzimas digestivas y la digestibilidad.

Palabras clave: *Totoaba macdonaldi*, enteritis, macroalga, prebióticos

Abstract of the thesis presented by **Lorena Andrea Garnica Gómez** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Aquaculture

Effect of macroalgae in soybean meal diets on the biological performance of totoaba, *Totoaba macdonaldi*

Abstract approved by:

Dr. Juan Pablo Lazo Corvera
Thesis director

Research looking at alternative vegetable ingredients, such as soybean meal, to replace fishmeal in the diet of carnivorous fish is necessary to reduce aquaculture production costs and minimize overexploitation of finite fishery resources. However, a high content of soybean meal in the diet for carnivorous fish has been shown to cause enteritis in certain species. Enteritis is the non-contagious subacute inflammation of the intestine, caused by the content of antinutritional factors, which results in physiological changes, immunological responses, and problems in the absorption of nutrients, with a reduction in the growth and health condition of the fish. Recent research evaluating functional ingredients, such as prebiotics, have been shown to reduce enteritis in carnivorous fish. Nonetheless, these positive effects of prebiotics are usually species-specific. Macroalgae contain polysaccharides that have the characteristics of a prebiotic (i.e., promoting the growth of beneficial intestinal microbiota). Thus, the objective of this study was to evaluate the effects of macroalgae added to diets formulated with vegetable ingredients on the growth, feed efficiency, diet digestibility, enzymatic activity (i.e., trypsin, lipase, and amylase), immune responses (i.e., respiratory burst and leukocyte count), histological changes in the intestine and the expression of genes related to the immune response (*il8*, *igm*, *aqp8* and *hsp70*) in *Totoaba macdonaldi*, an endangered endemic fish from the Gulf of Baja California of great relevance to Mexican marine aquaculture. Four isoproteic (48%) and isolipidic (13%) diets were formulated to meet totoaba nutritional requirements. Two consisted of commercial diets formulated with local macroalgae meal and plant-based ingredients (ALG1 and ALG2) and the other two were formulated with 26% soybean meal (DPB0 and DPB3), but the latter including 3% Mega Smart Kelp, a macroalgae prebiotic (DPB3). This level of soybean inclusion has been shown to cause enteritis in totoaba. At the end of the bioassay the fish fed the DPB0 and DPB3 diets had significantly higher growth and better dietary protein efficiency compared to those fed the commercial diets. Likewise, a higher digestibility of the DPB0 and DPB3 diets, better condition of the distal intestine and higher expression of genes related to immune (i.e., inflammation) and physiological (i.e., cellular stress) responses were observed. These results revealed that ALG1 and ALG2 diets resulted in a lower productive performance of the juveniles and negatively affected the intestinal health of the totoabas, even more than the DPB0 and DPB3 diets that included soybean meal. However, further research is required to clarify whether the higher saponin content found in the commercial diets or other dietary compounds negatively affected gut health, protein utilization, and digestibility.

Keywords: *Totoaba macdonaldi*, enteritis, macroalgae, soybean, prebiotic

Dedicatoria

¡A Luis David por todo su amor, apoyo y atreverse a acompañarme en esta travesía! Te amo

A las totoabas por enseñarme a enfrentar las situaciones adversas y seguir adelante

A mis padres y hermano por su apoyo incondicional a mis locuras, gracias.

Agradecimientos

Al Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada y al Departamento de Acuicultura por haberme permitido realizar mis estudios de maestría, brindarme todas las facilidades para realizar este proyecto y hacerme sentir como en casa. Especialmente al personal por su cálida atención y servicio.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la concesión de una beca para la matrícula 19214498 durante mi estancia de posgrado.

Al Dr. Lazo por aceptarme en su grupo de trabajo, nunca decirme que no a ninguna de mis ideas, ponerme los pies sobre la tierra y animarme a cada paso, gracias por sus consejos y ser una gran inspiración.

Al Dr. Barón por su incansable entusiasmo, paciencia, por responder las mil preguntas que le hice, por compartir su experiencia, conocimientos y siempre buscar una solución, lo admiro mucho.

Al Dr. Mata por su paciencia, gran colaboración a este proyecto, abrirme las puertas al laboratorio y enseñarme las técnicas moleculares adecuadas para este proyecto.

Al Dr. Sosa por sus estupendas recomendaciones, comentarios y buenos ánimos que fortalecieron este trabajo.

A Algamar, Acuario Oceánico y Juan Carlos Vivanco por su interés en generar nuevo conocimiento con los recursos nacionales, este país requiere de empresarios como ustedes que colaboren con la academia para mejorar los conocimientos, gracias por sus donaciones y colaboración a este proyecto.

Al grupo de investigadores que conforman el departamento de acuicultura, en particular me gustaría dar las gracias a la Dra. Mónica Hernández por su apoyo en todo lo que respecta a los análisis sanguíneos, facilitarme equipo de laboratorio y sus enseñanzas en clases, es una excelente académica

A los técnicos del departamento de acuicultura y externos que siempre estuvieron dispuestos a ayudarme en cualquiera de los tropiezos a los que me enfrenté, Luis Murillo, Jesús Mariscal, Francisco Marinou, Aurora Tinajero y Samantha de UABC.

A los guardias que estuvieron al pendiente de las totoabas, pero especialmente agradecida con Don Mario por su especial atención y ayuda con el sistema de circulación.

Al Dr. Jorge Cáceres por brindarme las facilidades para realizar las laminillas histológicas en su laboratorio y a la M. en C. Yanet Guerrero Rentería, técnico del laboratorio de Biología y Patología de organismos

acuáticos del departamento de acuicultura, por el entrenamiento técnico en la preparación de muestras de intestino de totoaba para el procesado histológico, estandarización de protocolos de tinción, así como la elaboración de laminillas.

En particular me gustaría dar las gracias al M. en C. Abelardo Campos técnico del laboratorio de Nutrición de organismos acuáticos del departamento de acuicultura, por el entrenamiento técnico en el uso de equipos de laboratorio de análisis químico, la estandarización de protocolos de actividad enzimática, análisis sanguíneos, por su dedicación y disposición durante todo el proyecto, muchas gracias por todas las enseñanzas desde calibrar el potenciómetro hasta cuantificar saponinas, por perseverar conmigo, darme ánimos y escucharme.

A mis compañeros de generación por el apoyo y hacer este proceso más divertido, Juan, Erika, Bri, al laboratorio hermano de ecofisiología Marco y Eugenio.

Al Dr. Madrid, Dr. Fuentes y M. en C. Armuelles por compartir sus experiencias previas, enseñarme técnicas, revisar algunos de los resultados y sus recomendaciones al proyecto.

A Mel y José por todas esas tardes de juegos, pero sobre todo por su apoyo durante el proyecto y todos los consejos. Gracias José por salvar el ojo de mi totoaba y estar al pendiente de ellas. Un especial gracias a Melanie Estrada por ayudarme en mi muestreo, acompañarme a alimentar, por las risas, enojos, llantos, paseos, pero sobre todo por estar en los malos tiempos y escucharme en todo este proceso, te amo amiga.

Quiero agradecer a mi familia que siempre me ha apoyado en mis locuras a pesar de la distancia, los amo, ¡gracias! sin ustedes no estaría aquí.

Finalmente, me gustaría agradecer a Luis David Hernández gracias por acompañarme en esta aventura, por tu apoyo incondicional, transportar, pesar y amar totoabas tanto como yo, siempre mostrar un gran interés en el proyecto y alentarme día con día, todo fue mejor a tu lado.

Tabla de contenido

Resumen en español	iii
Resumen en inglés	iv
Dedicatoria	v
Agradecimientos	vi
Lista de figuras	xi
Lista de tablas	xiii
Capítulo 1 . Introducción	1
1.1. Antecedentes.....	2
1.1.1. La harina de pescado y sus alternativas en dietas para peces	2
1.1.2. Factores antinutricionales en ingredientes vegetales.....	4
1.1.3. Sistema inmunológico en peces	9
1.1.3.1. Generalidades del sistema inmunológico de los peces.....	9
1.1.3.2. Proceso de inflamación.....	11
1.1.3.3. El tejido linfoide asociado al intestino y su función como barrera inmunológica	12
1.1.4. Enteritis en peces marinos	14
1.1.5. Evaluación de la enteritis en peces	16
1.1.5.1. Análisis sanguíneos.....	16
1.1.5.2. Análisis histológicos.....	17
1.1.5.3. Actividad de enzimas digestivas	17
1.1.5.4. Técnicas moleculares.....	18
1.1.6. Macroalgas como ingrediente funcional.....	20
1.1.6.1. Prebióticos a base de macroalgas	20
1.1.7. <i>Totoaba macdonaldi</i>	22
1.2. Justificación.....	23
1.3. Hipótesis	24
1.4. Objetivos	24
1.4.1. Objetivo general	24

1.4.2. Objetivos específicos	25
Capítulo 2 . Metodología	26
2.1. Formulación y elaboración de las dietas	26
2.2. Condiciones del bioensayo y cultivo	28
2.3. Muestreo	28
2.4. Análisis de composición proximal.....	30
2.4.1. Determinación de saponinas en las dietas	30
2.5. Desempeño del crecimiento y eficiencia alimenticia	31
2.6. Determinación del coeficiente de digestibilidad aparente	32
2.7. Análisis histológico.....	33
2.8. Actividad enzimática	34
2.8.1. Extracto y ensayos enzimáticos.....	34
2.8.1.1. <i>Actividad de la tripsina</i>	35
2.8.1.2. <i>Actividad de la lipasa</i>	35
2.8.1.3. <i>Actividad de la amilasa</i>	35
2.9. Análisis inmunológicos.....	36
2.9.1. Recuento de leucocitos	36
2.9.2. Actividad del estallido respiratorio (AER).....	36
2.10. Análisis de expresión de genes	36
2.11. Análisis estadísticos.....	38
Capítulo 3 . Resultados	39
3.1. Desempeño del crecimiento y eficiencia alimenticia	39
3.2. Composición proximal del músculo.....	41
3.3. Determinación del coeficiente de digestibilidad aparente	41
3.4. Actividad enzimática en el intestino.....	42
3.5. Análisis inmunológicos.....	43
3.6. Análisis histológicos	44
3.7. Análisis de expresión de genes	48

Capítulo 4 . Discusión..... 49

4.1. Desempeño del crecimiento y eficiencia alimenticia49

4.2. Digestibilidad de las dietas y capacidad digestiva53

4.3. Respuestas asociadas a la salud intestinal.....57

Capítulo 5 . Conclusiones66

Capítulo 6 . Recomendaciones68

Literatura citada69

Anexo.....84

Lista de figuras

- Figura 1.** Componentes principales del sistema inmunológico de los peces. La imagen muestra los principales componentes del sistema inmunológico el cual se divide en innato (parte superior, morado) y el sistema específico (parte inferior, rosa), divididos a su vez en tres categorías, barreras físicas, componentes humorales y celulares. Imagen generada en app.diagrams.net <https://app.diagrams.net/>, (Murphy y Weaver, 2016; Press y Evensen, 1999)11
- Figura 2 .** Esquema general de las estructuras histológicas del intestino en peces. La mucosa es la primera capa de la barrera intestinal y consiste en una hilera de células epiteliales, los enterocitos las cuales se caracterizan por tener microvellosidades en la zona apical o borde de cepillo, y las células mucosas encargadas de secretar mucus. Además de estas células especializadas, la lámina propia que está constituida por tejido conectivo vascularizado, con nervios y leucocitos, conforman la mucosa en forma de pliegues. Posteriormente se encuentra la mucosa sub-epitelial que es una capa adicional de tejido conectivo, seguida de capas de músculo suave o estriado, llamado muscular externa, túnica muscular o estrato compacto y la última capa de la barrera se conoce como serosa conformada de tejido conectivo que contiene vasos sanguíneos. El GALT se encuentra difuso entre el estrato compacto y la lámina propia (Wilson 2010). Imagen generada en Biorender.com13
- Figura 3.** Polisacáridos de *Macrocystis pyrifera* y sus posibles efectos prebióticos. La laminarina, fucoidano y manitol son algunos de los compuestos con características prebióticas que pueden beneficiar al ambiente intestinal de los peces y la disponibilidad de los nutrientes. Los efectos que pueden tener sobre el organismo pueden ser indirectos al ser sustrato de la microbiota y propiciar la proliferación de sus poblaciones, que a su vez los protegen de bacterias patógenas por competición de nicho o recursos (a). Otro efecto indirecto es la generación de metabolitos bacterianos a partir de los prebióticos, como los ácidos grasos de cadena corta, que tienen la capacidad de atravesar la barrera intestinal y viajar a través del torrente sanguíneo para su utilización (b). De forma directa los prebióticos pueden tener efectos en las células epiteliales (c) o estimular la actividad de leucocitos y sus respuestas inmunológicas (d). Imagen realizada en BioRender.com22
- Figura 4.** *Totoaba macdonaldi*23
- Figura 5.** Estructuras histológicas del intestino distal de *Totoaba macdonaldi*. A. Se muestra la longitud de un pliegue mucoso en negro (Long PM), las flechas indican un pliegue mucoso en verde y en rojo un par de pliegues fusionados en la zona submucosa (%PM/MS-E), en el círculo rojo se señala una célula mucosa. B. la imagen señala las medidas de la mucosa subepitelial (MS-E), lamina propia (LP) y la altura de los enterocitos (AE).....34
- Figura 6.** Incremento del peso de juveniles de *Totoaba macdonaldi* alimentados con dietas que incluyen macroalgas con relación al tiempo. La imagen muestra el peso promedio registrado en las biometrías durante 56 días de los 4 tratamientos evaluados; ALG1 y ALG2 = dietas comerciales con harina de macroalgas y plantas, DPB0 = dieta sin prebiótico y soya, DPB3 = dieta con prebiótico y soya.40
- Figura 7.** Coeficiente de digestibilidad aparente de las diferentes dietas (CDA%). Las letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos. Mientras que las barras indican la media \pm D.E. DPB0 = dieta con soya, DPB3 = dieta con soya y prebiótico, ALG1 y ALG2= dietas comerciales con macroalgas.42

- Figura 8.** Actividad enzimática total (U intestino¹) de la tripsina (A), lipasa (B) y amilasa (C) en el intestino de juveniles de *Totoaba macdonaldi* alimentados con las dietas experimentales después de 56 días. Las barras representan la media \pm D.E. DPB0 = dieta con soya, DPB3 = dieta con soya y prebiótico, ALG1 y ALG2 = dietas comerciales con macroalgas43
- Figura 9.** Células mucosas en el intestino distal de *Totoaba macdonaldi*. Las figuras A-C fueron teñidas con hematoxilina-eosina, la figura A muestra pliegues mucosos de totoaba alimentada con dieta DPB0, B con DPB3 mientras que la figura C con dieta ALG1, se señalan los precipitados observados en las totoabas de los tratamientos que incluyen macroalgas en las dietas. Las figuras D y E se tiñeron hematoxilina-eosina y azul alcian pH 2.5, la figura D muestra células mucosas del tratamiento DPB0, la figura E del tratamiento ALG1 las cuales se observan en diferente coloración.46
- Figura 10.** Imágenes histológicas del intestino distal de *Totoaba macdonaldi*. En las imágenes se muestran algunos de los cambios morfológicos en el intestino, A, E, I pertenecen al tratamiento DPB0. B, F, J=DPB3; C, G, K=ALG1; D, H, L=ALG2. En la primera fila se pueden observar la longitud de los pliegues mucosos y la abundancia de estos. En las imágenes E-H se puede observar el grosor de la lámina propia, así como infiltración de granulocitos eosinófilos teñidos de rojo. Las imágenes I-L teñidas con azul alcian muestran la cantidad de células mucosas presentes en los pliegues intestinales.....47
- Figura 11.** Expresión de genes de *il8* (A), *igm* (B), *hsp70* (c) y *aqp8* (d) en el intestino distal de juveniles de *Totoaba macdonaldi* alimentados con las dietas experimentales después de 56 días. Las barras representan la media \pm DE. las letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos a>b>c en el análisis post hoc de Tukey, el valor de P del ANOVA de una vía con un nivel de significancia $\alpha=0.05$. DPB0 = dieta con soya, DPB3 = dieta con soya y prebiótico, ALG1 y ALG2 = dietas comerciales con macroalgas.48

Lista de tablas

Tabla 1. Formulación de las dietas experimentales para juveniles de <i>Totoaba macdonaldi</i> . La formulación se presenta como g kg ⁻¹ de peso seco en las dietas DPB0 y DPB3. Las dietas comerciales ALG1 y ALG2 son fórmulas protegidas por la empresa.	27
Tabla 2. Secuencia de pares de oligonucleótidos utilizados en la reacción de qPCR, se muestra el tamaño del amplicón en pares de bases (pb), eficiencias de reacción (E) y coeficientes de determinación de Pearson (R ²).....	37
Tabla 3. Desempeño biológico y eficiencia alimenticia de juveniles de <i>Totoaba macdonaldi</i> alimentados con las dietas experimentales después de 56 días.	40
Tabla 4. Composición proximal (% en peso húmedo) del músculo de juveniles de <i>Totoaba macdonaldi</i> alimentados con las dietas experimentales después de 56 días.	41
Tabla 5. Análisis inmunológicos en juveniles de <i>Totoaba macdonaldi</i> alimentados con las dietas experimentales después de 56 días. Los valores representan la media ± D.E. Las letras en superíndice diferente indican diferencias significativas entre tratamientos.	44
Tabla 6. Análisis histológico de juveniles de <i>Totoaba. macdonaldi</i> alimentados con las dietas experimentales después de 56 días. Sistema de puntuación semicuantitativo y evaluación de medidas morfológicas.....	45
Tabla 7. Sistema de puntuación semicuantitativo descrito por Urán, (2008). Se evaluaron la cantidad de vacuolas supranucleares contenidas en los enterocitos (VSN), la cantidad de células mucosas coloreadas de azul en los pliegues mucosos (CM), el grosor de la lámina propia (LP) y la infiltración de granulocitos eosinófilos en los pliegues mucosos (GE). Cada parámetro se calificó en una escala del 1 al 5, en la que 5 es la condición más severa de enteritis.....	84

Capítulo 1 . Introducción

La acuicultura ha sido la industria de más rápido crecimiento en la producción de alimento durante los últimos años, sus productos son de alta calidad nutricional para la población humana y por eso su importancia. Actualmente, de todos los productos acuícolas para consumo humano, más de la mitad provienen de la acuicultura y se requiere que la producción siga creciendo, pero de una manera sostenible en particular en especies carnívoras de alto valor comercial (FAO, 2020).

Una de las limitantes en el cultivo de peces marinos es la alimentación. Por lo general las especies bajo cultivo tienen hábitos carnívoros y sus requerimientos nutricionales son típicamente de un alto contenido de proteína en la dieta (i.e., 40 hasta 55%), con un perfil específico de aminoácidos y ácidos grasos esenciales. Principalmente los ácidos grasos poliinsaturados de cadena corta (PUFA) y los ácidos grasos altamente insaturados de cadena larga (LC-PUFA, por sus siglas en inglés) son necesarios para procesos fisiológicos esenciales como generar energía metabólica para el crecimiento, reproducción y natación, además son constituyentes de los fosfolípidos que le aportan estructura y fluidez a las membranas celulares (NRC, 1993; Sargent *et al.*, 2002; Wilson, 2002; Oliva-Teles *et al.*, 2015). Para satisfacer los requerimientos nutricionales de los peces marinos, regularmente se incluyen harina y aceite de pescado (HP y AP, respectivamente) como ingredientes principales de sus dietas, ya que aportan los nutrientes necesarios, como aminoácidos, ácidos grasos, vitaminas, minerales y otros factores de crecimiento, además, tienen una alta digestibilidad y palatabilidad para los peces (NRC, 1993; Lovell, 2003; Bureau, 2012).

Debido a la alta demanda de la HP y AP sus precios siguen en aumento, elevando los costos de producción de la acuicultura, ya que la alimentación representan hasta un 60% del costo de una unidad de cultivo (Lovell, 2003). Además, la producción y uso de la HP y AP ha generado un impacto ambiental negativo al crear una alta tasa de extracción y demanda, que excede la tasa de recuperación de los recursos pesqueros, tornando a la acuicultura en un sector menos sostenible al ser uno de los mayores consumidores de estos insumos (Pigott y Tucker, 2002; FAO, 2020). Una de las respuestas a este problema mundial ha sido reemplazar la HP y el AP por ingredientes alternativos que cumplan con los requerimientos nutricionales de las especies cultivadas (Hardy, 2010; Oliva-Teles *et al.*, 2015).

Por su precio económico y disponibilidad, las harinas producidas a partir de plantas son una de las alternativas a la HP más estudiadas. Desafortunadamente se ha detectado que algunas harinas vegetales, principalmente la soya, pueden producir enteritis o un mal desempeño del crecimiento en algunos peces, con el uso prolongado de dietas con elevado contenido de estos ingredientes (i.e., >22%) (Gu *et al.*, 2016; Fuentes-Quesada *et al.*, 2018). Estas alteraciones se deben al contenido de factores antinutricionales que producen las plantas naturalmente, para defenderse de los herbívoros y que afectan la salud de los peces bajo cultivo (Rumsey *et al.*, 1994; Bakke-McKellep *et al.*, 2000; Krogdahl *et al.*, 2003; Bonaldo *et al.*, 2008; Oliva-Teles *et al.*, 2015; Gu *et al.*, 2016; Fuentes-Quesada *et al.*, 2018).

No obstante, en los últimos años se ha evaluado el uso de ingredientes funcionales que mejoran la salud intestinal y reducen el efecto negativo de los factores antinutricionales y de ciertos patógenos o toxinas, y se han considerado como una solución a la enteritis generada por la soya (Buentello *et al.*, 2010; Song *et al.*, 2014; Fuentes-Quesada *et al.*, 2020). Así mismo, en los últimos años el uso y conocimiento de los beneficios de las macroalgas en las dietas ha aumentado y se sabe que algunos de sus componentes, como los alginatos, fucooidanos, laminarinas y glucanos, tienen efectos prebióticos, es decir son ingredientes no digeribles, que pueden modular la microbiota y además son benéficos para la salud de los peces estimulando el sistema inmune y que podrían aliviar la enteritis (Iwashita *et al.*, 2015; Miranda *et al.*, 2017; Sardari y Nordberg Karlsson, 2018). La abundancia y diversidad de las macroalgas y sus compuestos pueden ser aprovechados como ingredientes funcionales para incrementar el uso de harinas vegetales en las dietas de peces carnívoros (Dantagnan *et al.*, 2009; Sardari y Nordberg, 2018 Gupta *et al.*, 2019). Por lo que es de gran interés conocer si las macroalgas que habitan en las localidades de Baja California, como *Macrocystis pyrifera*, pueden ser un ingrediente funcional para reducir el efecto de la enteritis causada por la soya y disminuir el uso de la harina de pescado en las dietas de *Totoaba macdonaldi*, una especie marina endémica y con alto valor comercial en México.

1.1. Antecedentes

1.1.1. La harina de pescado y sus alternativas en las dietas para peces

La harina de pescado (HP) se produce a partir de la pesca de peces pelágicos menores como el arenque, *Opisthonema* spp, anchovetas, *Anchoa* spp, y sardinas, *Sardinella* spp. En promedio se requieren 4.5 kg

de peces para producir 1 kg de HP y 21.5 kg para 1 kg de aceite de pescado (Boyd, 2015; Rajan, 2018; www.fishbase.se). La HP es utilizada como un ingrediente en el alimento para animales acuáticos bajo cultivo por su alta concentración de proteína, su excelente perfil de aminoácidos, su alta digestibilidad, buena palatabilidad y por ser una fuente rica de calcio, fósforo, taurina, minerales y vitaminas. Tanto así, que el 63% de la producción de HP es consumida por el sector acuícola (Boyd, 2015; Oliva-Teles *et al.*, 2015). Si la HP permanece como una de las principales fuentes de proteína en las dietas para organismos acuáticos cultivados, la demanda de este ingrediente que excede la tasa de recuperación de las poblaciones de especies naturales para su producción la haría cada vez menos sustentable. Así que disminuir la dependencia de este ingrediente es una prioridad para un desarrollo sostenible de la acuicultura (Jackson y Aldon, 2013; Boyd, 2014; IFFO, 2017; Seafish.org, s/f).

La cantidad de HP utilizada en las dietas depende de los hábitos alimenticios de los peces que se cultivan y por lo general se requieren de un 25% a un 55% de la dieta (Lovell, 2003). Se han logrado muchos avances en el reemplazo de la harina de pescado en el alimento para el salmón del Atlántico, *Salmo salar* (Krogdahl *et al.*, 2003), la trucha arcoíris, *Oncorhynchus mykiss* (Rumsey *et al.*, 1994; Vazirzadeh *et al.*, 2020) la lubina Europea, *Dicentrarchus labrax* (Torrecillas *et al.*, 2021), el jurel, *Seriola lalandi* (Bowyer *et al.*, 2013), la corvina, *Cynoscion parvipinnis* (Minjarez-Osorio *et al.*, 2016), *T. macdonaldi* (Fuentes-Quesada *et al.*, 2019) entre otras especies carnívoras, disminuyendo la inclusión de HP a solo un 25% dependiendo de la especie. Esto se ha logrado en parte gracias a que hay un mejor conocimiento de los requerimientos nutricionales de las especies cultivables. Sin embargo, el uso de algunos sustitutos disminuye la tasa de crecimiento en los peces, por lo que no se ha logrado la sustitución total de la HP en las dietas para peces marinos (Boyd, 2015).

Por un lado, algunas de las alternativas a la HP que se han evaluado en diferentes especies de peces han incluido subproductos de animales como harina de pluma, de sangre, cabeza de camarón y de retazos de carne, por mencionar algunas. Estos ingredientes tienen un alto contenido de proteína y precio accesible pero su composición es variable y tienen deficiencias de aminoácidos esenciales (Hardy, 2010; Dam *et al.*, 2019). Por otro lado, las principales plantas utilizadas como ingredientes sustitutos a la HP son el maíz, trigo, linaza, girasol, canola, algodón y soya (Minjarez-Osorio *et al.*, 2016; Hua *et al.*, 2019; Villanueva-Gutiérrez *et al.*, 2020). La harina de soya (HS) es uno de los ingredientes más evaluados y usados en la industria acuícola, pues además de su precio económico tiene la ventaja de ser uno de los cereales más cultivados a nivel mundial (Dersjant-li, 2002). Tan sólo en 2019 se registró una producción de

aproximadamente 333 millones de toneladas de HS (FAO, 2021). De hecho existen más de 2,500 variedades de soya, por lo que su disponibilidad es consistente durante todo el año (Dersjant-li, 2002; Hardy, 2010; Oliva-Teles *et al.*, 2015). Entre los ingredientes vegetales, la harina de soya tiene un alto contenido proteico y su perfil de aminoácidos es constante, a diferencia de otras harinas provenientes de plantas que pueden cambiar su composición nutricional según la temporada de cosecha (Sanz, 2009). Existen varias características que han limitado el uso de la harina de soya como sustituto de la HP en dietas para peces marinos; por ejemplo es deficiente en lisina, metionina y treonina, aminoácidos esenciales para algunas especies, es poco palatable ya que suele tener un sabor amargo y el mayor problema es el contenido de factores antinutricionales (FAN) (Lovell, 1988; Hendricks, 2003; Fuentes-Quesada *et al.*, 2019). De manera similar a la soya, el uso de harinas a base de plantas, se ha limitado por el bajo contenido de proteína, un perfil inadecuado de aminoácidos esenciales y los FAN que contienen (Hardy, 2010; Oliva-Teles *et al.*, 2015).

La búsqueda de nuevos ingredientes a partir de fuentes más sustentables como algas (micro y macroalgas), insectos, bacterias y levaduras, sigue en auge. Lo desafiante es usar ingredientes alternativos que no comprometan el crecimiento y la salud de los peces bajo cultivo, así como considerar el precio, disponibilidad, calidad nutricional, contenido de proteína y aminoácidos esenciales, digestibilidad, factores antinutricionales y palatabilidad (NRC, 1993; Hardy, 2010; Boyd, 2015; Oliva-Teles *et al.*, 2015).

1.1.2. Factores antinutricionales en ingredientes vegetales

Los FAN son compuestos naturales sintetizados por las plantas como metabolitos secundarios con fines de defensa contra depredadores, patógenos o condiciones adversas (Hendricks, 2003; Akande *et al.*, 2010). Son altamente abundantes, diversos y por lo general tienen efectos negativos en la salud de los animales que los consumen, ya que pueden afectar negativamente respuestas bioquímicas, fisiológicas e inmunológicas (Francis *et al.*, 2001; Akande *et al.*, 2010; Roberts, 2012). El avance en el conocimiento con relación a las características de los FAN y el contenido de estos en las plantas ha ayudado al mejoramiento de su uso en las dietas acuáticas. Algunos de los FANs se enlistan a continuación:

- Ácido fítico; es una reserva de fósforo y sales (llamadas fitatos) en las plantas como la soya, algodón y canola, que tiene la propiedad de unirse a proteínas y minerales disminuyendo su biodisponibilidad en los peces. También es un agente quelante con iones metálicos como calcio,

magnesio y zinc, al unirse a estos iones se forman complejos insolubles. Como consecuencia de su unión a proteínas, el ácido fítico puede inhibir la acción de enzimas proteolíticas importantes durante la digestión o formar complejos insolubles a partir de residuos de aminoácidos (NRC, 1993; Hendricks, 2003; Mohan *et al.*, 2015). Los efectos negativos del ácido fítico se pueden neutralizar con la adición de fitasas. Las fitasas son las enzimas que se encargan de liberar el fósforo del ácido fítico. Estas enzimas están ausentes en el sistema digestivo de los organismos monogástricos, por lo que su adición en las dietas de peces mejora la disponibilidad de proteínas y fósforo (Dong *et al.*, 2000; Francis *et al.*, 2001).

- Antivitaminas: son compuestos capaces de impedir la acción de las vitaminas por ser estructuralmente análogas. Son termolábiles por lo que un correcto tratamiento de calentamiento durante el procesamiento de las harinas puede eliminarlas, se han detectado en la soya, semillas de algodón y linaza (Sanz, 2009; Mohan *et al.*, 2015; Fuentes-Quesada y Lazo, 2018).
- Cianógenos: son compuestos glucosídicos que se encuentran en las semillas secas y raíces de plantas oleaginosas como la linaza. Son potencialmente tóxicos al hidrolizarse ya que liberan cianuro de hidrógeno, por lo que se requieren procesamientos para que el cianuro se volatilice antes de su uso (Francis *et al.*, 2001; Akande *et al.*, 2010; Mohan *et al.*, 2015). Como ejemplo, se pueden sumergir las semillas en agua por un tiempo determinado o dejarlas secar al sol (Wee y Shu, 1989).
- Fenoles (taninos): las plantas producen compuestos fenólicos como taninos que tienen el potencial de reaccionar con proteínas, minerales, carbohidratos y otros componentes citoplasmáticos formando sustratos resistentes a la digestión por las enzimas o se pueden unir a las mismas enzimas inhibiendo su actividad. Pueden disminuir la digestibilidad, disponibilidad y absorción de las proteínas, carbohidratos, vitaminas y minerales, por lo tanto, el valor nutricional de la harina también disminuye. Estos compuestos son fáciles de eliminar ya que son solubles en agua y se concentran en la cubierta de las semillas (Francis *et al.*, 2001; Akande *et al.*, 2010; Mohan *et al.*, 2015).
- Glucosinolatos: son los principales antinutrientes presentes en la canola. En las células de las plantas se encuentran en compartimentos separados de las enzimas tioglucosidasas que al

procesarlas, se liberan compuestos tóxicos como nitrilos capaces de provocar hiperplasia e hipertrofia de la tiroides, hígado y riñón, irritación de la mucosa intestinal y reduce la ingesta de alimento (Francis *et al.*, 2001; Fuentes-Quesada, 2018).

