

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS

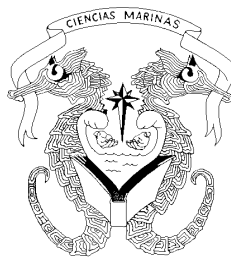
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS



Proteína de soya en dietas de juveniles de *Totoaba macdonaldi* y su efecto sobre la actividad de enzimas digestivas y metabólicas, y salud de los organismos bajo condiciones de cultivo

QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS EN ECOLOGÍA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA



PRESENTA

IDALY TREJO ESCAMILLA

ENSENADA, BAJA CALIFORNIA, MÉXICO, OCTUBRE DEL 2016.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE BAJA CALIFORNIA
Facultad de Ciencias Marinas
Instituto de Investigaciones Oceanológicas
POSGRADO EN ECOLOGÍA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA

"Proteína de soya en dietas de juveniles de *Totoaba macdonaldi* y su efecto sobre la actividad de enzimas digestivas y metabólicas, y salud de los organismos bajo condiciones de cultivo"

TESIS

Que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de:
DOCTOR EN CIENCIAS EN ECOLOGÍA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

IDALY TREJO ESCAMILLA

APROBADA POR:


Dra. Lus Mercedes López Acuña
Directora de Tesis
Dr. Mario Alberto Galaviz Espinoza
Sinodal
Dr. Carlos Alfonso Álvarez González
Sinodal
Dra. Ivone Giffard Mena
Sinodal
Dr. Conal David True
Sinodal

Ensenada, B. C. Octubre del 2016

RESUMEN

Totoaba macdonaldi, es un pez carnívoro endémico del Golfo de California, es muy cotizado en Oriente por su vejiga natatoria (buche); y es un organismo que se encuentra clasificado en peligro de extinción. Al ser un pez carnívoro, el principal reto para su avance tecnológico es la formulación de alimentos óptimos para su crecimiento y desarrollo. A fin de minimizar los costos en los insumos del alimento para totoaba, en el presente trabajo se diseñaron dietas con proteína de soya en sustitución parcial de la proteína de pescado, con la intención de evaluar y encontrar la mejor respuesta a la fuente alternativa. El concentrado de proteína de soya (CPS) es un producto derivado del grano de la soya con mayor aporte de proteína y en teoría, una fuente con mejor digestibilidad, en comparación a las harinas enteras de otros ingredientes vegetales. En el presente estudio se evaluó la respuesta en crecimiento, metabolismo y fisiología digestiva de los juveniles de *T. macdonaldi* ante las diferentes inclusiones de CPS. Se elaboraron ocho dietas experimentales con 0, 15, 30, 45, 60, 75, 90 y 100% de sustitución de HP. Para este bioensayo se trabajó con peces de 50 ± 1 g de peso inicial. Al final del experimento se demostró por medio de un modelo de regresión cuadrática que el mayor nivel de sustitución que puede incluirse en la dieta de totoaba es de 37.15% de CPS, mostrando la mejor respuesta en el desempeño y en los parámetros de crecimiento, tales como peso ganado, índice de crecimiento diario, tasa de crecimiento específico, así como en el consumo de alimento y razón de eficiencia proteica. De la misma forma la respuesta en la digestibilidad *in vitro* y actividad de enzimas digestivas no se vieron afectadas con inclusiones menores a 45% de sustitución. Por otra parte, las enzimas del metabolismo intermediario respondieron de manera significativa ante las variaciones de la inclusión de CPS. En el catabolismo de aminoácidos se mostró variaciones en la actividad de alanina aminotransferasa (ALAT), donde la actividad más alta se presentó en hígados de los peces alimentados con las dietas DC a CPS45. De la misma forma, las enzimas involucradas en la glucólisis como la hexoquinasa (HK), glucoquinasa (GK) y de la vía de la gluconeogénesis como la fructosa-1,6-bifosfatasa (FBPasa), cuyas enzimas mostraron una disminución paulatina en su actividad conforme se incrementó la inclusión de CPS.. En los resultados de hematología y química sanguínea se observó una mejor respuesta en las dietas DC a CPS45. En general, los resultados del presente estudio, pueden sugerir incorporar niveles no mayores a 45% de CPS en futuras dietas para juveniles de *Totoaba macdonaldi* con el fin de lograr reducir los costos en los insumos de los alimentos para la especie.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma de Baja California, a la Facultad de Ciencias de Marinas y al Instituto de Investigaciones Oceanológicas por haberme aceptado para poder cursar el Doctorado en el posgrado en Ecología Molecular y Biotecnología.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por brindarme la beca para realizar mis estudios de posgrado.

De manera especial quiero agradecer a la Dra. Lus Mercedes López Acuña, quien me dio su confianza, creyó en mí y me brindó siempre su apoyo y su amistad en el transcurso de todo mi posgrado.

Al Dr. Mario A. Galaviz, por haberme apoyado durante todo mi posgrado, durante los bioensayos, en el laboratorio, en el trabajo de escritorio y por supuesto, gracias por brindarme tú amistad.

Al Dr. Alfonso C. Álvarez, quien me recibió en su laboratorio, atendía a mis dudas justo cuando lo requería, me aconsejaba y sobretodo me brindó su amistad.

A la Dra. Ivone Giffard, por ayudarme y asesorarme en todo momento que lo requería, por sus cátedras y sus consejos.

Al Dr. Conal D. True, por haberme proporcionado a mis 480 hijos (totoabas) y siempre estuvo al pendiente de mi bioensayo, además por su apoyo en todo momento que lo requería.

A la Dra. Irma Soria, por su apoyo en el transcurso de mi posgrado, por sus recomendaciones y consejos.

A todo mi comité integrado por: Dra. Lus Mercedes López Acuña, Dr. Mario A. Galaviz, Dr. Alfonso C. Álvarez, Dra. Ivone Giffard, Dra. Irma Soria Mercado, Dr. Conal D. True, quienes me brindaron sus observaciones, correcciones y recomendaciones para llevar a un buen término la presente tesis.

A mi estimada Maestra Olivia Tapia, quien siempre me brindó su paciencia y su sabiduría en el área de histología, estoy inmensamente agradecida, sigo aprendiendo de todo el conocimiento que posee y su pasión que la distingue al enseñar.

A la Biol. Deyanira Rodarte, quién me apoyó en el área de histología, tuvo la paciencia para enseñarme y mostrarme el camino en ésta área, mil gracias Deya, y sobre todo por tu gran amistad.

A la Dra. Amalia Pérez Jiménez, quien a pesar de no conocerla físicamente, siempre estuvo dispuesta a guiarme desde Portugal y España, sigo aprendiendo de los conocimientos que genera.

Al Dr. Sergio Rodríguez y a la Quím. Marina Villegas, quienes me apoyaron en los análisis del perfil de aminoácidos de las dietas experimentales.

Al Lic. Heraclio Espinosa Acebedo, quien me apoyó desde el inicio de mi experimento, sin tu ayuda no sé qué hubiese hecho, fuiste clave importante en mi trabajo.

A todo el equipo que trabaja en la Unidad de Biotecnología en Piscicultura de la Facultad de Ciencias Marinas, sobre todo al Maestro Gerardo Sandoval por su apoyo incondicional y tu amistad en mi posgrado.

A mis queridos compañeros y amigos del Laboratorio de Nutrición: Isaura Bañuelos, Miguel Cabanillas, Tony Satriyo, Heraclio Espinosa, Paola Pérez, gracias por su amistad y su apoyo.

A todos mi amigos que estuvieron motivándome para llegar a este paso de mi vida, gracias por sus porras y consejos Melba De Jesús, Citlali Mirabal, Faviola Martínez, Blanca Partida, Julieta Herlo, Yesica Solorzano, Paty Millan, Francina L.Tarín, Jesús Ibarguen, Zarina, Rocio Latorre, Deyanira, Victoria y Miriam García.

A mis padres Rosy y Adolfo, gracias por su amor y su apoyo de mil maneras, ya que sin ustedes no hubiese llegado hasta este momento, los amo.

A mi hijo Evans, quien ha estado a mi lado en toda esta travesía y haz sido mi motorcito de vida, pero sobre todo agradezco a mí amado esposo Uddiel, quien me apoyó en todo este recorrido y tuvo la paciencia para sobrellevarme en los momentos difíciles.

DEDICATORIA

A Dios, por darme el regalo de la vida, haberme abierto las puertas correctas, ser mi pastor en toda mi travesía, por darme sabiduría y entendimiento cuando lo requería, y por incrementar mi Fé y amor hacia él.

A mis padres Rosy y Adolfo, quienes han sido mi ejemplo de superación y me han llenado de amor, siempre han estado cuando más los necesito, lo amo con toda mi alma.

A mis hermanos Citaly y Víctor, que me apoyaron y motivaron a salir adelante a pesar de las adversidades.

A mi pequeño hijo Evans André, quien es mi motor y motivo de vida, te amo inmensamente mi pequeño súper héroe.

A mi amado esposo Uddiel, quien a pesar de muchas adversidades nunca dejaste que me rindiera, te amo con todo mi ser, gracias por tu apoyo incondicional y tu gran amor.

ÍNDICE

CAPÍTULO I.....	6
1.0. INTRODUCCIÓN	7
1.1.0. Descripción y biología de <i>Totoaba macdonaldi</i>	1
1.2. Pesquería y medidas de protección	2
1.3. Estudios realizados en totoaba e interés en su acuacultura	3
1.4. Aspectos generales de sustitución de la harina de pescado.....	6
1.5. Generalidades de enzimas digestivas.....	11
1.6. Generalidades de metabolismo intermediario.....	15
2.0. ANTECEDENTES	22
2.1. Enzimas digestivas en peces.....	23
2.2. Metabolismo Intermediario	26
2.3. Hematología y química sanguínea en cultivo de peces	28
2.4. Histología de tejido hepático.....	29
3.0. Justificación	32
4.0. Hipótesis	33
5.0. Objetivos.....	33
5.1. Objetivo general	33
5.2. Objetivos particulares.....	33
6.0. Material y métodos.....	34
6.1. Dietas.....	34
6.2. Crecimiento.....	38
6.3. Parámetros de crecimiento y eficiencia del alimento.....	38
6.4 Métodos analíticos.....	40
6.4.5. Análisis químico proximal.....	41
6.5. Determinación de aminoácidos	41
6.6. Grado de hidrólisis (GH) y digestibilidad <i>In vitro</i>	42
6.7. Actividad de enzimas digestivas	42
6.8. Actividad de enzimas claves del metabolismo intermediario.....	43
6.9. Análisis hematológico y bioquímica sanguínea	46
6.10 Análisis histológico	47
7.0. Análisis estadístico	47

CAPÍTULO II.....	49
II. 8.0. RESULTADOS.....	50
II. 8.1. Supervivencia, crecimiento y eficiencia alimenticia	51
II. 8.2. Composición proximal de tejidos y retención de nutrientes	53
II.8.3. Grado de hidrólisis (GH) y Digestibilidad <i>In vitro</i>	59
II. 8.4. Actividad de enzimas digestivas	59
II. 8.5. Actividad de enzimas que participan en el metabolismo intermediario	63
II. 8.6. Hematología.....	67
II.8.7. Química sanguínea	68
II.8.8. Histología del hepatopáncreas de <i>Totoaba macdonaldi</i>	71
II.9.0. DISCUSIONES	79
II.9.1. Parámetros de crecimiento y eficiencia alimenticia	80
II.9.2. Composición proximal	82
II.9.3. Digestibilidad <i>In Vitro</i>	84
II.9.4. Actividad enzimática	87
II.9. 5. Metabolismo intermediario.....	93
II.9.6. Hematología y química sanguínea	101
II.9.7. Histología del parénquima hepático de los juveniles de totoaba.....	105
II.10.0. DISCUSIONES GENERALES.....	111
II.11.0. CONCLUSIONES GENERALES.....	117
12.0. RECOMENDACIONES	117
13.0. BIBLIOGRAFÍA	118

Lista de figuras

Figura 1. Reproductores de <i>Totoaba macdonaldi</i> en las instalaciones de la Unidad de Biotecnología en Piscicultura, Facultad de Ciencias Marinas.....	5
Figura 2. Visión genera de las principales rutas metabólicas (Tomado de Pérez-Jiménez, 2008).....	21
Figura 3. Crecimiento presentado en juveniles de <i>Totoaba macdonaldi</i> con los diferentes tratamientos durante el estudio experimental.....	51
Figura 4. Modelo de regresión cuadrática adaptada para describir la ganancia en peso ($\text{g kg ABW}^{-1} \text{ día}^{-1}$) de los juveniles de <i>Totoaba macdonaldi</i> en respuesta al remplazo de la harina de pescado por el concentrado de proteína de soya (CPS) en las dietas.....	53
Figura 5. Cortes histológicos de hepatopáncreas de juveniles de <i>Totoaba macdonaldi</i>	72
Figura 6. Cortes histológicos de hepatopáncreas de juveniles de <i>Totoaba macdonaldi</i> alimentados con DC.	77
Figura 7. Cortes histológicos de hepatopáncreas de juveniles de <i>Totoaba macdonaldi</i> alimentados con CPS15.....	75
Figura 8. Cortes histológicos de hepatopáncreas de juveniles de <i>Totoaba macdonaldi</i> alimentados con CPS30.....	76
Figura 9. Cortes histológicos de hepatopáncreas de juveniles de <i>Totoaba macdonaldi</i> alimentados con CPS45.....	76
Figura 10. Cortes histológicos de hepatopáncreas de juveniles de <i>Totoaba macdonaldi</i> alimentados con CPS60.....	77
Figura 11. Cortes histológicos de hepatopáncreas de juveniles de <i>Totoaba macdonaldi</i> alimentados con CPS75.....	77
Figura 12. Cortes histológicos de hepatopáncreas de juveniles de <i>Totoaba macdonaldi</i> alimentados con CPS90.....	78
Figura 13. Cortes histológicos de hepatopáncreas de juveniles de <i>Totoaba macdonaldi</i> alimentados con CPS100.....	78

Lista de tablas

Tabla 1. Factores antinutricionales importantes presentes en ingredientes vegetales (tomado de Francis et al. 2001).....	8
Tabla 2. Clasificación de las enzimas de acuerdo a la reacción que catalizan (tomado de Lehninger et al., 1984).....	12
Tabla 3. Ingredientes y composición proximal de las dietas experimentales para los juveniles <i>Totoaba macdonaldi</i> con diferentes niveles de concentrado de proteína de soya (CPS).....	36
Tabla 4. Perfil de aminoácidos (g 100 g dieta ⁻¹) de las diferentes dietas experimentales de los juveniles de <i>Totoaba macdonaldi</i>	37
Tabla 5. Supervivencia, Parámetros de crecimiento y eficiencia alimenticia de juveniles de <i>Totoaba macdonaldi</i> alimentados con las diferentes dietas experimentales durante dos meses.....	56
Tabla 6. Composición proximal de pez entero, músculo e hígado (% peso seco) de juveniles de <i>Totoaba macdonaldi</i> alimentados con las diferentes dietas experimentales durante dos meses.....	57
Tabla 7. Retención de Nitrógeno, Lípidos y Energía de los juveniles de <i>Totoaba macdonaldi</i> alimentados con las diferentes dietas experimentales durante dos meses.....	58
Tabla 8. Grado de Hidrólisis y % de digestibilidad de las diferentes dietas experimentales con diferentes niveles de concentrado proteínico de soya que fueron utilizadas para alimentar a los juveniles de <i>Totoaba macdonaldi</i>	61
Tabla 9. Actividad de enzimas digestivas de juveniles de <i>Totoaba macdonaldi</i> alimentados con diferentes niveles de concentrado de proteína de soya durante dos meses.....	62
Tabla 10. Actividad específica de enzimas relacionadas con el metabolismo intermediario hepático de juveniles de <i>Totoaba macdonaldi</i> alimentados con diferentes niveles de concentrado de proteína de soya (CPS).	65
Tabla 11. Actividad específica de enzimas relacionadas con el metabolismo intermediario hepático de juveniles de <i>Totoaba macdonaldi</i> alimentados con diferentes niveles de concentrado de proteína de soya (CPS).....	66

Tabla 12. Hematología y química sanguínea en juveniles de <i>Totoaba macdonaldi</i> en respuesta a las diferentes dietas con distintos niveles de inclusión de concentrado de proteína de soya.....	70
--	----

Tabla 13. Descripción del hepatopáncreas de los juveniles de <i>Totoaba macdonaldi</i> bajo los diferentes tratamientos.....	73
---	----

CAPÍTULO I

1.0. INTRODUCCIÓN

1.1.0. Descripción y biología de *Totoaba macdonaldi*

1.1.1. Clasificación taxonómica

- Reino: Animalia
- Filo: Chordata
- Clase: Actinopterygii
- Orden: Perciformes.
- Familia: Sciaenidae.
- Género: *Totoaba*.
- Especie: *macdonaldi*

Totoaba macdonaldi (Gilbert, 1981), se encuentra clasificada como un género y especie para la familia Sciaenidae (Cisneros-Mata et al., 1995).

De acuerdo a los caracteres distintivos de la especie; presentan un cuerpo alargado, cabeza puntiaguda, una boca oblicua y grande, la mandíbula inferior levemente prominente. Es un pez marino de gran tamaño (hasta 2 m de largo y de hasta 135 kg) y llega a vivir un promedio de 15 años (Fischer et al., 1995; Román-Rodríguez y Hammenn, 1997), presenta una madurez sexual tardía (a los 6 y 7 años de edad) (Cisneros-Mata et al., 1995).

En la cadena trófica de totoaba se observa una inclinación por pequeños peces de manera preferente, así como también por crustáceos (jaibas y camarones) se denomina como un pez netamente carnívoro (Arvizu y Chávez, 1972), tiene inclinación por altos niveles de proteína y un bajo requerimiento de lípidos en su dieta (Flanagan y Hendrickson, 1976; Cisneros Mata et al., 1995, López et al., 2006; Rueda-López et al., 2011).

T. macdonaldi es una especie endémica del alto Golfo de California y desova en la boca del Río Colorado durante la primavera (Román-Rodríguez y Hammenn, 1997). El máximo de su población se localiza en el extremo norte del Golfo de California, en las cercanías de Puerto Peñasco y Santa Clara, Sonora, y San Felipe, Baja California (Arvizu y Chávez, 1972).

La distribución de la totoaba está influenciada por dos factores, 1) temperatura y 2) salinidad, por lo que la especie efectúa migraciones anuales de dos tipos; de tal manera que por la temperatura, la totoaba tiende alejarse de las aguas cálidas (meses de verano) de la zona litoral del norte del Golfo, impulsando a los peces a refugiarse en aguas profundas y frías. Por la salinidad, la especie se dirige a la desembocadura del Río Colorado a principios de marzo hasta principios de junio, con el fin de reproducirse (Berdegúé, 1955).

1.2. Pesquería y medidas de protección

Es una especie declarada en peligro de extinción, esto debido a la intensiva pesca sobre su población adulta (de 1930 a 1975), en combinación con la falta de agua que se vertía al Río Colorado, lugar de desove y crianza de esta especie, por lo que se afectó de manera negativa su población (Rowell et al., 2008).

La pesquería de totoaba se estableció antes del año de 1920, como respuesta a la demanda cada vez más elevada del buche (vejiga natatoria) por la población China residentes en San Francisco, California (Craig, 1926; Chute, 1928). En 1942 la captura de ésta especie alcanzó un máximo de 2,261 toneladas, posteriormente, sin importar el incremento en el esfuerzo pesquero, la producción anual fluctuó hasta llegar a capturar sólo 58 toneladas en 1975 (Flanagan y

Hendrickson, 1976). De acuerdo a Minjares-Osorio (2012), durante el año de 1950 la pesquería de esta especie fue una de las actividades más importantes en el Noroeste de México. Posteriormente fue catalogada como especie en peligro de extinción debido a la drástica disminución en el medio (Flanagan y Hendrickson, 1976; Cisneros-Mata et al., 1995; Valenzuela-Quiñonez et al., 2011). En 1976 fue listada por la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestre (CITES, 2010), y se encuentra protegida por la NOM-059-SEMARNAT-2010 bajo el estatus de peligro de extinción. Estas medidas implementadas tienen la finalidad de recuperar la población silvestre de totoaba estableciendo una veda permanente de la especie, de manera que se logre recuperar su población silvestre.

Con el fin de implementar un programa de repoblamiento de totoaba, la Facultad de Ciencias Marinas de la Universidad Autónoma de Baja California, en 1997 inició un proyecto teniendo como objetivo piloto la captura de reproductores y ser mantenidos en el laboratorio de acuacultura de la facultad con el propósito de lograr la reproducción en cautiverio y lograr liberar organismos al medio natural.