- **Goitrógenos:** son sustancias que pueden inhibir la síntesis y secreción de hormonas de la tiroides. Como estas hormonas juegan un papel importante en el control del metabolismo del cuerpo, sus efectos pueden resultar en un menor crecimiento y desempeño reproductivo. Las legumbres como la soya y el cacahuete son ejemplos de vegetales que contienen sustancias goitrogénicas (Akande *et al.*, 2010).
- **Gosipoles:** son polifenoles contenidos en las glándulas de pigmento de las plantas como el algodón. Pueden reducir la disponibilidad de aminoácidos por su habilidad de unión con ciertos grupos aminos, por lo que sus efectos se reflejan en el crecimiento por limitación de aminoácidos (Francis *et al.*, 2001).
- **Inhibidores de amilasas:** han sido encontrados en diferentes granos de frijoles y en el trigo. Estos compuestos bloquean la función de las amilasas pancreáticas de los animales, pero no de las plantas, hongos o bacterias (Akande *et al.*, 2010; Mohan *et al.*, 2015). Pueden estar activas en ambientes con pH desde 4.5 a 9.5 y son termolábiles a una temperatura mayor de 95°C, por lo que pueden ser eliminadas por procesos fisicoquímicos en el tratamiento de semillas o durante la elaboración de la dieta. Estos inhibidores afectan mayormente a los peces herbívoros cuya cantidad de la amilasa es mayor. Sin embargo, la inclusión de carbohidratos junto con estos FAN en el alimento de peces carnívoros puede disminuir la actividad de amilasas y la digestibilidad de las dietas (Hofer y Sturmbauer, 1986; Natarajan *et al.*, 1992).
- **Inhibidores de proteasas:** son proteínas globulares cristalinas que inhiben la actividad de las proteasas (enzimas que digieren las proteínas), y que están presentes en la mayoría de las semillas leguminosas y cereales. Existen inhibidores específicos de ciertas enzimas y aquellos que tienen la capacidad de inhibir a la tripsina y quimiotripsina al mismo tiempo por medio de sitios de unión independientes, disminuyendo la capacidad digestiva de los peces. Al unirse a las enzimas forman complejos que las inactivan y son irreversibles, afectando la digestibilidad de las proteínas (NRC, 1993; Hendricks, 2003; Mohan *et al.*, 2015). Los inhibidores de proteasas pueden ser inactivados

al cocinar las semillas en agua hirviendo o al calentar la harina a una temperatura mayor de 80°C lo cual puede llevar a la pérdida de algunos de sus aminoácidos esenciales (Gupta, 1987; Vidalvalverde *et al.*, 1994).

- Lectinas (hemaglutininas): son glicoproteínas que pueden unirse de manera específica pero reversible a los carbohidratos que forman parte de glicoproteínas o glicolípidos. La unión a estos carbohidratos puede darse en las membranas celulares, lo que le confiere la propiedad aglutinante de algunas células de la sangre como los eritrocitos de varias especies animales, aunque tienen una especificidad y afinidad variable (Gupta, 1987; Francis *et al.*, 2001; Vasconcelos y Oliveira, 2004). Las lectinas son parcialmente resistentes a la degradación proteolítica del intestino por lo que tienen un efecto antinutricional en el epitelio intestinal. Pueden cambiar la homeostasis de la membrana celular de los enterocitos, inhiben sus funciones adsorbentes de los nutrientes, pueden alterar la permeabilidad del intestino y atravesar hacia el torrente sanguíneo, donde pueden afectar directamente en otros tejidos, como páncreas, hígado y riñón, así como el metabolismo al simular los efectos de hormonas endócrinas, aunque esto no se ha comprobado completamente en peces (Vol y Words, 1996; Buttle *et al.*, 2001; Vasconcelos y Oliveira, 2004; Krogdahl *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2019). La actividad hemaglutinante ha sido detectada en más de 800 plantas en diferentes proporciones y pueden ser removidas por tratamientos térmicos-húmedos, como someter las harinas a 100°C por 10 minutos o utilizar autoclave por un periodo de 5 a 30 minutos (Gupta, 1987; Francis *et al.*, 2001).
- Oligosacáridos de la familia de las rafinosas y polisacáridos complejos que no son almidón (NSP por sus siglas en inglés, como pectinas, galactanos y celulosa): son constituyentes importantes de una amplia variedad de leguminosas y cereales (Francis *et al.*, 2001; Muzquiz y Wood, 2007). Estos sacáridos no pueden ser hidrolizados ni absorbidos por animales monogástricos por la falta de actividad de algunas enzimas digestivas como la α -1,6 galactosidasa. La microbiota intestinal puede utilizar estos azúcares para su metabolismo, produciendo gases (H_2 , CO_2 y CH_4) y algunos malestares intestinales. Estos compuestos también se pueden unir a minerales en el intestino y reducir la digestibilidad de grasas. Algunos NSPs solubles pueden formar aglomerados en el intestino, incrementar la viscosidad del contenido intestinal y obstruir la actividad enzimática (Francis *et al.*, 2001; Mohan *et al.*, 2015). Estos compuestos pueden ser eliminados por diferentes procesos de las semillas, como la extrusión a altas temperaturas (120-145°C y 31-38 bar), en

autoclave o sumergiendo por 20 horas en bicarbonato de sodio (Bangoula *et al.*, 1993; Burel *et al.*, 1998).

- Saponinas: comprende un gran grupo de compuestos estructuralmente relacionados que contienen esteroides o aglicona triterpenos (sapogenina) unidos a uno o más oligosacáridos. En la soya se han clasificado en tres grupos, pero se han reportado otros tipos en varias legumbres comestibles (chícharo, cacahuate, girasol) y el contenido puede diferir aún entre plantas de la misma especie, dependiendo de la madurez de la semillas así como de variables agronómicas como salinidad del suelo, clima, temporada de cultivo y localización (Shiraiwa *et al.*, 1991; Hassan *et al.*, 2013; Troisi *et al.*, 2014). Tienen actividad hemolítica, propiedades espumantes y otorgan un sabor amargo a las plantas con altas concentraciones de saponinas. Puede afectar el desempeño y metabolismo de los animales de diferentes maneras; por ejemplo, son pobremente absorbidas por los organismos que las ingieren pero pueden formar micelas mezcladas con ácidos biliares y colesterol, que modifican la permeabilidad de los enterocitos del intestino y facilitan la entrada de patógenos (Sanz, 2009; Gu *et al.*, 2016). También pueden formar complejos insolubles al unirse al hierro, zinc y calcio, pueden inhibir la actividad de enzimas digestivas y reducen la absorción de los nutrientes a través de las paredes intestinales. Estos compuestos no son termolábiles por lo que se han tratado de eliminar con tratamientos químicos, incrementando el costo de fabricación de la harina sin obtener un resultado totalmente satisfactorio (Akande *et al.*, 2010; Mohan *et al.*, 2015). De hecho, la inflamación del intestino distal en peces se ha atribuido mayormente a este tipos de FANs (Krogdahl *et al.*, 2015).

Cabe mencionar que los efectos adversos que producen los FAN dependen de la especie en cultivo, edad, hábitos alimenticios de los peces además del nivel de inclusión del ingrediente en la dieta, la calidad y procesamiento de la harina (Francis *et al.*, 2001). Por ejemplo, el crecimiento en las carpas, *Cyprinus carpio*, no es afectado con la inclusión de hasta 45% de harinas vegetales, como la HS extraída con solvente, harina de arroz y hasta con dietas que incluían taninos condensados. Aunque se ha observado que pueden desarrollar enteritis inducida por la soya, tienen la capacidad de recuperarse (Dabrowski y Kozak, 1979; Becker y Makkar, 1999; Urán, 2008). Por el contrario en peces carnívoros como *S. salar*, *O. mykiss* y la dorada, *Sparus aurata*, al sustituir desde un 20 a un 40% con harina de soya, algodón o canola y en algunos casos harinas procesadas como concentrado de soya o harinas desgrasadas, pueden en la

mayoría de los casos afectar el crecimiento a corto plazo (Robaina *et al.*, 1995; Kaushik *et al.*, 2000; Francis *et al.*, 2001; Tacchi *et al.*, 2012).

Se ha comprobado que se pueden eliminar algunos FAN en el procesamiento de las harinas vegetales, principalmente aquellos termolábiles mediante tratamientos térmicos, con extracción por solventes o dilución, pero generalmente esto resulta en la disminución del valor nutricional del ingrediente sin mejoras completamente eficientes (Akande *et al.*, 2010; Mohan *et al.*, 2015). Además, el uso de diferentes procesos y estrategias para evitar los impactos negativos de los FAN en las dietas incrementa su costo. Por ejemplo, el concentrado de proteína de soya un producto profundamente procesado de la soya en el que se remueven las porciones de proteína no soluble de la harina, se obtiene un concentrado con alto contenido de proteína (i.e. 65 a 70%), menor cantidad de FAN y de mejor calidad nutricional (Dersjant-li, 2002; Krogdahl *et al.*, 2003; Oliva-Teles *et al.*, 2015; Zhou *et al.*, 2018). Aun así, el concentrado de proteína de soya ha afectado la salud intestinal de algunas especies de peces marinos, al incluirla desde un 26 hasta 45% en la dieta (Trejo-Escamilla *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2019).

1.1.3. Sistema inmunológico en peces

1.1.3.1. Generalidades del sistema inmunológico de los peces

Para entender cómo los FAN alteran la salud de los peces es importante reconocer los componentes principales del sistema inmunológico de estos organismos, principalmente aquellos componentes que conforman la barrera intestinal. Los peces, así como los demás vertebrados poseen un sistema inmune con mecanismos especializados, capaces de detectar, reaccionar y proteger al cuerpo contra patógenos y evitar las enfermedades que producen. Se divide en dos tipos de respuestas; la innata (también conocida como no específica) y la adaptativa (o específica).

El sistema inmune innato es el primer tipo de respuesta contra los patógenos que han ingresado al organismo. Reaccionan a un amplio rango de estímulos diferentes desde agentes infecciosos hasta agentes inorgánicos, debido a que reconoce patrones moleculares que caracterizan a los grupos de patógenos más comunes (Kindt *et al.*, 2007; Firdaus-Nawi y Zamri-Saad, 2016).

Por otro lado, las respuestas adaptativas son provocadas tras una infección, se adaptan para reconocer estructuras moleculares ajenas, se dirigen hacia la estructura del estímulo (llamado antígeno) y eliminan de forma específica al patógeno. Además, involucra un cambio adaptativo en el sistema que genera una memoria inmunológica específica (anticuerpos) capaces de reconocer futuros ataques. Este tipo de respuestas son mediadas por los linfocitos (células B y T), un tipo de células blancas (leucocito) que poseen receptores especializados en sus membranas para detectar antígenos específicos y permite una eliminación eficiente (Roberts, 2012; Rodger *et al.*, 2016).

Este tipo de respuestas son más lentas y energéticamente costosas de producir, lo que las convierte en algunos casos en respuestas poco eficientes. Por ejemplo, en salmónidos la producción de anticuerpos toma varias semanas mientras que las bacterias pueden infectar y matar en días, por esto se ha llegado a considerar que el sistema innato en peces tiene una mayor importancia como mecanismo de defensa, porque sus respuestas son veloces a pesar de ser generalizadas (Jutfelt, 2006). Aunque existe esta categorización del sistema inmunológico, *in vivo* los componentes innatos y específicos actúan de forma conjunta y son interdependientes en varias maneras (Tort *et al.*, 2003; Hoebe *et al.*, 2004).

El reconocimiento inmunitario en peces es notable por su capacidad de distinguir entre invasores y componentes propios por lo que tiene un gran número de estructuras, células y moléculas que cumplen con los objetivos del sistema inmune, se pueden dividir en (Figura 1):

- Órganos linfoides: a diferencia del sistema inmunológico de mamíferos, los peces no poseen médula ósea y ganglios linfáticos y en su lugar el riñón es el mayor órgano linfoide además del timo y el bazo. En general el tejido linfoide está constituido de una red reticular de células que soportan poblaciones de leucocitos migratorios o estacionarios (Press y Evensen, 1999).
- Barreras superficiales asociadas a mucosa: son recubrimientos que forman una matriz de inmunoglobulinas y células inmunológicas que tienen la capacidad de retener y evitar la entrada de patógenos al hospedero inhibiendo la colonización. También pueden generar respuestas inmunológicas rápidas como la inflamación del tracto gastrointestinal (Gomez *et al.*, 2013; Peatman *et al.*, 2015).

- Los factores humorales son sustancias solubles que se encuentran en los fluidos corporales y tienen funciones de protección mediante la inhibición del crecimiento de los microorganismos patógenos, pueden neutralizar enzimas, entre otras funciones (Firdaus-Nawi y Zamri-Saad, 2016).
- Por último, los factores celulares, también conocidos como leucocitos o células blancas son una variedad de células especializadas e involucradas en los mecanismos de defensa, cada tipo celular cumple con una función dentro del sistema (Rauta *et al.*, 2012).

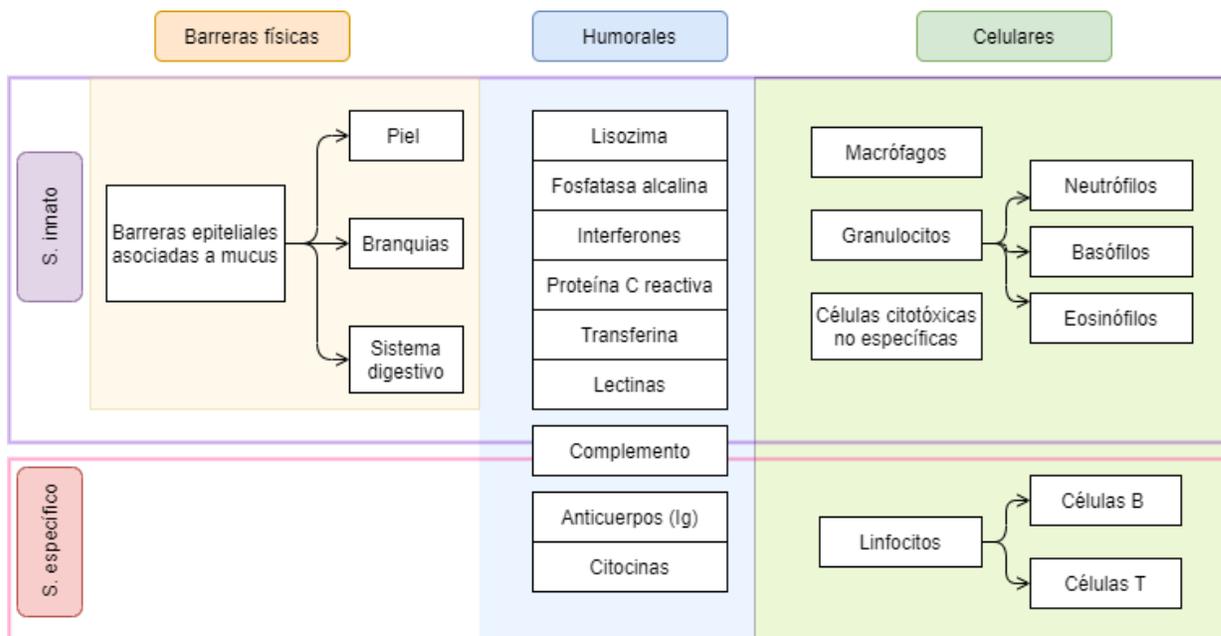


Figura 1. Componentes principales del sistema inmunológico de los peces. La imagen muestra los principales componentes del sistema inmunológico el cual se divide en innato (parte superior, morado) y el sistema específico (parte inferior, rosa), divididos a su vez en tres categorías, barreras físicas, componentes humorales y celulares. Imagen generada en app.diagramas.net <https://app.diagramas.net/>, (Murphy y Weaver, 2016; Press y Evensen, 1999)

1.1.3.2. Proceso de inflamación

Cuando un agente extraño atraviesa las barreras físicas del organismo y provoca un daño, una de las primeras respuestas inmunológicas que se desencadena es la inflamación, la cual se caracteriza por ser una cascada compleja de fenómenos efectuada en conjunto entre los componentes innatos y específicos, con el fin de detectar, aislar y eliminar el agente dañino y posteriormente facilitar la curación. Una de las características de la inflamación es la falta de especificidad, pues puede responder a heridas traumáticas,

lesiones mediadas por bacterias o virus y al daño químico por toxicidad (Kindt *et al.*, 2007; Roberts, 2012; Murphy y Weaver, 2016).

La inflamación puede dividirse en aguda (i.e., una respuesta rápida) o en crónica, es decir duradera y con posibles consecuencias patológicas. La reacción inflamatoria aguda combate las primeras fases de una infección y pone en marcha procesos que reparan el tejido dañado (Murphy y Weaver, 2016). A su vez la inflamación causa la liberación de ciertos factores, principalmente proteínas reguladoras de la familia de las citocinas, que desencadenan un incremento local del flujo sanguíneo, vasodilatación, permeabilidad capilar y el ingreso de células inmunológicas y factores humorales quimio atrayentes que eliminan bacterias y continúan la reparación tisular (Kindt *et al.*, 2007).

Por otro lado, la inflamación crónica se caracteriza por la proliferación celular, se puede extender hasta por meses o hasta que el agente que está causando el problema persista. Predominan en la zona dañada los macrófagos, linfocitos y células plasmáticas que proliferan y se acumulan, lo cual puede provocar daño tisular y fibrosis de manera significativa (Kindt *et al.*, 2007; Mumford *et al.*, 2007).

1.1.3.3. El tejido linfoide asociado al intestino y su función como una barrera inmunológica

En los peces las principales funciones del tracto gastrointestinal son procesar el alimento consumido, absorber nutrientes y agua del medio externo, así como excretar desechos. Su exposición a agentes externos lo haría vulnerable si no existiera el tejido linfoide asociado al intestino (GALT por su acrónimo en inglés). El GALT es un conjunto de células epiteliales, mucus y defensas inmunológicas que forman la primer barrera de defensa del intestino jugando un papel importante en el reconocimiento de señales, distinguiendo principalmente entre antígenos de patógenos y de bacterias comensales. Es una zona productiva de moléculas activas como las inmunoglobulinas y por lo tanto hay una alta regulación inmunológica en el tracto intestinal (Cerezuela *et al.*, 2012; Murphy y Weaver, 2016; Zhang *et al.*, 2021b).

Para entender mejor la asociación del GALT al intestino se describirá a continuación la conformación intestinal. La superficie del epitelio intestinal consiste en un arreglo en fila de células epiteliales llamadas enterocitos, que se especializan en la digestión y absorción de nutrientes. Están cubiertas de microvellosidades (conocido como borde de cepillo) en la zona apical y se mantienen juntas por uniones conocidas como uniones estrechas (tight junctions), que permiten la comunicación entre células

(Mokhtar, 2017). Entre los enterocitos se encuentran de manera aislada las células mucosas, especializadas en secretar mucus sobre la superficie apical, un fluido viscoso protector del epitelio que contiene factores humorales inmunológicos y glicoproteínas, principalmente mucinas que se producen a partir de gránulos internos de las células (Jutfelt, 2006; Salinas y Parra, 2015). Las mucinas se clasifican en neutras y ácidas, por su tinción PAS-Azul alcian. Las células mucosas con mucinas ácidas se tiñen azules, las neutras magenta y la presencia de ambos tipos de mucina en la misma célula resulta en un color intermedio (Wilson y Castro, 2010; Cerezuela *et al.*, 2012; Salinas y Parra, 2015; Lauriano *et al.*, 2019;). Esta capa mucosa además de protectora actúa como medio de lubricación y transporte entre los contenidos luminales y el epitelio. Se ha sugerido que algunas alteraciones luminales, incluyendo cambios en la microbiota pueden modificar las funciones de las células mucosas y su composición química (Gomez *et al.*, 2013; Salinas y Parra, 2015). La hilera de enterocitos, las células mucosas, el mucus y la lámina propia conforman la mucosa intestinal, que a su vez forma los pliegues mucosos y la primera capa de cuatro que constituyen la pared intestinal (Figura 2) (Jutfelt, 2006; Mokhtar, 2017).

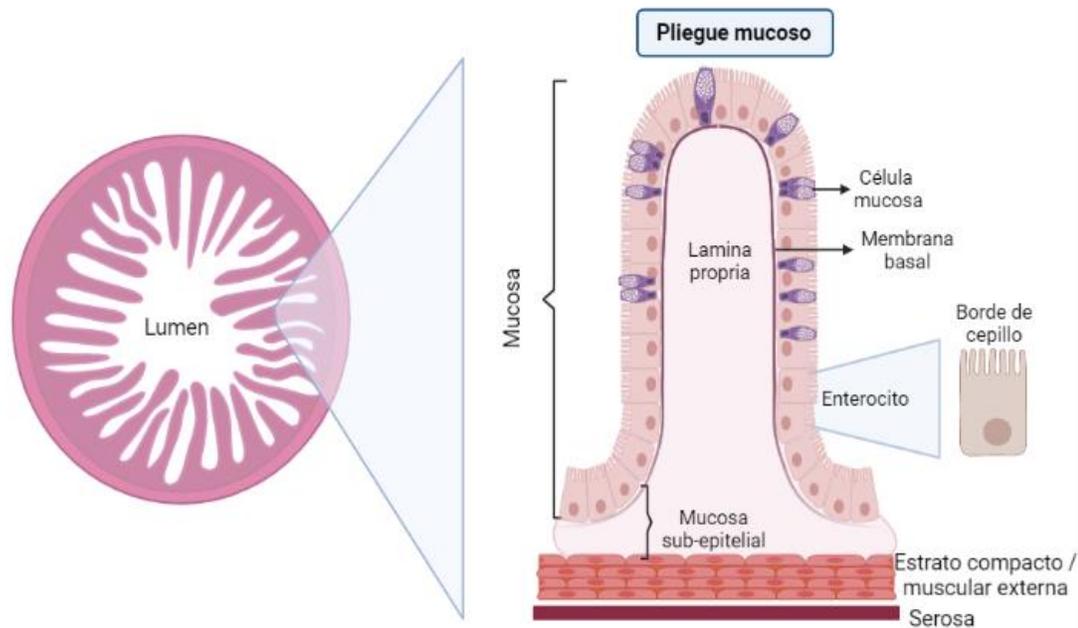


Figura 2 . Esquema general de las estructuras histológicas del intestino en peces. La mucosa es la primera capa de la barrera intestinal y consiste en una hilera de células epiteliales, los enterocitos, que se caracterizan por tener microvellosidades en la zona apical o borde de cepillo y las células mucosas encargadas de secretar mucus. Además de estas células especializadas, la lámina propia que está constituida por tejido conectivo vascularizado, con nervios y leucocitos, conforman la mucosa en forma de pliegues. Posteriormente se encuentra la mucosa sub-epitelial que es una capa adicional de tejido conectivo, seguida de capas de músculo suave o estriado, llamado muscular externa, túnica muscular o estrato compacto y la última capa de la barrera se conoce como serosa conformada de tejido conectivo que contiene vasos sanguíneos. El GALT se encuentra difuso entre el estrato compacto y la lámina propia (Wilson 2010). Imagen generada en Biorender.com

Tras la mucosa, el GALT se encuentra difuso entre la lámina propia de los pliegues mucosos y el estrato compacto, formando una relación intrínseca entre ambos estratos. Esta zona contiene macrófagos, linfocitos B y T, mastocitos, granulocitos, células plasmáticas y la expresión coordinada de citocinas, que evitan el paso de bacterias, virus, parásitos y toxinas, manteniendo la homeostasis del tejido (Jutfelt, 2006; Salinas y Parra, 2015).

Los enterocitos son capaces de tomar macromoléculas por endocitosis y se ha sugerido que se realiza un muestreo y presentación de antígenos hacia los macrófagos de la lámina propia y el epitelio. Allí los macrófagos procesan los antígenos y los presentan para activar funciones inmunes como la inflamación, inducir la producción de anticuerpos y ser almacenados por células de memoria (Press y Evensen, 1999).

Otro aspecto importante del sistema inmune del intestino es que permite la colonización simbiótica microbiana, conocida como la microbiota intestinal, y que puede impedir la colonización de ciertos patógenos. Esta microbiota está involucrada en varios procesos inmunes y hasta metabólicos (Butt y Volkoff, 2019).

1.1.4. Enteritis en peces marinos

Cómo se mencionó previamente los FAN de los vegetales provocan reacciones de respuesta generadas por el sistema inmunológico de los peces. Principalmente se ha detectado la inflamación subaguda no infecciosa del intestino distal, referida como enteritis (Krogdahl *et al.*, 2015). Junto con la inflamación se producen varios cambios morfológicos y fisiológicos en el intestino, principalmente en la zona distal, cuando se alimenta a los peces con altos niveles de inclusión de harinas vegetales y por un tiempo prolongado. Se ha observado enteritis al incluir principalmente harina de soya en la dieta en varias especies de peces bajo cultivo y de importancia comercial, como *S. salar* (Baeverfjord y Krogdahl, 1996; Bakke-McKellep *et al.*, 2000; Krogdahl *et al.*, 2003; Uran *et al.*, 2008), *O. mykiss* (Rumsey *et al.*, 1994), *C. carpio* (Urán, 2008) y *S. lalandi* (Bansemer *et al.*, 2015). Fuentes-Quesada *et al.* (2019), describieron los cambios morfológicos en el intestino distal e hígado de *T. macdonaldi*, alimentada con diferentes niveles de inclusión de harina de soya en la dieta (i.e., 0, 22, 44, y 64%). Observaron que con una inclusión moderada del 22% de harina de soya hay daños morfológicos y fisiológicos. Estas afectaciones dependen de la dosis y de la duración de administración de la soya, las cuales se acentúan afectando procesos digestivos y el crecimiento. También se han observado cambios morfológicos en el intestino de los peces

alimentados con otras harinas vegetales. Por ejemplo Tran-Ngoc *et al.* (2019), describió los efectos de la harina de canola y girasol en el intestino de la tilapia del Nilo, *Oreochromis niloticus*.

Dependiendo de la especie cultivada y el nivel de inclusión de la harina vegetal, el tiempo en el que se presentan los efectos de la enteritis pueden ser desde 4 hasta 18 semanas. A continuación, se describen algunos de los cambios morfo-fisiológicos reportados en el intestino de los peces y algunas respuestas inmunológicas (Bakke-McKellep *et al.*, 2000; Bonaldo *et al.*, 2008; Gu *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2016; Fuentes-Quesada *et al.*, 2018; Stone *et al.*, 2018):

- Alteración del GALT, disminuye el grosor de la mucosa y otras capas epiteliales del tejido intestinal (lamina propia, submucosa) que son cruciales para la digestión y absorción de nutrientes. Los organismos son más susceptibles a la colonización de patógenos y a enfermedades tras su alteración (Rust, 2003; Fuentes-Quesada *et al.*, 2018).
- Reducción del número de células epiteliales y de la longitud de los pliegues intestinales, que provoca una menor actividad enzimática y la reducción de la superficie de transporte y absorción de nutrientes (Baeverfjord y Krogdahl, 1996).
- La infiltración de células inflamatorias (linfocitos, plasmocitos, macrófagos, neutrófilos) y otras respuestas asociadas al sistema inmune, para intentar eliminar los FAN (Bakke-McKellep *et al.*, 2000; Roberts, 2012). Se ha observado una expansión de la lámina propia debido al incremento de células mononucleares (Bonaldo *et al.*, 2008).
- Incremento del número de células mucosas encargadas de regenerar el mucus intestinal (Fuentes-Quesada *et al.*, 2018).
- Reducción en el número de vacuolas supranucleares de los enterocitos. Estas vacuolas se encuentran dentro de los enterocitos principalmente en el área posterior del intestino y se encargan de digerir intracelularmente algunas proteínas. La disminución del número de vacuolas implica una menor digestión y absorción de proteínas que llegan intactas a la zona distal del intestino (Bakke-McKellep *et al.*, 2000; Rust, 2003).

Todas estas alteraciones afectan de manera directa la actividad de las enzimas digestivas y por tanto la digestibilidad de las dietas debido a que los nutrientes no son digeridos y absorbidos de manera eficiente. Estas afectaciones causan una reducción del crecimiento en diversas especies, algo no deseado en los cultivos acuícolas (Bonaldo *et al.*, 2008; Gu *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2016; Fuentes-Quesada *et al.*, 2018; Stone, *et al.*, 2018).

1.1.5. Evaluación de la enteritis en peces

Como se mencionó previamente, la enteritis es una alteración que afecta varias estructuras del intestino e influye en diferentes aspectos la salud de los peces bajo condiciones de cultivo, por lo que se han desarrollado diferentes técnicas para caracterizar el grado de afectación y entender estas lesiones, como las que se mencionarán a continuación.

1.1.5.1. Análisis sanguíneos

Los análisis de sangre han sido una herramienta clásica para describir el estado fisiológico de los organismos bajo cultivo, su estado de salud general e identificar enfermedades. El conteo de leucocitos es un análisis que registra la cantidad de células producidas como parte de la respuesta inmune. Los leucocitos viajan a través del torrente sanguíneo para ser distribuidos a los sitios en donde se encuentre una lesión y sean requeridos. Por lo tanto, una mayor cantidad de leucocitos en la sangre se relaciona con alguna respuesta inmunológica ante un factor de estrés (Campbell, 1988; Modra *et al.*, 1998; Del Río Zaragoza *et al.*, 2008;). Anteriormente Rumsey *et al.* (1994), observaron en alevines de *O. mykiss*, alimentados con proteína de soya (harina de soya tostada, desgrasada y descascarada o concentrado de soya en la dieta) un incremento en el número de leucocitos circulantes, asociado al inicio de una respuesta inflamatoria o el comienzo de una reacción hipersensitiva.

Otra de las pruebas de análisis de sangre comúnmente utilizadas para evaluar la respuesta inmune innata es el estallido respiratorio. Esta respuesta es el proceso en el que las células fagocíticas del sistema inmune (macrófagos, neutrófilos y monocitos) eliminan a los patógenos (Murphy y Weaver, 2016). Una vez que los patógenos son introducidos a la célula por fagocitosis comienza su desintegración por medio de la producción de especies reactivas de oxígeno ROS (como peróxido de hidrógeno o radical hidróxido), los

cuales son altamente tóxicos y forman la base de un sistema de eliminación potente (Biller-Takahashi *et al.*, 2013). Por lo tanto, la actividad del estallido respiratorio (AER) es un indicador de la inmunidad no específica además de que está correlacionado con la liberación de citocinas y la inflamación. Anteriormente se ha demostrado que los elementos tóxicos también son reconocidos por el sistema inmunológico y pueden ser eliminados por el estallido respiratorio. Cabe mencionar que se ha demostrado que el uso de prebióticos, como la inulina, estimula en peces la AER, disminuyendo los efectos adversos de los FAN (Takahashi *et al.*, 2013; Akhter *et al.*, 2015; Biller y Takahashi, 2018).

1.1.5.2. Análisis histológicos

Recientemente se han utilizado los análisis histológicos como una herramienta muy útil que ayuda a evaluar la salud intestinal de los peces. Con estas técnicas se han logrado caracterizar y distinguir los cambios morfológicos de las diferentes estructuras del intestino utilizando diferentes técnicas de tinción histológica, microscopía y evaluación que ha llevado a consensar cuales son las características más evidentes de la enteritis (Van den Ingh *et al.*, 1991; Bakke-McKellep *et al.*, 2000; Sitjà-Bobadilla *et al.*, 2019). Uno de los métodos más utilizados para la evaluación de la enteritis por medio de cortes histológicos es el sistema de puntuación semicuantitativo propuesto por Urán (2008). Este método consiste en dar una calificación entre una escala de 1 a 5 unidades arbitrarias considerando varios parámetros independientes. En este sistema, un valor de 5 indica la condición más severa de enteritis. Algunos de los parámetros cuantificados son; la presencia de células mucosas y la abundancia de granulocitos eosinófilos (Anexo). Sin embargo, aunque es un método rápido y relativamente sencillo, es necesario estar bien familiarizado con las estructuras y características intestinales mencionadas en organismos sanos. Adicionalmente, se han utilizado programas computacionales para la medición morfológica de estructuras alteradas, lo que resulta en una mayor precisión de las mediciones, no obstante es un trabajo laborioso y tardado (Raskovic *et al.*, 2011).

1.1.5.3. Actividad de enzimas digestivas

La cuantificación de la actividad relativa de las enzimas digestivas es otro método complementario que provee información adicional del estado de salud intestinal (Santigosa *et al.*, 2008; Campbell, 2017; Trejo-Escamilla *et al.*, 2017). Como se ha mencionado anteriormente, las alteraciones morfológicas del intestino

afectan varios procesos a nivel fisiológico, llegando a alterar la actividad de enzimas digestivas. Por lo que cuantificar la actividad y observar cambios de las principales enzimas digestivas (sensibles a FANs), pueden indicar alteraciones del intestino o el páncreas. Algunas de las enzimas típicamente cuantificadas son la tripsina, lipasa y amilasa, consideradas buenos marcadores del estado nutricional y de salud de los peces debido a que se ha observado que algunas modificaciones nutricionales en la dieta pueden causar cambios en su actividad (Krogdahl *et al.*, 2015; Trejo-Escamilla *et al.*, 2017; Fuentes-Quesada *et al.*, 2018;).

1.1.5.4. Técnicas moleculares

Por otra parte, la expresión de genes es el proceso en el cual las células producen moléculas a partir del código genético, gracias al desarrollo de técnicas moleculares más económicas y accesibles, se han podido analizar y cuantificar la expresión de genes involucrados en procesos inmunológicos y fisiológicos durante las alteraciones de la salud de los peces. Tal es el caso de la interleucina 8 (*il8*), una molécula que es expresada por leucocitos como respuesta innata y producida durante la reacción inflamatoria y que induce la locomoción de neutrófilos y monocitos al sitio de inflamación e incrementa la expresión de otras citocinas. Se ha observado un incremento en su expresión en peces alimentados con dietas que incluían harina de soya durante varias semanas (Fuentes-Quesada *et al.*, 2018; Tan *et al.*, 2019; Viana *et al.*, 2019).

Adicionalmente, la inmunoglobulina es una proteína transmembranal producida por las células B al reconocer antígenos por medio de receptores. Esta proteína es liberada en forma de anticuerpos específicos y existen varios tipos. Una de ellas es la inmunoglobulina M (*igm*) capaz de reconocer diferentes antígenos y también tiene propiedades proinflamatorias. La expresión de la *igm* es una respuesta específica del sistema inmune adaptativo y genera inmunización no solo en el suero, sino también en zonas mucosas (Zhang *et al.*, 2010; Vetvicka *et al.*, 2013). Por ejemplo, en el mero, *Epinephelus fuscoguttatus* × *Epinephelus lanceolatus*, se detectó una disminución en la expresión de *igm* en la mucosa intestinal tras haber sido alimentados con extractos de soya (Zhang *et al.*, 2021a, 2021b). En *T. macdonaldi*, se cuantificó una mayor expresión de *igm* al ser alimentadas con dietas que incluían harina de soya (Fuentes-Quesada *et al.*, 2020).

Otros genes también utilizados para caracterizar el estrés celular de los organismos son aquellos que generan estructuras celulares o proteínas capaces de mantener la homeostasis celular. Por ejemplo, las proteínas de choque térmico (heat shock protein, HSP) son proteínas chaperonas (proteínas que

estabilizan el plegamiento de otras proteínas) involucradas en el proceso de respuesta del estrés celular (Saibil, 2013). Las HSP son proteínas altamente conservadas entre varias especies de animales, que se describieron inicialmente en varios organismos en respuesta a cambios de temperatura. Sin embargo, hoy se sabe que las HSP tienen actividad importante ante diferentes estresores, como un shock osmótico, medio oxidante, hipoxia, infecciones patógenas y algunos contaminantes. Sus funciones son las de proteger varios procesos celulares críticos relacionados con el plegamiento, ensamble y translocación de proteínas ante estímulos estresores como los previamente mencionados, manteniendo el funcionamiento adecuado de las células (Iwama *et al.*, 1998; Saibil, 2013). Los principales genes de choque térmico no contienen intrones, es decir secuencias del gen que no codifican aminoácidos, así que el RNA mensajero puede inmediatamente traducirse a nuevas proteínas en minutos tras la exposición a un estresor, lo que hace que la expresión de genes de HSP sea un buen indicador del estrés celular (Iwama *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2018).

Con respecto a la relación entre HSP y los efectos fisiológicos de la soya en peces, Bakke-mckellep *et al.* (2007), observaron una mayor concentración de células que expresaban HSP-70 en la región apical de los pliegues mucosos del intestino distal de salmones con enteritis inducida por soya y dedujeron que probablemente la presencia de HSP-70 es una respuesta inflamatoria por parte de los enterocitos que resistieron el estrés inducido por FAN. Estas células resistentes intentan regular vías de muerte celular, recuperar a la célula y pueden ser responsable del reclutamiento de leucocitos a la zona a través de la expresión de *hsp*.

Por último, se conocen algunas moléculas como las acuaporinas (*aqp*) que crean canales de agua en las paredes celulares, lo que incrementa la permeabilidad de la membrana celular. Se ha propuesto que las acuaporinas en el epitelio intestinal son la principal ruta de absorción del agua y participan en la osmorregulación en peces (Jutfelt, 2006; Sundell y Sundh, 2012). En estudios anteriores con *S. salar* (Krogdahl *et al.*, 2015) y *T. macdonaldi* (Fuentes-Quesada *et al.*, 2020) se ha observado que la expresión de *aqp8* es inversamente proporcional y dependiente de la dosis de soya en las dietas, principalmente relacionado con la cantidad de saponinas incluidas. Es decir que un mayor contenido de FAN disminuye la cantidad de acuaporinas en los enterocitos y como consecuencia hay una menor absorción de agua que se refleja en diarrea. La diarrea es un síntoma típico de la enteritis inducida por harina de soya en peces marinos bajo cultivo.

Todos estos estudios previos han demostrado que hay varias técnicas alternativas y complementarias para evaluar y caracterizar la enteritis causada por la alimentación de los peces con harinas de soya. De tal forma que utilizar diferentes técnicas complementarias puede brindar un panorama más amplio de los efectos de estas alteraciones.

1.1.6. Macroalgas como un ingrediente funcional

Un ingrediente o alimento funcional se caracteriza por proveer un beneficio a la salud más allá de la nutrición básica. Algunos ingredientes, de diferente naturaleza, se han clasificado como funcionales por sus cualidades antioxidantes, antibacterianas, antiinflamatorias, entre otras y que previenen o reducen enfermedades crónicas (Miranda *et al.*, 2017; Gendel, 2021). En la acuicultura, estos ingredientes también brindan beneficios en el crecimiento y más allá de los alimentos tradicionales poco sustentables, también influyen en aspectos ambientales y económicos de las dietas (Miranda *et al.*, 2017). En los últimos años las algas se han convertido en una de las nuevas tendencias como ingredientes funcionales en la nutrición acuícola debido a su gran diversidad y a las propiedades benéficas que algunos de sus compuestos pueden tener. La incorporación de biomasa algal o la extracción de elementos bioactivos de especies como *Eucheuma denticulatum*, *Ascophyllum nodosum*, *Porphyra yezoensis*, *Ulva pertusa* o *M. pyrifera* ha mejorado el crecimiento, la eficiencia alimenticia, la deposición de proteína en el músculo, la pigmentación, respuesta al estrés, funciones del hígado o repuestas antioxidantes e inmunes en algunas especies de peces como *Pagrus major*, *Paralichthys olivaceus*, *D. labrax* y *O. mykiss*, por lo que es de gran interés conocer los efectos que pueden tener en otras especies de peces con potencial de cultivo y si pueden evitar la enteritis (Nakagawa, 1997; Colombo *et al.*, 2006; Garcia-Vaquero y Hayes, 2016; Miranda *et al.*, 2017).

1.1.6.1. Prebióticos a base de macroalgas

Los prebióticos son carbohidratos no digeribles para organismos monogástricos que estimulan la actividad o la abundancia de las bacterias benéficas del hospedero, también conocidas como microbiota intestinal. Estas bacterias habitan el lumen intestinal de manera simbiótica, son inofensivas y pueden facilitar la digestión o producción de metabolitos que de otra manera son inaccesibles para el hospedero,

además pueden destruir toxinas fatales para el hospedero, jugando un papel importante en el control de enfermedades y en la salud de los peces (Gibson y Roberfroid, 1995; Iwashita *et al.*, 2015).

Los prebióticos también pueden tener la capacidad de mejorar el metabolismo o ser inmunoestimulantes, es decir, que pueden modular el sistema inmune al incrementar la resistencia del hospedero contra enfermedades (Figura 3). Esta cualidad ha generado gran atención en la nutrición acuícola, para contrarrestar los efectos de los factores antinutricionales de las harinas vegetales incluidas en la dietas de los peces (Buentello *et al.*, 2010; Zhou *et al.*, 2018). Por estas razones es que el uso y estudio de estos ingredientes sigue en aumento, pues los resultados benéficos dependen de la dosis, duración de su ingesta, la especie, edad del pez, entre otros factores pueden alterar los resultados benéficos (Sado, *et al.*, 2008; Iwashita *et al.*, 2015).

Algunos de los prebióticos utilizados en la acuicultura son la inulina, oligofruktosa, lactosucrosa, lactulosa, β -glucanos y manano oligosacáridos, con los que se ha observado una mejora en el crecimiento, utilización del alimento, salud intestinal y en algunos casos estimulación del sistema inmune como migración de células inmunológicas, incremento de fagocitosis, actividad bactericida y la producción de anticuerpos (Delbert, 2002; Zhou *et al.*, 2010; Song *et al.*, 2014; Akhter *et al.*, 2015;).

Las macroalgas se caracterizan porque tienen un alto contenido de polisacáridos solubles no digeribles por peces carnívoros, cuya función en las algas es estructural o de almacenamiento, con alto potencial prebiótico (Gotteland *et al.*, 2020). Dependiendo del tipo de alga, se pueden encontrar una variedad de compuestos de este tipo. Por ejemplo, en las algas cafés de la clase Phaeophyta contienen hasta el 75% de polisacáridos como los alginatos, fucoidanos y laminarinas que estimulan el crecimiento de bifidobacterias y lactobacilos, comunidades bacterianas comunes de la microbiota intestinal de peces (Sardari y Nordberg, 2018; Gupta *et al.*, 2019; Gotteland *et al.*, 2020). Por su parte las algas rojas contienen polisacáridos como agar y glucanos, mientras que las algas verdes contienen ulvanos y xiloglucanos. Se ha reportado que estos compuestos pueden generar una estimulación del sistema inmunológico innato en humanos y ratones, así como efectos benéficos en el desempeño del crecimiento y mejoran la eficiencia alimenticia en peces como *P. major*, *O. niloticus* y *O. mykiss* (García-Vaquero y Hayes, 2016; Sardari y Nordberg, 2018; Gotteland *et al.*, 2020;). *M. pyrifera* es una especie de macroalga café abundante en las costas de Baja California y con gran potencial como ingrediente funcional, sin embargo, no se sabe con exactitud el efecto específico de los compuestos prebióticos que contiene, por lo que se requiere un

mayor estudio de sus aplicaciones y de los beneficios que puede conferir a los peces que las consuman (Dantagnan *et al.*, 2009).

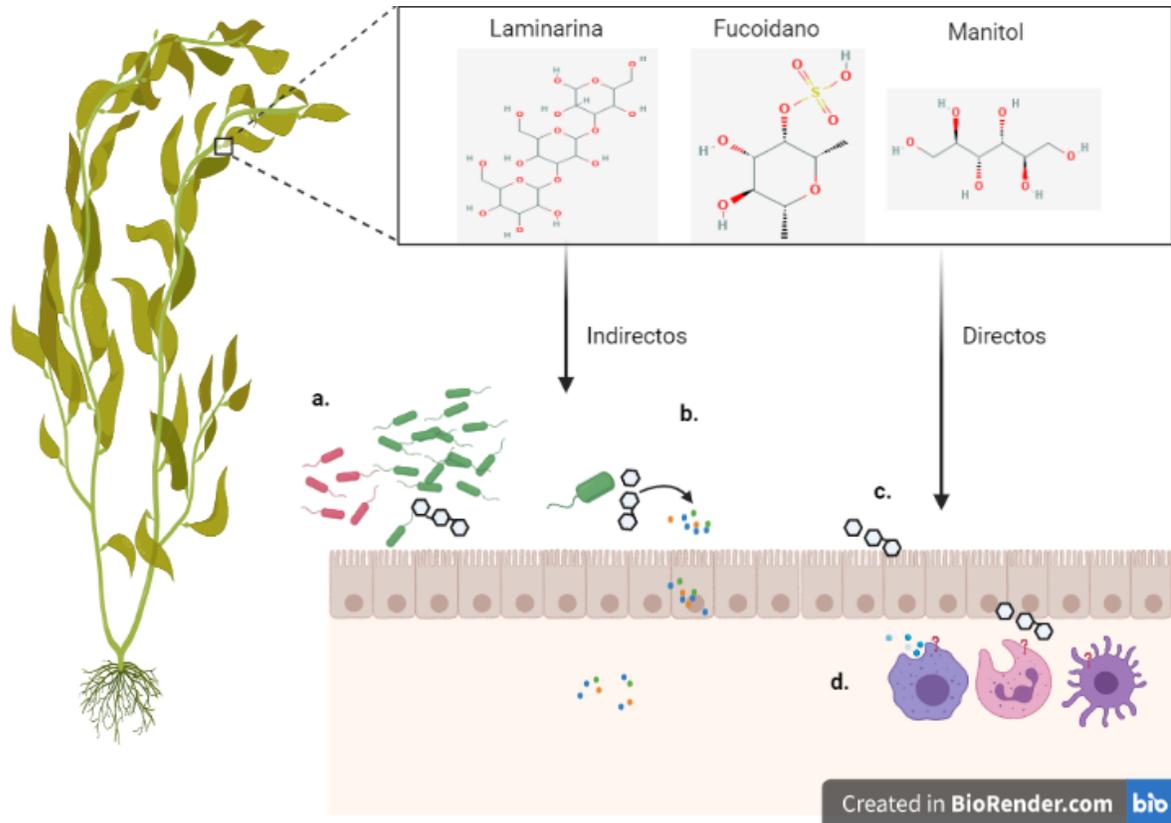


Figura 3. Polisacáridos de *Macrocystis pyrifera* y sus posibles efectos prebióticos. La laminarina, fucoidano y manitol son algunos de los compuestos con características prebióticas que pueden beneficiar al ambiente intestinal de los peces y la disponibilidad de los nutrientes. Los efectos que pueden tener sobre el organismo pueden ser indirectos al ser sustrato de la microbiota y propiciar la proliferación de sus poblaciones, que a su vez los protegen de bacterias patógenas por competición de nicho o recursos (a). Otro efecto indirecto es la generación de metabolitos bacterianos a partir de los prebióticos, como los ácidos grasos de cadena corta, que tienen la capacidad de atravesar la barrera intestinal y viajar a través del torrente sanguíneo para su utilización (b). De forma directa los prebióticos pueden tener efectos en las células epiteliales (c) o estimular la actividad de leucocitos y sus respuestas inmunológicas (d). Imagen realizada en BioRender.com

1.1.7. *Totoaba macdonaldi*

La totoaba es un pez que habita en el Golfo de Baja California, México, es una especie endémica y la más grande de la familia Sciaenidae, llega a medir hasta 2 metros de longitud y alcanza un peso de 135 kilos (Figura 4) (Cisneros-Mata *et al.*, 1995). La pesca de la especie aumentó debido a la gran demanda de la vejiga natatoria, también conocida como “buche”, considerada de gran importancia en la medicina tradicional China, llevando a la especie al borde de la extinción. En 1975 su pesca y venta fue prohibida

por la NOM-059 en México, sin embargo, el descenso poblacional se mantiene debido a la pesca furtiva (CITES, 2012; DataMares, 2017).

Actualmente se ha desarrollado la tecnología para su cultivo, reproducción y engorda, ya que se han registrado tasas de crecimiento de hasta 7.5 g día^{-1} , por lo que se ha convertido en una especie de importancia para la acuicultura comercial (Conald, 2012; Juárez *et al.*, 2016). Una de las limitantes del cultivo de *T. macdonaldi* es su dieta, pues al ser un pez carnívoro requiere un alto contenido proteico en el alimento que se le proporciona, el cual depende de un alto suministro de harina de pescado. Se recomienda un 46% en la dieta como un valor mínimo requerido de proteína cruda y un perfil de aminoácidos esenciales que cumpla con 1.53% de lisina. Además los juveniles requieren mínimo de 8.5% de lípidos para un crecimiento óptimo (Rueda-López *et al.*, 2011; Pérez-Velazquez, *et al.*, 2017; Madrid *et al.*, 2019). El ingrediente que típicamente cumple con estas características es la harina de pescado, por lo que los costos de alimentación son elevados, por lo que la fabricación de nuevas dietas, más eficientes, sustentables y económicas con ingredientes alternativos, es necesaria para un cultivo de totoaba sostenible.



Figura 4. *Totoaba macdonaldi*

1.2. Justificación

El crecimiento de la acuicultura de peces carnívoros ha aumentado la demanda de formulaciones de alimentos con un alto contenido proteico, que dependen de la harina de pescado como principal fuente de proteína. Conforme este ingrediente se vuelve más escaso, costoso y menos sostenible, es necesaria la búsqueda de ingredientes alternativos. El uso de harinas vegetales para sustituir a la HP es una opción viable si se incluyen medidas preventivas para los efectos adversos, como la enteritis causada por niveles altos de inclusión de estas harinas con factores antinutricionales.

El uso de macroalgas como ingrediente funcional puede ser una nueva alternativa como sustituto parcial de la HP o como prebiótico en las dietas, aportando protección contra los factores antinutricionales de las harinas a base de plantas, favoreciendo la digestión y absorción de los nutrientes, con lo cual se podrá reducir la inclusión de harina de pescado. Es necesario evaluar los efectos no sólo a nivel fisiológico sino también inmunológico dando una mejor descripción de los procesos celulares que están siendo afectados.

T. macdonaldi es una especie con creciente potencial económico para la acuicultura en México, pero debido a que el alto costo del alimento para su cultivo incrementa los gastos de producción, es necesario el desarrollo y producción de una dieta mexicana que cumpla con los requerimientos nutricionales de la especie y que disminuya los costos de cultivo. Sobre todo, si se incluyen ingredientes alternativos de bajo costo, comparados con la harina de pescado. El presente estudio evaluó el efecto del uso de macroalgas como ingrediente funcional en el desempeño del crecimiento, capacidad digestiva y respuesta inmune en juveniles de *T. macdonaldi* alimentados con dietas que incluyan harinas vegetales.

1.3. Hipótesis

- La inclusión de macroalgas como ingrediente funcional en la formulación de las dietas para juveniles de *T. macdonaldi* permitirá incorporar harinas vegetales como sustituto parcial de la harina de pescado sin comprometer el desempeño del crecimiento, digestibilidad y la salud del organismo.

1.4. Objetivos

1.4.1. Objetivo general

Evaluar el efecto de la inclusión de macroalgas en las dietas con harinas vegetales sobre el crecimiento, digestibilidad y la respuesta inmunológica en juveniles de *T. macdonaldi*.

1.4.2. Objetivos específicos

- Evaluar el efecto del uso de macroalgas como un ingrediente funcional en dietas con ingredientes vegetales para juveniles de *T. macdonaldi* sobre los diferentes índices de crecimiento y eficiencia alimenticia, la digestibilidad de las dietas, la actividad de la tripsina, lipasa y amilasa en el intestino.
- Evaluar el efecto del uso de macroalgas como un ingrediente funcional en dietas con ingredientes vegetales para juveniles de *T. macdonaldi* sobre la respuesta inmunológica con base en los análisis de sangre, valorando la cantidad de leucocitos y el estallido respiratorio, la expresión de genes inmunológicos, fisiológicos y de estrés celular, así como los cambios histológicos del intestino distal (i.e., salud intestinal).
- Evaluar el efecto del uso de macroalgas como un prebiótico (0 vs. 3%) para reducir la enteritis en juveniles de *T. macdonaldi* alimentados con dietas formuladas con harina de soya (26% de la dieta).

Capítulo 2 . Metodología

2.1. Formulación y elaboración de las dietas

Se evaluaron cuatro formulaciones de dietas isoproteicas (47%) e isolipídicas (13%) de acuerdo con los requerimientos de *T. macdonaldi* previamente reportados (Rueda-López *et al.*, 2011; Fuentes-Quesada *et al.*, 2020). La empresa Grupo Algamar, S.A. de C.V. formuló dos dietas comerciales (ALG1 y ALG2) que incluyen harina de macroalgas. Su fórmula exacta ha sido protegida por ser propiedad intelectual de la empresa, sin embargo, algunos de los ingredientes que incluyen son; harina de pescado, harina de macroalgas, gluten de maíz, frijol seco, trigo y semilla de canola. Las otras dos dietas fueron formuladas y elaboradas en el laboratorio de nutrición del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE), utilizando el aditivo Mega Smart Kelp de la misma empresa como prebiótico, que es un concentrado de diferentes macroalgas marinas con un alto porcentaje de polisacáridos (laminarina, fucoidano y manitol) y minerales. Una de las dietas se elaboró sin prebiótico (DPB0) y la otra incluyó 3% (DPB3). Estas dietas incluyeron harina de pescado como fuente proteica (Maz Industrial SA. de CV. Mazatlán Sinaloa, México) y dos fuentes de proteína de soya; 26% de harina de soya (Alimentos COLPAC, Sonora, México) y 7% de concentrado de harina de soya (NutriVance™ Midwest Ag Enterprises, Inc. MN, USA). Se agregó aceite de krill como atrayente (Biogrow, ProAqua, México). Para cumplir con los requerimientos nutricionales de *T. macdonaldi* en cuanto a aminoácidos esenciales se adicionó; lisina, metionina, treonina, arginina y taurina (Madrid *et al.*, 2019). Como aglutinante para la dieta se utilizó almidón previamente gelatinizado (fécula de maíz) (Tabla 1.).

La elaboración de las dietas consistió en mezclar los macronutrientes por 10 minutos en una mezcladora Hobart modelo HL200, posteriormente los micronutrientes por otros 10 minutos, se agregaron los aceites y el aglutinante junto con 30% de agua (del total de peso de la dieta a elaborar). Para conseguir la consistencia gelatinizada del almidón, se agregó agua tibia y se calentó la mezcla por 2 minutos en microondas. Después de la homogenización de los ingredientes se formaron pellets con un molino de carne y una placa de molienda de 4mm de diámetro. Las dietas se secaron a 60°C en una estufa por aproximadamente 48 horas y se almacenaron dentro de bolsas plásticas en refrigeración (-10°C) hasta su utilización.

Tabla 1. Formulación de las dietas experimentales para juveniles de *Totoaba macdonaldi*. La formulación se presenta como g kg⁻¹ de peso seco en las dietas DPB0 y DPB3. Las dietas comerciales ALG1 y ALG2 son fórmulas protegidas por la empresa.

Ingredientes	Dietas experimentales			
	ALG1	ALG2	DPB0	DPB3
Harina de pescado ^a			382	382
Harina de soya ^b			260	260
Concentrado de soya ^c			71	68
Harina de maíz			79.5	52.5
Almidón gelatinizado			80	80
Aceite de pescado ^a	Fórmula cerrada comercial,		96	96
Rovimix ^d	incluye en sus ingredientes		30	30
Stay-C ^d	principales: harina de		10	10
Taurina ^e	pescado, gluten de maíz,		10	10
Metionina ^f	harina de macroalgas, frijol		4.1	4.1
Lisina ^f	seco, trigo, semilla de		10	10
Arginina ^f	canola		1.8	1.8
Treonina ^f			0.5	0.5
Atrayente ^g			1	1
Benzoato de sodio			2.5	2.5
Cloruro de colina			1.5	1.5
BHT			0.1	0.1
Prebiótico ^h			0	30
	Composición proximal			
Proteína cruda (%)	49.8 ± 0.0	47 ± 0.5	47.2 ± 0.9	47.3 ± 0.5
Lípido crudo (%)	13.4 ± 0.3	12.9 ± 0.5	13.5 ± 0.2	13.3 ± 0.3
Humedad (%)	4.7 ± 0.0	5.2 ± 0.0	4.0 ± 0.6	6.9 ± 0.0
Ceniza (%)	16.1 ± 0.0	16 ± 0.4	12.2 ± 0.0	12.9 ± 0.0
ELN (%)	20.6 ± 0.3	24.1 ± 0.7	27.2 ± 0.7	26.5 ± 0.5
Saponinas (%)	1.038 ± 0.01	0.545 ± 0.04	0.259 ± 0.01	0.238 ± 0.04

^a Maz Industrial SA. de CV. Mazatlán, Sinaloa, México (69% de proteína, 10% lípidos)

^b Alimentos COLPAC, Sonora, México (48% proteína y 6% lípidos)

^c NutriVance TM Midwest Ag Enterprises, Inc. MN, USA (60% proteína y 0.5% lípido)

^d DSM, Guadalajara, México

^e Insumos NUBIOT SA. de CV., México

^f Free aminoacids, EVONIK, Degussa, México

^g Aceite de krill, Biogrow, Proveedora de Insumos Acuícolas, SA. de CV., Mazatlán, Sinaloa, México

^h Mega Smart Kelp, Grupo Algamar, Ensenada, Baja California, México.

2.2. Condiciones del cultivo y bioensayo

Los juveniles de *T. macdonaldi* fueron donados por la empresa Acuario oceánico y la Universidad Autónoma de Baja California (UABC). Los 120 organismos fueron trasladados por tierra en un tanque de 1 m³ con oxigenación al Laboratorio de Peces Marinos del CICESE. Los peces se aclimataron por dos semanas durante las cuales fueron alimentados con la dieta para peces marinos de Algamar (pellet de 5mm) en un sistema de recirculación con 12 tanques de 450 L, conectados a un filtro de cama móvil, un biofiltro fluidizado (medio kaldnes K1), un fraccionador de proteína, un intercambiador de calor (Titan Air Cooled Aqualogic) y una bomba de agua (3/4 hp). Las condiciones del agua fueron monitoreadas diariamente con un medidor multiparámetro (YSI Pro-2030). La temperatura se mantuvo en $23.4 \pm 0.4^{\circ}\text{C}$, oxígeno disuelto $5.88 \pm 0.3 \text{ mg L}^{-1}$, saturación de oxígeno $88.5 \pm 5.6\%$, salinidad de $35.6 \pm 0.3\text{‰}$ y tuvieron el fotoperiodo natural de marzo a mayo (12 hrs luz/12 hrs oscuridad). También se evaluó la concentración de nitrógeno residual en el agua con un kit colorimétrico API diariamente durante las semanas de aclimatación y posteriormente cada tercer día, se mantuvieron los niveles de nitrógeno amoniacal total (NAT) $<1 \text{ mgL}^{-1}$, nitritos $<0.5 \text{ mgL}^{-1}$ y nitratos $<40 \text{ mgL}^{-1}$.

Posteriormente se dio inicio al bioensayo en el cual las totoabas tenían un peso inicial promedio de $157.8 \pm 23 \text{ g}$, fueron alimentadas tres veces al día en los horarios 8:00, 12:00 y 16:00 hrs a saciedad aparente durante 8 semanas. En cada tanque se sembraron 10 organismos y representó una de las tres réplicas de los cuatro tratamientos. Los tratamientos evaluaron cada una de las formulaciones de las dietas (i.e., DPB0, DPB3, ALG1 y ALG2) y fue asignadas de manera aleatoria a cada unidad. Antes y después de cada dosis de alimentación, el alimento fue pesado para conocer el consumo diario.

2.3. Muestreo

Al inicio del bioensayo y cada quince días, se llevó a cabo una biometría de todos los organismos del sistema. Para seguir los protocolos bioéticos de la institución se anestesiaban las totoabas de un tanque por inmersión en agua de mar con metanosulfonato de triclaína (MS-222), a una concentración de 30 mgL^{-1} por aproximadamente durante 5 minutos o hasta que perdieran el equilibrio, para posteriormente registrar su peso con una báscula (AND, Serie SK-2000WP) y medir la longitud total del

pez con un ictiómetro. Posteriormente se colocaron en un tanque de recuperación antes de ser regresados a sus tanques experimentales (Ross y Ross, 2008).

Durante el bioensayo, después de la tercera semana, se procedió a iniciar la recolección de heces de los organismos en cada tanque. Esto se realizó después de la alimentación y antes de que comenzara el proceso de lixiviación (i.e., estimado en unos 30 minutos después de la alimentación). Se utilizó un tubo de vidrio como sifón para recolectar las heces. Inmediatamente después las heces eran colocadas en un filtro de 140 μm y enjuagadas con agua destilada. Posteriormente fueron colocadas en charolas y se dejaron secar por 24 horas en una estufa a 60°C. Finalmente se almacenaron en refrigeración (4°C) hasta su posterior análisis. Este proceso se repitió hasta que se acumularon 3 gramos de materia seca de heces por tanque.

Al inicio del experimento fueron sacrificados cuatro organismos como muestra inicial y al finalizar tres peces por tanque. Antes del sacrificio por sobredosis de triclaína (200 mg L⁻¹) se anestesiaron los organismos con el protocolo previamente mencionado, se pesaron y se extrajo sangre de la vena caudal con una jeringa de 1 ml. La sangre extraída se colocó en tubos de plástico con anticoagulante EDTA (BD Vacutainer) y se refrigeraron a 4°C hasta su análisis (no más de dos días).