1.3. Estudios realizados en totoaba e interés en su acuacultura

A partir de que la especie pudo adaptarse en cautiverio, ha despertado un interés en cuestiones de reproducción y cultivo larvario, dentro de los cuales se encuentran trabajos como el de Cisneros-Mata et al. (1995), quienes reportaron la edad media de reproducción en machos y hembras en 6 y 7 años, respectivamente. Morales-Ortiz (1999), describió el desarrollo embrionario de totoaba en condiciones *ex situ* desde que el huevo es fecundado hasta que las

larvas agotan su saco vitelino, a una temperatura de 26°C y salinidad de 35 ppm. Sandoval-Garibaldi (2002), reportó el desarrollo morfológico durante su desarrollo larval. Galaviz-Espinoza (2011), analizó los cambios bioquímicos y moleculares de las principales enzimas digestivas presentes durante el desarrollo embrionario. Díaz-Viloria et al. (2013), identificaron cambios morfológicos en larvas de vida silvestre. Mata-Sotres et al. (2015), desarrollaron distintos protocolos para el destete de totoaba.

En el área nutricional y metabólica se han realizado estudios para conocer los requerimientos de la especie en cautiverio, por lo que ha tenido un gran interés por diferentes grupos de investigadores, dentro estos trabajos se encuentran los siguiente: Talamás-Rohana (2001) evaluó el efecto de la temperatura en el metabolismo en diferentes edades de juveniles de totoaba, estableciendo dos temperaturas óptimas (24 a 26°C) para el cultivo. López et al. (2006) determinaron la composición proximal y el perfil de ácidos graso en tejido muscular y vísceras de juveniles de totoaba silvestres y cultivados. Con base en el trabajo anterior se inició diversos bioensayos para conocer los requerimientos nutricionales de totoaba. Es por ello que se han realizado diversos estudios sobre la composición proximal y crecimiento por raciones de alimentación, requerimientos de energía, absorción de aminoácidos y evaluación de requerimientos de proteína (Solórzano-Salazar, 2006; Vizcaíno-Pérez, 2008; Rosas et al., 2008; Rueda-López et al., 2011; González-Acevedo, 2011). Así como también se ha investigado la respuesta del metabolismo hepático y fisiológico ante la inclusión de ingredientes vegetales (Bañuelos-Vargas et al., 2014) y respuesta del remplazo de harina de pescado

(HP) por concentrado de proteína de soya (CPS) sobre el estatus de salud, con estudios de hematología y química sanguínea e histología del hepatopáncreas de juveniles de totoaba (López et al., 2015). Hasta la fecha se siguen realizando estudios acerca de los requerimientos nutricionales en esta especie, y en específico evaluar el efecto de fuentes alternas de proteína y energía en el metabolismo y desarrollo.

En la actualidad con los avances en la producción de juveniles de totoaba en cautiverio por parte de la Unidad de Biotecnología en Piscicultura de la Universidad Autónoma de Baja California, han llevado a la especie a despertar un interés en su acuacultura, por lo que hasta la fecha se han venido realizando cultivos piloto comerciales, situados en Baja California y Baja California Sur. No obstante se necesita seguir investigando sobre los requerimientos nutricionales en dietas formuladas para poderse desarrollar su cultivo.



Figura 1. Reproductores de *Totoaba macdonaldi* en las instalaciones de la Unidad de Biotecnología en Piscicultura, Facultad de Ciencias Marinas (UABC), Ensenada B.C. (foto Richard Hermman).

1.4. Aspectos generales de sustitución de la harina de pescado

Actualmente, la industria de la acuicultura ha crecido intensamente y es una importante fuente de alimento (Hardy et al., 2010). El crecimiento general de la producción acuícola sigue siendo relativamente elevado gracias al aumento de la demanda de los peces comestibles, sobre todo peces cultivados. En 2012 la acuicultura estableció un máximo histórico de producción y ahora proporciona casi el 50% de pescado destinado a la alimentación humana, de tal manera que se prevé que éste porcentaje aumente a 62% para el 2030 (FAO 2016). No obstante, la gran demanda de ingredientes para la elaboración de dietas para organismos en cultivo se ha incrementado de manera considerable, por lo que esta actividad depende en gran medida de la inclusión de ingredientes como la harina y aceite de pescado (Aragão et al., 2003, Tibaldi et al., 2006; Kasper et al., 2007; Murray et al., 2010; Cabral et al., 2011; Bonaldo et al., 2015; Wang et al., 2016). Estos ingredientes provienen de las pesquerías de pelágicos menores como sardina y anchoveta , las cuales han llegado a su máximo de explotación y por consecuencia sus costos son cada vez más elevados (Tacon y Metian, 2008; FAO, 2016). Por lo anterior, el utilizar dietas formuladas a base de harina y aceite de pescado en el cultivo de peces y crustáceos puede llegar a representar porcentajes superiores al 50% de los costos totales de producción (García-Ortega, 2010). Especies como corvina Europea *Dicentrarchus labrax*, salmón atlántico *Salmon salar*, trucha arcoíris *Oncorhynchus myskiss*, totoaba *T. macdonaldi* y corvina blanca *Atractoscion nobilis*, requieren altos niveles de proteína (45-55 %) derivada de la harina de pescado (Wilson, 2002; Hardy, 2002;

Agúndez Amador, 2007; Durazo et al., 2010; Rueda-López, 2011), por lo que este insumo llega a incrementar los costos en la producción de los organismos de cultivo (Kumar et al., 2010; FAO, 2014) y en particular de peces carnívoros marinos.

En los últimos años, los estudios realizados en la nutrición de peces marinos carnívoros en cautiverio se han enfocado en la búsqueda de fuentes alternativas que replacen parcial o totalmente la harina y aceite de pescado que se utiliza en la elaboración de dietas, con el fin de cubrir los requerimientos y no afectar el crecimiento y supervivencia de los organismos (Gatlin et al., 2007; Alami-Durante et al., 2010; Hardy, 2010). En la actualidad varias fuentes vegetales como las harinas de soya, maíz, papa, trigo, lupino, arroz son consideradas para remplazar parcial o totalmente la harina de pescado en la dieta para organismos acuáticos, debido a su amplia disponibilidad y precios más bajos comparados con la harina de pescado (Gatlin et al., 2007; Hanse et al., 2007); así como su producción sustentable (Barrows et al., 2010). Sin embargo, uno de los problemas que presentan estas fuentes vegetales como sustitutos alternativos de proteína, es la presencia de factores antinutricionales (FANs), entre los que se encuentran: inhibidores de proteasas, lectinas, ácido fítico, saponinas, alergénicos, antivitaminas (Francis et al., 2001), Tabla 1.

Tabla 1. Factores antinutricionales importantes presentes en ingredientes vegetales (tomado de Francis et al., 2001).

Ingredientes vegetal	Factor antinutricional presente
Harina de soya	Inhibidores de proteasas, lectinas, ácido fítico, saponinas, fitoestrógenos, antivitaminas, alérgenos
Harina de colza	Inhibidores de proteasas, ácido fítico, glucosinolatos
Harina de lupino	Inhibidores de proteasas, saponinas, fitoestrógenos, alcaloides
Harina de pera	Inhibidores de proteasas, lectinas, ácido fítico, saponinas, fitoestrógenos, antivitaminas, taninos
Harina de semilla de algodón	Ácido fítico, fitoestrógenos, antivitaminas, ácido ciclopropenico, gosipol
Harina de alfalfa	Inhibidores de proteasas, saponinas, fitoestrógenos, antivitaminas
Harina de sésamo	Inhibidores de proteasas, ácido fítico

El término “factor antinutricional” hace referencia a las sustancias endógenas del ingrediente o alimento que producen efectos negativos en la salud y desbalance nutricional del organismo que lo consume (Hardy et al., 2010). Algunos ingredientes vegetales contienen FANs que pueden causar alteración en los procesos digestivos, y en consecuencia, disminución de crecimiento, pobre eficiencia alimenticia, hipertrofia pancreática, hipoglicemia, disfunción hepática e inmuno supresión (Francis et al., 2001; Hardy et al., 2011, Skugor et al., 2011). Se ha observado en peces carnívoros ser más susceptibles a altas concentraciones de FANs, provocando problemas en la salud y consecuencia en el desarrollo

productivo de los organismos (Barrows et al., 2007; Skugor et al., 2011). Durante las últimas décadas la harina de soya (HS) ha sido probada como fuente de proteína alternativa para la sustitución de la HP en dietas suministradas a los peces de cultivo (Alexis y Nengas, 2001; Helland et al., 2002; Yamamoto et al., 2007).

Altas inclusiones de HS en la dieta de peces carnívoros llegan a presentar cambios en la morfología en la zona distal del intestino, causando inflamación en esta zona o bien enteritis, así como alteraciones en las diferentes capas de la mucosa y de la lámina propia, observando infiltraciones por células inflamatorias identificadas como linfocitos, macrófagos, eosinófilos y neutrófilos (Baeverfjord & Krogdahl 1996; Bakke-McKellep et al. 2000; Krogdahl et al., 2003), además de presentarse una disminución de los enterocitos y presencia de vacuolas en el citoplasma, afectando su actividad pinocítica en la zona apical de las vellosidades intestinales (Baeverfjord y Krogdahl 1996; Burrels et al., 1999; Bakke-McKellep et al. 2000; Krogdahl et al., 2003; Sorensen et al., 2011) lo cual está asociado con pérdida de microvellosidades en los pliegues intestinales (Burrels et al., 1999; Sorensen et al., 2011) provocando una disminución de la absorción de los nutrientes, ya que el epitelio intestinal es considerado como una estructura asociada con la digestión terminal (Silva et al., 2010). Por tales razones, se ha observado un escaso aprovechamiento de HS debido quizá a una deficiencia de aminoácidos y minerales, baja digestibilidad, escasa palatabilidad y presencia de FANs (como inhibidores de proteasas, fitatos, saponinas y lectinas) (Tacon, 1994; Francis et al., 2001; Tacon y Meitan, 2008). Los inhibidores de proteasas están

comúnmente asociadas a derivados de ingredientes como la soya, por lo que estas proteínas bloquean o inhiben la actividad de las proteasas digestivas (Brown et al., 2008) llegando a causar un efecto en la digestión y absorción de los nutrientes afectando el crecimiento, eficiencia alimenticia y sobrevivencia en los peces (Pérez et al., 2003; Pérez Arvizu, 2016).

Hoy en día una alternativa prometedora en la industria de la nutrición acuícola es el concentrado de proteína de soya (CPS), el cual es un derivado de la soya que se obtiene extrayendo la proteína con agua y etanol, reduciéndose su contenido en oligosacáridos (rafinosa y estaquiosa) y otros FANs, por lo que aumenta el contenido proteínico (alrededor de 65%) (Deng et al., 2010) y su digestibilidad, siendo muy similar a la harina de pescado (HP) (Stickney et al., 1996; Day y Plascencia González, 2000). En la actualidad, es uno de los ingredientes más idóneos para la sustitución parcial o total de la harina de pescado en dietas para diferentes especies de peces marinos, mostrando resultados alentadores en salmón del Atlántico *Hippoglossus hipoglossus* (Berge et al., 1999), turbot *Scophthalmus maxiums* (Day y Plascencia González, 2000), lenguado Japonés *Paralichthys olivaceus* (Deng et al., 2006), cobia *Rachycentron canadum* (Chou et al., 2004; Trushenski et al., 2011; Watson et al., 2014), totoaba *T. macdonaldi* (Bañuelos-Vargas et al., 2014; López et al., 2015).

Es por ello, que surge la necesidad e interés en el presente trabajo, para investigar los efectos en el crecimiento, desarrollo, supervivencia y cambios metabólicos (catabolismo y anabolismo) de totoaba al consumir diferentes niveles de CPS, y poder estimar variaciones en la respuesta de la actividad de las

enzimas digestivas (tripsina, quimotripsina, fosfatasa alcalina y leucina aminopeptidasa) y del metabolismo intermediario (glucoquinasa, hexoquinasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, alanino aminotransferasa y aspartato aminotransferasa) por efecto del uso de esta proteína alternativa en las dietas de totoaba. Lo anterior con el fin de establecer el nivel máximo de sustitución de la HP por CPS, y en un futuro diseñar dietas formuladas de acuerdo a la capacidad de degradar y aprovechar fuentes alternativas para optimizar los costos del alimento para el cultivo de la especie.

1.5. Generalidades de enzimas digestivas

Las enzimas son proteínas que actúan como catalizadores biológicos que incrementan la velocidad de una reacción, sin que ellas mismas se vean alteradas en el proceso global (Lehninger et al., 1984). Las enzimas digestivas se secretan a lo largo de tracto gastrointestinal y ayudan en la degradación de los alimentos, existen tres principales grupos de enzimas las cuales se clasifican de acuerdo al sustrato donde actúan: amilasas (digieren azúcares), proteasas (digieren proteínas) y lipasas (digieren lípidos).

Muchas enzimas se han nombrado añadiendo el subfijo “asa” al nombre de su sustrato o una palabra o frase que describe su actividad. Las enzimas han sido clasificadas por la Comisión de Enzimas (EC) de la Unión Internacional de Bioquímica (IUB), de acuerdo al modo de catálisis. Principalmente se clasifican en seis grandes grupos (Lehninger et al., 1984).

Tabla 2. Clasificación de las enzimas de acuerdo a la reacción que catalizan (tomado de Lehninger et al., 1984)

No.	Clase	Tipo de reacción catalizada
1	Oxidorreductasas	Reacciones oxidación-reducción, en las cuales cambia el estado de oxidación de uno o más átomos en una molécula (p. ejem. NAD^+ y NADP^+ , como aceptador de hidrógeno). Se incluyen en este grupo a las deshidrogenasas, reductasas, hidrolasas y catalasas.
2	Transferasas	Catalizan transferencias de grupos funcionales de una molécula a otra.
3	Hidrolasas	Reacciones de hidrólisis (transferencia de grupos funcionales al agua).
4	Liasas	Eliminaciones de un grupo o adicionan un grupo a un doble enlace, u otras rupturas que impliquen un reordenamiento electrónico (H_2O , CO_2 , NH_3).
5	Isomerasas	Transferencia de grupos dentro de moléculas dando formas isoméricas.
6	Ligasas	Formación de enlaces C-C, C-S, C-O y C-N, mediante reacciones de condensación acopladas a rotura de ATP.

En el caso particular de las enzimas digestivas muchas de ellas pertenecen al grupo 3, y se han dividido en grupos de acuerdo a su función del tipo de nutriente que hidrolizan:

Las proteasas (EC 3.4), son enzimas que catalizan la hidrólisis de los enlaces peptídicos que forman la estructura primaria de las proteínas y están presentes en la mayoría de los organismos (Lehninger et al., 1984). Dentro de las proteasas

digestivas de los organismos marinos se encuentran cuatro categorías de acuerdo a su mecanismo de acción (Haard y Simpson, 2000).

1. **Proteasas ácidas aspárticas (EC 3.4.23)**, son un grupo de endoproteasas caracterizadas por una alta actividad y estabilidad al pH ácido. Estas enzimas son referidas como “aspartil” proteasas (o carboxil proteasas) porque su centro catalítico está compuesto por dos residuos de grupo carboxil presentes en el ácido aspártico (2, 22). Las tres proteínas aspárticas aisladas y caracterizadas del estómago de animales marinos son pepsina, quimotripsina y gastrina (Haard y Simpson, 2000).

A) Pepsina (EC 3.4.23.1) es una proteasa ácida que se encuentra en el estómago de la mayoría de los vertebrados. Esta enzima es secretada en su forma de zimógeno, por las células principales de la mucosa gástrica. El pepsinógeno se convierte en pepsina activa por acción de la propia enzima y el pH ácido del jugo gástrico. La pepsina hidroliza preferentemente a los enlaces peptídicos en los que intervienen restos de aminoácidos aromáticos (fenilalanina, triptófano y tirosina), así como metionina y leucina. Esta enzima tiene su máxima actividad a pH de 1-2. El óptimo pH del estómago es de 2 a 4. La pepsina se inactiva por encima de pH 6.0 (Squires et al., 1986).

2. **Las serinas proteinasas (EC 3.4.21)** han sido descritas como un grupo de endoproteasas, caracterizado por la presencia de un residuo serina en su centro catalítico. Las enzimas mejor caracterizadas en ese grupo son quimotripsina, tripsina y elastasa.

- A) **Tripsina (EC 3.4.21.4)** es la principal enzima digestiva intestinal responsable de la hidrólisis de proteína de los alimentos. Es una serina proteasa pancreática que hidroliza los enlaces peptídicos constituidos por lisina y arginina. La tripsina es una endopeptidasa digestiva que está presente en el tracto digestivo de animales terrestres y peces, juega un papel importante en la activación de endopeptidasas digestivas, ésta enzima se forma a partir del tripsinógeno en el páncreas y activa a otros zimógenos como quimiotripsinógeno y proelastasa, entre otros. (Walsh, 1970). Su pH óptimo es de 8.0 (Hartley et al., 1972).
- B) **Quimotripsina (EC 3.4.21.1)**, es una proteasa serina capaz de hidrolizar enlaces peptídicos cuando el residuo 1 contiene tirosina, fenilalanina o triptófano, así mismo, actúa sobre amidas y ésteres. Se almacena en el páncreas en forma de un precursor, quimiotripsinógeno, y es activado por la tripsina (Whitaker, 1994).
3. **Metaloproteasas (EC 3.4.24)**, son enzimas hidrolíticas que dependen de la presencia de cationes divalentes como Zn^{+2} , Ca^{+2} o Mg^{+2} para catalizar la hidrólisis del enlace peptídico.
- A) **Leucina aminopeptidasa (EC 3.4.11)**, es una *exoproteasa* que cataliza la hidrólisis de los restos aminoacídicos, concretamente desde el extremo amino de un péptido. Se clasifican en función de los requerimientos de iones metálicos (Mn^{+2} , Mg^{+2} , Zn^{+2} o Co^{+2}) y la especificidad por determinados dipéptidos (Behal et al., 1965). Entre sus funciones destacan:

la maduración de proteínas, degradación terminal de proteínas, regulación hormonal y control del ciclo celular.

Fosfatasa ácida y alcalina (EC 3.1.3.2 y 3.1.3.1), son enzimas que pertenecen al grupo de las hidrolasas, la fosfatasa alcalina hidroliza el enlace éster fosfórico entre un grupo fosfato y un radical orgánico a pH 9-10, liberando así fósforo inorgánico. Están relacionados con procesos de mineralización de los huesos (Harris, 1989), y en el proceso de transporte de nutrientes a través de la del interior de la membrana del enterocito (proceso de absorción) (Álvarez-González et al., 2008).

1.6. Generalidades de metabolismo intermediario

El metabolismo se resume en reacciones multienzimáticas de rutas metabólicas, donde el producto de una enzima es el sustrato de la siguiente, llevando a la acumulación de pequeños cambios químicos en la molécula original (Drabrowski y Guderley, 2002).

El sistema metabólico de los peces es muy semejante al de los mamíferos (Hochachka y Mommsen, 1995). Aunque, en los peces de hábitos carnívoros, la fuente principal de energía para el mantenimiento del organismo son las proteínas y los lípidos (Pérez, 2009; Chou y Kaushik, 1983). Los peces herbívoros y/o omnívoros tienden a utilizar mejor los carbohidratos como fuente alternativa de energía.

En los peces el aporte proteínico proviene directamente del alimento, de aquí toman los aminoácidos esenciales que no son sintetizados o no son adecuadamente sintetizados *de novo* por los animales, los toman directamente del

alimento (Li et al., 2009). En este contexto para suplir las necesidades metabólicas en los peces se ha visto una dependencia principal de la proteína dietaria (Cowey y Luquet, 1983). De acuerdo con Walton (1986), debido a los hábitos dietarios, los peces carnívoros (baja proteína/altos carbohidratos) tienden a reducir la habilidad de regular las enzimas del catabolismo de aminoácidos, esto en respuesta a la disminución de la proteína dietaria y un incremento de los carbohidratos.

La eficiencia del aprovechamiento y utilización de los carbohidratos en los peces, depende en gran medida de la especie y factores como el nivel y tecnologías aplicadas a las fuentes (Stone, 2003; Krogdahl et al., 2005; Moreira et al., 2008). Los carbohidratos participan en gran medida en el metabolismo de la mayoría de los vertebrados (Pérez, 2008), después de su ingestión, digestión y absorción, la glucosa es liberada a diferentes destinos metabólicos (Moon y Foster, 1995). La glucosa es importante como fuente energética en la mayoría de los animales, no obstante en peces carnívoros parece ser limitado (Hemre et al., 2002; Stone, 2003), ya que se ha visto una respuesta a hiperglicemia después de haber suministrado altos niveles de carbohidratos en la dieta (Cowey y Walton 1989; Moon, 2001; López et al., 2015) provocando un efecto negativo en la salud y crecimiento del pez (Moon, 2001). Esta respuesta puede ser influenciada a que pocas cantidades de glucosa es fosforilada por la hexoquinasa (*HK; EC 2.7.1.1*), tanto en el hígado y músculo esquelético (Walton y Cowey, 1982), lo que conlleva a una inhibición de la enzimas claves de la glucólisis y puede restringirse el aprovechamiento de la glucosa de manera importante (Enes et al., 2008).