Posteriormente los organismos fueron disecados para extraer el sistema digestivo. Para esto se realizó un corte transversal a unos milímetros del ano y hasta los arcos branquiales, para así exponer la cavidad abdominal sin cortar el intestino. Se separó y pesó el hígado, mientras que el intestino fue almacenado de tres maneras diferentes según el análisis a utilizar. Para histología se utilizó la parte distal del intestino, se enjuagó con agua marina filtrada interna y externamente, posteriormente se colocó en tubos Falcón de 15 mililitros cubriendo el doble del volumen de la sección del intestino con formaldehído al 35%. Para los análisis moleculares se cortaron secciones de tres centímetros de largo a medio centímetro del ano, se limpiaron con agua destilada y se colocaron en tubos Eppendorf con RNAlater (Ambion, USA) y se refrigeraron (4°C). Los intestinos destinados a los análisis de actividad enzimática se almacenaron a -20°C hasta ser utilizados. Por último, se tomaron muestras del músculo de todas las totoabas sacrificadas. Ese mismo día las muestras fueron pesadas y secadas a 60°C en una estufa por 24 horas y posteriormente se almacenaron a 4°C.

2.4. Análisis proximal

Se analizó la composición proximal de las dietas formuladas, así como de las muestras del músculo (inicio y final del bioensayo) para determinar la cantidad de proteínas, lípidos, extracto libre de nitrógeno (ELN), humedad y cenizas.

Se cuantificó la humedad por análisis gravimétrico, secando las muestras a 60°C en una estufa hasta alcanzar el peso constante, no más de 48 horas. Las muestras secas se usaron para cuantificar el contenido de proteínas por el método de micro-Kjeldahl (Ma y Zuazago, 1942). Los lípidos se cuantificaron por el método de Soxhlet (1879) utilizando éter de petróleo. Por último, las cenizas se obtuvieron incinerando las muestras a 550° C durante 8 horas en una mufla (Lindergerg/Blue M, modelo BF51842PBFMC-1) (A.O.A.C., 1990).

El extracto libre de nitrógeno (ELN), que incluye los carbohidratos solubles e insolubles se calculó con la formula $ELN (\%) = 100 - (\% \text{ proteína cruda} + \% \text{ lípidos crudos} + \% \text{ ceniza})$.

2.4.1. Determinación de saponinas en las dietas

Se estimó la cantidad de saponinas en las dietas de manera gravimétrica según el método descrito por Harborne, (1985) y Ezeabara, (2014) el cual consistió en mezclar la muestra, seca y molida, con etanol al 20% en baño maría a 55°C. Posteriormente, la mezcla se filtró y el extracto se redujo por evaporación a un 60% a 90°C. Posteriormente se homogenizó con dietil-éter en un embudo de separación y se dejó reposar hasta que las fases se separaron. El extracto no espumoso se volvió a agitar con dietiléter hasta que cambió a un tono incoloro. Posteriormente las saponinas fueron extraídas con n-butanol y lavadas con NaCl al 5% en el mismo embudo de separación. Se colectó la fase superior en una vaso, previamente pesado, y se dejó evaporar en una estufa a 60°C por 24 horas aproximadamente. Finalmente se procedió a pesar en una balanza analítica (Precisa modelo 92SM-202A).

2.5. Desempeño del crecimiento y eficiencia alimenticia

El desempeño del crecimiento y la eficiencia alimenticia se evaluaron calculando los siguientes índices con los datos recopilados de las biometrías:

- Supervivencia (S); donde N_f es el número final de organismos y N_i el número inicial.

$$S = \frac{N_f}{N_i} \times 100 \quad (1)$$

- Crecimiento (C);

$$C = \text{Peso final (g)} - \text{peso inicial (g)} \quad (2)$$

- Incremento en peso relativo (IPR %);

$$IPR \% = \frac{\text{peso final} - \text{peso inicial(g)}}{\text{peso inicial (g)}} * 100 \quad (3)$$

- Coeficiente de crecimiento térmico (CCT); donde pf es el peso final, pi peso inicial, T temperatura en °C y d el número de días que duró el experimento.

$$CCT = \frac{\left(pf^{\frac{1}{3}} - pi^{\frac{1}{3}} \right)}{(T)(d)} (100) \quad (4)$$

- Tasa de eficiencia proteica (TEP);

$$TEP = \frac{\text{peso ganado}}{\text{proteína consumida}} \quad (5)$$

- Tasa de conversión alimenticia (TCA);

$$TCA = \frac{\text{alimento consumido (g)}}{\text{ganancia en peso (g)}} \quad (6)$$

- Consumo de alimento diario (CAD % día⁻¹);

$$FI = 100 * \frac{\left(\frac{\text{alimento consumido por pez}}{(p_i + p_f)/2}\right)}{\text{días}} \quad (7)$$

- Índice hepatosomático; considerando P_h como el peso del hígado y P_t el peso total del organismo

$$IHS = \frac{P_h}{P_t} \times 100 \quad (11)$$

2.6. Determinación del coeficiente de digestibilidad aparente

El coeficiente de digestibilidad aparente (% CDA) fue calculado por el método de cenizas insolubles en ácido (CIA) según Van Keulen y Young (1977), modificado por Montaña-Vargas *et al.* (2002). Una muestra seca de heces de cada tanque y muestras de cada una de las dietas fueron previamente pesadas e incineradas a 500°C en una mufla (Lindergerg/Blue M, modelo BF51842PBFMC-1). Posteriormente, las muestras de cenizas se hirvieron en ácido clorhídrico dentro de vasos de precipitado cubiertos por vidrios de reloj para evitar la evaporación. Tras cinco minutos en ebullición la solución fue filtrada con un papel Whatman de 110 mm de apertura previamente pesado y lavado con agua destilada. El filtro con las cenizas fue incinerado a 500°C para finalmente registrar por método gravimétrico las cenizas insolubles que fueron retenidas en los filtros. Posteriormente se calculó el coeficiente de digestibilidad utilizando las siguientes formulas;

$$CIA = \frac{\text{Peso de ceniza insolubel}(g)}{\text{Peso de materia seca}(g)} \times 100 \quad (8)$$

$$CDA = \left[100 - \left(\frac{CIA\% \text{ en dieta}}{CIA\% \text{ en heces}} \right) \right] \times 100 \quad (9)$$

2.7. Análisis histológico

Para detectar cambios morfológicos por una posible enteritis en *T. macdonaldi*, se realizó un análisis histológico del intestino distal. Las muestras del intestino se colocaron en formaldehído al 37% con buffer fosfato durante 72 horas. Posteriormente, cada sección de intestino se subdividió en más de tres secciones de aproximadamente 4 mm de ancho y se colocaron en cartuchos para histología para que fueran deshidratadas gradualmente en etanol (80-100%) y xileno. Posteriormente se incluyeron en parafina y se cortaron de manera transversal en secciones de 5-7 μm de espesor en un micrótomó rotatorio (Leica RM2245). Las secciones se tiñeron con hematoxilina-eosina y hematoxilina-eosina-azul alcian pH 2.5.

Las laminillas histológicas se visualizaron bajo un microscopio Axioscope.A1 (Zeiss®) y fueron evaluadas por el sistema de puntuación semicuantitativo propuesto por Urán (2008). Por este método se calificaron las siguientes características; la abundancia de vacuolas supranucleares (VSN), la cantidad de células mucosas en los pliegues mucosos (CM) las cuales fueron detectadas con la tinción hematoxilina-eosina-azul alcian pH 2.5, el grosor de la lámina propia (LP) y la infiltración de granulocitos eosinófilos (GE), dentro de una escala de 1 a 5 en la que 5 es la condición más severa de enteritis según el estudio previamente mencionado (Anexo).

También se capturaron imágenes fotográficas con la cámara para microscopio (AxioCam) y con el programa ZEN 3.4 (blue edition) se midieron y contaron las estructuras morfológicas del intestino que se ha registrado sufren mayor daño al incluir harinas vegetales en las dietas para peces marinos (Fuentes-Quesada *et al.*, 2018; Zhu *et al.*, 2020).

Por ejemplo, se contaron la cantidad de pliegues mucosos (#PM) en cada sección histológica, se calculó el porcentaje de pliegues mucosos que se encontraban fusionados en la zona de la mucosa sub-epitelial (%PM/MS-E), la longitud de los pliegues mucosos (Long PM) se midió desde la base del pliegue hasta la punta, la altura de los enterocitos (Altura E), la longitud de la lámina propia (Long LP), la longitud de la mucosa sub-epitelial (Long MS-E) y el diámetro del intestino (DI). Cada parámetro se midió 30 veces por sección y se evaluaron 3 secciones de intestino por muestra de pez (Figura 5).

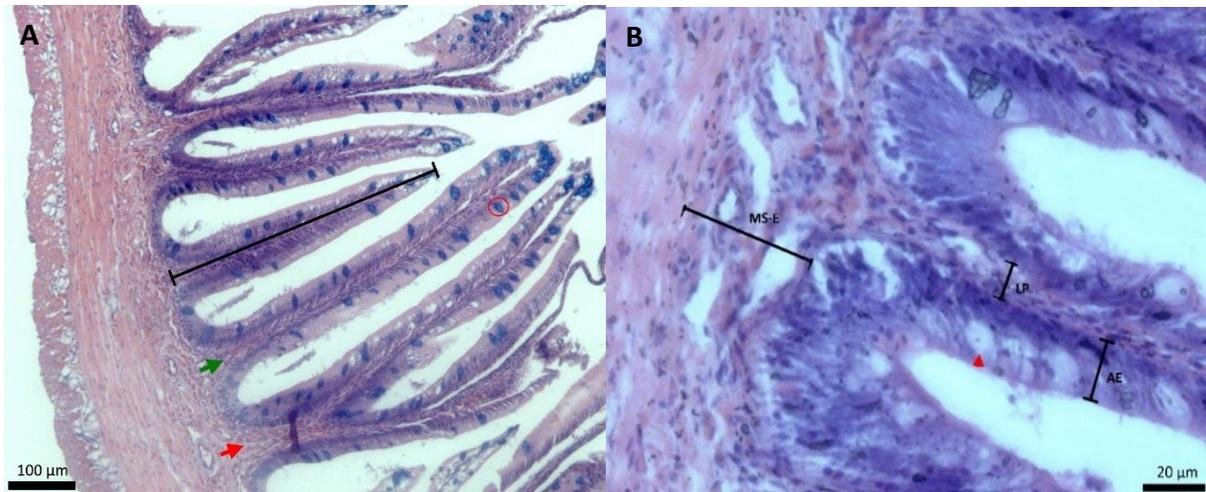


Figura 5. Estructuras histológicas del intestino distal de *Totoaba macdonaldi*. A. Se muestra la longitud de un pliegue mucoso en negro (Long PM), las flechas muestran un PM en verde y en rojo pliegues fusionados en la zona submucosa (%PM/MS-E), en el círculo rojo se señala una célula mucosa. B. señala las medidas de la mucosa subepitelial (MS-E), lamina propia (LP) y la altura de los enterocitos (AE).

2.8. Actividad enzimática

2.8.1. Extracto y ensayos enzimáticos

Las muestras congeladas del intestino fueron liofilizadas y posteriormente cada muestra fue pesada. Para extraer los extractos enzimáticos se homogenizaron en 10 ml de agua destilada con un homogeneizador de tejidos (Polytron PT 1200, Kinematica AG) en frío (0-4°C). Posteriormente fueron centrifugados a 8228.48 g (8000 rpm) durante 20 minutos a 4°C en una centrífuga Eppendorf 5810 R. Se dividió el sobrenadante en aproximadamente 10 alícuotas equitativas en tubos Eppendorf de 0.6 ml por muestra de intestino y fueron almacenadas a -80°C hasta su análisis. Para determinar la actividad enzimática se realizaron ensayos por métodos espectrofotométricos. Se utilizaron enzimas comerciales como controles positivos. Se utilizaron 3 réplicas por extracto enzimático para cada enzima y los resultados se estandarizaron en unidades enzimáticas por g de intestino ($U \text{ intestino}^{-1}$). Una unidad de actividad enzimática en los tres ensayos se definió como la cantidad de enzima requerida para provocar un aumento de 1 unidad de absorbancia por minuto (Applebaum *et al.*, 2001; Fuentes-Quesada *et al.*, 2018).

2.8.1.1. Actividad de la tripsina

Se siguió el método propuesto por Erlanger (1961) para determinar la actividad de la tripsina en el que se utilizó 1 mM de BAPNA (N -benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida hidroclicídrico, Sigma B-4875) en 500 μ L de DMSO como sustrato. La reacción se realizó con 50 mM buffer Tris-HCl (20 mM CaCl₂, pH 8.2) y se incubó a 37°C por 30 min. La reacción se detuvo con ácido acético al 30% y se registró la absorbancia a 410 nm en un lector de placas Varioskan Flash Thermo Scientific. Se utilizó agua destilada como blanco de lectura y como control positivo en lugar del extracto enzimático se utilizó enzima comercial de páncreas porcino (SIGMA T-0303).

2.8.1.2. Actividad de la lipasa

La actividad de la lipasa se estimó de acuerdo con el método de Gjellesvik (1992), usando 56 mM de Nitrofenil miristato (Sigma 70124) como sustrato disuelto en 0.5 mL de DMSO. La reacción se inició con 15 mM de buffer Tris-HCl y 25 mM de taurocolato de sodio a un pH de 8.5 y a 37°C. El incremento en absorbancia de la reacción se midió cada minuto a 405 nm por 60 minutos y como control positivo se utilizó lipasa comercial Tipo II de páncreas porcino (SIGMA L-3126).

2.8.1.3. Actividad de la amilasa

Se utilizó el método descrito en el manual de (Worthington Biochemical Corporation, 1993). Para esto se utilizó almidón comercial (Sigma S9765) al 1% como sustrato. La reacción inició con 20 mM del buffer de fosfato de sodio, 6 mM de cloruro de sodio y como colorante el ácido dinitrosalicílico al 2% en un pH de 6.9. Posteriormente los tubos se incubaron en un baño de agua hirviendo por 5 minutos. Finalmente se dejaron temperar y se mezclaron para leer la absorbancia a 540 nm. En este caso se realizó una curva estándar de maltosa para calcular la cantidad de maltosa que fue liberada durante la reacción y como control positivo la amilasa comercial de páncreas porcino Tipo IV-B (SIGMA A3176-500KU).

2.9. Análisis inmunológicos

2.9.1. Recuento de leucocitos

Siguiendo el método de Del Rio-Zaragoza *et al.* (2011), se colocaron 20 μL de sangre con anticoagulante en un tubo de ensayo y se agregaron 4 ml de solución Natt-Herrick en relación 1:200, se mezclaron y se dejaron reposar a temperatura ambiente durante cinco minutos. Posteriormente se realizó el conteo de leucocito en una cámara de Neubauer, agregando una gota de la solución en ambos extremos de la cámara y dejando reposar por cinco minutos. El número de leucocitos se calculó con la siguiente fórmula:

$$\# \text{ de cel blancas } \mu\text{l}^{-1} = \frac{(\text{Total de células blancas contadas} \times 10)}{8} \times 200 \quad (10)$$

2.9.2. Actividad del estallido respiratorio (AER)

Se analizaron las muestras de sangre siguiendo la metodología propuesta por Ibrahim *et al.* (2010). Brevemente, se colocaron 100 μl de sangre con anticoagulante y 100 μl de nitroazul de tetrazolium al 0.2%, NBT (Sigma-Aldrich, CAS 298-83-9) en un tubo de 0.6 ml y se incubó por 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente se tomaron 50 μl de la suspensión de las células sanguíneas con NBT y se colocaron en un tubo Eppendorf con 1 ml de N-dimetil formamida, se centrifugaron por 5 minutos a 1157.13 g (3000 rpm en una centrífuga Eppendorf 5810 R a 4°C). Se tomaron 250 μl de sobrenadante y se colocó en una microplaca, se midió la absorbancia a 620 nm. Los resultados se estandarizaron en unidades de absorbancia por μl ($\text{U } \mu\text{l}^{-1}$).

2.10. Análisis de expresión de genes

Se evaluó el efecto de las macroalgas sobre la expresión relativa de algunos genes de la respuesta inmunológica como la interleucina 8 (*il8*), la inmunoglobulina M (*igm*) y de estrés celular la proteína de choque térmico 70 (*hsp70*) y la acuaporina 8 (*aqp8*). Para la expresión génica se utilizaron las muestras del intestino distal que se encontraban en RNAlater (Ambion) a 4°C.

Para extraer el ARN total de las muestras se utilizó un kit de RNA comercial, NucleoSpin®RNA. Se removió el DNA genómico (gDNA) por medio de la digestión con DNasa en columna usando rDNase a 37°C por 30 minutos. Se evaluó la calidad y cantidad del ARN mediante espectrofotometría a 260/280nm con el equipo Nanodrop® LITE, Thermo Fisher Scientific, USA, las muestras en el rango de 1.9 y 2.1 fueron utilizadas el proceso de retrotranscripción. El ARN total (500 ng) se utilizó en una reacción de 20 µl usando el kit de transcripción reversa de cDNA de alta capacidad (Applied Biosystems; Carisbad CA, USA) en un termociclador Verity 96 (Applied Biosystems) para obtener el ADN complementario (cDNA). El programa de retrotranscripción consistió en 10 min a 25°C, 120 min a 37°C, 5 min a 85°C y al final se mantuvo a 4°C.

Finalmente se utilizó la técnica de PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR) utilizando en la reacción el reactivo SYBR® Select Master Mix (Applied Biosystems, USA), 1 ng de cDNA y los oligonucleótidos sentido y antisentido (200 nM cada uno, indicados en la **Tabla 2**) en un volumen de 10 µl total, en placas de reacción MicroAmp® Fast Optical de 96 pozos (Applied Biosystems, USA) cubiertas con una película adhesiva MicroAmp® Optical (Applied Biosystems). La cuantificación relativa de los genes se calculó por el método de $\Delta\Delta C_t$ utilizando un umbral automatizado y una línea base para determinar los valores de C_t (Livak y Schmittgen, 2001). La amplificación comprendió la desnaturalización inicial y activación de la polimerasa por 10 minutos a 95°C, seguido de 40 ciclos por 15 s a 95°C, posteriormente por 45 segundos a 60°C y una curva de fusión de 60°C a 95°C por 20 minutos. Para optimizar las condiciones del RT-qPCR se hizo a una temperatura de anillamiento (60°C), la concentración de oligonucleótido (200 nM) y la concentración del molde (cinco series de dilución 1:10 de 10 ng a 100 fg de ARN). Los número de acceso en GenBanck de los genes evaluados son los siguientes: HM754483.1 para *18S* como gen de referencia, XM_023404852 para *hsp70*, KY173353 para *igm*, KU847777 para *il8* y XM_023423310 para *aqp8*. Como calibrador se utilizó el cDNA de dos muestras del tratamiento DPB0.

Tabla. 2. Secuencia de pares de oligonucleótidos utilizados en la reacción de qPCR, se muestra el tamaño del amplicón en pares de bases (pb), eficiencias de reacción (E) y coeficientes de determinación de Pearson (R^2).

Gen	Secuencia sentido (5' – 3')	Secuencia antisentido (3' – 5')	Tamaño pb	E	R^2
<i>18S</i>	CGGTTCTATTTTGTGGGTTTTTC	CTTTCGCTTTCGTCCGTCTT	126	0.98	1.00
<i>il8</i>	CCTGAGAAGTCTGGGAGTCCG	GGAGTTGGGAGGGATGATCT	179	0.94	0.99
<i>igm</i>	CAGACAGGCTCCTGGAAAAG	GTGCGTCTCGAGCACAATAA	188	0.95	0.99
<i>hsp70</i>	CCGTTTTGATGACACAGTTG	CGAGGTAGGCTTCAGCAATC	103	1.00	0.99
<i>aqp8</i>	GCACAAATCAGGTGAGCAGA	CCCAGACAGGGCTGAAATAA	187	1.03	0.98

2.11. Análisis estadísticos

El análisis estadístico se realizó en el software R versión 3.6.1. Primero se probaron los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas de los datos obtenidos con las pruebas estadísticas de Shapiro-Wilk's y Barlett respectivamente. Se realizó un análisis de varianza de una vía con nivel de significancia de $P < 0.05$ para las variables de crecimiento, eficiencia alimenticia, composición muscular, actividad enzimática, análisis sanguíneos y expresión de genes. En caso de encontrar diferencias significativas entre tratamientos se utilizó una prueba *post hoc* de Tukey. Los datos del IHS fueron transformados por raíz cuadrada para su evaluación. En el caso de los datos de histología se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis y una prueba de Dunn como análisis *post hoc*.

Capítulo 3 . Resultados

3.1. Desempeño del crecimiento y eficiencia alimenticia

El peso promedio inicial de los juveniles de *T. macdonaldi* fue de aproximadamente 157.8 ± 23 gr. Como se observa en la Figura 6 hubo un incremento gradual del peso de manera similar en todos los tratamientos durante las primeras dos semanas del bioensayo, a partir de la cuarta semana se observaron diferencias entre los tratamientos. Cabe destacar que la supervivencia de los organismos fue del 100% durante el bioensayo.

Al finalizar el experimento los juveniles de *T. macdonaldi* alimentados con las dietas ALG1 y ALG2 resultaron con crecimiento, IPR y CCT significativamente menor que los demás tratamientos, como se muestra en la Tabla 3. En cuanto al peso final y TEP fue significativamente mayor para los peces alimentados con la dieta DPB0 en comparación con los alimentados con las dietas ALG1 y ALG2, pero no con respecto a los peces del tratamiento DPB3. Por otro lado, la TCA y CAD no mostraron diferencias significativas entre los tratamientos.

Con respecto al índice hepatosomático, en los peces alimentados con la dieta ALG2 fue significativamente mayor, por el contrario, los peces alimentados con la dieta DPB3 mostraron un índice de 0.89%.

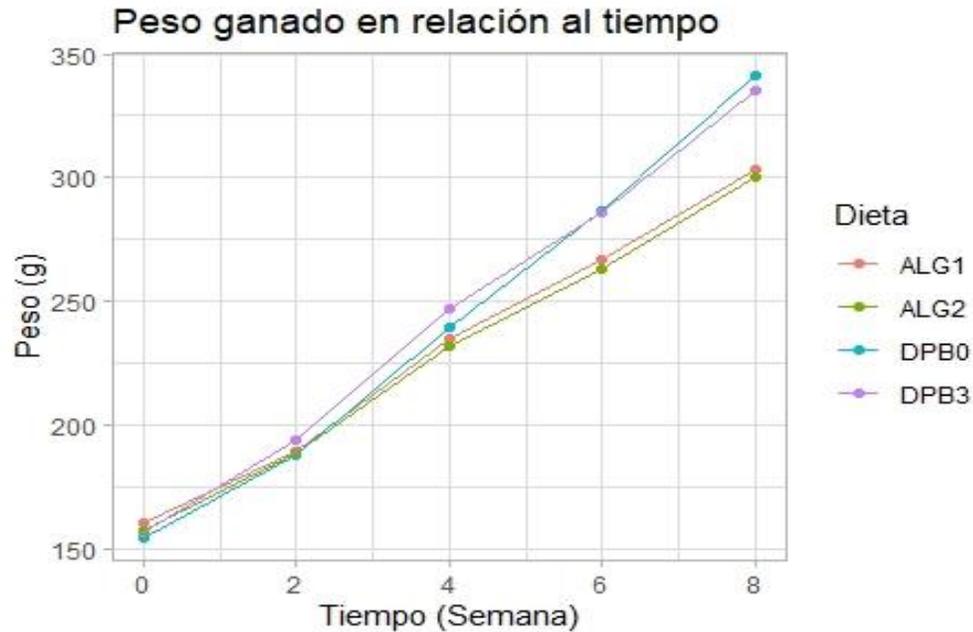


Figura 6. Incremento del peso de juveniles de *Totoaba macdonaldi* alimentados con dietas que incluyen macroalgas con relación al tiempo. La imagen muestra el peso promedio registrado en las biometrías durante 56 días de los 4 tratamientos evaluados; ALG1 y ALG2= dietas comerciales con harina de macroalgas y plantas, DPB0 = dieta sin prebiótico y soja, DPB3 = dieta con prebiótico y soja.

Tabla 3. Desempeño biológico y eficiencia alimenticia de juveniles de *Totoaba macdonaldi* alimentados con las dietas experimentales después de 56 días.

	ALG1	ALG2	DPB0	DPB3	Valor de P
Supervivencia (%)	100	100	100	100	
Peso inicial (g)	157.8 ± 25.1	161 ± 23.1	155.2 ± 20.9	157.3 ± 23.4	0.322
Peso final (g)	302.6 ± 49.6 ^{bc}	299.7 ± 45.7 ^c	341 ± 52.2 ^a	334.8 ± 56.3 ^{ab}	0.002
Crecimiento (g)	141.3 ± 3.3 ^b	141.3 ± 8.1 ^b	185.5 ± 21.1 ^a	177.5 ± 7.7 ^a	0.002
IPR (%)	87.9 ± 3.2 ^b	89.6 ± 1.5 ^b	119.5 ± 11.7 ^a	113.1 ± 6.2 ^a	0.0008
CCT	0.97 ± 0.01 ^b	0.98 ± 0.02 ^b	1.23 ± 0.09 ^a	1.18 ± 0.03 ^a	0.0006
TEP	1.3 ± 0.12 ^c	1.4 ± 0.12 ^{bc}	1.8 ± 0.08 ^a	1.6 ± 0.13 ^{ab}	0.001
TCA	1.4 ± 0.06	1.4 ± 0.15	1.3 ± 0.20	1.4 ± 0.06	0.579
CAD (% día ⁻¹)	1.6 ± 0.10	1.6 ± 0.15	1.8 ± 0.12	1.8 ± 0.11	0.181
IHS (%)	1.02 ± 0.12 ^{ab}	1.15 ± 0.13 ^a	0.99 ± 0.11 ^b	0.89 ± 0.07 ^b	0.0002

- Incremento en peso relativo (IPR); coeficiente de crecimiento térmico (CCT); tasa de eficiencia proteica (TEP); tasa de conversión alimenticia (TCA); consumo de alimento diario (CAD); índice hepatosomático (IHS)
- DPB0 = dieta con soja, DPB3 = dieta con soja y prebiótico, ALG1 y ALG2 = dietas comerciales con macroalgas y harinas de origen vegetal. Los valores representan la media ± desviación estándar (D.E.).
- El valor de P del ANOVA de una vía con un nivel de significancia $\alpha=0.05$ y las letras en superíndice indican diferencias significativas entre tratamientos a>b>c en el análisis *post hoc* de Tukey.

3.2. Composición proximal del músculo

En la Tabla 44. se muestra la composición proximal del músculo de juveniles de *T. macdonaldi* al inicio y al final del bioensayo. No se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de nutrientes en el músculo ($P > 0.05$) de los organismos entre los diferentes tratamientos, con un porcentaje en promedio de 20% de proteína, 1.3% de lípidos, 77% humedad, 1.5% de ceniza y 1.1% de extractos libres de nitrógeno.

Tabla 4. Composición proximal (% en peso húmedo) del músculo de juveniles de *Totoaba macdonaldi* alimentados con las dietas experimentales después de 56 días.

	Inicial	ALG1	ALG2	DPB0	DPB3	Valor de P
Humedad	77.5 ± 1.1	76.7 ± 0.4	77 ± 1.3	76.2 ± 0.4	76.6 ± 0.8	0.664
Proteína	18.7 ± 0.9	18.9 ± 0.5	19.4 ± 1.2	20.3 ± 0.5	19.7 ± 0.4	0.227
Lípido	0.85 ± 0.2	1.01 ± 0.2	1.4 ± 0.3	1.5 ± 0.6	1.3 ± 0.7	0.651
Ceniza	1.4 ± 0.1	1.5 ± 0.1	1.5 ± 0.1	1.4 ± 0.1	1.5 ± 0.1	0.4
ELN + fibra	1.6 ± 0.5	1.8 ± 0.3	0.7 ± 0.5	0.6 ± 0.8	0.9 ± 0.5	0.083

- Extracto libre de nitrógeno (ELN).
- DPB0 = dieta con soya, DPB3 = dieta con soya y prebiótico, ALG1 y ALG2 = dietas comerciales con macroalgas y harinas de origen vegetal. Los valores representan la media ± D.E. El valor de P del ANOVA de una vía con un nivel de significancia $\alpha = 0.05$ de los resultados finales

3.3. Determinación del coeficiente de digestibilidad aparente

Se encontraron diferencias significativas en la digestibilidad aparente de la materia seca de las dietas ($P < 0.05$) (Figura 7). La dieta DPB0 fue la de mayor digestibilidad con un porcentaje de 72.42 ± 2.44 , aunque no hay diferencia significativa con respecto a la dieta DPB3. La dieta de menor digestibilidad fue ALG1 con $43.72 \pm 3.19\%$ y sin diferencias estadísticamente significativas con respecto a la dieta ALG2.

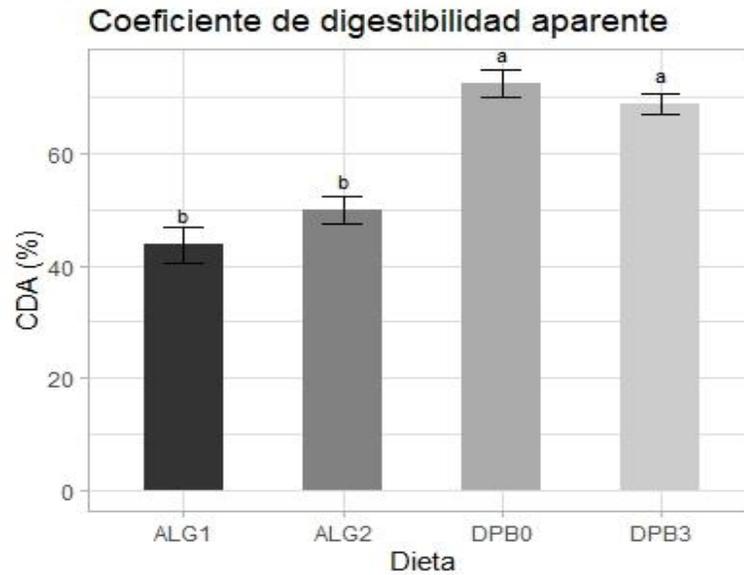


Figura 7. Coeficiente de digestibilidad aparente de las diferentes dietas (CDA%). Las letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos. Mientras que las barras indican la media \pm D.E. DPB0 = dieta con soya, DPB3 = dieta con soya y prebiótico, ALG1 y ALG2= dietas comerciales con macroalgas.

3.4. Actividad enzimática en el intestino

No se observaron diferencias significativas en la actividad de las enzimas intestinales tripsina ($P=0.69$), lipasa ($P=0.447$) y amilasa ($P=0.737$), en los peces de los diferentes tratamientos. Cabe señalar que en el caso de la tripsina y amilasa hubo una mayor actividad en los peces del tratamiento DPB0 y con respecto a la lipasa se observó mayor actividad enzimática en el tratamiento ALG2 (Figura 8).