En el metabolismo de los carbohidratos la glicolisis es la ruta del catabolismo de la glucosa en todos los organismos, incluidos los peces, por lo que se presenta la oxidación progresiva de una molécula de glucosa para generar dos moléculas de piruvato (Cowey y Walton, 1989), en esta ruta clave, la hexoquinasa (HK) es la enzima clave que fosforila a la glucosa y ayuda a mantener un gradiente de glucosa en el tejidos de los peces (Moon y Foster, 1995). La piruvato quinasa (*EC 2.7.1.40*) es una enzima clave que cataliza el último paso en la glicolisis, dando paso a la conversión de fosfoenolpiruvato a piruvato (Enes et al., 2009). Una ruta simultánea a la glucólisis, donde la glucosa puede entrar a la vía de la pentosa fosfato y donde el producto generado es NADPH, el cual es utilizado para la biosíntesis de ácidos grasos, colesterol y en la producción de ribosa-5-fosfato para la biosíntesis de purinas y pirimidinas, nucleótidos y ácidos nucleicos. Esta ruta es regulada principalmente de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (*G6PDH EC 1.1.1.49*) (Salwey, 2004; Enes et al., 2009), además el NADPH generado aporta para la regeneración de glutatión oxidado, favoreciendo a la protección de agentes oxidantes (Drabowski y Guderley, 2002). Por otra parte al generarse glucosa en exceso puede ser almacenada como una fuente energética de reserva en forma de glucógeno y ser también depositada en forma de grasa (adipocitos), donde posteriormente estas reservas son utilizadas en periodos largos de inanición o un requerimiento elevado de energía en lapsos cortos (Enes et al., 2009).

En el metabolismo lipídico en cordados, donde se incluye la digestión, absorción, transporte de lípidos, lipogénesis y β -oxidación de los ácidos grasos es

muy similar el funcionamiento, incluidos los peces (Hardy et al., 2011). En peces se ha observado que el acetil-CoA puede ser empleado en la obtención de energía mediante su oxidación en el ciclo de Krebs (Sargent et al., 2002), así como también es utilizado como precursor en la síntesis de colesterol y otros esteroides, o para la formación de cuerpos cetónicos en el hígado (Pérez, 2008).

Las enzimas metabólicas son las encargadas de catalizar las diversas reacciones químicas que se llevan a cabo dentro de las células, como producción de energía y la desintoxicación (Balch, 1997). Dentro de esta complejidad del metabolismo intermediario, las enzimas más estudiadas, son claves en el las rutas metabólicas y juegan un papel importante en la defensa antioxidante celular (Morales et al., 2004) e influyen en el mantenimiento de los organismos.

Hexoquinasa (HK; EC 2.7.1.1) en un grupo del tipo transferasa, que pueden transferir un grupo fosfato desde una molécula de "alta energía" a otra, que actuará como aceptor de este fosfato, denominada sustrato. Esta transferencia se denomina fosforilación. Hexoquinasas se han encontrado en todos los organismos (bacterias, levaduras, plantas, seres humanos y otros vertebrados). Cataliza la primera reacción de la glicólisis, que consiste en la fosforilación de glucosa a glucosa-6-fosfato, a una molécula que puede ser usada en la gluconeogénesis y la ruta de la pentosa fosfato. La HK juega un papel importante en el metabolismo intermediario. Esta enzima cuenta con diversas formas y tamaños. Entre las más importantes se encuentra la Hexoquinasa IV, comúnmente conocida como **Glukoquinasa (GK; EC 2.7.1.2.)** que es caracterizada por la baja afinidad para glucosa. Tiene un papel importante también

en la biosíntesis del glicógeno (Ferre et al., 1996; Nie et al., 2015). Enes (2009), reporta que los carbohidratos llegan a influir de manera importante en la actividad de la GK.

Glucosa-6-fosfato (G6P EC 3.1.3.9) es una enzima microsomal que juega un papel importante en la homeostasis por catálisis de la desfosforilación de glucosa-6-fosfato a glucosa, en el último paso de la gluconeogénesis y glicogenólisis. En todos los tipos de células, la actividad de la G6P está estrechamente relacionada a la membrana del retículo endoplásmico (Van de Werve et al., 2000).

Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH EC 1.1.1.49) es la primer enzima que cataliza la vía de la pentosa fosfato y la principal fuente intracelular de NADPH (Bonilla et al., 2007).

La regulación de la gluconeogénesis es dependiente en la actividad de enzimas claves como la **fructosa-1, 6-bifosfatasa (FBPasa EC 3.1.3.11)** que cataliza la hidrólisis de fructosa-1,6-bifosfatasa a fructuosa-6-fosfatasa. La FBPasa cataliza la reacción inversa catalizada en la glicólisis por la fosfofructoquinasa-1, 6-bifosfatasa.

Las enzimas **alanino aminotransferasa (AST EC 2.6.1.2)** y **aspartato aminotransferasa (AST EC 2.6.1.1)** son las más representativas en las reacciones que participan en la transaminación (Cowey y Walton, 1989). Estas enzimas transaminasas intervienen en la síntesis y degradación de aminoácidos actuando sobre la transferencia de grupos amino, estas enzimas juegan un papel importante

en la obtención de energía de manera directa para oxidación de esqueletos carbonados (Pereira et al., 1995).

Glutamato deshidrogenasa (GDH 1.4.1.2) es una enzima presente fundamentalmente en las mitocondrias del hígado, corazón, músculo y riñón. Desempeña un papel importante en el metabolismo de los aminoácidos, ya que es la llave principal que permite eliminar el radical aminado y liberan amoniaco (Salomón y Salomón, 2003). Tiene alta afinidad por el glutamato, y una alta actividad de la GDH suele ser utilizado como un indicador de posible necrosis hepática.

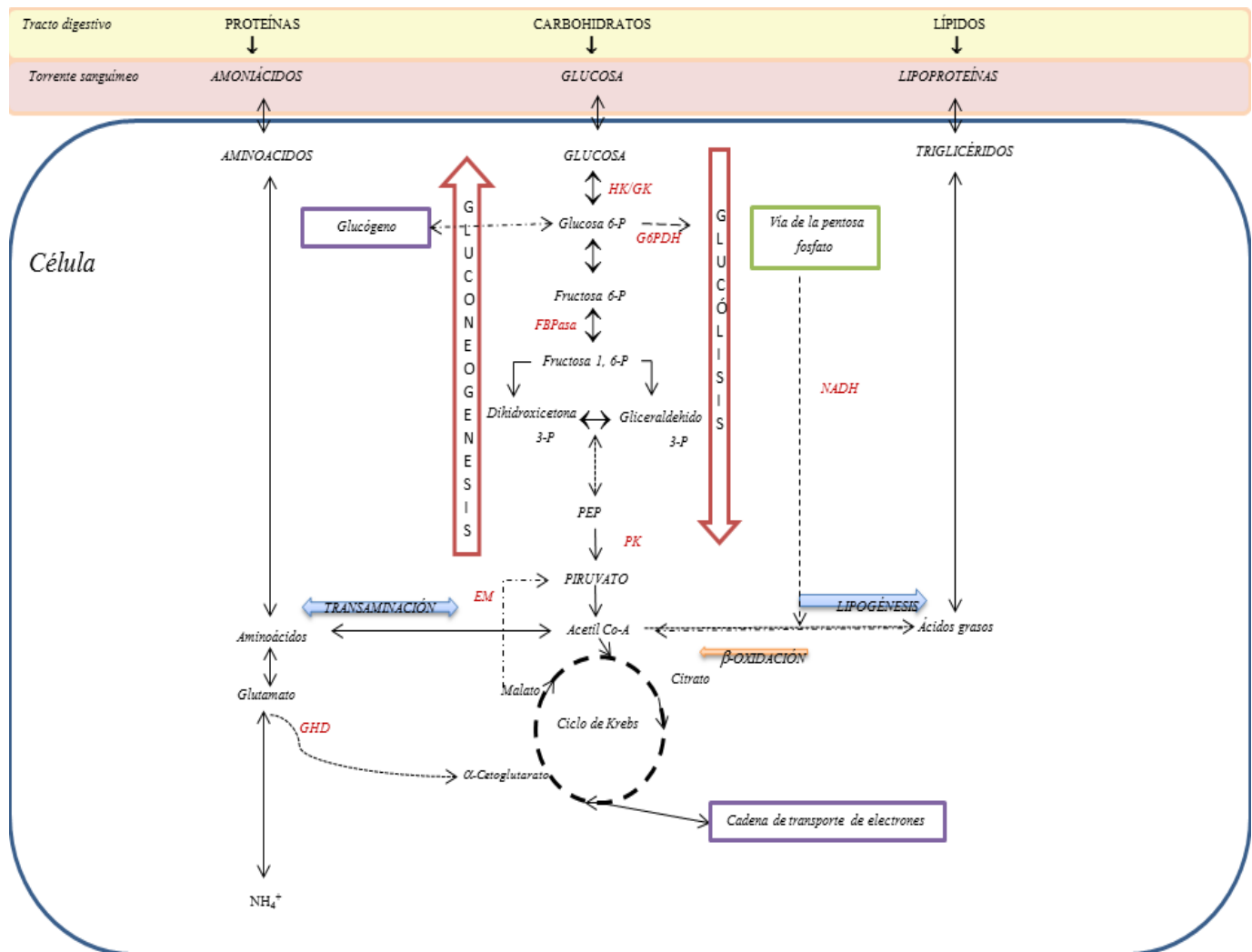


Figura 2. Visión genera de las principales rutas metabólicas (Tomado de Pérez-Jiménez, 2008). HK/Gk (Hexoquinasa/Glucoquinasa), FBPasa (Fructosa 1,6, Bifosfatasa), G6PDH (Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa, EM (Enzima málico), GHD (Glutamato deshidrogenasa), NADH (Nicotidamida adenina dinucleótica, en forma reducida).

2.0. ANTECEDENTES

2.1. Enzimas digestivas en peces

Debido al interés en encontrar fuentes alternativas a la harina de pescado para elaborar alimentos funcionales para organismos marinos, se requiere estudiar el efecto de las fuentes alternativas de proteína de origen vegetal, ya que la digestión y absorción de los nutrientes depende directamente de la actividad de las enzimas digestivas, por lo que es importante evaluar el nivel de actividad de aquellas que se encuentran a lo largo del sistema digestivo de los peces, ya que dicha evaluación nos dará respuesta de su estado nutricional. De las enzimas alcalinas importantes se encuentran; tripsina y quimotripsina señaladas como marcadores del estatus nutricional debido a su participación en la activación de otras proteasas digestivas alcalinas y de manera conjunta participan en la hidrólisis de las proteínas provenientes del alimento (Haard, 2000; Applebaum et al., 2001, Applebaum y Holt, 2003). Ambas proteasas digestivas son claves en la hidrólisis de la proteína del alimento (Rungruangsak-Torrissen et al., 2006; Uscanga et al., 2010).

Por otro lado, la fosfatasa alcalina y leucina aminopeptidasa son señaladas como marcadores de la integridad de los bordes intestinales por su predominancia, además que tiene un papel importante en los procesos de transporte de nutrientes a través de la membrana (Wahnon et al., 1992). hidrolizando y asimilando los péptidos y aminoácidos derivados de las dietas (Douglas et al., 1999). Estas enzimas son consideradas enzimas claves en los procesos digestivos de los peces carnívoros (Debnath et al., 2006). Por

consiguiente, al proporcionar dietas poco digeribles a los organismos, puede verse afectado de manera negativa la actividad enzimática, sobre todo para peces de hábitos alimenticios carnívoros, al consumir harinas vegetales. Autores como Córdava-Murueta y García-Carreño (2002), mencionan que si un organismo no tiene la capacidad de digerir cierta proteína proporcionada, ésta no será asimilada en su totalidad y por consecuencia se tendrá una baja digestibilidad y absorción de los sustitutos proteínicos, lo que traerá como consecuencia pobre desarrollo del organismo y repercutirá de manera negativa en su salud con el consecuente desarrollo de patologías (Oliva-Teles, 2012).

Lilleeng et al. (2007) ha estudiado el efecto de proteínas alternativas y su efecto en la actividad de enzimas digestivas, quienes evaluaron la actividad de tripsina en diferentes zonas del intestino (adyacente a ciegos pilóricos, intestino medio y zona distal) de juveniles del salmón del Atlántico con dietas que contenía un 24 y 30% de harina de soya, donde encontraron que el nivel de la actividad de tripsina fue disminuyendo a lo largo del intestino y en la zona distal se mostró un incremento en comparación a la dieta control a base de harina de pescado, esta respuesta la atribuyen a un proceso inflamatorio en la mucosa intestinal que induce a una elevada actividad proteolítica.

Li et al. (2015), observaron un incremento en la actividad de tripsina al incorporar 40% de concentrado de proteína de soya (CPS) en dietas de juveniles de lenguado *Platichthys stellatus*, sin embargo, con inclusiones de 100% de CPS en la dieta, la actividad de tripsina disminuyó de manera significativa, por lo que ésta respuesta se atribuye a un aumento de la presencia de FANs.

Tibaldi et al. (2006), reportan que no se afectó la actividad de leucina aminopeptidasa por altas inclusiones de CPS en juveniles de curvina Europea *Dicentrarchus labrax*, no obstante fosfatasa alcalina presentó una disminución en su actividad con inclusiones arriba de 50% proteína de soya, observándose un daño en los enterocitos.

En juveniles dorada *Sparus aurata*, no se presentaron diferencias en los niveles de actividad de leucina aminopeptidasa, aunque se presentó una baja actividad de fosfatasa alcalina por la inclusión 20% de harinas vegetales (colza y lupino) (Silva et al., 2010).

El diseño de las dietas con niveles adecuados de macronutrientes (principalmente proteína y lípidos) se debe basar no solamente en estudios de crecimiento, supervivencia de los peces o calidad del filete, sino también es importante conocer cómo se afecta la fisiología digestiva del pez. También es importante evaluar la respuesta de los organismos al ser alimentados con ingredientes alternativos, así como la cantidad suministrada (Rodríguez Covadonga et al., 2009). El realizar estudios de esta índole en peces carnívoros puede ayudar a entender algunos aspectos referentes al estado nutricional de los organismo de cultivo (Hidalgo et al., 1999).

Por todo lo anterior, la presente investigación evaluó la actividad de las principales enzimas digestivas como tripsina, quimotripsina, fosfatasa alcalina y leucina aminopeptidasa, consideradas como marcadores del estatus nutricional de los juveniles de *T. macdonaldi*, debido a que pueden verse afectadas por la calidad y cantidad de nutrientes suministrados, y así, elegir el nivel óptimo de

sustitución de la harina de pescado, y a su vez que pueda ser aprovechado por los juveniles sin que se vean afectados la capacidad de hidrolizar los nutrientes.

2.2. Metabolismo Intermediario

En el metabolismo intermediario hepático, no existe hasta el momento un patrón claro que vincule la actividad de las principales rutas metabólicas con la utilización de proteínas, lípidos y carbohidratos (Pérez-Jiménez, 2008), esto aunado a la respuesta que puede presentar cada especie hacia distintos nutrientes, ya que la fuente de los mismos suelen ser muy variables (Oliva-Teles 2012). Actualmente las investigaciones acerca de la respuesta de las enzimas que participan en el metabolismo intermediario se han enfocado principalmente en el uso de fuentes alternas de energía (carbohidratos) en peces carnívoros, en donde la mayoría de los organismos han presentado diferentes comportamientos en las distintas enzimas que participan en el metabolismos intermediario, sobre todo en las enzimas que participan en las rutas de la glucolisis y gluconeogénesis, tal como se ha observado en lubina Europea *D. labrax* (Enes et al., 2006a; Enes et al., 2006b; Moreira et al., 2008; Enes et al., 2008), en dorada *S. aurata* (Fernández et al., 2007), trucha arcoíris *O. mykiss* (Panserat et al., 2000b; Capilla et al., 2003), salmón del Atlántico *S. salar* (Panserat et al., 200b; Capilla et al., 2004). Así también, se han realizado estudios donde el metabolismo de los peces en la mayoría de las ocasiones tiende a verse afectado de manera significativa por inanición, sobre todo se inhiben las enzimas que participan en glucolisis, glucogénesis, catabolismo de aminoácidos, y lipogénesis, en especies como

lubina Europea *D. labrax* (Pérez-Jiménez et al., 2007; Viegas et al., 2014), en trucha arcoíris *O. mykiss* (Soengas et al., 2006).

Por otra parte, se ha observado que las enzimas que participan en el catabolismo de aminoácidos tienden a tener una alta afinidad por estos, por consiguiente, al tener una baja concentración en las dietas, se pueden inhibir las enzimas del metabolismo (Peres y Oliva-Teles, 2007). Se ha observado que un cambio en los nutrientes puede generar cambios en la actividad metabólica (Bañuelos-Vargas, 2014). En este sentido, en trucha *Salmo gairdneri* observaron Se ha observado que un cambio en los nutrientes puede generar cambios en la actividad metabólica un cambio la respuesta de la actividad de enzimas metabólicas por efecto de diferentes tipos de proteína (harina de pescado, caseína y gluten de maíz) suministrada. De los trabajos más recientes realizados en totoaba *T. macdonaldi*, se evaluó el efecto de CPS adicionada con taurina en el metabolismo intermediario (glicolisis, gluconeogénesis y catabolismo de aminoácidos), se observó que el uso de taurina ayuda a mejorar la actividad de las enzimas del metabolismo intermediario y en las antioxidantes, esto en las dietas con CPS (Bañuelos-Vargas et al., 2014).

Es de suma importancia continuar investigando el efecto de fuentes alternativas de proteínas derivadas de fuentes vegetales que sean más viables, accesibles, y que no se vea comprometido la actividad de las enzimas que participan en el metabolismo intermediario de los organismos de cultivo, para lograr elaborar dietas apropiadas para peces marinos carnívoros (Enes et al., 2009). Por lo que, analizar la respuesta del metabolismo de los peces carnívoros

como lo es totoaba podrá ayudar a visualizar de mejor manera el aprovechamiento de los nutrientes, y específicamente aquellos que son de interés.

2.3. Hematología y química sanguínea en cultivo de peces

La hematología y química sanguínea son una herramienta utilizada como indicador de salud tanto de organismos de hábitats silvestres como en cautiverio (Atencio-García et al., 2007). A partir de la respuesta de los parámetros de la hematología, así como de la química de la sangre en los peces, pueden indicar la condición fisiológica de los organismos debido a las dietas utilizadas en la alimentación (Glencross et al., 2007). Tal como se ha visto en estudios hematológicos de tilapia híbrida *Oreochromis niloticus*, tilapia nilótica *O. aureus* y tilapia *O. sp.* alimentados con dietas que contenían harina de algodón como fuente de proteína alternativa, los peces mostraron una disminución en el contenido de hemoglobina y del hematocrito, lo que podría atribuirse a un reflejo de la toxicidad de los polifenoles presentes en la harina de algodón (Mbahinzireki et al., 2001; Yue y Zhou, 2008). Por otra parte, en peces marinos como el salmón del Atlántico y cobia del Atlántico se ha observado que los parámetros hematológicos y química sanguínea no presentan diferencias significativas al sustituir la fuente de proteína de la dieta con inclusiones elevadas de proteínas vegetales (Hemre et al., 2005; Olsen et al., 2007).

Un estudio reciente en juveniles de totoaba muestra el efecto de la sustitución parcial de HP por CPS, donde observaron cambios negativos en la hematología y química sanguínea con 60% de la proteína alternativa. Estos resultados indicaron que con esos niveles los peces llegaron a presentar una

disminución tanto en la hematología como en la bioquímica sanguínea, aparentemente influenciada por los FANs contenidos en el CPS (López et al., 2015).

La hematología y química sanguínea han sido herramienta para valorar el estatus de salud de los peces sometidos a contaminantes, condiciones de estrés por manejo y por cuestiones nutricionales. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto del CPS en la dieta y con ayuda de la hematología y química sanguínea en juveniles de *T. macdonaldi* lograr determinar el efecto en la salud de los peces sometidos a los diferentes niveles de sustitución de CPS, y con ello determinar los niveles apropiados para la especie.

2.4. Histología de tejido hepático

Los análisis histológicos permiten determinar si existe o existió daño hepático causado por patologías ocasionadas por desbalance nutricional. La información acerca de la descripción del tejido hepático de peces es muy escasa, entre estos se encuentran los estudios de Guzmán-Beltrán et al. (2013) quienes observaron hepatocitos con núcleos prominentes centrados dispuestos en cordones e identificaron la parte exocrina y endócrina del páncreas del bagre *Pimelodus blochii*, así como el trabajo de Torres et al. (2010), quienes realizaron la descripción histológica del hígado de tilapia *O. niloticus* e identificaron la forma poliédrica de los hepatocitos y nódulos pancreáticos dentro del tejido hepático. Menke et al. (2011), observaron que el parénquima de pez cebra muestra un acomodo diferente de los hepatocitos con respecto a los vertebrados terrestres. Respecto a lo anterior, es de suma importancia conocer el acomodo y la estructura

del parénquima hepático y pancreático de los peces de estudio. Esto servirá como punto de referencia para evaluar el posible daño en el tejido hepático como señal de alguna anomalía del funcionamiento del hígado, relacionado a cuestiones nutricionales o por factores abióticos que puedan afectar y ser un indicio de alguna patología del pez en su cultivo.