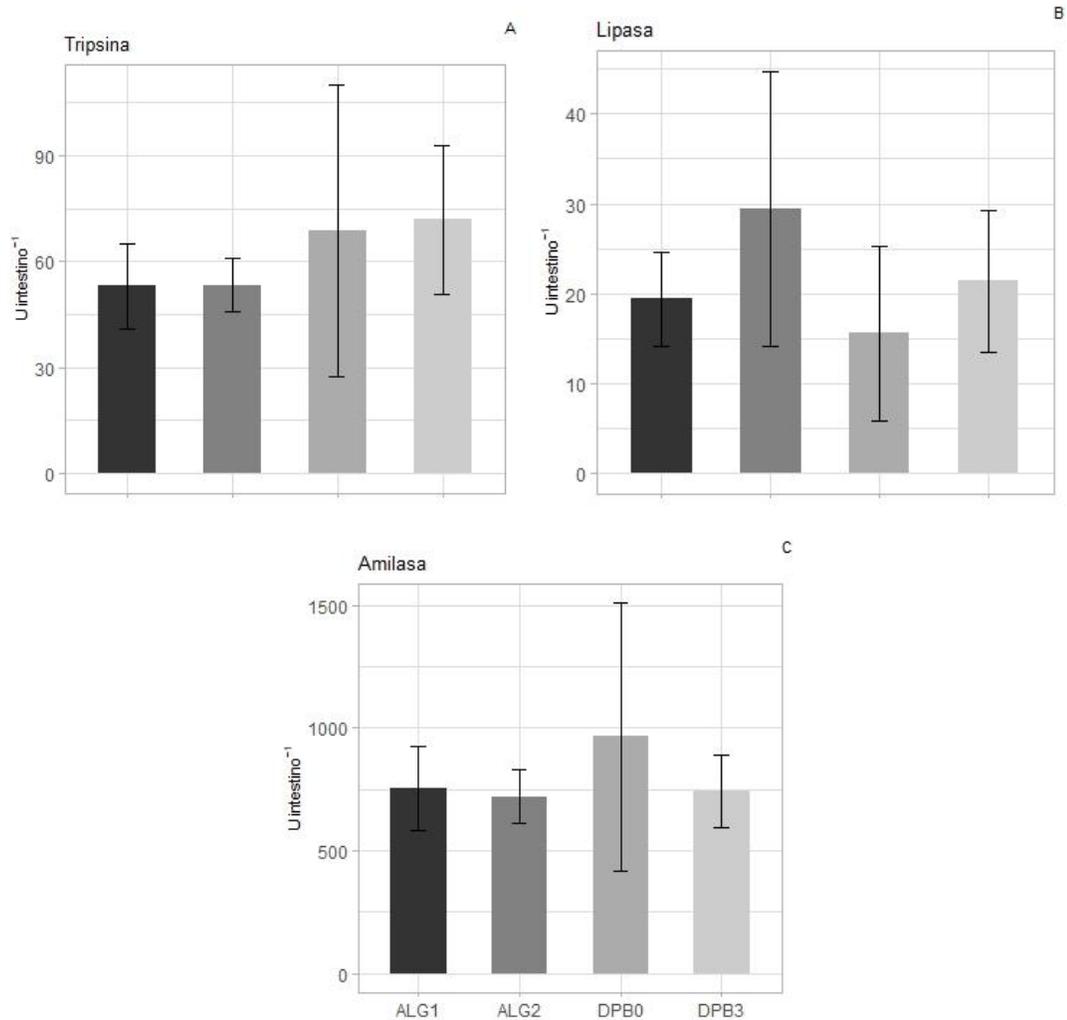


Figura 8. Actividad enzimática total ($U \text{ intestino}^{-1}$) de la tripsina (A), lipasa (B) y amilasa (C) en el intestino de juveniles de *Totoaba macdonaldi* alimentados con las dietas experimentales después de 56 días. Las barras representan la media \pm D.E. DPB0 = dieta con soya, DPB3 = dieta con soya y prebiótico, ALG1 y ALG2 = dietas comerciales con macroalgas

3.5. Análisis inmunológicos

No se encontraron diferencias significativas en los análisis sanguíneos realizados en los juveniles de *T. macdonaldi* en los diferentes tratamientos; ni en la cantidad de leucocitos en la sangre ni en la actividad del estallido respiratorio. Aunque se puede observar en la Tabla 5 que la AER fue mayor con respecto a la muestra inicial, de $30 U \mu\text{l}^{-1}$ hasta $50\text{-}62 U \mu\text{l}^{-1}$ en los tratamientos. En el conteo de leucocitos las muestras

del tratamiento ALG1 tuvieron una mayor cantidad leucocitos por microlitro de sangre y por el contrario la dieta DPB3 fue la de menor cantidad ($22.83 \pm 8.19 \times 10^3$).

Tabla 5. Análisis inmunológicos en juveniles de *Totoaba macdonaldi* alimentados con las dietas experimentales después de 56 días. Los valores representan la media \pm D.E. Las letras en superíndice diferente indican diferencias significativas entre tratamientos.

	Inicial	ALG1	ALG2	DPB0	DPB3	Valor de P
AER ¹	0.30 \pm 0.03	0.52 \pm 0.14	0.50 \pm 0.14	0.55 \pm 0.10	0.62 \pm 0.06	0.596
# de leucocitos ²	27.92 \pm 5.44	29.83 \pm 11.29	25.94 \pm 5.68	25.01 \pm 4.90	22.83 \pm 8.19	0.751

¹ AER = Actividad del estallido respiratorio, absorbancia a 620 nm ($U \mu l^{-1}$)

² número de leucocitos $\times 10^3 \mu l^{-1}$ de sangre

DPB0=dieta c/ soya, DPB3=dieta c/soya + prebiótico, ALG1 y ALG2=dietas c/ macroalgas y harinas vegetales.

3.6. Análisis histológicos

El sistema de puntuación semicuantitativo mostró para todos los tratamientos un promedio mayor a 3.5 en la escala de 1 a 5, lo cual indica afectación en las estructuras intestinales. Entre estas afecciones se incluyen una disminución en la cantidad de vacuolas supranucleares de los enterocitos, un aumento del número de células mucosas en los pliegues intestinales, engrosamiento de la lámina propia e infiltración de granulocitos eosinófilos en los pliegues. Estas características son algunos signos patológicos de la enteritis en el intestino de las totoabas evaluadas después de 56 días de bioensayo. No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos en ninguna de los valores de estimados para estos parámetros (Figura 10).

Cabe destacar que el tratamiento ALG2 mostró un mayor número de células mucosas, además de que se observaron diferencias en las imágenes histológicas. Por ejemplo, con la tinción hematoxilina-eosina se observaron precipitados en los pliegues mucosos, que con un análisis más específico como, la tinción azul-alcián, fueron identificados como células mucosas caracterizados por una diferente coloración (Figura 9).

Por otro lado, en las medidas morfológicas del intestino de los peces no se encontraron diferencias significativas en el número de pliegues mucosos entre los tratamientos, ni en el porcentaje de pliegues fusionados (Figura 10 I-L). Sin embargo, es importante mencionar que fue un porcentaje de fusión en más del 43% de su totalidad. Con respecto a la longitud de los pliegues de las mucosas intestinales en los cortes histológicos del tratamiento ALG2 se observaron pliegues más largos con respecto a los demás

tratamientos. El tamaño de los enterocitos fue de mayor tamaño en los tratamientos ALG2 y DPB0. El grosor de la lámina propia fue mayor en ALG1 en comparación con los demás tratamientos mientras que la mucosa sub-epitelial mostró mayor engrosamiento en los tratamientos DPB. Por último, el valor del diámetro intestinal fue similar en todos los tratamientos a excepción de DPB3 que fue significativamente menor (Tabla6).

Tabla 6. Análisis histológico de juveniles de *Totoaba macdonaldi* alimentados con las dietas experimentales después de 56 días. Sistema de puntuación semicuantitativo y evaluación de medidas morfológicas.

Sistema de puntuación semicuantitativo					
	ALG1	ALG2	DPB0	DPB3	Valor de P
VSN	3.7 ± 1	3.9 ± 1.2	4 ± 0.3	4.6 ± 0.3	0.144
CM	4.2 ± 0.5	5 ± 0.3	3.4 ± 0.9	4.3 ± 0.5	0.119
LP	3.7 ± 1.1	4 ± 0.5	3.8 ± 0.9	3.8 ± 0.5	0.929
GE	3.9 ± 0.6	4 ± 0.7	3.8 ± 0.6	4 ± 0.9	0.827
Promedio	3.8 ± 0.5	4 ± 0.4	3.7 ± 0.6	4 ± 0.3	0.749
Evaluación de medidas morfológicas					
# PM	60.55 ± 10.7	62 ± 8.2	60.55 ± 8.6	53.55 ± 6.8	0.0785
% PM/ MS-E	58.08 ± 13.5	59.36 ± 9	54.19 ± 12.2	43.54 ± 18.3	0.182
Long PM	475.11 ± 128.9 ^b	557.29 ± 152.7 ^a	510.7 ± 200.4 ^b	512.93 ± 174.7 ^b	>0.001
Altura E	28.3 ± 8.4 ^b	31.88 ± 10.2 ^a	31.94 ± 9.9 ^a	28.23 ± 8.3 ^b	>0.001
Long LP	35.13 ± 28.8 ^a	28.34 ± 22.6 ^b	28.06 ± 22.9 ^b	25.52 ± 19 ^b	>0.001
Long MS-E	61.92 ± 20.8 ^b	59.55 ± 24.2 ^b	64.22 ± 24.6 ^a	67.46 ± 20.8 ^a	>0.001
DI	3.4 ± 0.7 ^a	3.4 ± 0.6 ^a	3.6 ± 1.9 ^a	3.2 ± 0.8 ^b	0.0003

- Los valores representan la media ± D.E. Las letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos.
- DPB0 = dieta con soya, DPB3 = dieta con soya y prebiótico, ALG1 y ALG2 = dietas comerciales con macroalgas.
- Pliegues mucosos (PM); vacuolas supranucleares (VSN); células mucosas (CM); lámina propia (LP); mucosa sub-epitelial (MS-E); granulocitos eosinófilos (GE); número total de pliegues mucosos en el intestino (#PM)*; porcentaje de pliegues mucosos con engrosamiento en la mucosa sub-epitelial (%PM/MS-E); longitud de los pliegues mucosos, µm (Long PM); altura de los enterocitos, µm (Altura E); longitud de la lámina propia, µm (Long LP); longitud de la mucosa sub-epitelial, µm (Long MS-E); diámetro del intestino, mm (DI). *El número de pliegues por corte histológico.

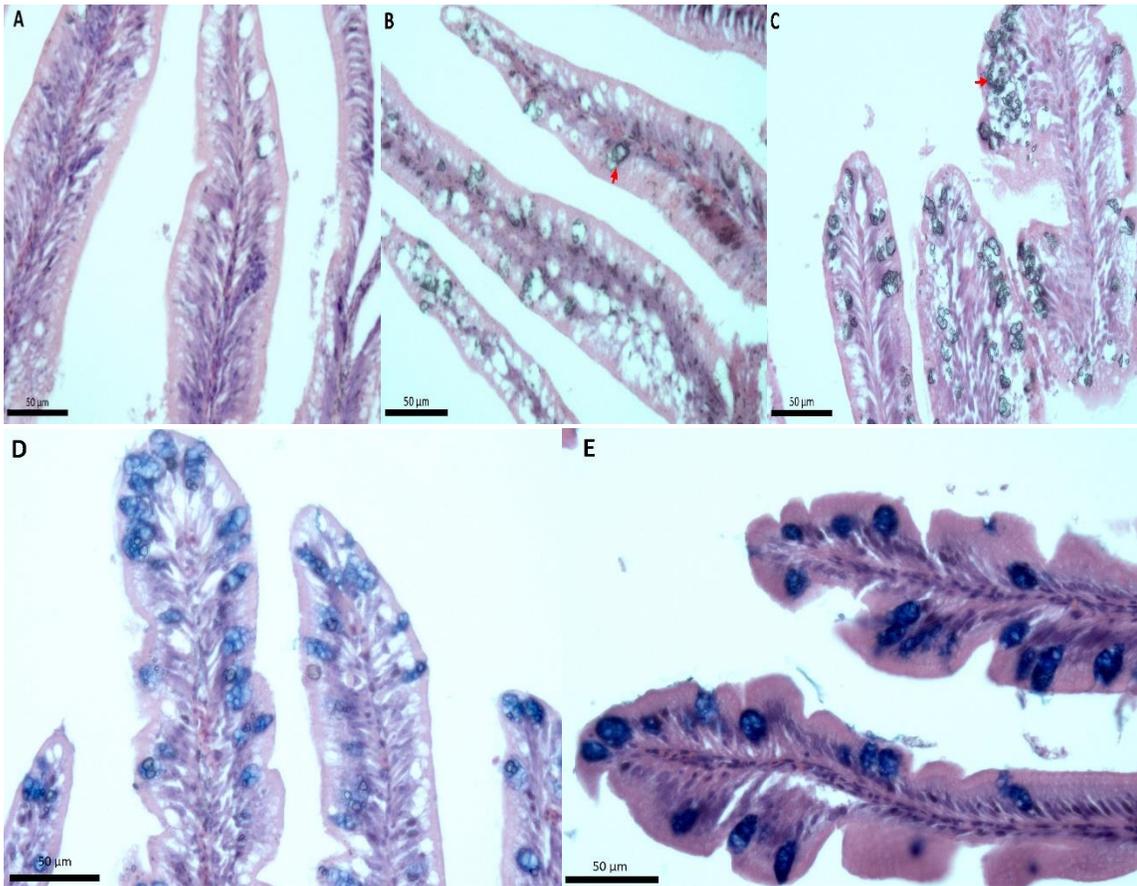


Figura 9. Células mucosas en el intestino distal de *Totoaba macdonaldi*. Las figuras A-C fueron teñidas con hematoxilina-eosina, la figura A muestra pliegues mucosos de totoaba alimentada con dieta DPB0, B con DPB3 mientras que la figura C con dieta ALG1, se señalan los precipitados observados en las totoabas de los tratamientos donde las dietas incluyen macroalgas. Las figuras D y E se tiñeron hematoxilina-eosina y azul alcian pH 2.5, la figura D muestra células mucosas del tratamiento DPB0, la figura D del tratamiento ALG1 las cuales se observan en diferente coloración.

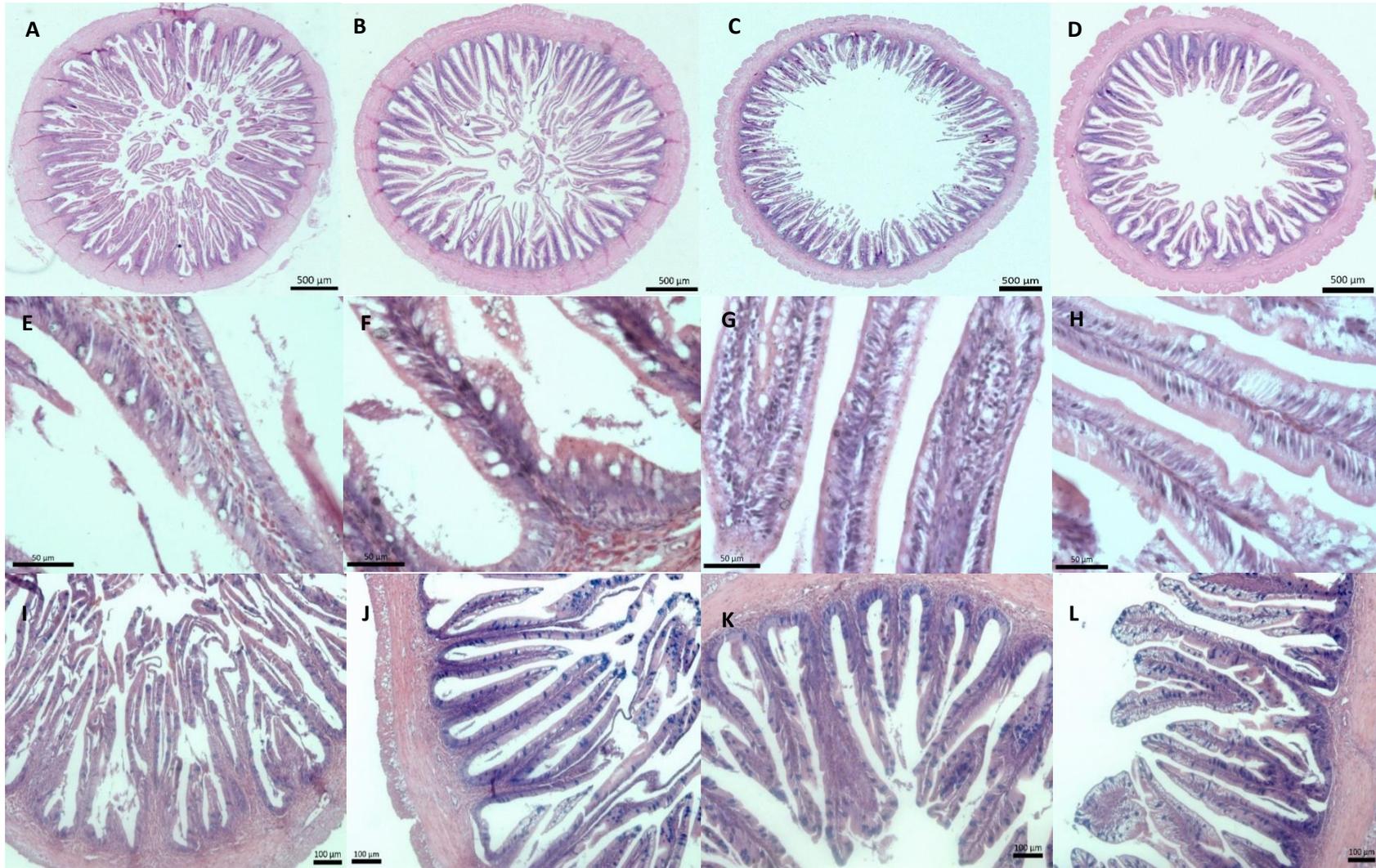


Figura 10. Imágenes histológicas del intestino distal de *Totoaba macdonaldi*. En las imágenes se muestran algunos de los cambios morfológicos en el intestino, A, E, I pertenecen al tratamiento DPB0. B, F, J=DPB3; C, G, K=ALG1; D, H, L=ALG2. En la primera fila se pueden observar la longitud de los pliegues mucosos y la abundancia de estos. En las imágenes E-H se puede observar el grosor de la lámina propia, así como infiltración de granulocitos eosinófilos teñidos de rojo. Las imágenes I-L teñidas con azul alcian muestran la cantidad de células mucosas presentes en los pliegues intestinales.

3.7. Análisis de expresión de genes

Se observaron diferencias significativas en la expresión de genes en el intestino distal de *T. macdonaldi* en los diferentes tratamientos. La expresión relativa de los genes cuantificados se presenta en la Figura 11. Con respecto a la expresión del gen *il8* el tratamiento ALG2 mostró una expresión significativamente mayor que los tratamientos DPB0 y DPB3, sin embargo, con respecto a ALG1 no mostró diferencias significativas. El tratamiento DPB3 mostró una expresión significativamente menor que *igm* con respecto a los demás tratamientos. En cuanto al gen de estrés celular, *hsp70* en el tratamiento ALG1 hubo una expresión significativamente mayor con respecto a ALG2. Mientras que la expresión del gen *aqp8* fue significativamente menor en los tratamientos ALG1 y DPB3.

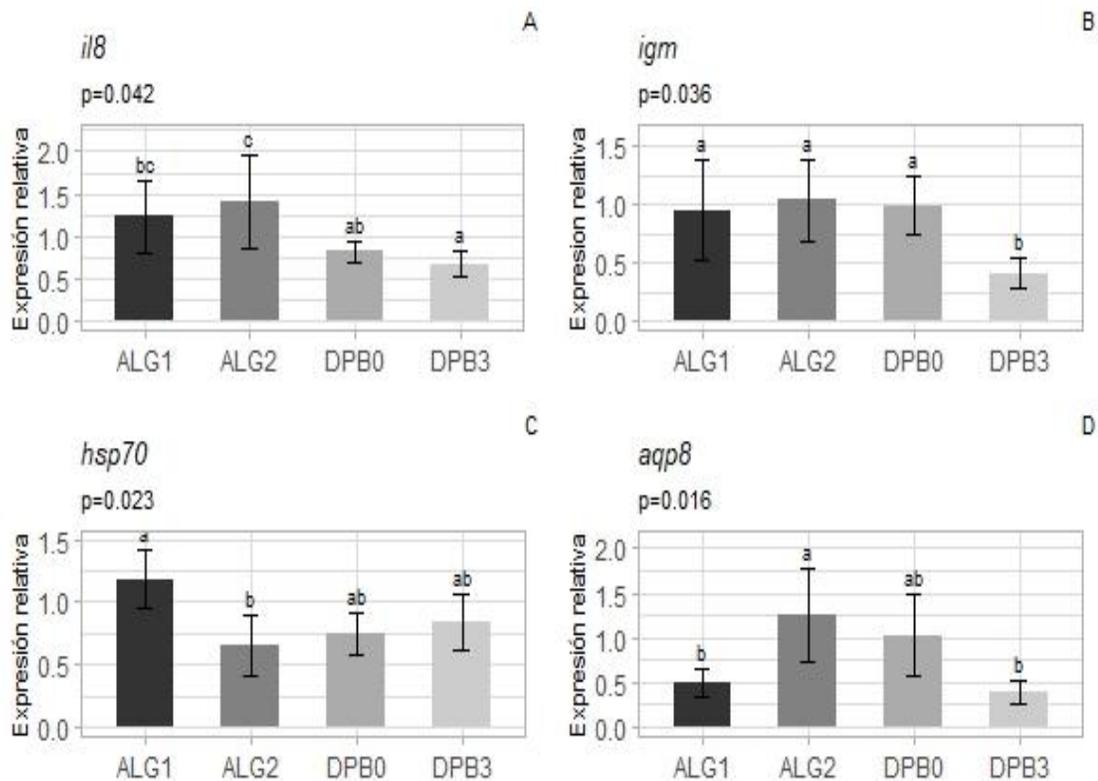


Figura 11 Expresión de genes de *il8* (A), *igm* (B), *hsp70* (c) y *aqp8* (d) en el intestino distal de juveniles de *Totaba macdonaldi* alimentados con las dietas experimentales después de 56 días. Las barras representan la media ± DE. las letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos a>b>c en el análisis post hoc de Tukey, el valor de P del ANOVA de una vía con un nivel de significancia $\alpha=0.05$. DPB0 = dieta con soya, DPB3 = dieta con soya y prebiótico, ALG1 y ALG2 = dietas comerciales con macroalgas. .

Capítulo 4 . Discusión

Los resultados de este estudio muestran los efectos de la inclusión de las macroalgas y otros ingredientes alternativos como sustitutos parciales de la harina de pescado, tanto en el desempeño biológico como en la capacidad digestiva y la salud intestinal de los juveniles de *T. macdonaldi*, explorando variables de respuesta clásicas y algunas técnicas más recientes, como las herramientas moleculares. La integración de diversas variables provee una representación más clara de los eventos fisiológicos que pueden ocurrir al incluir nuevos ingredientes en las dietas experimentales. Actualmente existe un gran volumen de investigaciones en nutrición acuícola dedicadas a la evaluación de nuevos ingredientes con buen rendimiento biológico con el objetivo de disminuir la demanda del uso de la harina de pescado y las consecuencias ambientales que conlleva su producción. El uso de las macroalgas en las dietas acuícolas como ingrediente funcional puede tener un efecto positivo en la sostenibilidad de la acuicultura en general y particularmente para el cultivo de *T. macdonaldi*.

4.1. Desempeño del crecimiento y eficiencia alimenticia

La tasa de crecimiento de *T. macdonaldi* fue similar a lo que previamente se ha reportado en la especie (CCT entre 0.97 y 1.2) inclusive en totoabas alimentadas con dietas que incluyen una menor cantidad de ingredientes vegetales (Zapata *et al.*, 2016; Fuentes-Quesada *et al.*, 2020; Villanueva-Gutiérrez *et al.*, 2020;). A diferencia de lo esperado el desempeño del crecimiento y eficiencia alimenticia de los peces resultó mayor en los tratamientos con las formulaciones de las dietas experimentales (DPB0 y DPB3) en comparación con los tratamientos donde se evaluaron las formulaciones de las dietas comerciales (ALG1 y ALG2). Se estimaba lo contrario por el grado de enteritis que podría generarse al incluir 26% de harina de soya (HS) y consecuentemente las deficiencias en el crecimiento que pudiera provocar. Anteriormente estudios con la misma especie revelaron que con niveles mayores al 22% de inclusión de HS en la dieta se ha observado un menor desempeño (Fuentes-Quesada *et al.*, 2018). A continuación, se presentan algunas de las razones por las que se cree se observaron estos resultados y que se irán desglosando a lo largo de la discusión.

Primeramente, se ha asociado un menor crecimiento debido a un menor consumo del alimento por la palatabilidad de las dietas, en especial aquellas formuladas con ingredientes vegetales. Esto es debido a

que algunos factores antinutricionales asociados a esos ingredientes, como las saponinas, se caracterizan por tener un sabor amargo y desagradable (Bureau *et al.*, 1998; Santigosa *et al.*, 2008). Sin embargo, el consumo de las dietas en el presente estudio, evaluado por los índices de CAD y TCA, fue similar en los cuatro tratamientos, probablemente por la adición de atrayentes e ingredientes con buena palatabilidad como el aceite de krill, la harina y aceite de pescado (Fuentes-Quesada *et al.*, 2018).

Los efectos negativos en el crecimiento (i.e., CCT e IPR) atribuibles a la inclusión de ingredientes vegetales en las dietas también se han asociado a que las dietas formuladas no cumplen con los requerimientos nutricionales de los peces. En el presente estudio las cuatro dietas fueron formuladas con las cantidades necesarias de proteína y lípidos estimadas para *T. macdonaldi* (Rueda-López *et al.*, 2011). Sin embargo, aunque se cumplan los requerimientos de proteínas y lípidos de la especie de interés, las fuentes proteicas y/o lipídicas pueden ser deficientes en los aminoácidos esenciales (a.a.e.) y ácidos grasos esenciales (a.g.e.) requeridos, que son realmente los nutrientes que aportan energía y sustratos para procesos celulares vitales y la producción de nuevo tejido. Por lo que el verdadero requerimiento es por una mezcla balanceada de a.a.e. y a.g.e. que constituyen a las macromoléculas (Wilson, 2002). La falta de a.a.e. o a.g.e. resulta en la reducción de síntesis de proteínas y estructuras celulares, disminuye el mantenimiento de procesos metabólicos y por lo tanto el crecimiento se ve afectado negativamente (Sargent *et al.*, 2002; Halver y Hardy, 2003).

Las dietas DPB0 y DPB3 se formularon con un contenido de 26% de harina de soya, 7% de concentrado de soya, otros ingredientes vegetales y harina de sardina (con 69% de proteína) la cual aportó el mayor porcentaje de proteína en la dieta. Asimismo, para prevenir deficiencias por la inclusión de la soya, se incluyó aceite de pescado como la fuente principal de ácidos grasos y se suplementó con a.a.e. (i.e. metionina, lisina, arginina) y vitaminas (i.e. vitamina E). Este balance nutricional pudo hacer más productivas estas dietas inclusive con la cantidad de harinas vegetales que incluían. Por su parte las dietas ALG1 y ALG2 contenían harina de pescado, ingredientes de origen vegetal (i.e., frijol seco, gluten de maíz, trigo, semilla de canola) y harina de macroalgas, que aportaron hasta un 50% de proteínas y 13% de lípidos. Sin embargo, el crecimiento fue significativamente inferior a las totoabas de los tratamientos DPB, por lo que es probable que no tuvieran los a.a.e o a.g.e (PUFAs y LC-PUFAs) en cantidades o proporciones adecuadas para *T. macdonaldi* (Villarreal *et al.*, 2011; Madrid *et al.*, 2019). En el presente estudio no se determinó la cantidad de a.a.e. y a.g.e. de las dietas por lo que no se puede concluir definitivamente esta

conjetura y se recomienda analizar el perfil de estos nutrientes en las dietas y su digestibilidad para futuros estudios.

Por otro lado, la tasa de eficiencia proteica (TEP) indica la cantidad de proteína consumida para aumentar una unidad de peso y es un reflejo de la calidad de la proteína dietética. Por lo tanto, este índice demuestra que la proteína aportada por las dietas DPB0 y DPB3 tuvo un mejor aprovechamiento para el crecimiento de *T. macdonaldi* que la proteína aportada por las dietas ALG1 y ALG2. La calidad proteica está influenciada por la composición de aminoácidos y la digestibilidad de la proteína (Wilson, 2002).

Anteriormente Fuentes-Quesada y colaboradores (2018), reportaron una menor TEP en *T. macdonaldi* que habían consumido una dieta con mayor contenido de harina de soya. En su experimento evaluaron dietas isoprotéicas (48.5%) e isolipídicas (8.6%) en las que aumentaron la sustitución de harina de pescado por de harina de soya. Los FAN presentes en las dietas que contenían harina de soya indujeron alteraciones en la morfología del sistema digestivo, en la salud intestinal y disminuyeron la actividad de enzimas digestivas, estos cambios a su vez afectaron la TEP y el crecimiento, debido a una menor utilización de los nutrientes en las dietas. También se ha observado en otras especies de peces que los FAN de la harina de soya afectan la digestibilidad de la dieta. Por ejemplo, Krogdahl *et al.* (2003), observaron que en *S. salar*, una inclusión de 12% de harina de soya extraída con solvente (i.e., para reducir los lípidos), redujo el crecimiento y la conversión del alimento, debido al contenido de FAN que afectaron la digestión y absorción de nutrientes de las dietas. Incluso en el híbrido de la carpa dorada (*C. carpio x Carassius auratus*) un pez omnívoro también hay afectaciones en el crecimiento y la TEP, tras un periodo de ocho semanas de alimentación con dietas que incluían concentrado de proteína de soya (CPS). En este caso se hizo una sustitución de hasta el 100% de la harina de pescado por CPS, lo que ocasionó la alteración de la integridad intestinal y disminuyó los índices de crecimiento (Zhu *et al.*, 2020).

Por lo tanto, los FAN afectan la digestibilidad de las proteínas, lo que reduce la calidad proteica de las dietas. Aunque las afectaciones dependen del tipo de ingredientes incluidos en la dieta, el procesamiento de las harinas y la especie a estudiar también suelen tener un efecto perjudicial en la asimilación de proteína. En el presente estudio no se identificó específicamente cuál de los ingredientes en las dietas ALG pudieron afectar la TEP, pero se identificó que hay un mayor contenido de saponinas o moléculas similares (Tabla 1) en comparación con las dietas DPB. Estas moléculas posiblemente afectaron la salud intestinal de los peces y provocaron una disfunción digestiva y de absorción de la proteína dietética.