La histología ha sido tomada como referencia para evaluar los estados de salud y nutricional de los peces. Hasta el momento, se conoce el efecto de alimento comercial en dorada *S. aurata* y lobina Europea *D. labrax* presentando señales de esteatosis en hígado de los juveniles (Spisni et al., 1998); en lenguado del Atlántico (*H. Hippoglossus*) observaron un efecto en el tejido hepático en los organismos alimentados con diferentes dietas, al final del estudio los autores concluyeron que dichas alteraciones en la histología del hígado fue debida al alimento comercial (Bolla et al., 2011); en carpa común *Cyprinus carpio* evaluaron el efecto de la harina de algodón como sustituto proteínico, lo que presentó cambios en el parénquima hepáticos de la carpa (Wang et al., 2014). En un estudio más reciente realizado por nuestro grupo de investigación, donde se evaluó el efecto de CPS adicionado con taurina se realizaron cortes histológicos del tejido hepático de totoaba, mostrando que al no suplementar taurina a las dietas con altos niveles de CPS causó efectos adversos en el metabolismo, dando pie a la formación de un hígado verde y a la presencia de macro vesículas en hepatocitos (López et al., 2015). Por consiguiente, la histología podría ser considerada como herramienta clave para poder evaluar el efecto que tienen las fuentes alternativas de ingredientes, en el caso particular, el efecto de CPS en la

morfología de las células hepáticas, dando respuesta a elegir un mejor nivel de inclusión de sustituto proteínico en dietas de totoaba.

En el presente trabajo se analizó el hígado mediante estudios histológicos, ya que es un órgano importante en los procesos metabólicos y sobre el cual existe escasa información básica, por lo que se pueden valorar los problemas nutricionales que pueden afectan la fisiología hepática en peces marinos carnívoros de importancia en la acuacultura.

3.0. Justificación

Es vital para la acuacultura maximizar el rendimiento de la producción del cultivo de peces mediante el desarrollo de alimentos óptimos según las necesidades fisiológicas de cada especie en sus diferentes etapas de crecimiento, así como, optimizar el rendimiento económico, considerando el valor nutritivo, disponibilidad y facilidad de procesamiento de las diferentes materias primas, de tal manera que el costo final del alimento sea rentable para el acuacultor. De acuerdo a estudios enfocados sobre requerimientos nutricionales en peces carnívoros, se ha comprobado que el concentrado de proteína de soya es un ingrediente potencial para cubrir las demandas de proteína, tomando en cuenta las concentraciones adecuadas en los alimentos, sin embargo, algunas especies carnívoras han mostrado ser poco tolerantes a este fuente de proteína de origen vegetal. Existe un interés apremiante por parte de la industria de los alimentos para la acuacultura contar con el conocimiento para reducir los insumos de harina de pescado en las formulas, así como, reducir los costos de producción de alimentos para peces carnívoros, y en particular de *Totoaba macdonaldi* como especie potencial para la acuacultura en el noroeste del país. Por todo lo anterior, es necesario realizar estudios para determinar los niveles óptimos de sustitución proteica en las formulas alimenticias de esta especie, para que los cultivos sean rentables.

Con el fin de aportar dicho conocimiento, es necesario investigar sobre la respuesta del metabolismo intermediario y actividad de enzimas digestivas, así

como el estatus de salud y cambios histológicos en el tejido hepático en juveniles de *T. macdonaldi* al ser alimentados con diferentes niveles de concentrado de proteína de soya y lograr desarrollar formulaciones acorde con sus capacidades fisiológicas y benéficas para soportar condiciones de cultivo.

4.0. Hipótesis

El uso del concentrado de proteína de soya como fuente alternativa de proteína en la dieta para juveniles de *Totoaba macdonaldi* tendrá un efecto positivo en los parámetros productivos, así como en la actividad de las enzimas digestivas y metabólicas, y salud de los organismos. Se establecerán los niveles óptimos de sustitución en la dieta sin verse comprometido el desarrollo y salud de la especie.

5.0. Objetivos

5.1. Objetivo general

Evaluar los efectos del concentrado de proteína de soya en dietas formuladas para juveniles de *Totoaba macdonaldi* sobre los parámetros productivos, así como la actividad de enzimas digestivas, metabólicas, y la salud de los organismos.

5.2. Objetivos particulares

1. Determinar el efecto de dietas formuladas con concentrado de proteína de soya en el crecimiento, peso promedio ganado, índice de crecimiento diario y eficiencia alimenticia de juveniles de *Totoaba macdonaldi*.

2. Evaluar la actividad de enzimas digestivas y metabolismo intermediario en juveniles de *Totoaba macdonaldi* alimentados con dietas formuladas con concentrado de proteína de soya.
3. Medir la respuesta hematológica y de bioquímica sanguínea de juveniles de *Totoaba macdonaldi* ante la sustitución parcial y total de la harina de pescado por concentrado de proteína de soya.

Comparar por medio de histología del hígado a juveniles de *Totoaba macdonaldi* alimentados con las dietas formuladas a base de concentrado de proteína de soya con la dieta control a base de harina de pescado.

6.0. Material y métodos

Dietas experimentales fueron elaboradas a partir de dos fuentes de proteína, harina de pescado y concentrado proteína de soya, la elaboración se realizó en la Unidad de Biotecnología en Piscicultura (UBP) de la Facultad de Ciencias Marinas (FCM) de la Universidad Autónoma de Baja California (UABC).

6.1. Dietas

Se formularon ocho dietas isoprotéicas, en las cuales se varió la sustitución de harina de pescado por concentrado de proteína de soya con un 0, 15, 30, 45, 60, 75, 90 y 100%, de reemplazo en proporción de la fuente de pescado, nombrándose como DC, CPS15, CPS30, CPS45, CPS60, CPS75, CPS90 y CPS100, respectivamente, ver Tabla 3.

Los ingredientes secos (harina de pescado y krill, proteína de soya, cloruro de colina, vitaminas, minerales, ácido ascórbico) se homogenizaron en una mezcladora marca HOBART (modelo A 2000) y se añadió aceite de pescado con vitamina E para prevenir los efectos de la rancidez oxidativa, y por lo tanto la rancidez de la dieta, posteriormente se agregaron el almidón cocido y la gelatina disuelta en agua caliente de forma líquida para obtener pellets, posteriormente se secaron en una estufa de convección a 70°C por 24 horas, hasta obtener una humedad inferior a 5%.

Terminada la elaboración de las dietas se almacenaron en bolsas de plástico a una temperatura de -20°C hasta ser utilizadas.

Tabla 3. Ingredientes y composición proximal de las dietas experimentales para los juveniles *Totoaba macdonaldi* con diferentes niveles de concentrado de proteína de soya (CPS).

	Dietas							
	DC	CPS15	CPS30	CPS45	CPS60	CPS75	CPS90	CPS100
Ingredientes (% peso seco)								
Harina de pescado ¹	57.7	49.0	39.6	31.3	23.3	17.2	6.6	0.0
CPS ¹	0.0	8.6	16.9	25.4	33.6	40.0	51.0	58.0
Harina de krill ²	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0
Gelatina	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
Almidón	14.0	14.0	13.5	13.0	12.5	12.2	11.4	9.0
Celulosa	2.8	2.4	1.5	1.5	2.6	1.5	1.3	3.3
A. de pescado ¹	5.0	5.5	8.0	8.3	8.5	8.6	9.0	9.5
Mez. minerales ³	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
Mez. vitaminas ⁴	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
Cloruro de colina	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.20
Lisina ⁵	1.0	1.0	1.0	1.1	1.1	1.2	1.3	1.3
Metionina ⁵	0.5	0.50	0.60	0.70	0.70	0.80	0.80	0.50
Taurina ⁵	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50
Análisis proximal (% peso seco)								
Proteína total	51.4	51.4	50.3	50.8	51.5	51.5	50.9	50.5
Lípidos totales	12.8	11.9	12.3	12.4	12.0	11.9	11.8	11.8
Cenizas %	14.7	14.1	12.9	12.9	12.3	11.1	10.2	9.2
Almidón %	13.8	13.6	13.1	12.8	12.2	11.8	11.4	11.0
ELN	7.3	8.4	10.0	11.2	11.5	13.5	15.5	17.5
Energía (kJ/g ⁻¹)	19.6	19.3	19.2	19.0	19.1	19.0	18.8	18.2
Razón P/E (kJ ⁻¹)	24.6	24.9	24.2	24.2	24.5	24.3	23.9	23.6

¹Rangen, comercial HighPro fish meal, U.S.A. (proteína: 72%; lípidos: 12%; cenizas: 16%) y Concentrado de Proteína de Soya (CPS, proteína: 71%, lípidos: 5%, ash:5%), ²Harina de krill de Skretting, Vancouver, British Columbia, Canadá; CP: 60.0%; CL: 20%). ³ ASA Premix (g kg⁻¹): ASA Premix (g 100 g⁻¹). ⁵Amino ácidos de Pharmaceutical Co., Ltd., U.S.A. Extracto libre de nitrógeno (ELN) = 100-(%Proteína+%Lípidos+%Ceniza+%Almidón). DC: Dieta control, CPS15: Dieta 15%, CPS30: 30%, CPS45: 45, CPS60: 60%, CPS75: 75%, CPS90: 90% y CPS100: 100 %.

Tabla 4. Perfil de aminoácidos (g AA 100 g⁻¹ de dieta, base seca) de las diferentes dietas experimentales de los juveniles de *Totoaba macdonaldi*.

	DC	CPS15	CPS30	CPS45	CPS60	CPS75	CPS90	CPSC100
Proteína cruda	51.4	51.4	50.3	50.8	51.5	51.5	50.9	50.5
<i>Aminoácidos esenciales</i>								
Histidina	2.03	2.08	2.07	1.97	1.91	1.79	1.84	1.93
Treonina	2.12	2.05	2.06	1.90	1.84	1.67	1.71	1.70
Arginina	3.37	3.27	3.79	3.54	3.36	3.07	3.40	3.42
Valina	2.29	2.24	2.23	2.06	2.03	1.84	1.90	1.87
Metionina	0.97	0.88	1.01	0.92	0.84	0.58	0.72	0.61
Isoleucina	2.06	1.89	1.75	1.92	1.86	1.78	1.79	1.89
Leucina	3.60	3.58	3.21	3.32	3.34	3.16	3.21	3.29
Fenilalanina	2.03	2.11	2.11	2.05	2.16	2.11	2.20	2.38
Lisina	4.44	4.14	3.89	3.96	3.47	3.13	3.18	3.07
Triptófano	0.06	0.05	0.06	0.05	0.05	0.06	0.05	0.05
Taurina	1.32	1.30	1.27	1.18	1.10	1.21	1.16	1.01
<i>Aminoácidos no esenciales</i>								
Ácido aspártico	4.34	4.62	5.36	4.49	4.56	5.69	4.57	6.33
Serina	2.08	2.11	2.29	2.25	2.16	2.17	2.21	2.38
Ácido glutámico	8.04	8.31	8.92	8.98	8.79	8.72	9.14	9.76
Glicina	2.70	2.58	2.81	2.72	2.41	2.40	2.30	2.38
Alanina	3.05	2.74	2.92	2.65	2.32	2.63	2.08	2.69
Prolina	2.15	2.26	2.36	2.37	2.40	2.44	2.52	2.63
Tirosina	0.78	0.75	1.09	0.94	0.98	0.63	0.97	0.86

DC: Dieta control, CPS15: Dieta 15%, CPS30: 30%, CPS45: 45, CPS60: 60%, CPS75: 75%, CPS90: 90% y CPS100: 100 %.

6.2. Crecimiento

Totoaba macdonaldi

Se trabajó con juveniles de *T. macdonaldi* que fueron proporcionados por UBP de la Facultad de Ciencias Marinas de la UABC, mismo lugar donde se desarrolló el bioensayo de alimentación.

Los peces fueron cultivados en un sistema cerrado tipo “*Guelph*” que consta de 24 tanques de 120 L a una temperatura $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$. Los peces fueron aclimatados durante 2 semanas con la dieta control (DC), posteriormente se les alimentó con las dietas experimentales. El diseño experimental fue aleatorio simple, por lo que cada tratamiento fue por triplicado, distribuidos al azar y cada tanque contenía 20 organismos. El peso promedio de los organismos al inicio del experimento fue de 50 ± 1.0 g. Se les alimentó dos veces al día (8:00 y 18:00 horas) a saciedad aparente. Se monitoreó y controló la temperatura a 23 ± 1 con un termo control de chillers. La salinidad fue monitoreada con un refractrómetro y mantenida a $35 \pm 0.5\text{‰}$. La concentración de oxígeno disuelto se mantuvo a 6 mg L^{-1} . El total de nitrógeno amoniacal total fue monitoreado diariamente antes de cada alimentación con un kit (Aquarium Pharmaceutical, Mars, PA, USA). El fotoperiodo fue controlado de manera automática con un ciclo de 12 h luz: 12 h oscuridad. La duración del experimento fue de 60 días para poder observar el efecto de cada uno de los tratamientos.

6.3. Parámetros de crecimiento y eficiencia del alimento

6.3.1 Supervivencia (%) = $(\# \text{ de peces al final} / \# \text{ de peces al inicio}) \times 100$

6.3.2. Tasa de Crecimiento (TC): La tasa de crecimiento se determinó por replica-tratamiento ($\text{g org.}^{-1} \text{ día}^{-1}$) al dividir el peso ganado entre el número de organismos pesados por el número de días transcurridos en el experimento (Hardy y Barrows, 2002). $TC = \text{Peso final} - \text{peso inicial} / (\# \text{ organismos}) \times (\text{días})$

6.3.3. Índice de Crecimiento Diario: $ICD = [(P_{uf}^{1/3} - P_i^{1/3}) \times (\# \text{ días})^{-1}] \times 100$

Dónde: P_{uf} = peso final (g), P_i = peso inicial (g)

6.3.4. Eficiencia de Conversión Alimenticia (ECA)

La eficiencia de conversión alimenticia se calculó mediante la división del peso de los organismos y el alimento seco consumido (Hardy y Barrows, 2002).

$ECA = \text{Peso ganado (g)} / \text{alimento seco (g)}$

6.3.5 Razón de Eficiencia Proteica (REP): La razón de eficiencia de proteína se determinó mediante el peso ganado entre la proteína total consumida por los organismos (Hardy y Barrows, 2002).

$REP = \text{Peso ganado (g)} / \text{proteína total consumida}$

6.4 Métodos analíticos

6.4 .1. Retención de nitrógeno, lípidos y energía

La determinación de la retención de nitrógeno, lípidos y energía en juveniles de totoaba de las dietas experimentales fueron realizados de acuerdo a Cho y Kaushik (1990).

6.4.2. Retención de nitrógeno

$$N_R \text{ (g pez}^{-1}\text{)} = \{[(PF \times P_{tF}) / 100] - [(PI \times P_{tI}) / 100] \} / 6.25 \times NI / 100$$

$$NI \text{ (\%)} = 6.25 \times [AI \times (PC / 100)]$$

Donde N_R es la cantidad de nitrógeno retenido desde la dieta; PF es el peso final del pez; P_{tF} es la proteína total final del pez entero; PI es el peso inicial del pez; P_{tI} es la proteína total inicial del pez entero; NI es el nitrógeno ingerido desde la dieta. AI es la cantidad de alimento consumido por pez; PC es la cantidad de proteína cruda por gramo de dieta.

6.4.3. Retención de lípidos

$$L_R \text{ (g pez}^{-1}\text{)} = \{[(PF \times L_F) - (PI \times L_I)] / 100\} \times LI / 100$$

$$LI \text{ (\%)} = AI \times (LT / 100)$$

Donde L_R es la cantidad de lípidos retenidos desde la dieta; L_F es la cantidad de lípidos final del pez entero; L_I es la cantidad de lípidos inicial del pez entero; LI es la cantidad de lípidos ingeridos desde la dieta. LC es la cantidad de lípidos cruda por gramo de dieta.

6.4.4. Retención de energía

$$E_R \text{ (kJ pez}^{-1}\text{)} = [(PF \times E_F) - (PI \times E_I)] \times EI / 100$$

$$EI \text{ (\%)} = AI \times (ET / 100)$$

Donde E_R es la cantidad de energía total retenida desde la dieta; E_F es la cantidad de energía total final del pez entero; E_I es la cantidad de energía total inicial del pez entero; EI es la cantidad de energía total ingerida desde la dieta. LC es la cantidad de energía total por gramo de dieta.

6.4.5. Análisis químico proximal

Cada uno de los ingredientes, las dietas formuladas, los tejidos (músculo e hígado), el organismo entero y sus heces fueron analizados en su contenido químico proximal. Para el análisis de proteína cruda se multiplicó la concentración de nitrógeno total de la muestra por la constante 6.25 ($N \times 6.25$) mediante el método Kjeldahl (1883). Las cenizas se obtuvieron al calcinar 1 gr. de muestra durante 8 horas a 500 °C (AOAC, 1995). El contenido de lípidos se determinó por el método modificado de Folch et al. (1957). El contenido de almidón fue determinado utilizando estándar de almidón con un kit de glucosa por medio del método de Plummer (1987).

6.5. Determinación de aminoácidos

La determinación de los perfiles de aminoácidos se llevó a cabo en un sistema UPLC: Sistema de bombeo Dual (Bin Pump) con un cromatógrafo de líquidos Agilent 1260, con detector de fluorescencia de onda múltiple Agilent 1260, λ_{exc} : 280nm, λ_{emss} : 340nm en las instalaciones del laboratorio de nutrición acuícola de la FCM.

6.6. Grado de hidrólisis (GH) y digestibilidad *In vitro*

Para obtener el la digestibilidad *In vitro* de los ingredientes y de las dietas se llevó a cabo la metodología propuesta por Dimes y Haard (1994). Se utilizó un pH-STAT (902 Stat Trinitron Metrohm, Suiza). Para la determinación de proteasas ácidas los extractos se incubaron con hemoglobina (0.5%) con un buffer de pH 3 (Glicina-HCl). Para el caso de las proteasas alcalinas se utilizó como sustrato a la caseína (1%) con un buffer universal de pH 9 (Stauffer, 1989), la proteína en solución de 40 mg volúmen de 5 ml (8 mg de proteína ml^{-1}) de agua destilada. Ambas reacciones (ácida y alcalina se mantuvieron tanto 37°C).

La digestibilidad ácida (multienzimático a pH 3.5) se utilizó 50 UAE ml^{-1} , se utilizó 0.1 N HCl, la reacción tuvo una duración de 15 minutos (90 s); la digestibilidad alcalina (multienzimático a pH 8) considerando 400 UAE ml^{-1} de actividad total, la reacción duró 45 minutos (2700 s) a pH 8 con NaOH 1N.

El grado de hidrólisis (GH en %), se obtiene de acuerdo a los enlaces peptídicos hidrolizados por las proteasas digestivas con respecto al número total de enlaces peptídicos presentes en una proteína (Adler-Niesse, 1976).

6.7. Actividad de enzimas digestivas

Los extractos enzimáticos se obtuvieron al disecar al pez en una base de hielo seco y obtener partes de su sistema digestivo (intestino) de los juveniles de totoaba al inicio y al final del experimento, (6 organismos por replica), se congelaron a -70°C. Posteriormente fueron homogenizados en HCl-Tris 50 mmol L^{-1} , CaCl_2 20 mmol L^{-1} , pH 9 a un volumen 1:5, con un homogenizador de tejidos y se centrifugaron a 14,000 rpm

por 150 min a 4°C. Se recobró la fracción soluble y se distribuyeron en alícuotas de 0.5 mL y se almacenaron a -70°C hasta la realización de los análisis enzimáticos. Se midió la actividad de las siguientes enzimas digestivas:

Actividad proteolítica alcalina: La proteasa alcalina fue medida con la técnica de Walter (1984) usando como sustrato caseína al 0.5 % en una solución tampón Tris-HCl 50 mmol L⁻¹, CaCl₂ 10 mmol L⁻¹ a pH 9.

Tripsina (E.C.3.4.2.1.4): Se utilizó una modificación de la metodología de Erlanger et al. (1961), empleando Nα-Benzoil-DL-Arginina-P-Nitroanilida (BAPNA), utilizando una solución amortiguadora de Tris-HCl 100 mM, CaCl₂ 10 mM a pH 8.

Quimotripsina (EC. 3.4.21.1): La actividad quimotripsina fue determinada por el método de Del Mar et al. (1979) con N-benzoil-L-tirosina etil ester (BTEE), utilizando una solución amortiguadora de Tris-HCl 100 mM, CaCl₂ 100 mM a pH 7.8.

Leucina aminopeptidasa (EC.2.1.6.6): Esta enzima fue determinada por el método de Maraux et al. (1973) utilizando como sustrato L-leucin-P-nitroanilida (0.1 mmol L⁻¹) en DMSO usando una solución tampón de fosfato sódico 50 mM a pH 7.2.

Fosfatasa alcalina (EC.3.1.3.1): Fue determinada utilizando como sustrato 4-nitrofenilfosfato en una solución amortiguadora de NaOH-glicina (0.1 M) a pH 10.1, de acuerdo a la metodología de Bergmeyer (1974).

6.8. Actividad de enzimas claves del metabolismo intermediario

Se realizó la extracción de hígado por cada réplica (dos peces por tanque). Antes de realizar los análisis enzimáticos, las muestras de hígado se homogenizaron en proporción 1:4 de muestra de hígado: tampón Tris-HCl 100 mM pH 7.8, con Tritón X-100 al 0.1% y EDTA 0.1 mM. Todo el proceso de homogeneización se realizó en frío

utilizando baños de hielo molido. El homogenizado fue centrifugado a 16,000 rpm a 4°C durante 30 minutos y el sobrenadante se recuperó y almacenó en tubos de 0.5 mL y se resguardaron a -70°C hasta el momento de su análisis (Pérez-Jiménez et al., 2012).

Para determinar la actividad de las diferentes enzimas implicadas en el metabolismo intermediario, se utilizó un lector de microplacas ThermoScientific, donde fueron monitoreados los cambios de absorbancia a una longitud de onda de 340 nm. Todas las enzimas del metabolismo intermediario fueron analizadas a 25°C en un volumen final de la “mezcla de reacción” de 200 µL. La concentración óptima de sustrato, así como de la dilución más apropiada del extracto, fue establecido con base en los análisis preliminares.

Se evaluó la actividad de las siguientes enzimas clave del metabolismo intermediario:

Aspartato aminotransferasa (ASAT, E.C. 2.6.1.1), y **alanino aminotransferasa** (ALAT, E.C. 2.6.1.2), se realizó basándose en la medida espectrofotométrica de la disminución de densidad óptica producida por la oxidación de NADH, para lo cual se utilizaron kits comerciales de realizó determinaron con kits de *POINTE SCIENTIFIC, INC.*

Glutamato deshidrogenasa (GDH, E.C. 1.4.1.2), para determinar la actividad GDH se tomó como base la medida espectrofotométrica de la disminución de densidad óptica producida por la oxidación de NADH, para lo cual se utilizó la metodología de Morales et al. (1990), utilizando una solución amortiguadora de Imidazol 71.4 mM pH 7.4, como sustrato α -KG (α -ácido ketoglutarico) 200mM.

Hexoquinasa (HK, *E.C. 2.7.1.1*) y, **glucoquinasa** (GK; *E.C. 2.7.1.2*). La actividad HK y GK y se realizó basándose en la medida espectrofotométrica de la reducción de NADP⁺, para ambas enzimas se prosiguió de acuerdo con la metodología de Vijayan et al. (1990), para lo cual se utilizó una solución amortiguadora de 50 mM 192 ATP, 100 mM MgCl₂, 8 mM NADP, 2 unidades mL⁻¹ G6PD y como sustrato glucosa a 10 mM (HK) y 1 M (GK).

Fructosa 1-6 bifosfatasa (FBPasa, *E.C. 3.1.3.11*). Su actividad fue estimada basándose en la medida espectrofotométrica de la reducción de NADP⁺, de acuerdo a la metodología de Morales et al. (1990). La mezcla de reacción que contenía 71.4 mM imidazol-HCl como buffer (pH 7.4), 100 mM MgCl₂, 240 mM 2-mercaptoetanol, 10 mM NADP, 2 unidades mL⁻¹ de G6PD, 2 unidades mL⁻¹ de PGI y 0.5 mM de fructosa 1,6-bisfosfatasa y como sustrato Fructosa 1-6-bifosfato (FBP) 5 mM.

Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PD, *E.C. 1.1.1.49*), para medir la actividad FBPasa se realizó basándose en la medida espectrofotométrica de la reducción de NADP⁺, para lo cual se utilizó la metodología de Morales et al. (1990), para lo cual se utilizó un mezcla de reactivos que contenía 71.4 mM imidazol, HCl como amortiguador (pH 7.4), 100 mM MgCl₂, 20 mM NADP y como sustrato 10 mM de glucosa-6-fosfatasa (G6P).

Enzima málica (EM, *E.C. 1.1.1.40*). Esta medición se basó en la medida espectrofotométrica de la reducción de NADP⁺, para lo cual se utilizó un mezcla de reactivos que contenía solución amortiguadora de imidazol y HCl 71.4 mM imidazol y HCl (pH 7.4), 100 mM MgCl₂, 8 mM NADP y como sustrato 40 mM L-malato. La actividad EM se empleó el método descrito por Singer et al. (1990).

6.9. Análisis hematológico y bioquímica sanguínea

Los peces fueron sometidos a 12 horas de ayuno. Para los análisis hematológicos, se colectaron muestras individuales de sangre de 6-8 peces por tanque. La sangre se colectó a través de punción cardiaca con jeringas con 0.1 ml de solución EDTA (7.5 mg mL^{-1} sangre) como anticoagulante. Las muestras se procesaron de manera inmediata para los análisis de eritrocitos circulantes, hemoglobina y hematocrito. El resto de las muestras de sangre fueron centrifugadas a 12,000 rpm por 5 minutos a 4°C (Atencio-García et al., 2007). Se colectó el plasma y se almacenó en refrigeración para los análisis de concentración de proteínas totales, albúmina y glucosa el mismo día.

La cuenta total de eritrocitos circulantes ($1 \times 10^6 \text{ cel.}\mu\text{L}^{-1}$) se realizó mediante la dilución de 20 μL de sangre en solución de Dacie para peces a razón de 1:50, muestra: solución, respectivamente (Blaxhall y Daisley, 1973; De Pedro et al., 2004). Después de homogenizar las muestras, se tomaron 10 μL para colocarlos en la cámara Neubauer. Para el posterior conteo de los eritrocitos, fueron tomadas fotografías de la cámara Neubauer a través de una cámara digital PAXcam2 (Pax-it versión 6, Mis Inc., USA) software conectada un microscopio óptico BH-2 Olympus (Japón).

El hematocrito (HT, %) fue determinado por el método de micro hematocrito, para lo cual las muestras de sangre fueron centrifugadas 10,000 rpm por 5 min y se utilizó el lector para tubos capilares de hematocrito *Spiracrit Lancer*. La concentración de hemoglobina (HB, g dL^{-1}) se determinó con kits de *POINTE SCIENTIFIC, INC*. Los datos obtenidos de la cuenta total de EC, concentración de HB y HT fueron utilizados para calcular los índices de Wintrobe como se describe a continuación:

Media del volumen celular (eritrocitos)

$$(MVC, fL) = HT * 10^7 / EC$$

Media de hemoglobina celular

$$(MHC, pg) = HB * 10^7 / RBC$$

Media de la concentración de hemoglobina corpuscular (MCHC, g dl⁻¹) = HB*100 / HT.

6.10 Análisis histológico

Para analizar el estado histológico del hígado de los juveniles de totoaba al ser alimentados con las diferentes formulaciones que contenían variaciones en la proteína de origen vegetal, se tomaron muestras las cuales fueron fijadas en solución Davison por un periodo de 24 horas. Posteriormente se lavaron con agua destilada y se almacenaron en etanol 70% a 4°C hasta su deshidratación. La deshidratación de las muestras se realizó a través de un deshidratador de tejidos automático (Leica-TP 1040). Se empleó la metodología de tinción para Hematoxilina y Eosina.

Se tomaron fotografías de las láminas en una cámara digital Olympus (software versión 6, Mis Inc., USA) conectada a un microscopio AXIOSCOP 40.

7.0. Análisis estadístico

Los datos obtenidos de los parámetros de crecimiento y actividad específica e individual de las enzimas digestivas y metabólicas fueron analizados para evaluar normalidad y homogeneidad de varianzas, se aplicó ANOVA de una vía. La normalidad fue probada con la prueba Kolmogorov-Smirnov y la homogeneidad con la prueba de Levene. Los resultados se expresaron como media $\pm$ error estándar, en caso de no ser

paramétricos, estos fueron transformados a logaritmo natural. Se aplicó la prueba de Student-Newman para denotar si los datos fueron estadísticamente significantes con alfa 0.05. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa Sigma-Plot 11.0 para Windows (Sigma-Plot® ver. 11.0, USA). Se aplicó un modelo de regresión cuadrática de acuerdo a Robbins et al. (2006), se utilizó PROC NLIN in SAS V8 for Windows.

CAPÍTULO II

II. 8.0. RESULTADOS

II. 8.1. Supervivencia, crecimiento y eficiencia alimenticia

Al final del periodo experimental, la supervivencia de los organismos fue mayor al $97 \pm 3.0\%$, no se presentaron diferencias significativas ($P = 0.8$) entre los tratamientos (Tabla 5). Se presentaron diferencias significativas en crecimiento y eficiencia alimenticia ($P < 0.001$). Los peces presentaron un peso entre 103 ± 1.9 a 135 ± 7.1 g, con los mayores ejemplares en DC hasta CPS45, y los menores en las dietas CPS90 y CPS100, siendo significativamente diferentes del resto de las dietas, Figura 2.

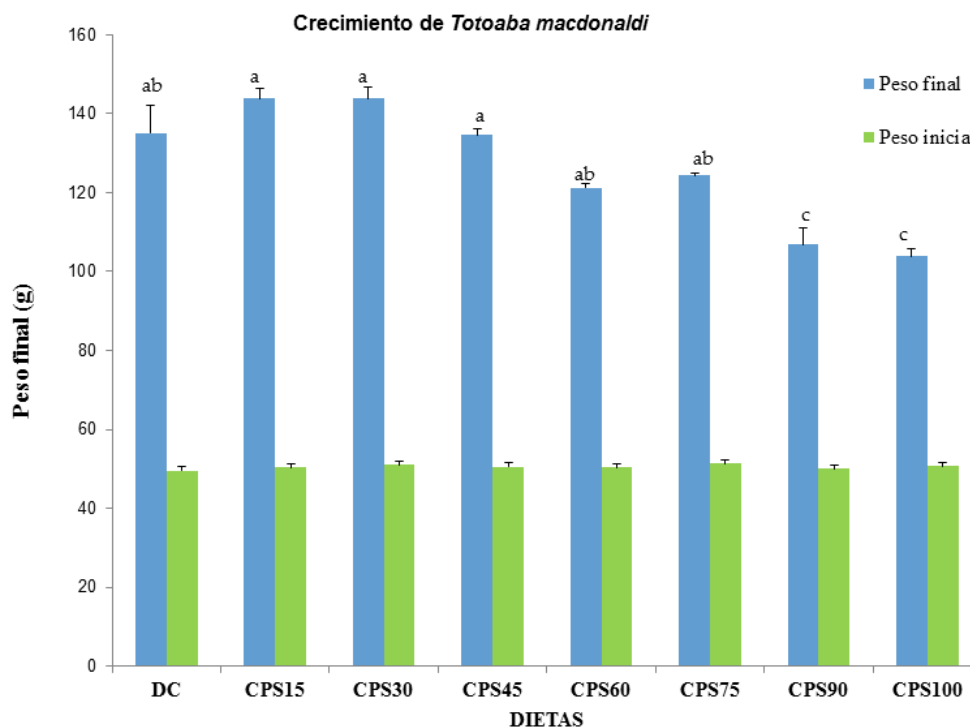


Figura 3. Crecimiento presentado en juveniles de *Totoaba macdonaldi* con los diferentes tratamientos durante el estudio experimental. DC: Dieta control, CPS15: Dieta 15%, CPS30: 30%, CPS45: 45, CPS60: 60%, CPS75: 75%, CPS90: 90% y CPS100: 100 %.

Al final del bioensayo (60 días), se detectaron diferencias significativas ($P < 0.001$) en el crecimiento y eficiencia alimenticia de los juveniles (Tabla 5). El peso

ganado ($\text{g kg ABW}^{-1} \text{ día}^{-1}$) e índice de crecimiento diario final presentaron valores similares entre DC hasta CPS45 (17.5 ± 0.37 a 16.5 ± 0.35 g y 2.8 ± 0.03 a 2.6 ± 0.06 %), mientras tanto al incrementar el nivel de CPS CPS60 a CPS75, los valores de estos parámetros disminuyeron (15.0 ± 0.37 $\text{g kg}^{-1} \text{ día}^{-1}$, y $2.3 \pm 0.0\%$). Por su parte al sustituir de 90 a 100% de CPS, los peces disminuyeron su crecimiento, en tanto que CPS90 y CPS100 fueron los más afectados ($P < 0.001$). La tasa de crecimiento específico (TCE) presentó valores de 1.8 ± 0.05 a 1.2 ± 0.02 ($P < 0.01$) de la DC hasta CPS75, a medida que CPS incrementó en la dieta se presentaron los valores más bajos en CPS90 y CPS100. El consumo diario de alimento (CDA) y la eficiencia alimenticia (EA) y la tasa de eficiencia proteica (REP) en totoaba presentaron una tendencia similar, con similitud estadística en los peces alimentados con CPS hasta el 75 % y los valores más bajos en los peces alimentados con CPS90 y CPS100, disminuyendo conforme se incrementó CPS en la dieta.

La correlación de entre la ganancia en peso ($\text{g kg ABW}^{-1} \text{ día}^{-1}$) y el reemplazo de la harina de pescado por el CPS, se describe en el modelo de línea quebrada, donde se estima el máximo el nivel máximo de sustitución de la harina de pescado hasta un 34.17% (Figura 3).

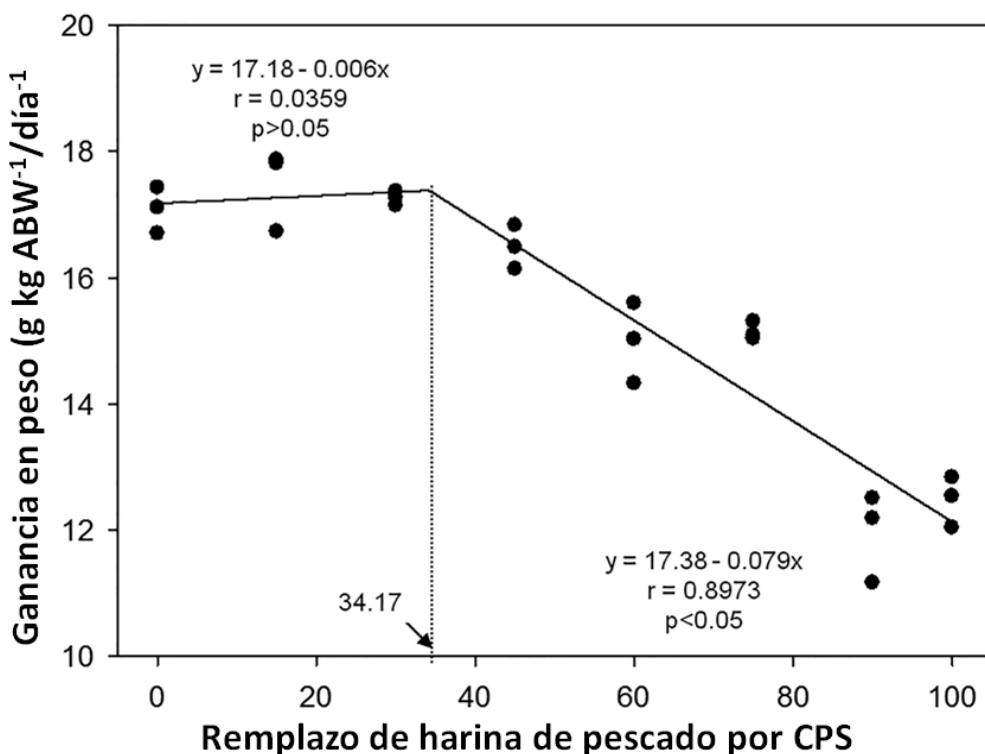


Figura 4. Modelo de regresión cuadrática, adaptada para describir la ganancia en peso (g kg ABW⁻¹ día⁻¹) de los juveniles de *Totoaba macdonaldi* en respuesta al remplazo de la harina de pescado por el concentrado de proteína de soya (CPS) en las dietas. El nivel máximo de remplazo se estimó al 34.17%.

II. 8.2. Composición proximal de tejidos y retención de nutrientes

En la composición proximal de tejidos se observaron diferencias significativas ($P < 0.05$) en respuesta a la incorporación de CPS en las dietas de los juveniles, tal como se indica en la Tabla 6. En el contenido de proteína y humedad de pez entero no se presentaron diferencias significativas ($P > 0.05$). En cuanto al contenido de lípidos se registraron rangos de 3.33 ± 0.01 a $3.39 \pm 0.02\%$, donde los valores más altos se

presentaron en los peces que se alimentaron con CPS90 y CPS100 ($P < 0.001$) comparativamente con el resto de las dietas. En el contenido de cenizas se obtuvieron valores de 3.34 ± 0.05 a $2.33 \pm 0.4\%$, donde CPS15 registró el valor más alto en cenizas y fue significativamente diferente ($P < 0.001$) de CPS60 hasta CPS100. Por otra parte, en el contenido de proteína y humedad en músculo se no mostró diferencias significativas ($P > 0.05$); sin embargo, en el contenido lípidos existieron diferencias significativas ($P < 0.001$) con valores de 1.44 ± 0.02 a $1.57 \pm 0.04\%$, CPS90 y CPS100 promovieron los valores más altos, siendo diferentes al resto de las dietas. En cuanto al contenido de cenizas en músculo los rangos se presentaron entre 1.35 ± 0.02 a $1.21 \pm 0.02\%$, donde CPS30 registro el valor más altos y fue significativamente ($P < 0.001$) diferente de CPS75, CPS90 y CPS100.

Respecto a la composición proximal de hígado de los juveniles de totoaba se obtuvieron diferencias significativas ($P < 0.05$) por efecto de la inclusión del CPS en las dietas de los juveniles, Tabla 4. En el contenido de proteína presentó un rango de 12.87 ± 0.14 a $10.57 \pm 0.20\%$, CPS60 hasta CPS100 fueron los valores más bajos ($P < 0.001$) con respecto al resto de las dietas. El depósito de lípidos en el hígado de los organismos osciló entre 12.01 ± 0.13 a $5.79 \pm 0.09\%$, donde CPS15, CPS30 y CPS45 presentaron los valores más altos de manera significativa ($P < 0.001$) con respecto al resto de las dietas: CPS75, CPS90 y CPS100. En cuanto al depósito de glucógeno se registraron valores de 8.7 ± 0.6 . a $6.5 \pm 0.10\%$, donde DC, CPS15 y CPS30 fueron significativamente ($P < 0.001$) diferentes de CPS60 a CPS100. Los valores de IHS no presentaron diferencias significativas ($P = 0.23$) en los organismos alimentados con las diferentes dietas.

La retención de nitrógeno (%N_R), lípidos (%L_R) y energía (%E_R) presentaron diferencias significativas ($P < 0.001$) por efecto de la inclusión de CPS en las dietas de los juveniles, tal como se muestra en la Tabla 7. En %N_R se obtuvo valores de 56.0 ± 2.46 a $42.6 \pm 1.0\%$, donde CD, CPS15 y CPS30 presentaron los valores más altos y mostraron diferencias significativas ($P < 0.001$) con respecto a CPS75, CPS90 y CPS100. En cuanto a %L_R y %E_R se obtuvieron valores de 25.7 ± 0.9 a $31.6 \pm 1.8\%$ y 49.0 ± 1.6 a $31.9 \pm 0.8\%$, respectivamente, donde las dietas DC, CPS15 y CPS30 registraron los valores más altos, siendo significativamente diferentes ($P < 0.001$) principalmente de CPS75, CPS90 y CPS100.

Tabla 5. Supervivencia, Parámetros de crecimiento y eficiencia alimenticia de juveniles de *Totoaba macdonaldi* alimentados con las diferentes dietas experimentales durante dos meses.

	Dietas							
	DC	CPS15	CPS30	CPS45	CPS60	CPS75	CPS90	CPS100
Supervivencia %	100.0±0.00	98.0±1.67	100±0.00	98.0±2.50	98.0±2.50	97.0±3.33	98.0±1.67	100.0±0.00
Peso inicial (g)	49.5±1.20	50.3±0.44	51.1±0.71	50.5±0.45	50.4±0.85	51.3±0.60	50.0±0.72	50.74±0.38
Peso final(g)	135.1±4.14 ^{ab}	143.8±2.62 ^a	143.9±2.87 ^a	132.1±1.11 ^{ab}	121.3±1.10 ^{bc}	124.4±0.57 ^b	106.9±4.18 ^{cd}	103.9±1.89 ^d
Peso ganado (g kg ABW ⁻¹ día ⁻¹)*	16.7±0.53 ^a	17.5±0.37 ^a	17.3±0.06 ^a	16.5±0.35 ^{ab}	15.0±0.37 ^b	15.1±0.08 ^b	11.9±0.40 ^c	12.5±0.23 ^c
ICD (%) ¹	2.6±0.13 ^{ab}	2.8±0.08 ^a	2.8±0.03 ^a	2.6±0.06 ^{ab}	2.3±0.06 ^c	2.3±0.06 ^c	1.9±0.09 ^d	1.8±0.04 ^d
TCE ²	1.7±0.06 ^a	1.8±0.05 ^a	1.7±0.01 ^a	1.6±0.00 ^a	1.5±0.04 ^a	1.5±0.01 ^a	1.3±0.05 ^b	1.2±0.02 ^b
CAD (g pez día ⁻¹) ³	22.6±1.52 ^a	23.4±0.63 ^a	23.7±0.66 ^a	22.0±0.45 ^a	20.1±0.30 ^b	21.0±0.49 ^b	17.4±0.62 ^c	15.4±0.22 ^c
EA ⁴	1.3±0.01 ^a	1.3±0.03 ^a	1.3±0.01 ^a	1.3±0.03 ^a	1.2±0.01 ^b	1.2±0.02 ^b	1.1±0.04 ^c	1.1±0.04 ^c
REP ⁵	2.4±0.05 ^{ab}	2.5±0.08 ^a	2.5±0.09 ^a	2.3±0.13 ^{ab}	2.2±0.04 ^{bc}	2.2±0.06 ^{bc}	2.1±0.13 ^c	2.1±0.07 ^c
IVS ⁶	3.3±0.1 ^{abc}	2.9±0.2 ^c	2.9±0.1 ^c	3.1±0.1 ^{bc}	3.2±0.1 ^{abc}	3.2±0.1 ^{abc}	3.6±0.2 ^{ab}	3.8±0.2 ^a

Medias (±SEM), las diferencias estadísticas entre los tratamientos son indicadas con la diferentes letras (P<0.05, ANOVA de una vía, aplicando Tukey).