Por otro lado, en este estudio la composición proximal del músculo no tuvo diferencias significativas en los peces alimentados de los diferentes tratamientos. De manera similar en estudios previos con *T. macdonaldi*, el contenido de proteína muscular no cambió entre organismos alimentados con diferentes dietas experimentales. Por ejemplo, Trejo-Escamilla *et al.* (2017), evaluaron dietas isoprotéicas e isolipídicas, incrementando la sustitución de HP por CPS desde 15% hasta 100%. Encontraron que a partir del 45% de inclusión de CPS en las dietas hay diferencias significativas en el desempeño del crecimiento y eficiencia alimenticia de *T. macdonaldi*. La sustitución no tuvo un efecto en el contenido de proteína en el músculo, pero sí en el de lípidos, aumentando a la par de la sustitución de HP. Mientras que Fuentes-Quesada (2018), no observó cambios significativos en la composición proximal corporal de *T. macdonaldi* más que en el contenido de cenizas, cuando evaluó dietas isoprotéicas e isolipídicas que incluían 24% de harina de soya, glutamina y/o agavina, en donde la glutamina pudo mejorar la absorción de minerales y lo que afectó el contenido de cenizas.

Por el contrario, se ha observado que no hay cambios significativos en la composición muscular en otras especies como *S. aurata*, *D. labrax* (Bonaldo *et al.*, 2008), la anguila, *Monopterus albus* (Zhang *et al.*, 2019) y *S. salar* (Krogdahl *et al.*, 2003) al ser alimentados con harina de soya en las dietas, aunque si afectó su desempeño. Los autores explican que los FAN de la soya afectan la digestión de los nutrientes, pero su utilización y los procesos metabólicos consecuentes no, por lo tanto, se depositan de la misma forma en el músculo y el contenido de nutrientes no cambia, como ocurrió en el presente estudio. Aunque el efecto de las fuentes vegetales en el crecimiento del músculo ha sido poco estudiado se sabe que podría influir en la abundancia del músculo blanco, pero el mecanismo molecular que afecta el crecimiento muscular y no su composición no ha sido comprendido completamente (Zhang *et al.*, 2019).

Los resultados del desempeño del crecimiento y eficiencia alimenticia demostraron que la sustitución de harina de pescado por soya sigue teniendo un alto potencial en la acuicultura de *T. macdonaldi*, ya que hasta un 26% puede ser incorporado sin comprometer la ganancia de peso y utilización del alimento. El bajo desempeño del crecimiento con las dietas ALG1 y ALG2 probablemente esté relacionado con la digestibilidad de las dietas y la eficiencia de la utilización de la proteína.

Con respecto a los valores del índice hepatosomático (IHS) de los juveniles de *T. macdonaldi* reportados en el presente estudio, fueron entre 0.89 y 1.15% y se observaron diferencias significativas entre tratamientos. Los valores del IHS coinciden con los resultados obtenidos por Trejo-Escamilla *et al.* (2017)

(0.9 y 1.17%) en la misma especie aunque de menor peso (103-144 gr. en su estudio contra 300-340 gr. del presente estudio). No obstante, en ese estudio no observaron diferencias significativas entre el IHS de las totoabas cuando fueron alimentadas con dietas en las que se sustituyó HP por CPS desde 15% al 100%.

Por su parte Fuentes-Quesada *et al.* (2018), obtuvieron valores más altos del IHS (i.e. 1.71%) con una dieta control, en contraste, en las totoabas que fueron alimentadas con más de 44% de harina de soya en la dieta el IHS disminuyó significativamente junto con el contenido de vacuolas de grasa en los hepatocitos. Cuando incluyeron el 64% de harina de soya en las dietas, el IHS incrementó, lo relacionaron con un proceso de catálisis en el tejido muscular, debido a que se consumieron las reservas de lípidos del hígado así que los nutrientes del músculo circulan y son nuevamente depositados en el hígado, incrementado el contenido de vacuolas de grasa y el IHS. Por otro lado, Robaina *et al.* (1995), observaron que en *S. aurata* el hígado de los peces que consumieron altos niveles de harina de soya mostraron un mayor contenido de vacuolas de grasa. Además, mencionan que el ácido fítico de la soya puede disminuir la disponibilidad de fósforo y glicógeno, e incrementa la deposición de lípidos en el hígado.

En el presente estudio puede ser que alguno de los ingredientes en la dieta ALG2 provocara el incremento del IHS. Ya sea que los FAN, como las saponinas causaran una menor disponibilidad de lípidos, el consumo de reservas energéticas del hígado, posteriormente la deposición de nutrientes por catálisis muscular y que incrementaran el contenido de vacuolas de grasa. Pero, no es evidente cual fue la razón de las diferencias del IHS en el presente estudio debido a que no se evaluaron otras características del hígado. Es importante que estudios futuros evalúen este órgano ya que tiene un papel principal en la asimilación de los nutrientes absorbidos por el intestino y es uno de los principales órganos de almacenamiento de reservas energéticas (Sargent *et al.*, 2002; Webster y Lim, 2002; Rust, 2003; Zakęś *et al.*, 2010; González-Félix *et al.*, 2018). Sobre todo, sería relevante evaluar si existe alguna relación entre los componentes de las macroalgas y la fisiología del hígado.

4.2. Digestibilidad de las dietas y capacidad digestiva

Como se mencionó previamente, la digestibilidad de las dietas tiene un efecto en el crecimiento de los peces debido a que es un proceso múltiple, primero de digestión y después de absorción. Por lo tanto, el

coeficiente de digestibilidad aparente (CDA) es un indicador de la biodisponibilidad de los nutrientes para ser usados en el metabolismo de los peces y difiere entre los ingredientes que son incluidos en las dietas.

En el presente experimento, el CDA fue significativamente diferente entre las dietas experimentales y las comerciales (Figura 6). Estudios anteriores han revelado que la digestibilidad de los ingredientes vegetales como la soya, lupino, canola, girasol y habas en los peces carnívoros es menor que los ingredientes de origen animal. Esto se ha asociado a un mayor contenido de carbohidratos principalmente en forma de polisacáridos no almidonados, a un mayor tiempo de digestión de la proteína vegetal y a la menor cantidad de aminoácidos esenciales (Santigosa *et al.*, 2008; Dam *et al.*, 2019; Tran-Ngoc *et al.*, 2019; Egerton *et al.*, 2020;). En el presente estudio el CDA de las dietas ALG fue menor, sin embargo, como se desconoce la formulación exacta de estas dietas no podemos elucidar cuál de los ingredientes afectó directamente el CDA. Por lo que tendrían que evaluarse de manera particular los componentes y las cantidades incluidos en estas dietas para poder identificar los ingredientes que disminuyeron el CDA.

Otro factor que pudo influir en el CDA son los FAN, los cuales son compuestos muy diversos (Sección 1.1.2.), que varían según el tipo de planta. En este caso los FAN de las dietas ALG pudieron ser inhibidores de la actividad de enzimas digestivas o compuestos que provocaron cambios morfológicos en el intestino distal, afectando la funcionalidad de las estructuras intestinales. Por ejemplo, el acortamiento de los pliegues mucosos disminuye el área superficial para el intercambio de sustancias a través de la barrera epitelial (Merrifield *et al.*, 2011). Se cree que la región distal del intestino aporta del 5 al 8% de la absorción total de los macronutrientes, sin embargo, también se encarga de otras funciones como la absorción de componentes digestivos endógenos como la taurina, de proteínas intactas y de componentes menos digeribles, por lo que su afectación puede tener gran influencia en la disponibilidad y utilización de los nutrientes, principalmente en aquellas dietas que tienen un mayor contenido de ingredientes menos digestibles. Es necesario que en trabajos futuros se identifiquen los FAN de las dietas para reconocer cuáles son sus verdaderos efectos en la digestibilidad de los ingredientes en los peces que las consumen (Rumsey *et al.*, 1994; Baeverfjord y Krogdahl, 1996; Krogdahl *et al.*, 2003).

Por otra parte, las macroalgas como sustituto de la harina de pescado han sido poco estudiadas en peces. Algunos autores han demostrado que al agregar sólo 5% de *Gracilaria bursa* o *Ulva rigida* mejoraron la utilización de nutrientes en la tilapia de Nilo y con una inclusión del 1.5 al 6% del alga café *M. pyrifera* en *O. mykiss*, se incrementó el contenido de PUFAs en el músculo sin afectar el crecimiento (Dantagnan *et al.*,

2009; Garcia-Vaquero y Hayes, 2016). Es importante mencionar que los beneficios observados al incluir macroalgas en las dietas para corresponden a porcentajes de inclusión menores al 10%. Por ejemplo, Davies *et al.* (1997), demostró que la adición de más de 16% de *Porphyra purpurea* en *Chelon labrosus* afectó negativamente el desempeño del crecimiento y utilización del alimento por el contenido de carbohidratos complejos que contenía la dieta al añadir esa alga. Al incluir la microalga spirulina, *Arthrospira sp.*, en las dietas para *T. macdonaldi* se ha reportado una baja digestibilidad de la dieta y se cree que es una consecuencia de las estructuras complejas de la pared celular algal la cual contiene peptidoglucanos poco digeribles para los peces carnívoros (Ranferi y Lazo, 2019; Villanueva-Gutiérrez *et al.*, 2020).

Adicionalmente se sabe que algunos de los compuestos de las macroalgas y del ingrediente Mega Smart Kelp utilizado en el presente estudio contienen alginatos, que son polisacáridos carboxilados de gran peso molecular. Estos compuestos son muy abundantes en las algas cafés como como *Sargassum sp.*, *Fucus sp.* y laminariales como *M. pyrifera* y *Laminaria sp.* (Castro-González *et al.*, 1994; Sardari y Nordberg, 2018). A partir de los alginatos se han producido fibras dietéticas y oligosacáridos que han incrementado la microbiota intestinal en humanos (Lactobacilos y Bifidobacterias), que benefician al hospedero (Sardari y Nordberg, 2018). Pero también se sabe que la estructura compleja de los alginatos puede formar una goma viscosa a través de la interacción con el agua, que pueden reducir la digestión de las proteínas en la dieta y tiene un efecto inhibitorio de la amilasa pancreática en puercos (Sardari y Nordberg, 2018). También se ha reportado que las macroalgas pueden tener factores antinutricionales como lectinas, ácido fítico, inhibidores de enzimas y moléculas complejas poco digeribles (Garcia-Vaquero y Hayes, 2016). Por lo tanto, es probable que las macroalgas incluidas en las dietas ALG afectaran la digestibilidad de las dietas, ya que es uno de los componentes que no tenía DPB0 y sólo se incluyó un 3% en DPB3. Sería interesante realizar estudios en el futuro orientados a evaluar el CDA de las macroalgas utilizadas en las dietas ALG de manera independiente, reconocer si tienen FAN y cómo pueden afectar el desempeño de los peces.

La digestibilidad de las dietas está directamente relacionada con la actividad de las enzimas digestivas. El proceso de digestión es muy complejo e involucra procesos físicos, químicos y enzimáticos que comienzan desde que el alimento es ingerido por la boca y termina con la excreción de las heces por el ano. Los procesos enzimáticos de la digestión son específicos para la ruptura molecular de las proteínas, lípidos o carbohidratos. Se ha reportado que el perfil nutricional y la forma molecular de los nutrientes, particular de cada dieta, puede promover o disminuir la producción y actividad de las enzimas digestivas, la

evaluación de su actividad en el intestino es un buen indicador de la capacidad digestiva de los organismos (Webster y Lim, 2002; Trejo-Escamilla *et al.*, 2017).

Las enzimas digestivas pueden ser secretadas al lumen intestinal, estar unidas al borde de cepillo de los enterocitos o dentro de las células epiteliales contenidas en vacuolas supranucleares (Rust, 2003). La tripsina es una de las principales proteasas secretadas al lumen del intestino de peces carnívoros que corta los enlaces peptídicos de la proteína en el extremo carboxilo de los aminoácidos arginina y lisina. Es una enzima clave en el proceso digestivo debido a que activa zimógenos de otras enzimas digestivas que participan en el proceso digestivo. Por su parte las lipasas intestinales son responsables de la hidrólisis extracelular de los lípidos para liberar los ácidos grasos y otros compuestos y puedan así ser absorbidos. Las amilasas se encargan de la digestión de los polisacáridos presentes en los carbohidratos como el almidón, aunque en los peces carnívoros su actividad es baja, ya que el contenido de carbohidratos que consumen naturalmente es menor que los demás macronutrientes (Halver y Hardy, 2003; Rust, 2003).

En el presente estudio no se encontraron diferencias significativas en la actividad enzimática de las tres enzimas digestivas cuantificadas debido a la alta variabilidad entre replicas en estas variables. No obstante, se observaron notables aumentos en la actividad de las enzimas tripsina y amilasa en el tratamiento DPB0 y de la lipasa en ALG2 (Figura 8). En contraste con estos resultados diversos autores han observado cambios significativos en la actividad de las enzimas digestivas al incluir harina de soya en las dietas. Por ejemplo, Zhang *et al.* (2019), en la anguila *M. albus*, observaron una disminución significativa de la actividad de la tripsina con el incremento de concentrado de soya en la dieta, a pesar de que contiene bajos niveles de inhibidores de tripsina, en comparación de la harina de soya. Mientras que las actividades de la amilasa y lipasa aumentaron inicialmente y después disminuyeron, los autores sugieren que *M. albus* puede tener la capacidad de adaptar su fisiología digestiva a cambios en la composición nutricional. Asimismo, Fuentes-Quesada *et al.* (2018), mostraron que la actividad de la tripsina y la amilasa disminuyó significativamente en las totoabas con la inclusión gradual de harina de soya en las dietas, este fenómeno lo atribuyeron al estado crónico de inflamación, la atrofia de estructuras intestinales que reducen la actividad enzimática en general del tejido mucoso y por la presencia de inhibidores y otros factores antinutricionales en la soya. Krogdahl *et al.* (2003; 2015), han reportado que el contenido de fibras, fitoesteroles, fitoestrógenos y saponinas en ingredientes a base de plantas, afectan la reabsorción de las sales biliares e incrementan la cantidad de bilis en el intestino, lo cual puede estimular la secreción y actividad de la lipasa significativamente. Sin embargo, en el presente estudio no

se pudo concluir que las diferencias en el crecimiento, eficiencia alimenticia y digestibilidad de las totoabas esté relacionada con cambios en la actividad de enzimas digestivas. La evaluación de la actividad enzimática en diferentes etapas de los bioensayos, podría dar una imagen más amplia de su comportamiento, de los efectos de los ingredientes y de la capacidad de adaptación de la fisiología digestiva con respecto a la composición nutricional. Además, será necesario evaluar una dieta basal que no incluya ingredientes que pudieran afectar la actividad enzimática para tener una comparación más atinada del estado fisiológico normal.

4.3. Respuestas asociadas a la salud intestinal

En contraste con lo esperado, las variables de la respuesta inmunológica evaluadas en las muestras de sangre (AER y conteo de leucocitos) no resultaron en diferencias significativas entre tratamientos (Tabla 5). Es probable que la enteritis y las alteraciones locales de la región distal del intestino, como la infiltración de leucocitos o el acortamiento de los pliegues mucosos que se discutirán posteriormente, no tuvieron un efecto sistémico evidente, no repercutieron en la salud general del pez o los análisis no están íntimamente relacionados con el efecto de las macroalgas.

Los resultados de la AER del presente estudio coinciden con los de Vazirzadeh *et al.* (2020), donde incluyeron en las dietas para trucha arcoíris macroalgas como *Sargassum boveanum*, *Gracilariopsis pérsica* e *Hypnea flageliformes* y no encontraron diferencias significativas en los valores de AER entre tratamientos durante el experimento. Sin embargo, el índice disminuyó considerablemente a partir del día 47 y mencionan que los efectos inmunoestimulantes de las algas son a corto plazo (menos de dos semanas). Por el contrario, en el estudio de Enciso y Lazo (2015), en *T. macdonaldi*, si se observó el efecto estimulador con dietas que incluían prebióticos como quitosano o inulina. Los autores reportan que la AER aumentó significativamente al inicio y posteriormente en el día 60 la actividad disminuyó en las totoabas que consumieron los prebióticos, esto sin afectar el crecimiento. Por lo que se recomienda hacer pruebas del estallido respiratorio a lo largo del experimento para detectar si existe inmunoestimulación por parte de las macroalgas agregadas a las dietas.

En el presente estudio cabe destacar que los valores de AER estimados fueron mayores al final del bioensayo en todos los tratamientos en comparación con los valores de las muestras iniciales. Esto puede

representar un estado más activo de las respuestas inmunológicas innatas en la sangre por el incremento de especies reactivas de oxígeno, es decir mayor fagocitosis ligada con actividad microbicida o eliminación de antígenos. Puede ser que los factores antinutricionales aportados por las dietas fueran detectados como antígenos durante el experimento. Anteriormente se ha reportado en *S. aurata* (Kokou *et al.*, 2017) y en la corvina de aletas cortas *Cynoscion parvipinnis* (Minjarez-Osorio *et al.*, 2016) que al ser alimentadas con dietas que incluyen derivados de soya, hay un aumento significativo de la AER. Estos estudios mencionan que los factores antinutricionales de las dietas pueden facilitar reacciones hipersensitivas, como una mayor actividad fagocítica o que el desbalance nutricional y deficiencias causadas por el reemplazo de harina de pescado son un factor de estrés, que ocasionan efectos adversos en la respuesta inmune de algunas especies de peces que son susceptibles a ingredientes específicos de las plantas. Sin embargo, es necesario tomar un mayor número de muestras iniciales y a lo largo del bioensayo para corroborar cual es el patrón de la AER en *T. macdonaldi* al evaluar nuevos ingredientes en las dietas (Rumsey *et al.*, 1994).

Con respecto al número de leucocitos en la sangre, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos. Los resultados de Sado *et al.* (2008), coinciden con los del presente estudio. Por ejemplo, al alimentar a *O. niloticus* con manano oligosacáridos (MOS) como prebióticos, no se observaron diferencias significativas en el conteo de leucocitos, aunque las dietas tuvieron un efecto negativo en el consumo de alimento y el crecimiento. Los autores mencionan que los conteos de leucocitos, pueden ser poco fiables por las diferencias que se pueden dar en el número de células, no sólo con el estrés de los peces ante un factor nutricional, sino también puede haber variaciones por la edad, sexo, la temporada del año y otras condiciones ambientales (Weiss y Wardrop, 2000).

No obstante, los datos de los conteos celulares pueden indicar una respuesta fisiológica ante algún factor de estrés al que estén expuestos los peces, incluidos cambios en la dieta y son variables relativamente fáciles de evaluar. Por lo que es recomendable emplear un grupo control en el que no haya ningún factor de estrés para diferenciar los valores de sangre normales de los peces (Modra *et al.*, 1998). A diferencia del presente estudio, Rumsey *et al.* (1994), observaron un incremento significativo en la cantidad de leucocitos en *O. mykiss* alimentadas con harina de soya y concentrado de soya, que se relacionaron con las lesiones crónicas en el intestino, mencionan que el incremento de leucocitos puede indicar el inicio de una respuesta inflamatoria, de una reacción hiper sensitiva y la activación inmune. Mientras que Ebrahimi *et al.* (2012), al suplementar las dietas de la carpa, *C. carpio*, con Immunogen, un prebiótico comercial,

observaron una mayor sobrevivencia contra bacterias pero también observaron un aumento significativo de leucocitos en la sangre. Estos autores mencionan que el incremento de leucocitos puede ser el resultado del estrés por el consumo diario del prebiótico. Sin embargo, gracias a ese aumento la mortalidad ante patógenos disminuye y mejora el estado de salud de los peces.

En el presente estudio los efectos de las macroalgas como prebiótico pudieron influir en la actividad inmunológica o por el contrario los ingredientes causaron una reacción hipersensitiva. Probablemente todos los tratamientos tuvieron un factor de estrés ya que no se observaron diferencias significativas entre tratamientos. Por lo tanto, es altamente recomendable contar con un conteo de leucocitos control, ya sea incluyendo un grupo control en el diseño experimental o un número de muestras iniciales significativas y evaluarlo a través del experimento.

En cuanto a los análisis histológicos del intestino y su caracterización semicuantitativa se sabe que los FAN no sólo disminuyen la actividad enzimática y modifican procesos digestivos, sino que también generan cambios morfológicos en el intestino de los peces carnívoros (Baeverfjord y Krogdahl, 1996; Hendricks, 2003). En el presente estudio se observaron lesiones y cambios morfológicos en el intestino distal en las totoabas de los cuatro tratamientos (Tabla6). La mayoría de las alteraciones observadas son enteropatías típicas de la enteritis inducida por soya que se han descrito en varias especies de peces carnívoros como *O. mykiss* (Rumsey *et al.*, 1994), *S. aurata* (Bonaldo *et al.*, 2008) y *S. salar* (Krogdahl *et al.*, 2003; Krogdahl *et al.*, 2015).

Previamente Fuentes-Quesada *et al.* (2018), describieron para *T. macdonaldi* los cambios morfológicos en el intestino distal cuando se incluía desde 22% hasta 64% de harina de soya en las dietas. Los autores mencionan que a partir del 22% de inclusión de soya las totoabas desarrollaron enteritis, lo que generó hiperplasia de las células mucosas, densamente agrupadas en los ápices de los pliegues, se produjo un aumento en la fusión de pliegues mucosos y su acortamiento, atrofia de la mucosa intestinal, una disminución en la altura de los enterocitos, reducción de sus vacuolas supranucleares y el engrosamiento de estructuras de los pliegues como la lámina propia, por la infiltración de granulocitos eosinófilos. Sus resultados los llevaron a concluir que *T. macdonaldi* tiene una alta sensibilidad a la soya, que afecta las estructuras y la fisiología del intestino distal, lo cual limita la utilización de los nutrientes en las dietas. Los cambios morfológicos observados en las totoabas del presente estudio, alimentadas con dietas DPB coinciden con los resultados descritos por Fuentes-Quesada *et al.* (2018), para con una inclusión de 22%

de soya en las dietas y permiten pensar que los tratamientos ALG tenían soya o componentes similares que provocaron el mismo tipo de cambios, como las saponinas que se encontraron en mayor proporción en estas dietas.

Algunos de los cambios morfológicos que se observaron en general en los cuatro tratamientos fue poca abundancia de vacuolas supranucleares en los enterocitos, una gran cantidad de células mucosas en los pliegues intestinales, la infiltración de granulocitos eosinófilos y un porcentaje mayor a 43% de pliegues mucosos fusionados. La disminución del número de vacuolas supranucleares afecta mecanismos como la endocitosis, el funcionamiento de los enterocitos y la digestión intracelular. Mientras que la hiperplasia de células mucosas y la infiltración de leucocitos son respuestas inmunológicas ante factores de estrés, como pueden ser los FAN. Un mayor número de células mucosas genera mayor cantidad de mucosa que protege la barrera epitelial y lubrica los materiales no digeridos del alimento (Bakke-McKellep *et al.*, 2000; Merrifield *et al.*, 2011). El aumento de leucocitos es el resultado del reclutamiento de estas células en la zona de inflamación intestinal, con el propósito de reparar las lesiones provocadas (Bakke-McKellep *et al.*, 2000; Bakke-mckellep *et al.*, 2007; Uran *et al.*, 2008).

De manera particular las medidas morfológicas de las estructuras de los pliegues mucosos (i.e. longitud de los pliegues, lamina propria, altura de los enterocitos) fueron muy variables entre los tratamientos, como se muestra en la Tabla 6. Estos resultados coinciden con los que describieron Tran-Ngoc *et al.* (2019), en *O. niloticus*, donde evaluaron dietas en las que incluyeron en cada una un tipo de harina vegetal diferente, como la harina de soya, de girasol, canola y arroz. Observaron que la soya fue la que más afectó las estructuras intestinales, pero en las demás dietas con plantas, también observaron alteraciones típicas de la enteritis. Lo mismo pudo ocurrir con las totoabas en el presente trabajo y como consecuencia, estos cambios pudieron reducir la capacidad de absorción de los nutrientes, reduciendo la digestibilidad, lo que resultó en un menor desempeño del crecimiento en los tratamientos ALG. En contraste, algo no esperado fue que los peces alimentados con la dieta ALG2 tuvieran la mayor longitud de los pliegues intestinales (Figura 10), esta cualidad permitiría una mayor capacidad para absorber los nutrientes al incrementar el área de superficie, por lo tanto, la absorción de nutrientes no se vería afectada. Esto último podría indicar que el efecto negativo de estas dietas está relacionado con la digestión y no la absorción de los ingredientes en las dietas.

Continuando con el cuestionamiento de ¿por qué si los análisis histológicos de los peces alimentados con la dieta ALG2 fueron similares a los de los peces alimentados con la dieta DPB, tuvieron un peor desempeño? podríamos agregar que es de gran importancia recalcar que las diferencias en la coloración de las células mucosas en las imágenes histológicas, fue probablemente por la excreción de otro tipo de muco-polisacáridos por las células mucosas los cuales se tiñeron de otro color (Barón, B y Fuentes-Quesada, J., comunicación personal, octubre 2021) (Figura 9). Ya que únicamente en los tratamientos que incluían macroalgas se observaron estas características, así que es posible que este tipo de ingredientes en la formulación de las dietas repercutió en los procesos de digestión y absorción de los nutrientes. Anteriormente Cerezuela *et al.* (2012), evaluó los efectos de *Bacillus subtilis* y microalgas (*Tetraselmis chuii* y *Phaeodactylum tricornutum*) como ingredientes funcionales en *S. aurata*. Todos los tratamientos de ese estudio mostraron alteraciones morfológicas en diferentes grados, similares a la enteritis producida por soya. Con el uso de técnicas histoquímicas (PAS y azul alcian) observaron diferentes coloraciones en la tinción de las células mucosas. En la dieta con *B. subtilis*, *T. chuii* y *P. tricornutum* aumentaron las células mucosas de mucina neutra y con las demás dietas disminuyeron las células mucosas de mucina mixta. Cerezuela *et al.* (2012), mencionan que el cambio en las células mucosas fue por la adición de bacterias y microalgas en las dietas, los cuales modificaron la microbiota intestinal ya establecida, por consecuencia el contenido de mucina y el tipo de mucosidad secretada.

Pese a que la fisiología y los efectos de la mucina no es bien entendida, se ha sugerido que existen dos tipos, la mucina ácida que protege contra la translocación de bacterias y la neutra que se ha relacionado con la hidrólisis enzimática y el proceso de absorción de nutrientes. En peces herbívoros como la carpa, las mucinas ácidas se encuentran presentes en altas cantidades en el intestino posterior ya que facilitan la eliminación de residuos y la absorción de moléculas solubles en agua y otras partículas. Es probable que células mucosas de propiedades ácidas se incrementaran con la presencia de macroalgas o alguno de sus componentes (incluidos en Mega Smart Kelp). Por lo tanto, se recomienda evaluar otro tipo de técnicas que logren diferenciar el tipo de mucinas que fueron secretadas con estas dietas en *T. macdonaldi*, para así diferenciar tipos de células mucosas y su función en la digestión y absorción de nutrientes.

Por otro lado, es importante mencionar que algunas de las alteraciones fisiológicas mencionadas anteriormente, son también el resultado de la interacción y expresión de genes relacionados con el sistema inmune, como los que se evaluaron en el presente estudio. En este sentido la inmunoglobulina M y la interleucina 8 son proteínas que forman parte del tejido linfoide asociado al intestino, así que pueden

encontrarse en la mucosa intestinal en un estado natural y se encargan de generar respuestas inmunológicas rápidas. El tracto gastrointestinal al ser una de las principales entradas de agentes externos incluyendo patógenos, necesita de estas moléculas para evitar enfermedades. Sin embargo, se ha detectado que estas moléculas también tienen un papel importante ante otros agentes que afectan la salud, como los FAN en las dietas.

La expresión de interleucina 8 está ligada con el sistema innato ya que es una molécula de naturaleza proinflamatoria así que es un buen indicador de este tipo de respuesta (Fuentes-Quesada *et al.*, 2020; W. Zhang *et al.*, 2021b). En el presente trabajo se observaron diferencias significativas en la expresión de *il8* entre los juveniles de *T. macdonaldi* alimentados con las diferentes dietas. En aquellos peces que consumieron la dieta ALG2 hubo una mayor expresión de *il8* que en las que consumieron la dieta DPB3. Estudios previos han demostrado que hay un incremento en la expresión de interleucinas proinflamatorias en aquellos peces susceptibles a la soya. Si la inflamación intestinal ocasionada por el consumo continuo de factores antinutricionales es prolongada, puede provocar un agotamiento fisiológico, que reduce los niveles de *il8*. (Zhang *et al.*, 2019; Zhou *et al.*, 2018; Fuentes-Quesada *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2021a;). Sin embargo, también se sabe que la adición de prebióticos en las dietas puede regular la expresión de interleucinas proinflamatorias, especialmente cuando hay un estímulo inflamatorio en el intestino (Lokesh *et al.*, 2012; Shokryazdan *et al.*, 2017). Tomando en cuenta los resultados de CDA e histológicos, es probable que en las totoabas del tratamiento ALG2 los niveles altos de *il8* hayan sido provocados por los cambios morfológicos y por algún factor de la dieta que estimuló la inflamación. Mientras que en las totoabas del tratamiento DPB3, el Mega Smart Kelp pudo disminuir la expresión de esta molécula proinflamatoria, por lo que podría considerarse como un inmunoestimulante.

En otro sentido, las inmunoglobulinas (Ig) se relacionan con el sistema humoral adaptativo, ya que al reconocer antígenos específicos generan anticuerpos que viajan a través del torrente sanguíneo a la zona que son requeridos y generando una memoria inmunológica para su posterior defensa. Se ha detectado en puercos que cuando consumen soya se producen anticuerpos que reconocen estructuras la soya, las globulinas G y BC de, por lo que el incremento de Ig al ingerirla se relaciona a un efecto hipersensitivo por macromoléculas de la soya (Li *et al.*, 1988). Este tipo de reconocimiento ha llevado a sugerir que la enteritis es una respuesta mediada por células de carácter específico y no sólo es una respuesta innata y generalizada (Rumsey *et al.*, 1994). En este estudio se observó una expresión de *igm* significativamente alta en las totoabas de los tratamientos ALG1, ALG2 y DPB0, como resultado de una posible reacción

aguda a los ingredientes de las dietas. En *S. salar*, alimentados con harina o extractos de soya, Krogdahl *et al.* (2000), detectaron el aumento en los niveles de IgM en el intestino distal lo que los llevó a deducir el posible efecto inmunogénico en esa región del intestino. Posteriormente Bakke-McKellep *et al.* (2007), demostraron que en el salmón existe una cadena dispersa y moderada de linfocitos B positivos a IgM en la lámina propia y en el tejido intraepitelial de la zona apical de los pliegues mucosos, que pueden constituir parte de la barrera intestinal. Al inducir soya en las dietas, esta población se incrementa de manera difusa hacia la zona apical de la mucosa. Aunque no se tiene claro si la *igm* está involucrada en la inducción del proceso inflamatorio o como reacción de defensa después de la posible disrupción del epitelio, como una reacción alérgica. En este caso puede ser que la adición de Mega Smart Kelp en la dieta DPB3 haya disminuido la expresión de *igm*. Previo a este estudio, Fuentes-Quesada *et al.* (2020), observaron en las totoabas que consumieron una dieta con soya y agavina como prebiótico, una menor expresión de *igm* en comparación con una dieta que incluía soya sin prebiótico. Estas últimas totoabas también tuvieron un mejor desempeño del crecimiento y un cambio en la composición de la microbiota intestinal, la cual benefició la salud de los peces. Lo cual concuerda con lo que se observó en las totoabas de este estudio, que fueron alimentadas con la dieta DPB3. Se propone que en un futuro se evalué si Mega Smart Kelp tiene la capacidad de modificar la microbiota intestinal y cuál sería su beneficio en otros peces marinos.

Por otro lado, la proteína HSP70 está involucrada en la sobrevivencia celular y en la citoprotección, ya que una de sus principales funciones se relaciona con el plegamiento de otras proteínas, su estabilización y manteniendo la homeostasis celular. Además, se ha demostrado que pueden suprimir respuestas inmunológicas y promover la integridad del epitelio intestinal expuesto a sustancias tóxicas (Sealey *et al.*, 2013). Existen varios posibles mecanismos de transducción de señales sensibles a estresores que inician o regulan la producción de HSP, por ejemplo, cambios ambientales que alteran la homeostasis celular (Iwama *et al.*, 1998). En *S. aurata* alimentada con niveles elevados de proteína vegetal (i.e. 25-75%), se incrementó la expresión de *hsp70* en el intestino distal. Esta respuesta se asoció con la citoprotección y con mecanismos homeostáticos contra respuestas inflamatorias potencialmente causadas por la soya, por lo que la HSP70 también responde a la composición subóptima de las dietas, indicando estrés cuando hay una mayor expresión molecular de *hsp70* (Kokou *et al.*, 2017). Bakke-mckellep *et al.* (2007), detectaron en el salmón, la presencia de células epiteliales positivas a HSP70 en el ápice de los pliegues mucosos cuando fueron alimentados con soya. Estas células fueron aquellas que sobrevivieron a los cambios morfológicos y a la inflamación, las cuales responden a los estresores (FAN) en la soya, intentando

regular las vías apoptóticas y facilitar la recuperación celular por medio de la expresión de *hsp70*. La expresión de HSP70 en estas células pueden ser responsables del reclutamiento de leucocitos y de la inflamación del tejido conectivo (Iwama *et al.*, 1998; Tsukimi y Okabe, 2001; Uran *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2018). Además se sabe que la HSP70 parece proteger a la mucosa contra toxinas y condiciones de úlceras en mamíferos al tratar de mantener la integridad intestinal (Wang *et al.*, 2018). Los valores de expresión significativamente más altos de *hsp70* en las totoabas alimentadas con la dieta ALG1 puede ser un reflejo del estrés por la cantidad de saponinas y factores antinutricionales incluidos en la dieta.

Por último, las acuaporinas son proteínas transmembranales que generan canales de agua e incrementan la permeabilidad en la membrana celular. En mamíferos se han identificado al menos cuatro isoformas, incluida la *aqp8*, que se expresan en el epitelio intestinal (Jutfelt, 2006). En el salmón del Atlántico se ha observado la presencia de *aqp8* en el borde de cepillo, en la región sub-apical y basolateral de las membranas de los enterocitos y estos canales incrementan el transporte de agua trans-epitelial (Sundell y Sundh, 2012). Los estudios en peces con respecto a estas moléculas empiezan a tomar mayor importancia por su función osmótica (Jutfelt, 2006). Previamente Fuentes-Quesada *et al.* (2020) y Krogdahl *et al.* (2015), describieron en *T. macdonaldi* y en el salmón respectivamente, que la expresión de *aqp8* en el intestino disminuyó significativamente cuando los peces ingirieron soya y específicamente saponinas, lo que ocasionó una disminución de la absorción de agua por parte de los enterocitos, provocando un mayor contenido de agua en el lumen y diarrea, un síntoma común de la enteritis. Por el contrario, Zhang *et al.* (2021a), encontraron en el mero *Epinephelus fuscoguttatus* x *E. lanceolatus* una mayor expresión de la *aqp8*, 9 y 10, pero una reducción en las *aqp1*, 4 y 12 cuando ingirieron dietas con 40% de harina de soya fermentada. Estos autores mencionan que el cambio en la permeabilidad intestinal hace que el sistema inmune local quede expuesto a los antígenos externos, que normalmente no cruzan la barrera epitelial e inducen la enteritis, como los FAN de las dietas y microorganismos patogénicos. Ninguno de estos resultados coincide con lo que pudo haber ocurrido en las totoabas de los tratamientos evaluados en el presente estudio, puede ser que algún compuesto en la dieta ALG2 provocara una mayor expresión de este gen. En este caso es necesario contar con un tratamiento que no incluya factores de estrés que ayude a reconocer mejor la expresión molecular de las *aqp* y reconocer cuales son los verdaderos efectos de las macroalgas en este tipo de moléculas.

En conclusión, se observó un mejor desempeño del crecimiento y eficiencia alimenticia en los peces alimentados con las dietas DPB0 y DPB3 que incluían 26% de harina de soya, en las que se observó un

mejor TEP, CDA y una menor expresión de *il8*. Sin embargo, se observaron daños morfológicos en el intestino distal en todos los tratamientos, característicos de la enteritis, que se deben tomar en consideración al alimentar a estos peces por tiempo prolongados con estas dietas. El menor desempeño productivo de las dietas ALG1 y ALG2 se relacionó principalmente con un mayor contenido de FANs (i.e., saponinas) y su efecto en la digestibilidad de las dietas. Sin embargo, aunque contenían un nivel adecuado de proteína y lípidos, no se puede descartar el efecto de la calidad de la proteína de estas dietas con una menor TEP, posiblemente ocasionada por alguna deficiencia o desbalance de nutrientes esenciales como algún a.a.e. y se recomienda evaluar en estudios posteriores.

Es de gran interés conocer las propiedades de las macroalgas, un ingrediente funcional que ha sido poco estudiado, pero con un alto potencial principalmente por el tipo de polisacáridos que contienen. Sin embargo, la adición del prebiótico, Mega Smart Kelp, en la dieta para *T. macdonaldi* no resultó en efectos positivos en el crecimiento, eficiencia alimenticia ni la digestibilidad de las dietas en la totoaba, pero si disminuyó la expresión de *igm* en el intestino distal en comparación con las del tratamiento DPB0, sin el prebiótico, lo que abre las puertas para estudios futuros con este prebiótico.

Este estudio también demostró que *T. macdonaldi* sigue siendo un pez nacional viable para la acuicultura comercial por su fácil adaptación al cultivo y crecimiento a pesar de las condiciones de salud intestinal observadas. Por último, queda mencionar que gracias a la evaluación de diferentes variables se logró un mayor conocimiento de los efectos de las dietas en la respuesta inmune y en la salud intestinal de la totoaba. No obstante, quedan por detallar algunas técnicas para mejores evaluaciones futuras, que permitan reconocer los factores antinutricionales en las dietas, utilizando por ejemplo otros métodos de tinción y detección de mucinas.

Capítulo 5 . Conclusiones

- *T. macdonaldi* tuvo un mejor crecimiento y eficiencia alimenticia cuando consumieron las dietas DPB que incluían harina de soya en comparación con las dietas comerciales con macroalgas. Uno de los principales factores a los que se le atribuye este resultado es a la calidad de la proteína, que se refleja en una menor TEP.
- La adición de Mega Smart Kelp en la dieta con soya (DPB3) no produjo efectos positivos en el crecimiento, eficiencia alimenticia y digestibilidad de los juveniles de *T. macdonaldi* en un periodo de 56 días.
- Las diferencias nutrimentales en las dietas no afectaron significativamente la composición proximal del músculo de *T. macdonaldi* después de 56 días.
- Los ingredientes como frijol, canola, trigo y/o macroalgas de las dietas ALG afectaron negativamente la digestibilidad de las dietas (CDA). La reducción del CDA se relacionó directamente con el contenido de factores antinutricionales (FANs), como las saponinas, presentes en estas dietas.
- Las diferencias en la composición de las dietas no afectaron significativamente la actividad de las enzimas digestivas en el intestino de *T. macdonaldi* a pesar de los cambios morfológicos del intestino que ocurrieron después de 56 días.
- La respuesta inmunológica de *T. macdonaldi* evaluada por análisis de sangre (i.e., actividad del estallido respiratorio y la cantidad de leucocitos) no resultaron diferentes, por lo que la adición de macroalgas no afectó estas variables.
- Después de 56 días de duración del estudio, el IHS de *T. macdonaldi* se vio afectado por los tratamientos, mostrando un mayor índice en los organismos alimentados con la dieta ALG2, posiblemente por el alto contenido de saponinas.
- Las totoabas de todos los tratamientos evaluados mostraron alteraciones en la morfología del intestino distal, típicas de la enteritis. Sin embargo, se observaron coloraciones diferentes entre

las células mucosas con las dietas que incluían macroalgas o sus derivados (ALG1, 2 y DPB3). La adición de macroalgas pudo alterar la composición de mucina y afectar la digestibilidad de las dietas.

- Las dietas ALG incrementaron la expresión relativa del gen *il8* en el intestino de *T. macdonaldi* lo que demuestra un estado inflamatorio latente probablemente estimulado por saponinas u otros FANs. En contraste, la adición del ingrediente Mega Smart Kelp disminuyó la expresión de esta molécula, lo cual demuestra su capacidad prebiótica y su potencial inmunoestimulante.
- Las dietas ALG1, ALG2 y DPB0 mostraron mayor expresión de *igm*, que puede estar asociado a un efecto hipersensitivo y una respuesta inmune específica. La adición del prebiótico en la dieta DPB3 pudo regular la expresión de *igm* en el intestino distal de *T. macdonaldi* alimentadas con esta dieta.
- El contenido de la dieta ALG1 provocó una mayor expresión relativa del gen *hsp70* en el intestino de *T. macdonaldi*, como respuesta al estrés celular ocasionado por la cantidad de saponinas incluidas en esta dieta. Es probable que este incremento de *hsp70* refleje la respuesta celular para mantener su integridad.
- En este trabajo no se pudo concluir que las macroalgas tengan un efecto benéfico en *T. macdonaldi*, pero tampoco repercutieron cuando fueron añadidas como prebiótico (DPB3) por lo que se debería estudiar con más detalle sus efectos.

Capítulo 6 . Recomendaciones

- Conocer con más detalle la formulación de los ingredientes de las dietas comerciales para evaluar su efecto en la digestibilidad de las dietas.
- Conoce el contenido de aminoácidos y ácidos grasos de las dietas comerciales para descartar la posibilidad de deficiencias de nutrientes esenciales.
- Evaluar la inclusión de macroalgas como único prebiótico en las dietas para reconocer y evaluar su efecto en los peces.
- Extraer o probar los polisacáridos puros de las macroalgas (laminarina, alginato entre otros) para evaluar sus efectos prebióticos en las dietas.
- La cuantificación y evaluación de otros factores antinutricionales en las dietas, así como la caracterización precisa las saponinas, proporcionará un mejor entendimiento de las alteraciones que provocan en la salud intestinal de los peces.
- Para la evaluación de análisis de sangre se recomienda un mayor número de muestreos a lo largo del bioensayo y un tratamiento control sin estresores (dietéticos) para una mejor comparación e interpretación de los resultados.
- Evaluar la actividad enzimática en diferentes etapas de los bioensayos y disminuir la variabilidad entre réplicas (aumentando el número de replicas) para dar una imagen más amplia de su comportamiento y de los efectos de los tratamientos
- Las medidas morfológicas derivadas en los análisis de histología son tardadas pero precisas y eficientes, se recomienda aplicar nuevas técnicas de tinción para elucidar el tipo de mucus que las células mucosas puedan secretar.
- Tener un mejor conocimiento de las formulaciones de las dietas o de su composición nutricional sería un beneficio para los actores involucrados en el proyecto, dando mejores conclusiones con respecto a los ingredientes y condiciones utilizadas.

Literatura citada

- Akande, K. E., Doma, U. D., Agu, H. O., Adamu, H. M. 2010. Major antinutrients found in plant protein sources: Their effect on nutrition. *Pakistan Journal of Nutrition*, 9(8), 827–832. doi:10.3923/pjn.2010.827.832
- Akhter, N., Wu, B., Memon, A. M., Mohsin, M. 2015. Probiotics and prebiotics associated with aquaculture: a review. *Fish and Shellfish Immunology*, 45, 733–741.
- Applebaum, S. L., Perez, R., Lazo, J. P., Holt, G. J. 2001. Characterization of chymotrypsin activity during early ontogeny of larval red drum (*Sciaenops ocellatus*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 25(4), 291–300. doi:10.1023/A:1023202219919
- Baeverfjord, G., Krogdahl, A. 1996. Development and regression of soybean meal induced enteritis in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., distal intestine: a comparison with the intestines of fasted fish. *Journal of Fish Diseases*, 19, 375–387.
- Bakke-McKellep, A. M., Frøystad, M. K., Lilleeng, E., Dapra, F., Refstie, S., Krogdahl, Å., Landsverk, T. 2007. Response to soy: T-cell-like reactivity in the intestine of Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of Fish Diseases*, 30(1), 13–25. doi:10.1111/j.1365-2761.2007.00769.x
- Bakke-McKellep, A. M., McL Press, C., Baeverfjord, G., Krogdahl, Å., Landsverk, T. 2000. Changes in immune and enzyme histochemical phenotypes of cells in the intestinal mucosa of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., with soybean meal-induced enteritis. *Journal of Fish Diseases*, 23(2), 115–127. doi:10.1046/j.1365-2761.2000.00218.x
- Bakke-mckellep, A. M., Penn, M. H., Salas, P. M., Refstie, S., Sperstad, S., Landsverk, T., Ringø, E., Krogdahl, Å. 2007. Effects of dietary soyabean meal, inulin and oxytetracycline on intestinal microbiota and epithelial cell stress, apoptosis and proliferation in the teleost Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *British Journal of Nutrition*, 97(4), 699–713. doi:10.1017/S0007114507381397
- Bangoula, D., Parent, J., Vellas, F. 1993. Valeur alimentaire du lupin blanc (*Lupinus albus* var Lutop) chez la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*). Effet de la cuisson-extrusion. *Reproduction Nutrition Development*, 33(4), 325–334. doi:10.1051/rnd:19930402
- Bansemer, M. S., Forder, R. E. A., Howarth, G. S., Suitor, G. M., Bowyer, J., Stone, D. A. J. 2015. The effect of dietary soybean meal and soy protein concentrate on the intestinal mucus layer and development of subacute enteritis in Yellowtail Kingfish (*Seriola lalandi*) at suboptimal water temperature. *Aquaculture Nutrition*, 21(3), 300–310. doi:10.1111/anu.12160
- Becker, K., Makkar, H. P. S. 1999. Effects of dietary tannic acid and quebracho tannin on growth performance and metabolic rates of common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Aquaculture*, 175(3–4), 327–335. doi:10.1016/S0044-8486(99)00106-4

- Biller-Takahashi, J., Takahashi, L., Saita, M., Gimbo, R., Urbinati, E. 2013. Leukocytes respiratory burst activity as indicator of innate immunity of pacu *Piaractus mesopotamicus*. *Brazilian Journal of Biology*, 73(2), 425–429. doi:10.1590/s1519-69842013000200026
- Biller, J. D., Takahashi, L. S. 2018. Oxidative stress and fish immune system: Phagocytosis and leukocyte respiratory burst activity. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias*, 90(4), 3403–3414. doi:10.1590/0001-3765201820170730
- Bonaldo, A., Roem, A. J., Fagioli, P., Pecchini, A., Cipollini, I., Gatta, P. P. 2008. Influence of dietary levels of soybean meal on the performance and gut histology of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) and European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Aquaculture Research*, 39(9), 970–978. doi:10.1111/j.1365-2109.2008.01958.x
- Bowyer, J. N., Qin, J. G., Smullen, R. P., Adams, L. R., Thomson, M. J. S., Stone, D. A. J. 2013. The use of a soy product in juvenile yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*) feeds at different water temperatures: 1. Solvent extracted soybean meal. *Aquaculture*, 384–387, 35–45. doi:10.1016/j.aquaculture.2012.12.005
- Boyd, C. E. 2015. Overview of aquaculture feeds: global impacts of ingredient use. (2nd ed.). *En Feed and Feeding Practices in Aquaculture*. Elsevier. pp. 3–25.
- 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, 411–418. doi:10.1111/j.1365-2109.2009.02178.x
- Bureau, D., Harris, A., Young, C. 1998. The effects of purified alcohol extracts from soy products on feed intake and growth of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 161(1–4), 27–43.
- Bureau, D. P. 2012. Deconstructing the fish meal and fish oil replacement story in aquaculture: Focusing on nutrient requirements, characterization of feed ingredients and pragmatic approaches. *En The Altech 28th Annual International Symposium, 2012*. Lexington Kentucky
- Burel, C., Boujard, T., Corraze, G., Kaushik, S. J., Boeuf, G., Mol, K. A., Van Der Geyten, S., Kühn, E. R. 1998. Incorporation of high levels of extruded lupin in diets for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Nutritional value and effect on thyroid status. *Aquaculture*, 163(3–4), 325–345. doi:10.1016/S0044-8486(98)00241-5
- Butt, R. L., Volkoff, H. 2019. Gut microbiota and energy homeostasis in fish. *Frontiers in Endocrinology*, 10(9), 6–8. doi:10.3389/fendo.2019.00009
- Buttle, L. G., Burrells, A. C., Good, J. E., Williams, P. D., Southgate, P. J., Burrells, C. 2001. The binding of soybean agglutinin (SBA) to the intestinal epithelium of Atlantic salmon, *Salmo salar* and Rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, fed high levels of soybean meal. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 80(3–4), 237–244. doi:10.1016/S0165-2427(01)00269-0

- Campbell, I. 2017. Intermediary metabolism. En Fish Nutrition (3rd ed.). Elsevier. doi:10.1016/j.mpaic.2016.11.017
- Campbell, T. W. 1988. Fish cytology and hematology. The Veterinary clinics of North America. Small animal practice, 18(2), 349–364. doi:10.1016/s0195-5616(88)50036-0
- Castro-González, M. I., Carrillo-Dominguez, S., Perez-Gil, F. 1994. Composición química de *Macrocystis pyrifera* (sargazo gigante) recolectada en verano e invierno y su posible empleo en alimentación animal. Ciencias Marinas, 20(1), 33–40. doi:10.7773/cm.v20i1.955
- Cerezuela, R., Fumanal, M., Tapia-Paniagua, S. T., Meseguer, J., Morinigo, M. Á., Esteban, M. Á. 2012. Histological alterations and microbial ecology of the intestine in gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) fed dietary probiotics and microalgae. Cell and Tissue Research, 350(3), 477–489. doi:10.1007/s00441-012-1495-4
- Cisneros-Mata, M. A., Montemayor-Lopez, G., Roman-Rodriguez, M. J. 1995. Life History and Conservation of *Totoaba macdonaldi*. Conservation Biology, 9(4), 806–814. doi:10.1046/j.1523-1739.1995.09040806.x
- CITES. 2019. Notification to the Parties Geneva. CoP18. Reporte en Convention on international trade in endangered species of wild fauna and flora, Vol. 061..
- Colombo, M. L., Risè, P., Giavarini, F., De Angelis, L., Galli, C., Bolis, C. L. 2006. Marine macroalgae as sources of polyunsaturated fatty acids. Plant Foods for Human Nutrition, 61(2), 67–72. doi:10.1007/s11130-006-0015-7
- Conald, D. T. 2012. Desarrollo de la biotecnia de cultivo de *Totoaba macdonaldi*. Tesis de doctorado. Universidad Autónoma de Baja California. http://fcm.ens.uabc.mx/jatay/tesis/posgrado/oceanografia_costera/doctorado/Desarrollo de la biotecnia de cultivo de Totoaba.pdf
- Dabrowski, K., Kozak, B. 1979. The use of fish meal and soyabean meal as a protein source in the diet of grass carp fry. Aquaculture, 18(2), 107–114. doi:10.1016/0044-8486(79)90023-1
- Dam, C. T. M., Elizur, A., Ventura, T., Salini, M., Smullen, R., Pirozzi, I., Booth, M. 2019. Apparent digestibility of raw materials by yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*). Aquaculture, 511(4), 734233. doi:10.1016/j.aquaculture.2019.734233
- Dantagnan, P., Hernández, A., Borquez, A., Mansilla, A. 2009. Inclusion of macroalgae meal (*Macrocystis pyrifera*) as feed ingredient for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Effect on flesh fatty acid composition. Aquaculture Research, 41(1), 87–94. doi:10.1111/j.1365-2109.2009.02308.x
- DataMares. 2017. Totoaba (*Totoaba macdonaldi*). Consultado el 15 de abril de 2021, de <http://datamares.ucsd.edu/perfil-de-especie-totoaba/?lang=es#pm-management-tools-section>

website: <http://datamares.ucsd.edu/perfil-de-especie-totoaba/?lang=es#pm-management-tools-section>

- Davies, S. J., Brown, M. T., Camilleri, M. 1997. Preliminary assessment of the seaweed *Porphyra purpurea* in artificial diets for thick-lipped grey mullet (*Chelon labrosus*). *Aquaculture*, 152(1–4), 249–258. doi:10.1016/S0044-8486(96)01513-X
- Del Río-Zaragoza, O. B., Fájér-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 immunobiology*, 33, 483–494.
- Del Río Zaragoza, O., Rodríguez, M. H., Ramirez, L. F. B. 2008. Thermal stress effect on tilapia *Oreochromis mossambicus* (Pisces: Cichlidae) blood parameters. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, 41(2), 79–91. doi:10.1080/10236240801896223
- Delbert, M. G. I. 2002. Nutrition and fish health. En *Fish Nutrition* (3rd ed.). Elsevier. pp. 671–702.
- Dersjant-li, Y. 2002. The use of soy protein in aquafeeds. *Avances en Nutrición Acuícola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola 3 al 6 de septiembre 2002. Cancún Quintana Roo, México.* pp 541–558.
- Dong, F. M., Hardy, R. W., Higgs, D. A. 2000. Antinutritional factors. En *The encyclopedia of aquaculture*. John Wiley and Sons. (2nd ed). pp. 45-50
- 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. doi:10.1111/j.1439-0396.2011.01182.x
- Egerton, S., Wan, A., Murphy, K., Collins, F., Ahern, G., Sugrue, I., Busca, K., Egan, F., Muller, N., Whooley, J., McGinnity, P., Culloty, S., Ross, R. P., Stanton, C. 2020. Replacing fishmeal with plant protein in Atlantic salmon (*Salmo salar*) diets by supplementation with fish protein hydrolysate. *Scientific Reports*, 10(1), 1–16. doi:10.1038/s41598-020-60325-7
- Enciso, S., Lazo, J. P. 2015. 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*). Centro de Investigación Científica de Estudios Superiores de Ensenada. Tesis de maestría. 83 pp.
- Erlanger, B. F., Kokowsky, N., Cohen, E. 1961. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 95(2), 271–278.
- Ezeabara, C. 2014. Determination of tannin content in various parts of six citrus species. *Journal of Scientific Research and Reports*, 3(10), 1384–1392. doi:10.9734/jsrr/2014/5832

- FAO. 2020. El estado mundial de la pesca y la acuicultura. La sostenibilidad en acción. Roma. <https://doi.org/10.4060/ca9229es>.
- FAO. 2021. Crops and livestock products. <https://doi.org/10.4060/dqcl76>
- Firdaus-Nawi, M., Zamri-Saad, M. 2016. Major components of fish immunity: A review. *Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science*, 39(4), 393–420.
- Fishbase. Arenque, Sardina, Anchoveta. Consultado el 14 de febrero de 2022, de <https://www.fishbase.se/ComNames/CommonNameSearchList.php>
- Francis, G., Makkar, H. P. S., Becker, K. 2001. Antinutritional factors present in plant-derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish. *Aquaculture* (199), 197-227. doi:10.1016/S0044-8486(01)00526-9
- Fuentes-Quesada, J. P. 2018. Optimization of alternative ingredients in low fishmeal diets using functional nutrients in *Totoaba macdonaldi* juveniles. Centro de Investigación Científica de Estudios Superiores de Ensenada. Tesis de doctorado. 152 pp.
- Fuentes-Quesada, J. P., Cornejo-Granados, F., Mata-Sotres, J. A., Ochoa-Romo, J. P., Rombenso, A. N., Guerrero-Rentería, Y., Lazo, J. P., Pohlenz, C., Ochoa-Leyva, A., Viana, M. T., Fuentes-Quesada, J. P., Cornejo-Granados, F., Mata-Sotres, J. A., Ochoa-Romo, J. P., Rombenso, A. N., Guerrero-Rentería, Y., Lazo, J. P., Pohlenz, C., ... Viana, M. T. 2020. Prebiotic agavin in juvenile totoaba, *Totoaba macdonaldi* diets, to relieve soybean meal-induced enteritis: growth performance, gut histology and microbiota. *Aquaculture*, (May), 1–20. doi:10.1111/anu.13151
- Fuentes-Quesada, J. P., Viana, M. T., Rombenso, A. N., Guerrero-Rentería, Y., Nomura-Solís, M., Gomez-Calle, V., Lazo, J. P., Mata-Sotres, J. A. 2018. Enteritis induction by soybean meal in *Totoaba macdonaldi* diets: Effects on growth performance, digestive capacity, immune response and distal intestine integrity. *Aquaculture*, 495(August 2017), 78–89. doi:10.1016/j.aquaculture.2018.05.025
- Fuentes-Quesada, J. P., Viana, M. T., Rombenso, A. N., Guerrero-Rentería, Y., Normura-Solís, M., Gómez-Calle, V., Lazo, J. P., Mata-Sotres, J. A. 2019. Enteritis induction by soybean meal in totoaba diets. En *Global Aquaculture Advocate*, 2019.
- García-Vaquero, M., Hayes, M. 2016. Red and green macroalgae for fish and animal feed and human functional food development. *Food Reviews International*, 32(1), 15–45. doi:10.1080/87559129.2015.1041184
- Gendel, S. M. 2021. Potential functional food ingredients: Insufficient ingredient descriptions. *Journal of Functional Foods*, 86, 104721. doi:10.1016/j.jff.2021.104721
- Gibson, G. R., Roberfroid, M. B. 1995. Dietary modulation of the human colon microbiota: introducing the concept of prebiotics. En *Feed and Feeding Practices in Aquaculture* (Vol. 125). pp. 1401–1412.