*ABW: Peso promedio: (peso inicial + peso final) / 2

¹Índice de crecimiento diario, ICD: [(peso final^{1/3} – peso inicial^{1/3})/ número de días] × 100

²Tasa de crecimiento específico: (Peso final-Peso inicial/Número de peces/Tiempo)*100

³Consumo de alimento diario, CAD: (consumo promedio de alimento diario/ número de peces)

⁴Eficiencia alimenticia, EA: (peso ganado/ consumo de alimento)

⁵Razón de eficiencia proteica, REP: (peso ganado/ consumo de proteína cruda)

⁶Índice viscerosomático, IVS = (peso húmedo de vísceras/peso del pez) x100

DC: Dieta control, CPS15: Dieta 15%, CPS30: 30%, CPS45: 45, CPS60: 60%, CPS75: 75%, CPS90: 90% y CPS100: 100 %.

Tabla 6. Composición proximal de pez entero, músculo e hígado (% peso húmedo) de juveniles de *Totoaba macdonaldi* alimentados con las diferentes dietas experimentales durante dos meses.

	Dietas							
	DC	CPS15	CPS30	CPS45	CPS60	CPS75	CPS90	CPS100
Pez entero								
Humedad	73.9±0.16	74.0±0.20	74.0±0.16	74.1±0.15	74.5±0.05	74.7±0.11	74.9±0.22	75.2±0.13
Proteína	19.40±0.10	19.25±0.34	19.03±0.01	18.74±0.04	19.06±0.63	19.06±0.33	18.42±0.22	18.20±0.12
Lípidos	3.33±0.01 ^{bc}	3.28±0.08 ^c	3.34±0.07 ^{ab}	3.20±0.18 ^c	3.12±0.01 ^c	3.35±0.05 ^{ab}	3.42±0.03 ^a	3.39±0.02 ^a
Cenizas	3.34±0.05 ^{ab}	3.42±0.03 ^a	3.10±0.02 ^{bc}	3.40±0.01 ^a	3.11±0.04 ^{bc}	2.87±0.06 ^d	2.65±0.05 ^d	2.33±0.04 ^d
Músculo								
Humedad	75.3±0.22	75.8±0.24	75.3±0.07	75.1±0.02	75.6±0.27	75.2±0.53	75.9±0.09	76.0±0.18
Proteína	21.7±0.22	21.3±0.14	21.9±0.05	21.8±0.14	21.5±0.17	21.8±0.58	20.9±0.07	21.2±0.19
Lípidos	1.44±0.02 ^{bc}	1.34±0.01 ^c	1.43±0.01 ^{bc}	1.46±0.01 ^b	1.37±0.02 ^{bc}	1.47±0.02 ^b	1.57±0.02 ^a	1.57±0.04 ^a
Cenizas	1.35±0.02 ^a	1.36±0.02 ^a	1.37±0.02 ^a	1.36±0.01 ^a	1.34±0.03 ^{ab}	1.31±0.01 ^b	1.25±0.01 ^d	1.21±0.02 ^d
Hígado								
Humedad	68.6±1.97 ^c	67.0±0.41 ^c	67.1±0.44 ^c	67.4±0.30 ^b	70.7±0.22 ^b	71.9±0.52 ^b	72.1±0.21 ^a	72.7±0.18 ^a
Proteína	12.26±0.08 ^a	12.76±0.14 ^a	12.87±0.17 ^a	12.33±0.09 ^a	11.01±0.10 ^b	10.57±0.20 ^b	11.68±0.17 ^b	11.89±0.16 ^b
Lípidos	10.16±0.41 ^{bc}	11.91±0.08 ^a	12.01±0.13 ^a	11.83±0.04 ^a	10.10±0.15 ^{ab}	9.03±0.14 ^c	5.79±0.09 ^e	7.16±0.10 ^d
Cenizas	1.12±0.02 ^b	1.11±0.02 ^b	1.27±0.02 ^a	1.25±0.02 ^a	1.16±0.03 ^b	1.15±0.08 ^b	1.10±0.01 ^b	1.17±0.01 ^b
Glucogeno	8.6±0.11 ^a	8.4±0.17 ^a	8.7±0.06 ^a	8.2±0.04 ^{ab}	7.6±0.11 ^b	7.5±0.09 ^b	6.6±0.23 ^c	6.5±0.10 ^c
HSI*	1.08±0.06	0.92±0.03	0.92±0.03	0.90±0.04	0.94±0.02	0.95±0.02	1.17±0.13	0.98±0.09

Medias ±SEM (n=3), las diferencias estadísticas entre los tratamientos son indicadas con la diferentes letras (P<0.05). *IHS: índice hepatosomático: (peso de hígado húmedo / peso del pez entero) ×100. DC: Dieta control, CPS15: Dieta 15%, CPS30: 30%, CPS45: 45, CPS60: 60%, CPS75: 75%, CPS90: 90% y CPS100: 100 %.

Tabla 7. Retención de Nitrógeno, Lípidos y Energía de los juveniles de *Totoaba macdonaldi* alimentados con las diferentes dietas experimentales durante dos meses.

	Dietas							
	DC	CPS15	CPS30	CPS45	CPS60	CPS75	CPS90	CPS100
Nitrógeno								
Consumo (g kg ABW ⁻¹ día ⁻¹) ¹	1.0±0.05	1.0±0.04	1.0±0.06	1.0±0.06	1.0±0.02	1.0±0.02	0.9±0.03	0.9±0.01
Retención (g kg ABW ⁻¹ día ⁻¹)	0.57±0.00 ^a	0.56±0.00 ^a	0.53±0.01 ^a	0.48±0.01 ^{ab}	0.5±0.00 ^b	0.4±0.00 ^{bc}	0.4±0.00 ^{cd}	0.4±0.00 ^d
Retención (%)	53.8±1.54 ^a	56.0±2.46 ^a	55.3±1.92 ^{ab}	50.8±2.55 ^{ab}	48.1±0.83 ^b	43.3±1.64 ^c	45.3±2.69 ^c	42.6±1.00 ^c
Lípidos								
Consumo (g kg ABW ⁻¹ día ⁻¹)	1.7±0.07 ^a	1.5±0.07 ^{ab}	1.6±0.06 ^{ab}	1.6±0.09 ^{ab}	1.5±0.05 ^{ab}	1.5±0.03 ^{ab}	1.4±0.05 ^b	1.3±0.02 ^b
Retention (g kg ABW ⁻¹ día ⁻¹)*	0.49±0.04 ^{ab ab}	0.49±0.02 ^{ab}	0.56±0.00 ^a	0.43±0.00 ^{bc}	0.41±0.01 ^{bc}	0.37±0.01 ^{cd}	0.35±0.01 ^{cd}	0.33±0.01 ^d
Retención (%)	31.6±1.8 ^a	31.2±1.8 ^a	36.0±0.8 ^a	27.4±1.7 ^b	25.7±0.1 ^b	28.3±0.3 ^c	26.0±1.3 ^c	25.7±0.9 ^c
Energía								
Consumo (kJ g kg ABW ⁻¹ día ⁻¹)	2.5±0.11	2.5±0.11	2.5±0.1	2.5±0.14	2.4±0.08	2.4±0.06	2.3±0.08	2.1±0.03
Retención (kJ g kg ABW ⁻¹ día ⁻¹)*	1.1±0.04 ^{ab}	1.2±0.01 ^a	1.2±0.01 ^a	1.1±0.00 ^b	0.9±0.02 ^c	0.9±0.01 ^c	0.8±0.01 ^d	0.7±0.01 ^d
Retención (%)	45.7±1.13 ^a	48.3±1.93 ^a	49.0±1.63 ^a	42.8±2.38 ^{ab}	38.8±0.52 ^b	38.8±1.20 ^b	33±1.53 ^c	31.9±0.76 ^c

Medias ±SEM (n=3), las diferencias estadísticas entre los tratamientos son indicadas con la diferentes letras (P<0.05). ABW: Peso promedio: (peso inicial + peso final) / 2.

DC: Dieta control, CPS15: Dieta 15%, CPS30: 30%, CPS45: 45, CPS60: 60%, CPS75: 75%, CPS90: 90% y CPS100: 100 %.

II.8.3. Grado de hidrólisis (GH) y Digestibilidad *In vitro*

El grado de hidrólisis (HG) ácido y alcalino de las diferentes dietas utilizadas en el presente estudio reportó diferencias significativas ($P < 0.001$) en respuesta al nivel de inclusión de CPS en las dietas de juveniles de totoaba, tal como se muestra en la Tabla 8. Los valores obtenidos de GH ácido presentó rangos de 1.77 ± 0.02 a $0.26 \pm 0.03\%$, donde la dieta que registró el valor más alto fue CD mostrando diferencias significativas ($P < 0.001$) con respecto al resto de las dietas. Respecto a GH alcalina presentó valores de 4.58 ± 0.13 a $3.38 \pm 0.06\%$, el mayor GH se observó en CPS30 y el menor en CPS100 con diferencias significativas ($P < 0.001$) entre éstas dietas. En cuanto al porcentaje de digestibilidad *in vitro* de las dietas, presentaron valores de 90.4 ± 0.03 a $54.7 \pm 1.19\%$, donde los porcentajes más altos lo presentaron CD, CPS15 y CPS30 y fueron significativamente ($P < 0.001$) diferentes con respecto al resto de las dietas, Tabla 8.

II. 8.4. Actividad de enzimas digestivas

Al evaluar la actividad de las enzimas digestivas de los juveniles de totoaba, se presentaron diferencias significativas ($P < 0.05$) en respuesta a los diferentes niveles de inclusión de CPS en las dietas, como se observa en la Tabla 9. Respecto a los resultados obtenidos de la actividad total de proteasas alcalinas se presentó en los rangos de 397.2 ± 9.2 a 201.2 ± 32.7 U mg proteína⁻¹, los niveles más altos de proteasas alcalinas totales se presentaron en DC, CPS15 y CPS30, mostrando diferencias significativas ($P < 0.001$) con respecto al resto de las dietas. La actividad de tripsina reportó valores de 9.38 ± 0.52 a 2.27 ± 0.10 mU x 10⁻³ mg proteína⁻¹, la actividad más

alta se presentó en la DC con diferencias significativas ($P < 0.001$) con respecto al resto de las dietas. Así mismo, quimotripsina también presentó una actividad variable por la inclusión de CPS en las diferentes dietas, se registraron valores de 1.20 ± 0.07 a 0.60 ± 0.02 mU mg proteína⁻¹, la actividad más alta se presentó en DC, CPS15 y CPS30 siendo así significativamente diferentes ($P < 0.001$) con respecto al resto de las dietas. En cuanto a la actividad de la fosfatasa alcalina los valores obtenidos fueron de 51.172 ± 2.65 a 25.422 ± 1.50 mU mg proteína⁻¹, se detectó una mejor respuesta en las dietas DC, CPS15 y CPS30, observando diferencias significativas ($P < 0.001$) con respecto al resto de las dietas. En lo que respecta a la actividad de la enzima leucina aminopeptidasa (exopeptidasa de borde de cepillo) presentó diferencias significativas por la inclusión de CPS ($P < 0.001$) con valores de 30.37 ± 0.26 a 17.86 ± 1.01 mU $\times 10^{-3}$ mg proteína⁻¹, donde la actividad más alta la presentaron los organismos alimentados con CPS15 y CPS30, con respecto a las dietas con mayor inclusión de CPS.

Tabla 8. Grado de Hidrólisis y % de digestibilidad de las diferentes dietas experimentales con diferentes niveles de concentrado de proteína de soya que fueron utilizadas para alimentar a los juveniles de *Totoaba macdonaldi*.

	DC	CPS15	CPS30	CPS45	CPS60	CPS75	CPS90	CPS100
% GHAc	1.77±0.02 ^a	1.16±0.05 ^b	1.04±0.05 ^b	0.96±0.05 ^b	0.46±0.02 ^c	0.28±0.08 ^c	0.37±0.04 ^c	0.26±0.03 ^c
% GHAlc	4.24±0.32 ^{ab}	4.32±0.02 ^a	4.58±0.13 ^a	4.22±0.03 ^{ab}	4.10±0.13 ^{ab}	3.96±0.14 ^{bc}	3.59±0.06 ^{bc}	3.38±0.06 ^c
% Digestibilidad	90.4±3.0 ^a	82.4±0.7 ^{ab}	84.4±2.7 ^{ab}	77.9±0.3 ^{bc}	68.5±1.7 ^{cd}	63.8±2.8 ^{ed}	59.6±1.4 ^{ed}	54.7±1.2 ^e

Medias ±SEM (n=3), las diferencias estadísticas entre los tratamientos son indicadas con la diferentes letras (P<0.05).

GHA: Grado de hidrólisis ácido

GHAl: Grados de hidrólisis alcalino

DC: Dieta control, CPS15: Dieta 15%, CPS30: 30%, CPS45: 45, CPS60: 60%, CPS75: 75%, CPS90: 90% y CPS100: 100 %.

Tabla 9. Actividad de enzimas digestivas de juveniles de *Totoaba macdonaldi* alimentados con diferentes niveles de concentrado de proteína de soya durante dos meses.

Dietas							
DC	CPS15	CPS30	CPS45	CPS60	CPS75	CPS90	CPS100
Proteasas alcalinas U mg proteína⁻¹							
397.2±9.2 ^a	401.2±9.5 ^a	416.7±19.6 ^a	269.2±7.6 ^b	237.1±11.5 ^b	234.8±23.8 ^b	222.3±16.0 ^b	201.2±32.7 ^b
Tripsina mU x 10⁻³ mg proteína⁻¹							
9.38±0.52 ^a	4.68±0.41 ^b	4.94±0.18 ^b	3.16±0.04 ^c	2.57±0.21 ^{cd}	2.53±0.48 ^{cd}	2.32±0.15 ^d	2.27±0.10 ^d
Quimotripsina mU x mg proteína⁻¹							
1.20±0.07 ^a	1.04±0.08 ^{ab}	1.10±0.02 ^a	0.80±0.04 ^{bc}	0.75±0.03 ^c	0.63±0.03 ^c	0.62±0.03 ^c	0.60±0.02 ^c
Fosfatasa alcalina mU mg proteína⁻¹							
51.17±2.65 ^a	53.32±1.91 ^a	53.78±1.52 ^a	44.07±0.65 ^b	30.76±0.62 ^b	26.25±1.77 ^c	26.15±2.46 ^c	25.42±1.50 ^c
Leucina aminopeptidasa mU x 10⁻³ mg proteína⁻¹							
30.37±0.26 ^b	31.70±1.48 ^a	33.93±0.88 ^a	27.37±0.76 ^b	25.08±2.59 ^b	17.37±0.85 ^c	18.24±1.13 ^c	17.86±1.01 ^c

Medias ±SEM (n=3), las diferencias estadísticas entre los tratamientos son indicadas con la diferentes letras (P<0.05).

DC: Dieta control, CPS15: Dieta 15%, CPS30: 30%, CPS45: 45, CPS60: 60%, CPS75: 75%, CPS90: 90% y CPS100: 100 %.

II. 8.5. Actividad de enzimas que participan en el metabolismo intermediario

La actividad de las enzimas claves en las principales rutas del metabolismo intermediario mostró ser influenciada por la composición de las dietas experimentales (Tablas 10 y 11).

La actividad de las enzimas del catabolismo de aminoácidos, aspartato aminotransferasa (ASAT) y glutamato deshidrogenasa (GDH) no presentaron diferencias significativas en los niveles de actividad ($P > 0.05$), sin embargo, los valores más altos en estas dos enzimas se mostraron en DC. En alanino aminotransferasa (ALAT) se registraron valores de 278.5 ± 33.1 a 399.8 ± 16.4 mU mg^{-1} proteína, donde las actividades más baja se presentaron en los peces alimentados con las dietas CPS90 y CPS100, siendo estos significativamente diferentes ($P < 0.05$) del resto de las dietas, Tabla 10.

Respecto a las enzimas que participan en la glucólisis, se observaron diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los tratamientos. En hexoquinasa (HK), los valores oscilaron entre 2.0 ± 0.4 a 5.5 ± 0.6 mU mg^{-1} proteína, donde los valores más altos se observaron en los hígados de los peces alimentados con DC, CPS15 y CPS30, siendo estos significativamente ($P < 0.05$) diferentes de CPS75-CPS100 dietas. Por su parte la respuesta de la actividad de glucoquinasa (GK), osciló entre los valores de 4.5 ± 0.6 a 8.2 ± 0.9 mU mg^{-1} proteína, donde los valores más altos se presentaron en DC-CPS30 mostrando diferencias significativas ($P < 0.05$) con las dietas CPS60-CPS100, Tabla 10.

La respuesta de la actividad de la enzima que participa en la vía de gluconeogénesis (Fructosa-1,6-bifosfatasa, FBPasa) mostró diferencias significativas ($P < 0.05$) por efecto de la inclusión del CPS, en nivel de actividad osciló entre 12.3 ± 0.3

a 19.4 ± 1.3 mU mg⁻¹ proteína, donde las dietas DC a CPS45 reportaron los valores más altos, siendo estos estadísticamente diferentes ($P < 0.05$) de las dietas CPS75 a CPS100, Tabla 10.

Respecto al nivel de actividad de Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) los valores oscilaron entre 22.4 ± 1.3 y 19.0 ± 0.9 mU mg⁻¹ proteína, aunque no se presentaron diferencias significativas ($P > 0.05$) entre las diferentes dietas, no obstante, los valores más bajos registrados se presentó en CPS90 y CPS100. Por su parte el nivel de enzimas málica (EM), obtuvo valores de 6.0 ± 0.3 a 7.7 ± 0.2 , si bien no se presentó diferencias estadísticas ($P > 0.05$) entre los distintos tratamientos, el nivel de actividad de CPS90 y CPS100 (7.21 y 7.68 , mU mg⁻¹ proteína), registraron la los valores más altos de esta enzima, Tabla 11.

Tabla 10. Actividad específica de enzimas relacionadas con el metabolismo intermediario hepático de juveniles de *Totoaba macdonaldi* alimentados con diferentes niveles de concentrado de proteína de soya (**CPS**). Datos se expresan como mU mg⁻¹ proteína.

Dietas	DC	CPS15	CPS30	CPS45	CPS60	PS70	CPS90	CPS100
Catabolismo de aminoácidos								
Aspartato aminotransferasa								
(ALAT)	93.5±3.8 ^a	80.7±3.9 ^{abc}	76.1±3.1 ^{abc}	75.4±9.8 ^{abc}	84.1±7.6 ^{ab}	70.8±8.8 ^{abc}	57.1±5.4 ^c	57.8±2.6 ^{cb}
Alanino aminotransferasa								
(ASAT)	878.2±36.4	735.2±56.9	801.4±35.2	772.0±57.0	838.7±40.9	744.6±46.3	695.7±57.7	776.7±16.8
Glutamato deshidrogenasa								
(GDH)	324.0±11.4	302.8±14.3	312.6±13.4	294.2±29.4	280.6±24.7	256.9±26.8	281.7±27.7	318.9±18.4
Glucólisis								
Hexoquinasa (HK)	5.5±0.6 ^a	5.2±0.3 ^{ab}	4.9±0.2 ^{ab}	4.2±0.5 ^{ab}	3.6±0.5 ^{bc}	2.3±0.5 ^c	2.1±0.2 ^c	2.0±0.4 ^c
Glucoquinasa (GK)	8.2±0.9 ^a	7.3±0.6 ^a	7.1±0.6 ^a	6.5±0.9 ^{ab}	5.5±0.6 ^{bc}	4.9±0.6 ^{bc}	4.9±0.7 ^{bc}	4.5±0.6 ^{bc}
Gluconeogénesis								
Fructosa-1,6-bisfosfatasa								
(FBPasa)	19.4±1.3 ^a	17.3±1.7 ^{ab}	16.7±0.6 ^{ab}	16.6±0.8 ^{ab}	15.2±1.2 ^b	13.6±0.9 ^{bc}	13.3±1.2 ^{bc}	12.3±0.3 ^c

Medias ±SEM (n=3), las diferencias estadísticas entre los tratamientos son indicadas con la diferentes letras (P<0.05).

DC: Dieta control, CPS15: Dieta 15%, CPS30: 30%, CPS45: 45, CPS60: 60%, CPS75: 75%, CPS90: 90% y CPS100: 100 %.

Tabla 11. Actividad específica de enzimas relacionadas con el metabolismo intermediario hepático de juveniles de *Totoaba macdonaldi* alimentados con diferentes niveles de concentrado de proteína de soya (**CPS**). Datos se expresan como mU mg⁻¹ proteína.

Dietas	DC	CPS15	CPS30	CPS45	CPS60	PS70	CPS90	CPS100
Lipogénesis								
Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa								
(G6PD)	19.9±0.6	21.7±1.4	20.9±0.7	22.9±1.8	22.4±1.3	22.0±1.3	20.2±1.3	19.0±0.9
Enzimas málicas								
(EM)	6.0±0.6	6.7±0.4	6.0±0.3	6.8±0.9	6.7±0.6	7.0±0.5	7.2±0.6	7.7±0.2

Medias ±SEM (n=3), las diferencias estadísticas entre los tratamientos son indicadas con la diferentes letras (P<0.05).

DC: Dieta control, CPS15: Dieta 15%, CPS30: 30%, CPS45: 45, CPS60: 60%, CPS75: 75%, CPS90: 90% y CPS100: 100 %.

II. 8.6. Hematología

El conteo de glóbulos rojos (eritrocitos) mostró diferencias significativas entre los tratamientos, Tabla 12. En el conteo de eritrocitos, se presentaron valores de 3.0 ± 0.06 a $2.3 \pm 0.09 \times 10^6$ células por ml, el valor más alto se presentó en DC siendo significativamente diferente ($P < 0.001$) a los organismos alimentados con CPS70, CPS90 y CPS100. El porcentaje de hematocrito mostró una variación de 22.2 ± 0.31 a 17.0 ± 0.77 %. Los valores más altos se presentaron en DC, CPS15 y CPS30 siendo significativamente diferentes ($P < 0.001$) de CPS75, CPS90 y CPS100. En el contenido de hemoglobina los valores oscilaron entre 7.4 ± 0.08 a 5.5 ± 0.21 g dL⁻¹, los valores más altos se presentaron en DC, CPS15 y CPS30 siendo significativamente diferentes ($P < 0.001$) de CPS75, CPS90 y CPS100.

Índices Wintrobe

Los valores en el volumen corpuscular medio de eritrocitos (VCM) no mostró ser influenciado por la incorporación de CPS en las dietas de los juveniles de totoaba ($P > 0.05$). La hemoglobina corpuscular media (HCM) los valores obtenidos oscilaron entre 27.4 ± 0.26 a 22.7 ± 0.758 , los peces alimentados con la dietas CPS15, CPS30 y CPS45 fueron significativamente diferentes ($P < 0.05$) a los peces alimentados con CPS60, CPS75, CPS90 y CPS100. La concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM) presentó valores de 37.3 ± 0.55 a 32.9 ± 0.37 , siendo significativamente mayor ($P < 0.05$) en peces alimentados con las dietas CPS15, CPS30 y CPS45, Tabla 12.

II.8.7. Química sanguínea

La sustitución de HP por CPS produjo cambios en la química sanguínea de los juveniles de totoaba en el presente estudio, Tabla 12. En cuanto al contenido de glucosa en plasma no se presentó una tendencia clara, por lo que puede deducirse que el contenido de CPS en las dietas de juveniles no influyó en el contenido de glucosa. Se obtuvieron valores de $54.0 \pm 0.2.5$ a 36.6 ± 1.3 . mg dL⁻¹, los peces alimentados con la dieta CPS75 presentó una concentración significativamente mayor ($P < 0.05$) en relación a los peces de los tratamientos CPS30, CPS45, CPS90 y CPS100.

La concentración de proteína en plasma presentó valores de 1.7 ± 0.1 a 2.3 ± 0.1 , los valores más altos se presentaron en los peces alimentados con las dietas DC, CPS15, CPS30 y CPS45 siendo significativamente diferente ($P < 0.05$) a las dietas CPS60, CPS75, CPS90 y CPS100.

El contenido de albumina en plasma de los juveniles presentó valores de 0.7 ± 0.0 a 0.5 ± 0.0 g dL⁻¹, los peces alimentados con la dieta CPS45 registró los valores más altos, siendo significativamente diferente ($P < 0.001$) a los peces alimentados con las dietas CPS15, CPS60, CPS75, CPS90 y CPS100. La menor concentración de albumina se encontró en la dieta CPS90 y CPS100.

Los valores obtenidos de globulinas presentes en el plasma oscilaron entre 1.5 ± 0.3 a 1.2 ± 0.2 , los valores más altos estuvieron presentes en las dietas DC y CPS15 siendo significativamente diferente ($P < 0.01$) a las dietas CPS60, CPS75, CPS90 y CPS100.

Al analizar la relación Albúmina:Globulinas (Alb:Glb) se observó que no se presentó una tendencia muy clara por efecto de la incorporación de CPS en la dieta de los juveniles. Los resultados obtenidos oscilaron entre 0.4 ± 0.0 a 0.7 ± 0.0 , peces alimentados con las dietas CPS45, CPS60 y CPS75 mostraron una relación Alb:Glb significativamente menor ($P < 0.05$) a la encontrada en los tratamientos DC, CPS15, CPS90 y CPS100. Los peces alimentados con la dieta CPS15 mostraron la mayor relación respecto ($P < 0.05$) al resto de los tratamientos, Tabla 12.

Tabla 12. Hematología y química sanguínea en juveniles de *Totoaba macdonaldi* en respuesta a las diferentes dietas con distintos niveles de inclusión de concentrado de proteína de soya en la dietas

	Dietas							
	DC	CPS15	CPS30	CPS45	CPS60	CPS75	CPS90	CPS100
Hematología								
Glóbulos rojos %	3.0±0.06 ^a	3.0±0.04 ^{ab}	2.8±0.03 ^{ab}	2.7±0.02 ^{ab}	2.7±0.09 ^{ab}	2.5±0.09 ^{bc}	2.4±0.07 ^{cd}	2.3±0.09 ^d
Hematocrito %	22.2±0.31 ^a	20.6±0.34 ^{ab}	20.7±0.17 ^{ab}	19.3±0.60 ^{bc}	18.5±0.41 ^{bc}	18.2±0.84 ^{cd}	17.3±0.53 ^d	17.0±0.77 ^d
Hemoglobina	7.1±0.08 ^{ab}	7.4±0.08 ^a	7.4±0.09 ^a	6.8±0.12 ^{ab}	6.7±0.11 ^{bc}	6.5±0.14 ^{bcd}	5.5±0.21 ^d	6.0±0.32 ^{cd}
MHC	7.1±0.08 ^{ab}	7.4±0.08 ^a	7.4±0.09 ^a	6.8±0.12 ^{ab}	6.7±0.11 ^{bc}	6.5±0.14 ^{bcd}	5.5±0.21 ^d	6.0±0.32 ^{cd}
MVC	73.6±0.13	69.7±1.80	73.3±1.77	73.1±1.12	71.1±1.10	69.2±1.02	68.3±1.84	71.1±1.69
MCHC	32.0±0.3 ^e	37.0±0.3 ^a	37.3±0.6 ^a	35.5±0.6 ^{abc}	34.6±0.3 ^{bc}	35.8±0.5 ^{abc}	32.9±0.4 ^{de}	34.4±0.6 ^{cd}
Química sanguínea								
Glucosa	48.6±0.9 ^{bcd}	51.7±1.1 ^{abc}	37.9±1.3 ^{de}	36.6±1.3 ^e	53.0±2.2 ^{ab}	54.0±2.5 ^a	45.0±2.6 ^{bc}	43.2±1.4 ^{cde}
Proteína	2.3±0.1 ^a	2.0±0.1 ^b	2.0±0.0 ^{bc}	2.1±0.1 ^{ab}	1.7±0.1 ^{cd}	1.6±0.1 ^d	1.5±0.1 ^d	1.7±0.1 ^{cd}
Albúmina	0.7±0.0 ^{abc}	0.6±0.0 ^{cd}	0.8±0.0 ^{ab}	0.8±0.0 ^a	0.7±0.0 ^{bc}	0.7±0.0 ^c	0.5±0.0 ^e	0.6±0.0 ^b
Globulinas	1.5±0.3 ^a	1.4±0.2 ^{ab}	1.2±0.2 ^{bcd}	1.3±0.1 ^{abc}	1.0±0.2 ^d	1.0±0.2 ^d	1.0±0.2 ^d	1.2±0.2 ^{cd}
Alb: Glb	0.5±0.0 ^c	0.4±0.0 ^c	0.7±0.0 ^{ab}	0.7±0.0 ^b	0.6±0.0 ^{ab}	0.4±0.0 ^a	0.4±0.0 ^c	0.4±0.0 ^c

Medias ±SEM (n=3), las diferencias estadísticas entre los tratamientos son indicadas con la diferentes letras (P<0.05).

Gr: glóbulos rojos (cel ml-1) x 106, **Ht:** hematocrito %, **Hb:** hemoglobina g dL-1, **MCHC:** media de concentración de hemoglobina g dL-1, **MHC:** media de hemoglobina corpuscular pg y **MVC:** media del volumen celular fL. **Gluc:** glucosa (mg dL-1), **Pt:** proteína (g dL1), **Alb:** albumina (g dL-1), y relación albumina / globulinas (**Alb: Glb**). DC, CPS15, CPS30, CPS45, CPS60, CPS75, CPS90 y CPS100. Las diferentes letras muestran diferencias significativas (ANOVA de una vía, seguido por una prueba Tukey; p<0.05).

II.8.8. Histología del hepatopáncreas de *Totoaba macdonaldi*

Para el presente estudio se logró identificar en totoaba que el hígado integra en su estructura anatómica al páncreas, conformando al hepatopáncreas (hp); glándula que se encuentra constituida por el estroma y parénquima. Se observó que el estroma está integrado por tejido conjuntivo denso que forma una cápsula (cap) que rodea a la glándula y su vez penetra al órgano para constituir trabéculas o tabiques de tejido conjuntivo laxo y formar estructuras ramificadas en forma radial, entre las cuales se encuentran los acinos pancreáticos (ap) que se encuentran delimitados a su vez por tejido conjuntivo denso, que se separa del parénquima hepático (ph) diferenciando a los dos componentes principales del hepatopáncreas (Figura 3 A).

Al observar al parénquima hepático (hp) de la totoaba, no se presentaron lobulillos bien integrados tal como sucede en mamíferos, quienes presentan componentes denominados triadas portales (vena porta, una arteria y un conducto biliar). En estos es posible observar las ramas de la arteria hepática, la vena porta, los conductos biliares asociados a los cordones de hepatocitos que a su vez se disponen entre los capilares sinusoides, en cuyo interior se encuentra tejido hematopoyético.

Los cordones de células hepáticas (hepatocitos), se encuentran de forma radial a la vena central y captan el fluido de las venas portas (v) y arterias (a); además de las secreciones de los hepatocitos y liberan su contenido en la vena. El hepatocito tiene forma poligonal que presenta un núcleo y nucléolo muy evidente (Figura 3 B).

En cuanto al componente pancreático, este se encuentra entremezclado con el parénquima hepático formando acinos pancreáticos (ap) o adenómeros serosos; cuyas células son de forma piramidal con núcleo redondo basófilo (H-E) asociado a la membrana

basal, y gran cantidad de gránulos de zimógeno (proenzimas digestivas) situados en la zona apical, sustancias que son secretadas por exocitosis hacia un vaso sanguíneo localizado en la región central de los adenómeros, observando el endotelio y gran cantidad de eritrocitos y leucocitos. En la zona apical de los acinos pancreáticos se logró identificar lo que aparenta ser los islotes de Langerhans (il), separada de la parte exócrina del páncreas. La vena central asociada al componente pancreático está delimitado por un endotelio y tejido conjuntivo laxo así como también por una capa fina de fibras musculares lisas y dentro de esta vena se distinguieron por presentar una gran cantidad de elementos formes o comúnmente conocidos como eritrocitos (ef) (Figura 3 A, B, C y D).

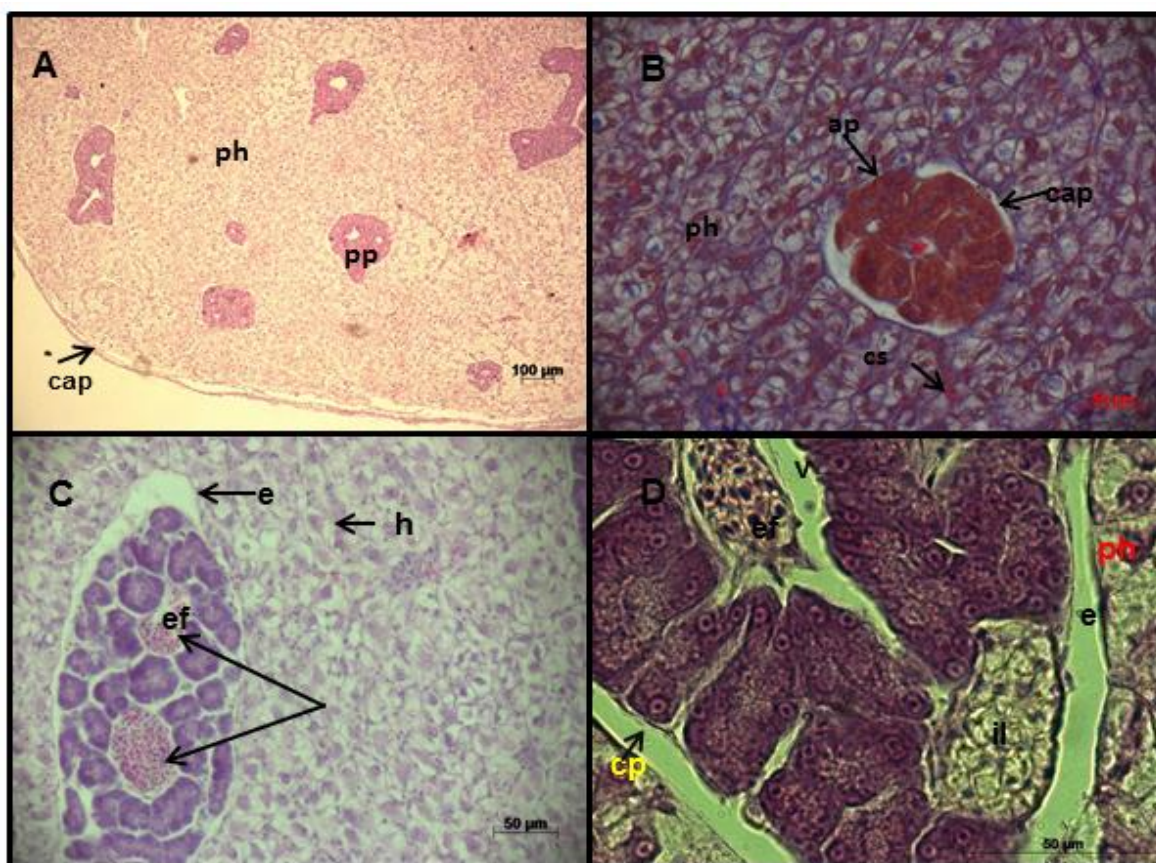


Figura 5. Cortes histológicos de hepatopáncreas de juveniles de *Totoaba macdonaldi*; A) Parénquima hepático (ph), parénquima pancreático (pp), delimitado por una cápsula conformada por tejido conjuntivo (cap), técnica H-E, 5x; B) parénquima hepático (ph),

donde se observa hepatocitos conformados por núcleo y nucléolo rodeados de citoplasma, capilares sinusoides con presencia de elementos formes (ef), en la parte central se observa el acino pancreático (ap), delimitado por una cápsula (cap), que se separa del tejido hepático, en el centro del acino pancreático (ap) se observa una vena central con elementos formes Tricrómica, 20x; C) hepatocitos con citoplasma bien definido, así con su núcleo y nucléolo (h), presencia de capilares sinusoides (cs), acino pancreático (ap) delimitado de endotelio (e), en la zona central presencia de venas (v), con elementos formes; (ef), técnica H-E, 10x; D) Acinos pancreáticos vena central (v), islote de Langerhans (il), célula pancreática (cp) técnica H-E, 40x.

Tabla 13. Descripción del hepatopáncreas de los juveniles de *Totoaba macdonaldi* bajo los diferentes tratamientos

Dieta	Descripción del hepatopáncreas de los juveniles de <i>Totoaba macdonaldi</i>
DC	• Presencia moderada de microvesículas y macrovesículas en hepatocitos (posible almacenamiento de glucógeno y/o lípidos) (ligera esteatosis). • Presencia de ligera dilatación y congestión de elementos formes (ef) en capilares sinusoides (cs). • Presencia de células adiposas (adipocitos) alrededor de los acinos o nódulos pancreáticos (ap) (Figura 4 B).
CPS15	• Presencia de microvesículas en la gran mayoría de las células; por ende gran cantidad de vesículas que desplazan al núcleo del hepatocito (esteatosis de moderada a alta). • Presencia de una ligera cantidad de grupos de adipocitos en los acinos o nódulos pancreáticos (depósito de lípidos) Figura 5.
CPS30	• Presencia de microvesículas y macrovesículas en la gran mayoría de las células; es decir presencia de vacuolas pequeñas y grandes que desplazan totalmente al núcleo (esteatosis microvesicular y macrovesicular) (depósito de glucógeno y/o grasa).
CPS30	• Presencia de dilatación sinusoidal con abundantes elementos formes, indicando una ligera congestión sinusoidal. • Presencia escasa de células adiposas y la vena central con presencia moderada de elementos formes (Figura 6). • Presencia de microvesículas y macrovesículas en la gran mayoría de las células, además de la presencia de grupos de células adiposas de manera moderada (esteatosis).

CPS45	• Dilatación sinusoidal en zonas asociadas con hepatocitos afectados. • Congestión sinusoidal. • Presencia de grupos de células adiposas entre acinos pancreáticos (Figura 7). • Presencia de abundantes microvesículas y macrovesículas en la gran mayoría de las células y entre estos grupos de células adiposas (esteatosis).
CPS60	• Dilatación sinusoidal generalizada. • Congestión sinusoidal. • Presencia de grupos de células adiposas entre acinos pancreáticos (ap) (Figura 8).
CPS75	• Presencia de un tejido hepático (parénquima), de tipo microvesicular asociado a zonas de hepatocitos con macrovesículas; es decir las vacuolas ocupan a todo el citoplasma, desplazando totalmente al núcleo. • Presencia de núcleos picnóticos. • Presencia de escasa cantidad de adipocitos, asociados a capilares sinusoides dilatados, con gran cantidad de posibles mononucleares • Los acinos pancreáticos sin daño aparente (Figura 9). • Presencia de un tejido hepático de tipo microvesicular y macrovesicular.
CPS90	• Picnosis hepática o núcleos picnótico (np). • Presencia de células adiposas (a). • Parénquima pancreático disminuido menor cantidad de acinos además de estar muy separadas unas de otras; (Figura 10).
CPS100	• Presencia de abundantes microvesículas y macrovesículas en la gran mayoría de las células hepáticas. • Moderada presencia de núcleos picnóticos en hepatocitos. • Reducción del parénquima pancreático (Figura 11).

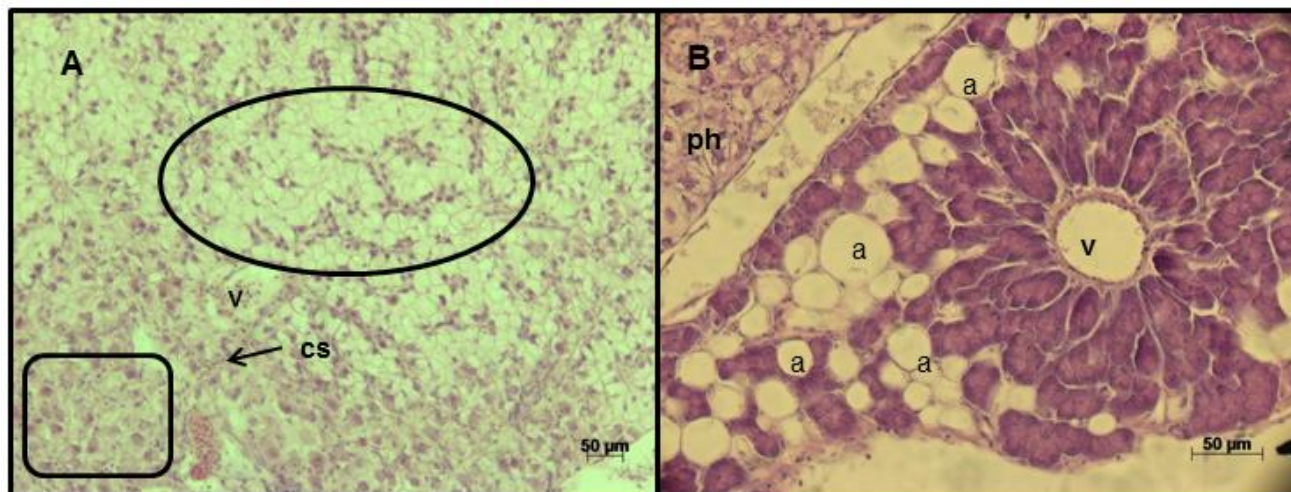


Figura 6. Cortes histológicos de hepatopáncreas de juveniles de *Totoaba macdonaldi* de alimentados con la dieta DC. A) Circulo superior, indican la presencia abundante de hepatocitos con macrovesículas y con núcleo desplazado a la periferia, congestión de canales sinusoides (cs), vena hepática (v), circulo inferior indican zona con hepatocitos sanos aparentemente con presencia de citoplasma ligeramente contraído; técnica H-E, 10x; B) Presencia de células adiposas (a), entre las células del páncreas, vena pancreática, (v), parénquima hepático (hp), técnica H-E, 20x.