- Gjellesvik, D. R., Lobardo, D., Walther, B. T. 1992. Pancreatic bile salt dependent lipase from cod (*Gadus morhua*): purification and properties. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1124, 123–134.
- Gomez, D., Sunyer, J., Salinas, I. 2013. The mucosal immune system of fish: the evolution of tolerating commensals while fighting pathogens. *Fish & shellfish immunology*, 35(6), 1729–1739. doi:10.1016/j.surg.2006.10.010.Use
- González-Félix, M. L., Gatlin, D. M., Urquidez-Bejarano, P., de la Reé-Rodríguez, C., Duarte-Rodríguez, L., Sánchez, F., Casas-Reyes, A., Yamamoto, F. Y., Ochoa-Leyva, A., Perez-Velazquez, M. 2018. Effects of commercial dietary prebiotic and probiotic supplements on growth, innate immune responses, and intestinal microbiota and histology of *Totoaba macdonaldi*. *Aquaculture*, 491(March), 239–251. doi:10.1016/j.aquaculture.2018.03.031
- Gotteland, M., Riveros, K., Gasaly, N., Carcamo, C., Magne, F., Liabeuf, G., Beattie, A., Rosenfeld, S. 2020. The pros and cons of using algal polysaccharides as prebiotics. *Frontiers in Nutrition*, 7(October). doi:10.3389/fnut.2020.00163
- Gu, M., Bai, N., Zhang, Y., Krogdahl, Å. 2016. Soybean meal induces enteritis in turbot *Scophthalmus maximus* at high supplementation levels. *Aquaculture*, 464, 286–295. doi:10.1016/j.aquaculture.2016.06.035
- Gupta, S., Lokesh, J., Abdelhafiz, Y., Siriyappagouder, P., Pierre, R., Sørensen, M., Fernandes, J. M. O., Kiron, V. 2019. Macroalga-derived alginate oligosaccharide alters antestinal bacteria of Atlantic Salmon. *Frontiers in Microbiology*.. doi:10.3389/fmicb.2019.02037
- Gupta, Y. P. 1987. Anti-nutritional and toxic factors in food legumes : a review. *Plant Foods for Human Nutrition*, 37, 201–228.
- Halver, J. E., Hardy, R. W. 2003. Nutrient flow and retention. En *Fish Nutrition*, (3rd ed.). Elsevier. 755–770. doi:10.1016/b978-012319652-1/50015-x
- Harborne, J. B. 1985. Phytochemical methods. En *Brittonia* (2nd ed). Chapman and hall. doi:10.2307/2806080
- Hardy, R. W. 2010. Utilization of plant proteins in fish diets: Effects of global demand and supplies of fishmeal. *Aquaculture Research*, 41(5), 770–776. doi:10.1111/j.1365-2109.2009.02349.x
- Hassan, S. M., Aqil, a a Al, Attimarad, M. 2013. Determination of crude saponin and total flavonoids content in guar meal. *Advancement in Medicinal Plant Research*, 1(1), 24–28.
- Hendricks, J. D. 2003. Adventitious toxins. En *Fish Nutrition*. (3rd ed) Elsevier. doi:10.1016/b978-012319652-1/50011-2
- Hoebe, K., Janssen, E., Beutler, B. 2004. The interface between innate and adaptive immunity. *Nature*

Immunology, 5(10), 971–974. doi:10.1038/ni1004-971

- Hofer, R., Sturmbauer, C. 1986. Inhibition of trout and carp α -amylase by wheat. *Aquaculture*, 48, 277–283.
- Hua, K., Cobcroft, J. M., Cole, A., Condon, K., Jerry, D. R., Mangott, A., Praeger, C., Vucko, M. J., Zeng, C., Zenger, K., Strugnell, J. M. 2019. The future of aquatic protein: Implications for protein sources in aquaculture diets. *One Earth*, 1(3), 316–329. doi:10.1016/j.oneear.2019.10.018
- Ibrahem, 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 and Shellfish Immunology*, 29(2), 241–246.
- IFFO. 2017. Fish in: Fish out (FIFO) ratios for the conversion of wild feed to farmed fish, including salmon. Consultado el 15 de septiembre de 2021, de https://www.iffco.com/fish-fish-out-fifo-ratios-conversion-wild-feed#_ftn4
- Iwama, G. K., Thomas, P. T., Forsyth, R. B., Vijayan, M. M. 1998. Heat shock protein expression in fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 8(1), 35–56. doi:10.1023/A:1008812500650
- Iwashita, M. K. P., Addo, S., Terhune, J. S. 2015. Use of pre- and probiotics in finfish aquaculture. En *Feed and Feeding Practices in Aquaculture*. (3rd ed.). Elsevier. pp. 235–245.
- Jackson, A., Aldon, F. 2013. How much fish is consumed in aquaculture. de Global Aquaculture Alliance website. Consultado el 20 de agosto de 2021. <https://www.globalseafood.org/advocate/how-much-fish-is-consumed-in-aquaculture/>
- Juarez, L. M., Konietzko, P. A., Schwartz, M. H. 2016. Totoaba aquaculture and conservation: Hope for an endangered fish from Mexico's Sea of Cortez. *World Aquaculture*, 47(4), 30–38.
- Jutfelt, F. 2006. The intestinal epithelium of salmonids: Transepithelial transport, barrier function & bacterial interactions. Department of zoology, zoophysiology. Goteborg University. Tesis de doctorado. <https://gupea.ub.gu.se/handle/2077/4724>
- Kaushik, S. J., Cravedi, J. P., Lalles, J. P., Sumpter, J., Fauconneau, B., Laroche, M. 2000. Partial or total replacement of fish meal by soybean protein on growth, protein utilization, potencial estrogenic or antigenic effects, cholesterolemia and flesh quality in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Advances in Space Research*, 25(3–4), 737–740. doi:10.1016/S0273-1177(99)00832-7
- Kindt, T. J., Goldsby, R. A., Osborne, B. A. 2007. Inmunología de Kuby. En J. de Leon-Fraga (Ed.), *Journal of Chemical Information and Modeling* (6ta ed.). doi:10.1017/CBO9781107415324.004
- Kokou, F., Sarropoulou, E., Cotou, E., Kentouri, M., Alexis, M., Rigos, G. 2017. Effects of graded dietary levels of soy protein concentrate supplemented with methionine and phosphate on the immune and

- antioxidant responses of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *Fish and Shellfish Immunology*, 64(May), 111–121. doi:10.1016/j.fsi.2017.03.017
- Krogdahl, A., Bakke-mckellep, A. M., Baeverfjord, G. 2003. Effects of graded levels of standard soybean meal on intestinal structure, mucosal enzyme activities and pancreatic response in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) *Aquaculture Nutrition*, 9, 361–371.
- Krogdahl, Å., Bakke-mckellep, A. M., Baeverfjord, G. 2003. Effects of graded levels of standard soybean meal on intestinal structure, mucosal enzyme activities, and pancreatic response in Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.). *Journal of Crystal Growth*, 9, 361–371. doi:10.1016/0022-0248(86)90160-0
- Krogdahl, Å., Bakke-Mckellep, A. M., Røed, K. H., Baeverfjord, G. 2000. Feeding Atlantic salmon *Salmo salar* L. soybean products: Effects on disease resistance (furunculosis), and lysozyme and IgM levels in the intestinal mucosa. *Aquaculture Nutrition*, 6(2), 77–84. doi:10.1046/j.1365-2095.2000.00129.x
- Krogdahl, A., Gajardo, K., Kortner, T. M., Penn, M., Gu, M., Berge, G. M., Bakke, A. M. 2015. Soya saponins induce enteritis in Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(15), 3887–3902. doi:10.1021/jf506242t
- Lauriano, E. R., Pergolizzi, S., Aragona, M., Montalbano, G., Guerrera, M. C., Crupi, R., Faggio, C., Capillo, G. 2019. Intestinal immunity of dogfish *Scyliorhinus canicula* spiral valve: A histochemical, immunohistochemical and confocal study. *Fish and Shellfish Immunology*, 87(11), 490–498. doi:10.1016/j.fsi.2019.01.049
- Li, D. F., Reddy, G., Blecha, F., Hancock, J. D., Allee, G., Nelssen, J. L. 1988. Transient hypersensitivity to soybean meal in the early-weaned pig. *Kansas Agricultural Experiment Station Research Reports*, 0(10), 42–48. doi:10.4148/2378-5977.6263
- Lokesh, J., Fernandes, J. M. O., Korsnes, K., Bergh, Ø., Brinchmann, M. F., Kiron, V. 2012. Transcriptional regulation of cytokines in the intestine of Atlantic cod fed yeast derived mannan oligosaccharide or β -Glucan and challenged with *Vibrio anguillarum*. *Fish and Shellfish Immunology*, 33(3), 626–631. doi:10.1016/j.fsi.2012.06.017
- Lovell, R.T. 1988. Use of soybean products in diets for aquaculture species. L. McCass (Editor), *Soybean Utilization Alternatives, Symposia Proceedings for Alternate Crops and Products*, 16-18 St. Paul, MN. University of Minnesota, St. Paul, 1988, pp. 2. p. 2.
- Lovell, Richard T. 2003. *Diet and fish husbandry*. En *Fish Nutrition*. (3rd ed). Elsevier doi:10.1016/b978-012319652-1/50014-8
- Ma, T. S., Zuazago, G. 1942. Micro-Kjeldahl method for organic nitrogen. *Industrial and engineering chemistry*. 14 (3). pp 280-282
- Madrid, J., Pohlenz, C., Viana, M. T., Lazo, J. P. 2019. Dietary lysine requirement for juvenile, *Totoaba*

- macdonaldi*. Aquaculture, 500(10), 92–98. doi:10.1016/j.aquaculture.2018.10.003
- Merrifield, D. L., Olsen, R. E., Myklebust, R., Ringo, E. 2011. Dietary effect of soybean (*Glycine max*) products on gut histology and microbiota of fish. Intech, 476.
- Minjarez-Osorio, C., Castillo-Alvarado, S., Gatlin, D. M., González-Félix, M. L., Perez-Velazquez, M., Rossi, W. 2016. Plant protein sources in the diets of the sciaenids red drum (*Sciaenops ocellatus*) and shortfin corvina (*Cynoscion parvipinnis*): A comparative study. Aquaculture, 453, 122–129. doi:10.1016/j.aquaculture.2015.11.042
- Miranda, M., Lopez-Alonso, M., Garcia-Vaquero, M. 2017. Macroalgae for functional feed development: Applications in aquaculture, ruminant and swine feed industries. Seaweeds: Biodiversity, Environmental Chemistry and Ecological Impacts, (June), 133–153.
- Modra, H., Svobodova, S., Kolarova, J. 1998. Comparison of differential leukocyte counts in fish. Acta Vet. BRNO, 67, 215–226.
- Mohan, V. R., Tresina, P. S., Daffodil, E. D. 2015. Antinutritional factors in legume seeds: Characteristics and determination. En Encyclopedia of Food and Health (1a ed.). doi:10.1016/B978-0-12-384947-2.00036-2
- Mokhtar, D. M. 2017. Fish histology. From cells to organs. (2nd ed.) En Apple academic press Inc.
- Montaño-Vargas, J., Shimada, A., Vásquez, C., Viana, M. . 2002. Methods of measuring feed digestibility in the Green abalone (*Haliotis fulgens*). Aquaculture, 213((1-4)), 339-346.
- Mumford, S., Heidel, J., Smith, C., Morrison, J., MacConnell, B., Blazer, V., Histology John Morrison, N. 2007. Fish histology and histopathology. Manual de prácticas
- Murphy, K., Weaver, C. 2016. Janeway 's (9th ed). Kenneth Murphy.
- Muzquiz, M., Wood, J. A. 2007. Antinutritional factors. Chickpea breeding and management. (1st ed.). CAB International. doi:10.1079/9781845932138.006
- Nakagawa, H. 1997. Effect of dietary algae on improvement of lipid metabolism in fish. Biomedicine and Pharmacotherapy, 51(8), 345–348. doi:10.1016/S0753-3322(97)88053-5
- Natarajan, M., Ross, B., Ross, L. G. 1992. Susceptibility of carp and tilapia α -amylase to purified wheat amylase inhibitor. Aquaculture, 102, 265–274.
- NRC. 1993. Nutrient requirements of fish. En Nutrient Requirements of Fish. National Research council. (2nd ed.) pp. 124 . doi:10.17226/2115

- Oliva-Teles, A., Enes, P., Peres, H. 2015. Replacing fishmeal and fish oil in industrial aquafeeds for carnivorous fish. En D. A. Davis (3rd ed.), *Feed and Feeding Practices in Aquaculture*. Woodhead publishing: Porto, Portugal. pp. 203–223.
- Peatman, E., Lange, M., Zhao, H., Beck, B. H. 2015. Physiology and immunology of mucosal barriers in catfish (*Ictalurus spp.*). *Tissue Barriers*, 3(4), 1–14. doi:10.1080/21688370.2015.1068907
- Perez-Velazquez, M., Minjarez-Osorio, C., González-Félix, M. L. 2017. Effect of dietary lipid level on growth performance, feed utilization and body composition of totoaba, *Totoaba macdonaldi* (Gilbert, 1890). *Aquaculture Research*, 48(5), 2607–2617. doi:10.1111/are.13002
- Pigott, G. M., Tucker, B. W. 2002. Special feeds. En *Fish nutrition* (3rd ed.) Vol. 5. Elsevier. pp. 651–669.
- Press, C. M. L., Evensen, O. 1999. The morphology of the immune system in teleost fishes. *Fish and Shellfish Immunology*, 9(4), 309–318. doi:10.1006/fsim.1998.0181
- Rajan, P. 2018. Marine fishery resources and species diversity of tropical waters. En *Biodiversity and climate change adaptation in tropical islands*. (1st ed). Elsevier. pp 323-354
- Ranferi, E., Lazo, J. P. 2019. Efecto de la sustitución parcial y total de la harina y aceite de pescado con harinas de microalgas, en juveniles de *Totoaba macdonaldi*. Centro de Investigación Científica de Estudios Superiores de Ensenada. 72 pp. Tesis de maestría
- Raskovic, B., Stankovic, M., Markovic, Z., Poleksic, V. 2011. Histological methods in the assessment of different feed effects on liver and intestine of fish. *Journal of Agricultural Sciences, Belgrade*, 56(1), 87–100. doi:10.2298/jas1101087r
- Rauta, P. R., Nayak, B., Das, S. 2012. Immune system and immune responses in fish and their role in comparative immunity study: A model for higher organisms. *Immunology Letters*, 148(1), 23–33. doi:10.1016/j.imlet.2012.08.003
- Robaina, L., Izquierdo, M. S., Moyano, F. J., Socorro, J., Vergara, J. M., Montero, D., Fernández-Palacios, H. 1995. Soybean and lupin seed meals as protein sources in diets for gilthead seabream (*Sparus aurata*): nutritional and histological implications. *Aquaculture*, 130(2–3), 219–233. doi:10.1016/0044-8486(94)00225-D
- Roberts, R. J. (Ed.). 2012. *Fish pathology* (4ta ed.). Wiley-Blackwell.
- Rodger, H. D., Secombes, C. J., Belmonte, R., Evensen, O., Dalmo, R., Bogwald, J., Tafalla, C., Cowan, G., Smith, P., Chisrofilogiannis, P., Midtlyng, P. J., Monaghan, S. J., Thompson, K. D., Smith, P., Adams, A. 2016. *Fish vaccines* (A. Adams, Ed.). Springer US.
- Ross, L. G., Ross, B. 2008. *Anaesthetic and Sedative En Techniques for Aquatic Animals*. (3a ed.) Blackwell publishing. doi:10.1006/jfbi.2000.1267

- 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. doi:10.1016/j.aquaculture.2011.07.007
- Rumsey, G. L., Siwicki, A. K., Anderson, D. P., Bowser, P. R. 1994. Effect of soybean protein on serological response, non-specific defense mechanisms, growth, and protein utilization in rainbow trout. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 41(3–4), 323–339. doi:10.1016/0165-2427(94)90105-8
- Rust, M. B. 2003. Nutritional physiology. *Fish Nutrition*, (3rd ed). Elsevier. 367–452. doi:10.1016/b978-012319652-1/50008-2
- Sado, R. Y., Almeida Bicudo, A. J. D., Cyrino, J. E. . 2008. Feeding dietary mannan oligosaccharides to juvenile Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, has no effect on haematological parameters and showed decreased feed consumption. *J. World Aquacult. Soc.*, 39, 821–826.
- Saibil, H. 2013. Chaperone machines for protein folding, unfolding and disaggregation. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 14(10), 630–642. doi:10.1038/nrm3658.Chaperone
- Salinas, I., Parra, D. 2015. Fish mucosal immunity: Intestine. En *Mucosal Health in Aquaculture*. (2nd ed). Elsevier. doi:10.1016/B978-0-12-417186-2.00006-6
- Santigosa, E., Sánchez, J., Médale, F., Kaushik, S., Pérez-Sánchez, J., Gallardo, M. A. 2008. Modifications of digestive enzymes in trout (*Oncorhynchus mykiss*) and sea bream (*Sparus aurata*) in response to dietary fish meal replacement by plant protein sources. *Aquaculture*, 282(1–4), 68–74. doi:10.1016/j.aquaculture.2008.06.007
- Sanz, F. 2009. La nutrición y alimentación en piscicultura. (1st ed). Publicaciones científicas y tecnológicas de la fundación observatorio español de acuicultura.
- Sardari, R. R. R., Nordberg Karlsson, E. 2018. Marine poly- and oligosaccharides as prebiotics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(44), 11544–11549. doi:10.1021/acs.jafc.8b04418
- Sargent, J. R., Tocher, D. R., Bell, J. G. 2002. The lipids. En *Fish Nutrition* (3rd ed). Elsevier. doi:10.1038/170727c0
- Seafish.org. s/f. Feed. Pangasius. Consultado el 28 de agosto de 2021, de <https://www.seafish.org/responsible-sourcing/aquaculture-farming-seafood/species-farmed-in-aquaculture/aquaculture-profiles/pangasius/feed/>
- Sealey, W. M., Barrows, F. T., Smith, C. E., Wacyk, J. M., Powell, M. S., Hardy, R. W., Shelden, E. A. 2013. Heat shock protein regulation in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, is altered by dietary soybean meal inclusion and anti-phospholipase A2 antibody. *World Aquaculture Soc*, 44(5), 655–668.

- Shiraiwa, M., Harada, K., Okubo, K. 1991. Composition and content of saponins in soybean seed according to variety, cultivation year and maturity. *Agricultural and Biological Chemistry*, 55(2), 323–331. doi:10.1080/00021369.1991.10870575
- Shokryazdan, P., Faseleh Jahromi, M., Navidshad, B., Liang, J. B. 2017. Effects of prebiotics on immune system and cytokine expression. *Medical Microbiology and Immunology*, 206(1), 1–9. doi:10.1007/s00430-016-0481-y
- Sitjà-Bobadilla, A., Gil-Solsona, R., Estensoro, I., Piazzon, M. C., Martos-Sitcha, J. A., Picard-Sánchez, A., Fuentes, J., Sancho, J. V., Calduch-Giner, J. A., Hernández, F., Pérez-Sánchez, J. 2019. Disruption of gut integrity and permeability contributes to enteritis in a fish-parasite model: A story told from serum metabolomics. *Parasites and Vectors*, 12(1), 1–18. doi:10.1186/s13071-019-3746-7
- 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 and Shellfish Immunology*, 40(1), 40–48. doi:10.1016/j.fsi.2014.06.016
- Stone, D. A. J., Bellgrove, E. J., Forder, R. E. A., Howarth, G. S., Bansemer, M. S. 2018. Inducing subacute enteritis in yellowtail kingfish *Seriola lalandi*: the effect of dietary inclusion of soybean meal and grape seed extract on hindgut morphology and inflammation. *North American Journal of Aquaculture*, 80(1), 59–68. doi:10.1002/naaq.10002
- Sundell, K. S., Sundh, H. 2012. Intestinal fluid absorption in anadromous salmonids: Importance of tight junctions and aquaporins. *Frontiers in Physiology*, 1–13. doi:10.3389/fphys.2012.00388
- Tacchi, L., Secombes, C. J., Bickerdike, R., Adler, M. A., Venegas, C., Takle, H., Martin, S. A. M. 2012. Transcriptomic and physiological responses to fishmeal substitution with plant proteins in formulated feed in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*). *BMC Genomics*, 13(1), 1–21. doi:10.1186/1471-2164-13-363
- Tan, C., Zhou, H., Wang, X., Mai, K., He, G. 2019. Resveratrol attenuates oxidative stress and inflammatory response in turbot fed with soybean meal based diet. *Fish and Shellfish Immunology*, 91(5), 130–135. doi:10.1016/j.fsi.2019.05.030
- Torrecillas, S., Montero, D., Carvalho, M., Benitez-Santana, T., Izquierdo, M. 2021. Replacement of fish meal by Antarctic krill meal in diets for European sea bass *Dicentrarchus labrax*: Growth performance, feed utilization and liver lipid metabolism. *Aquaculture*, 545(6), 737166. doi:10.1016/j.aquaculture.2021.737166
- Tort, L., Balasch, J. C., Mackenzie, S. 2003. Fish immune system. A crossroads between innate and adaptative responses. *Inmunología*, 22(3), 277–286.
- Tran-Ngoc, K. T., Haidar, M. N., Roem, A. J., Sendão, J., Verreth, J. A. J., Schrama, J. W. 2019. Effects of feed ingredients on nutrient digestibility, nitrogen/energy balance and morphology changes in the intestine of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture Research*, 50(9), 2577–2590. doi:10.1111/are.14214

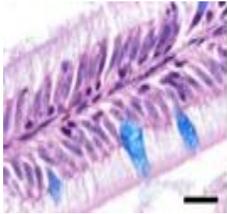
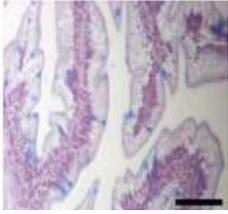
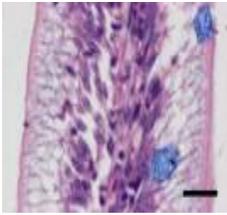
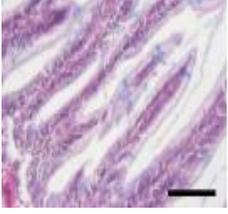
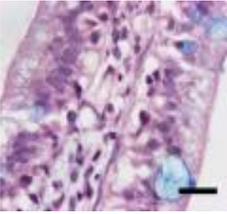
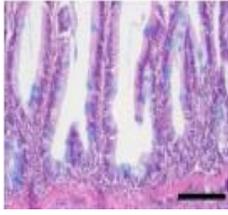
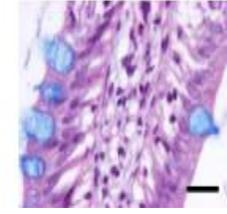
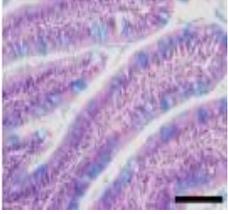
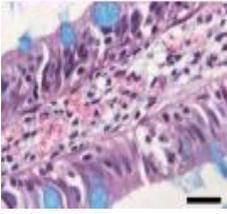
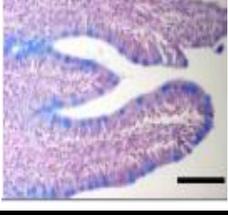
- Trejo-Escamilla, I., Galaviz, M. A., Flores-Ibarra, M., Álvarez González, C. A., López, L. M. 2017. Replacement of fishmeal by soya protein concentrate in the diets of *Totoaba macdonaldi* (Gilbert, 1890) juveniles: effect on the growth performance, in vitro digestibility, digestive enzymes and the haematological and biochemistry parameters. *Aquaculture Research*, 48(8), 4038–4057. doi:10.1111/are.13225
- Troisi, J., Pulvento, C., National, I., National, I., Vega-galvez, A. 2014. Saponinas. Estado del arte de la quinoa en el mundo 2013. (1st ed.) FAO. CIRAD. doi:10.13140/2.1.1568.5129
- Tsukimi, Y., Okabe, S. 2001. Recent advances in gastrointestinal pathophysiology: Role of heat shock proteins in mucosal defense and ulcer healing. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 24(1), 1–9. doi:10.1248/bpb.24.1
- Urán, P. A. 2008. Etiology of soybean-induced enteritis in fish. Wageningen University. Tesis de doctorado
- Uran, P. A., Schrama, J. W., Rombout, J. H. W. M., Obach, A., Jensen, L., Koppe, W., Verreth, J. A. J. 2008. Soybean meal-induced enteritis in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) at different temperatures. *Aquaculture Nutrition*, 14(4), 324–330. doi:10.1111/j.1365-2095.2007.00534.x
- Uzoma Aguoru, C., Ogbodo, C., Olalekan Olasan, J. 2017. Chemosystematics studies on six varieties of *Mangifera indica* L. *Agricultural Sciences*, 08(03), 253–259. doi:10.4236/as.2017.83018
- van den Ingh, T. S. G. A. M., Krogdahl, Å., Olli, J. J., Hendriks, H. G. C. J. M., Koninkx, J. G. J. F. 1991. Effects of soybean-containing diets on the proximal and distal intestine in Atlantic salmon (*Salmo salar*): a morphological study. *Aquaculture*, 94(4), 297–305. doi:10.1016/0044-8486(91)90174-6
- Van Keulen, J., Young, B. A. 1977. Evaluation of acid-insoluble ash as a natural marker in ruminant digestibility studies. 44(2), 282–287.
- Vasconcelos, I. M., Oliveira, J. T. A. 2004. Antinutritional properties of plant lectins. *Toxicon*, 44(4), 385–403. doi:10.1016/j.toxicon.2004.05.005
- Vazirzadeh, A., Marhamati, A., Rabiee, R., Faggio, C. 2020. Immunomodulation, antioxidant enhancement and immune genes up-regulation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed on seaweeds included diets. *Fish and Shellfish Immunology*, 135577. doi:https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.08.048.
- Vetvicka, V., Vannucci, L., Sima, P. 2013. The effects of β - Glucan on fish immunity. *North American Journal of Medical Sciences*, 5(10), 580–588. doi:10.4103/1947-2714.120792
- Viana, M. T., Rombenso, A. N., Del Rio-Zaragoza, O. B., Nomura, M., Díaz-Argüello, R., Mata-Sotres, J. A. 2019. Intestinal impairment of the California yellowtail, *Seriola dorsalis*, using soybean meal in the diet. *Aquaculture*, 513(April), 734443. doi:10.1016/j.aquaculture.2019.734443
- Vidal-valverde, C., Frias, J., Estrella, I., Gorospe, M. J., Ruiz, R., Bacon, J., Industriales, I. D. F., Cierva, J. De.

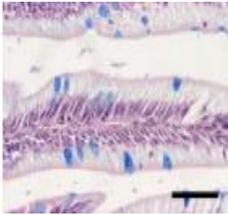
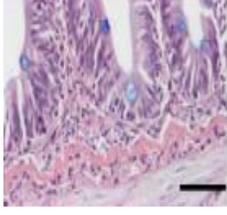
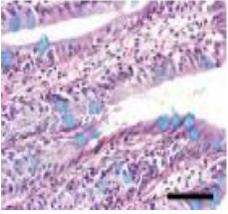
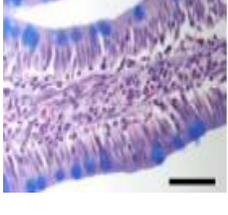
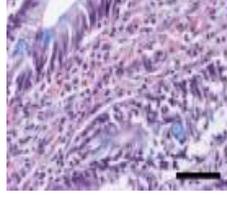
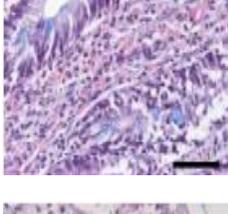
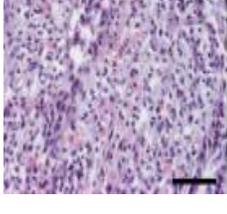
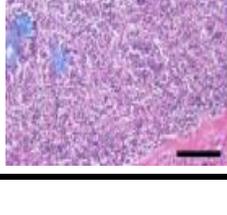
1994. Effect of processing on some antinutritional factors of lentils. *J. agric. Food Chem*, (1992), 2291–2295. doi:10.1021/jf00046a039
- Villanueva-Gutiérrez, E., González-Félix, M. L., Gatlin, D. M., Perez-Velazquez, M. 2020. Use of alternative plant and animal protein blends, in place of fishmeal, in diets for juvenile totoaba, *Totoaba macdonaldi*. *Aquaculture*, 529(July), 735698. doi:10.1016/j.aquaculture.2020.735698
- Villarreal, G., Lazo, J. P., Cordero, B. 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* (Vol. 11). doi:10.16194/j.cnki.31-1059/g4.2011.07.016
- Vol, G., Words, K. 1996. Biological effects metabolic of plant lectins on the gastrointestinal tract: meteabolic consequences and applicatons. *Trends In Glycoscience And Glycotechnology*, 8(41), 149–165.
- Wang, K., Liu, C., Hou, Y., Zhou, H., Wang, X., Mai, K., He, G. 2019. Differential apoptotic and mitogenic effects of lectins in Zebrafish. *Frontiers in Endocrinology*, 10(6), 1–10. doi:10.3389/fendo.2019.00356
- Wang, Y., Lin, F., Zhu, X., Leone, V. A., Dalal, S., Tao, Y., Messer, J. S., Chang, E. B. 2018. Distinct roles of intracellular heat shock protein 70 in maintaining gastrointestinal homeostasis. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 314(2), G164–G178. doi:10.1152/ajpgi.00208.2017
- Webster, C., Lim, C. 2002. Nutrient requirements and feeding of finfish for aquaculture. En *Nutrient requirements and feeding of finfish for aquaculture*. doi:10.1079/9780851995199.0000
- Wee, K. L., Shu, S.-W. 1989. The nutritive value of boiled full-fat soybean in pelleted feed for Nile tilapia. *Aquaculture* 81, 303–314., 81, 303–314.
- Weiss, D., Wardrop, J. 2000. *Veterinary hematology*. Vol. 4 (2nd ed.). Wiley-Blackwell. <http://marefateadyan.nashriyat.ir/node/150>
- Wilson, J. M., Castro, L. F. C. 2010. Morphological diversity of the gastrointestinal tract in fishes. En *Fish Physiology* (1st Ed, Vol. 30). doi:10.1016/S1546-5098(10)03001-3
- Wilson, R. P. 2002. Amino acids and proteins. En *Fish nutrition* (3rd ed.). Elsevier. doi:10.5005/jp/books/13106_3
- Worthington Biochemical Corporation. 1993. Alpha amylase. En *Worthington Enzyme Manual: Enzymes and Related Biochemicals*.
- Wu, N., Song, Y. L., Wang, B., Zhang, X. Y., Zhang, X. J., Wang, Y. L., Cheng, Y. Y., Chen, D. D., Xia, X. Q., Lu, Y. S., Zhang, Y. A. 2016. Fish gut-liver immunity during homeostasis or inflammation revealed by

- integrative transcriptome and proteome studies. *Scientific Reports*, 6(October), 1–17. doi:10.1038/srep36048
- Zakęś, Z., Demska-Zakęś, K., Kowalska, A., Hancz, C., Jarmołowicz, S. 2010. Impact of diets supplemented with rapeseed, soy, and sunflower oils on growth rates and the histological picture of the livers of juvenile pikeperch, *Sander lucioperca* (L.). *Archives of Polish Fisheries*, 18(2), 67–75. doi:10.2478/v10086-010-0008-x
- Zapata, D. B., Lazo, J. P., Herzka, S. Z., Viana, M. T. 2016. The effect of substituting fishmeal with poultry by-product meal in diets for *Totoaba macdonaldi* juveniles. *Aquaculture Research*, 47(6), 1778–1789. doi:10.1111/are.12636
- Zhang, J., Zhong, L., Peng, M., Chu, W., Liu, Z., Dai, Z., Hu, Y. 2019. Replacement of fish meal with soy protein concentrate in diet of juvenile rice field eel *Monopterus albus*. *Aquaculture Reports*, 15(June). doi:10.1016/j.aqrep.2019.100235
- Zhang, W., Tan, B., Deng, J., Dong, X., Yang, Q., Chi, S., Liu, H., Zhang, S., Xie, S., Zhang, H. 2021a. Effects of high level of fermented soybean meal substitution for fish meal on the growth, enzyme activity, intestinal structure protein and immune-related gene expression and intestinal flora in juvenile pearl gentian grouper. *Aquaculture Nutrition*, 27(5), 1433–1447. doi:10.1111/anu.13281
- Zhang, W., Tan, B., Deng, J., Dong, X., Yang, Q., Chi, S., Liu, H., Zhang, S., Xie, S., Zhang, H. 2021b. Mechanisms by which fermented soybean meal and soybean meal induced enteritis in marine fish juvenile pearl Gentian Grouper. *Frontiers in Physiology*, 12. doi:10.3389/fphys.2021.646853
- Zhang, Y. A., Salinas, I., Li, J., Parra, D., Bjork, S., Xu, X., LaPatra, S., Bartholomew, J., Sunyer, J. O. 2010. IgT, a primitive immunoglobulin class specialized in mucosal immunity. *Nat Immunol.*, 11(9), 827–835. doi:10.1038/ni.1913.IgT
- Zhou, Q., Buentello, J. A., Iii, D. M. G. 2010. Effects of dietary prebiotics on growth performance, immune response and intestinal morphology of red drum (*Sciaenops ocellatus*). *Aquaculture*, 309(1–4), 253–257. doi:10.1016/j.aquaculture.2010.09.003
- Zhou, Z., Ringø, E., Olsen, R. E., Song, S. K. 2018. Dietary effects of soybean products on gut microbiota and immunity of aquatic animals: A review. *Aquaculture Nutrition*, 24(1), 644–665. doi:10.1111/anu.12532
- Zhu, R., Li, L., Li, M., Yu, Z., Wang, H., Wu, L. 2020. The effects of substituting fish meal with soy protein concentrate on growth performance, antioxidant capacity and intestinal histology in juvenile golden crucian carp, *Cyprinus carpio* × *Carassius auratus*. *Aquaculture Reports*, 18(7), 100435. doi:10.1016/j.aqrep.2020.100435

Anexos

Tabla 7. Sistema de puntuación semicuantitativo descrito por Urán, (2008). Recuperado Se evaluaron la cantidad de vacuolas supranucleares contenidas en los enterocitos (VSN), la cantidad de células mucosas coloreadas de azul en los pliegues mucosos (CM), el grosor de la lámina propia (LP) y la infiltración de granulocitos eosinófilos en los pliegues mucosos (GE). Cada parámetro se calificó en una escala del 1 al 5, en la que 5 es la condición más severa de enteritis. Tabla modificada de Urán, (2008)

Calificación	Vacuolas supranucleares		Cantidad de células mucosas en los pliegues	
1		Tamaño basal		Células difusas
2		Reducción del tamaño		Incremento de células dispersas
3		Reducción del tamaño y difusión		Células ampliamente distribuidas
4		Comienza extinción de vacuolas		Grupos densos de células
5		Sin vacuolas		Muy abundantes y apretadas

Calificación	Grosor de la lámina propia		Granulocitos eosinófilos	
1		Tamaño normal		Pocos GE en la mucosa sub-epitelial
2		Incremento de tamaño		Incrementa el número en la MSE y algunos migran a la LP
3		Tamaño mediano		Incrementa la migración a la LP
4		Tamaño largo		Células difusas en la Lp y MS
5		Extra largo		Una gran densidad de GE en la LP y MS