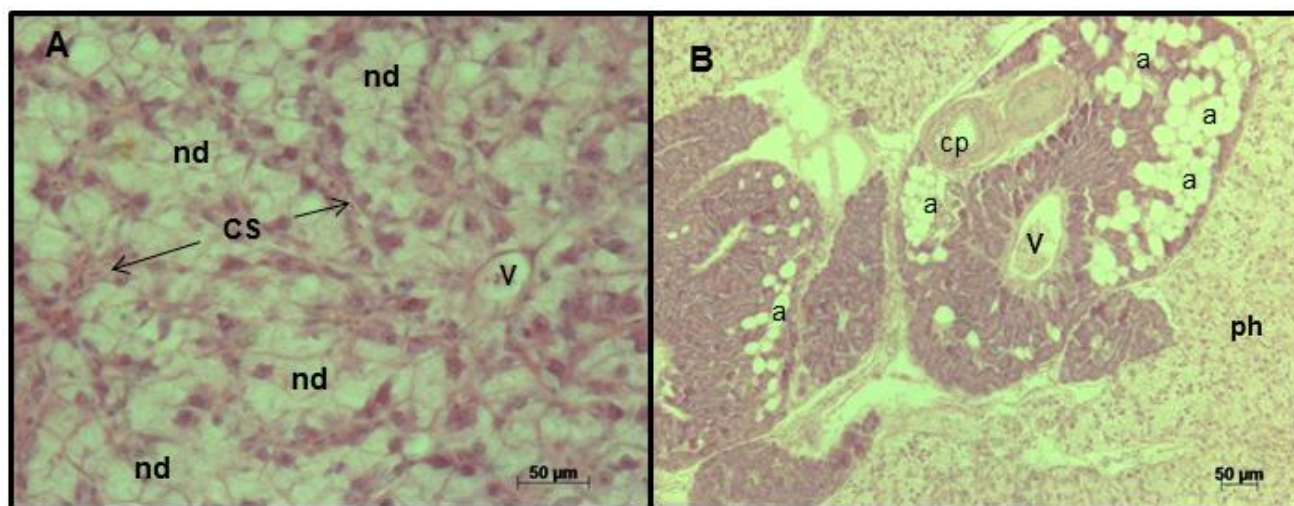


Figura 7. Cortes histológicos de hepatopáncreas de juveniles de *Totoaba macdonaldi* de tratamiento CPS15; A) Presencia abundante de hepatocitos con macrovesículas y con núcleo desplazado a la periferia (nd), capilares sinusoides congestionados (cs), técnica H-E, 10x; B) Células adiposas entre las células pancreáticas (a), parénquima hepático (ph), conducto pancreático (cp) técnica H-E, 5x.

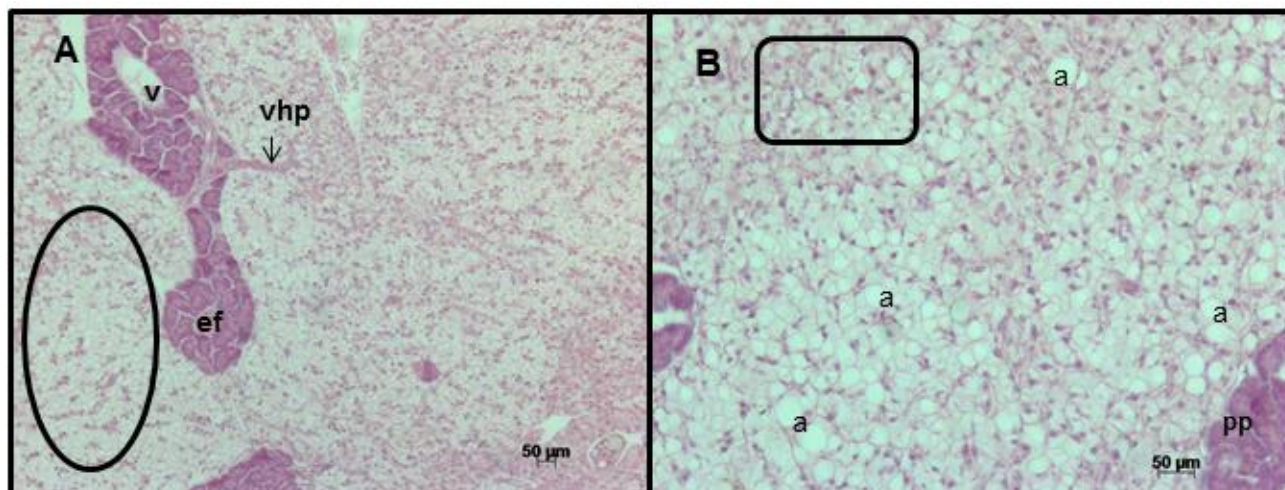


Figura 8. Cortes histológicos de hepatopáncreas de juveniles de *Totoaba macdonaldi* alimentados con la dieta CPS30; A) Presencia abundante de hepatocitos con macrovesículas señalados dentro del círculo, ligera congestión de capilares sinusoides (cs), vena hepatopancreática congestionada (vhp), técnica H-E, 5x; B) Cuadro indican presencia de hepatocitos con citoplasma ligeramente contraído y algunos con núcleos picnóticos, presencia de células adiposas (a), parénquima pancreático (pp) técnica H-E, 10x.

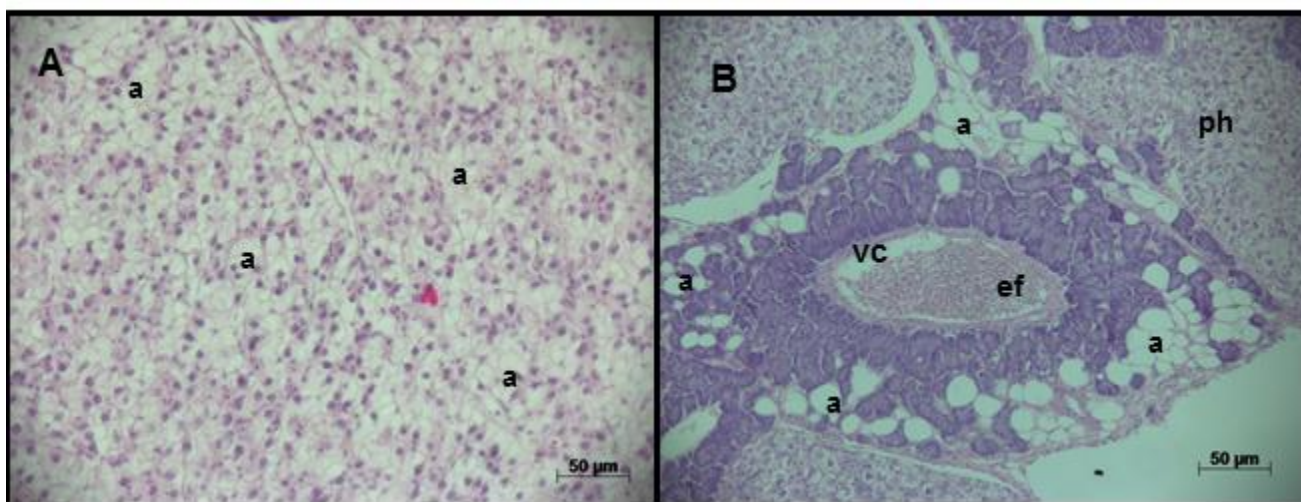


Figura 9. Cortes histológicos de hepatopáncreas de juveniles de *Totoaba macdonaldi* alimentados con dieta CPS45; A) Presencia generalizada de células adiposas en el parénquima hepático, técnica H-E, 10x; B) Presencia de células adiposas (a) entre las células pancreáticas, vena central (vc), técnica H-E, 10x.

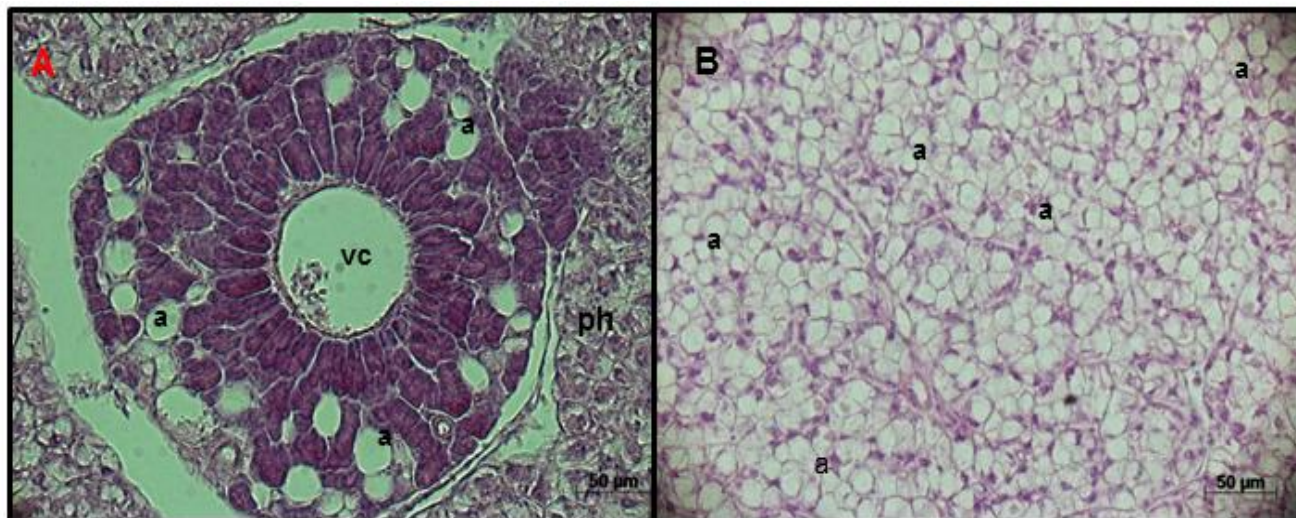


Figura 10. Cortes histológicos de hepatopáncreas de juveniles de *Totoaba macdonaldi* alimentados con dieta CPS60; A) Presencia de células adiposas (a) entre las células pancreáticas, parénquima hepático (ph), vena central (vc), técnica H-E, 20x. B) Dominancia de células adiposas en el parénquima hepático (a), técnica H-E, 10x.

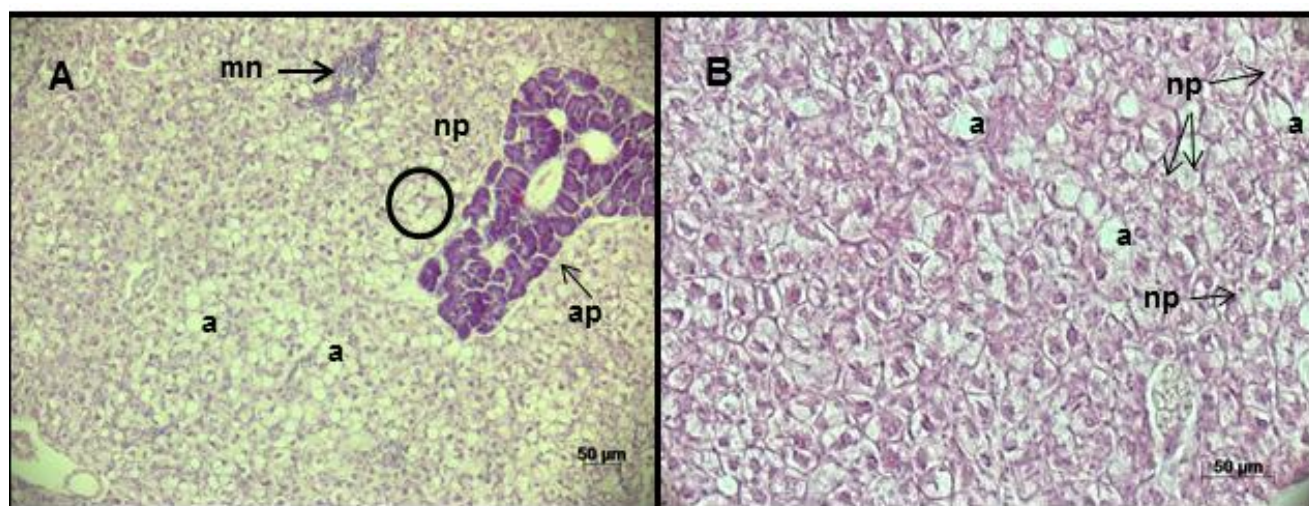


Figura 11. Cortes histológicos de hepatopáncreas de juveniles de *T. macdonaldi* alimentados con dieta CPS75; A) Presencia de mononucleares (mn), adipocitos, a, hepatocitos con núcleo picnótico (np), sobresaliendo la presencia de microvesículas, el círculo indican presencia de hepatocitos con citoplasma ligeramente contraído y algunos con núcleo desplazado, técnica H-E, 10x; B) Presencia de adipocitos (a), hepatocitos con núcleo picnótico (np), técnica H-E, 20x.

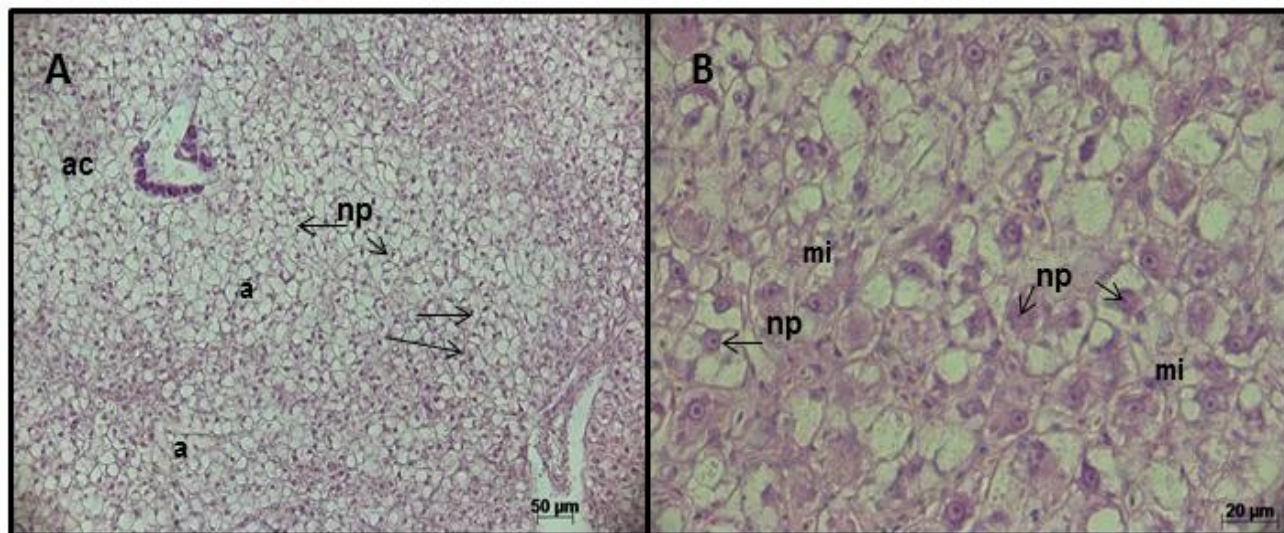


Figura 12. Cortes histológicos de hepatopáncreas de juveniles de *Totoaba macdonaldi* alimentados con la dieta CPS90; A) Reducción de acino pancreático (pp), núcleos picnóticos (np), células adiposas (a), técnica H-E, 10x, B) Hepatocitos con microvesículas, citoplasma ligeramente contraído (mi), y núcleos picnóticos (np), técnica H-E, 20x.

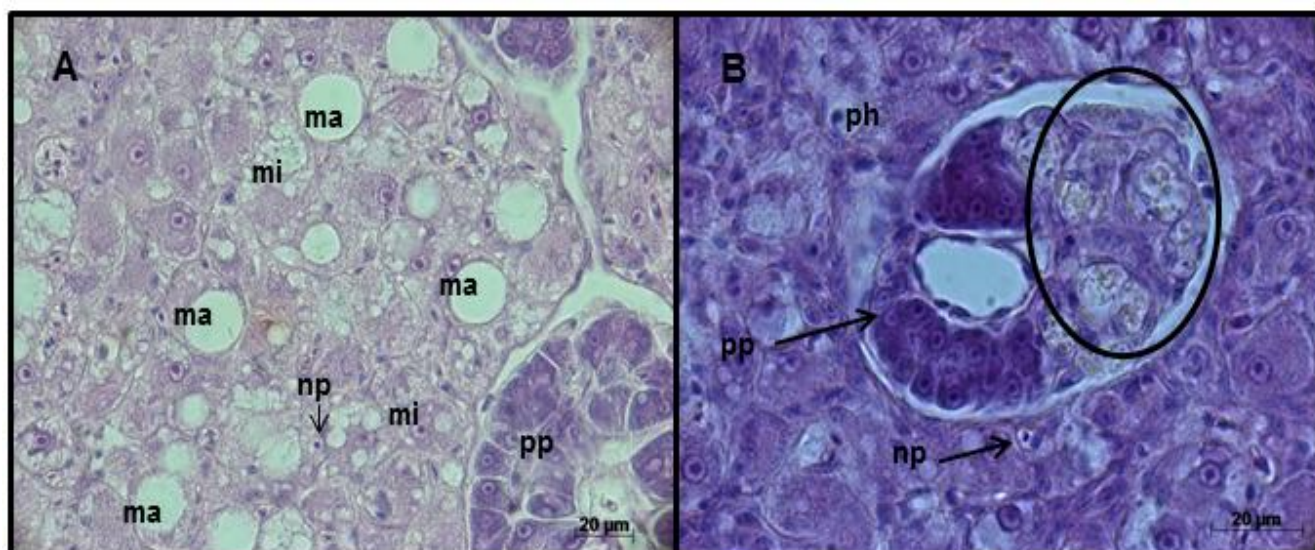


Figura 13. Cortes histológicos de hepatopáncreas de juveniles de *Totoaba macdonaldi* alimentados con la dieta CPS100; A) Se observa la presencia hepatocitos con micro y macrovesículas, (mi) y (ma), núcleos picnóticos (np), parénquima pancreático (pp), técnica H-E, 20x; B) Hepatocitos con presencia de microvesículas, parénquima pancreático (pp), núcleos picnóticos (np), reducción del parénquima con posible necrosis, señalado dentro de círculo, técnica H-E, 40x.

II.9.0. DISCUSIONES

II.9.1. Parámetros de crecimiento y eficiencia alimenticia

De acuerdo a los diferentes parámetros de crecimiento y las diferencias obtenidas por la inclusión de los diferentes niveles de CPS como sustituto de HP, los resultados sugieren que los juveniles *T. macdonaldi* pueden lograr un buen crecimiento hasta con una sustitución de 34.17% de CPS en las dietas. Una respuesta similar se ha observado en salmón del Atlántico *S. salar* (Refstie et al., 2000), cobia *Rachycentron canadum* (Chou et al., 2004), cobia del Atlántico *Gadus morhua* (Hansen et al., 2007; Walker et al., 2010), y lenguado *P. stellatus* (Li et al., 2015). Para estas especies de hábitos alimenticios carnívoros no se ha visto comprometido su desarrollo por inclusiones de CPS menor al 40% en sus dietas. En el presente estudio se logró apreciar un menor desarrollo en los juveniles que fueron alimentados con sustitución mayor a 45% de HP por CPS. Sales et al. (2009), hacen mención que utilizar altos niveles de CPS como sustituto de HP llega a causar efectos negativos en el crecimiento de los peces, sin embargo, al adicionar aminoácidos esenciales como metionina en dietas con altos niveles de CPS, el crecimiento de los peces en cultivo no se verá comprometido. Por su parte la metionina es un aminoácido esencial y tiene un papel importante en la síntesis de proteínas, participa como intermediario en la síntesis de cisteína y funciones fisiológicas del pez (Lie et al., 2009). Se ha estimado que los requerimientos de metionina para peces de manera general pueden estar de 1.8 a 4.0% en la proteína dietaria (Wilson, 2002). En el presente estudio el contenido de metionina osciló de 1.88 a 1.2%, lo que puede indicar que inclusiones mayores a 45% no cubre las demandas de los organismos, por consiguiente la cantidad de metionina fue menor en las dietas CPS60-CPS100 respecto a la DC, lo que se sugiere que dicho

aminoácido fue limitante para los juveniles de *T. macdonaldi* mostrando un menor desarrollo en las dietas con inclusiones mayores a 45% de CPS. Una respuesta similar se presentó en cobia *R. canadum* (Chou et al., 2004) y tambor cuneado *Nibea miichthioides* (Wan et al., 2006), donde los autores mencionan que con sustituciones mayores a 40% la deficiencia de metionina fue la razón por la cual el crecimiento de los peces fue afectado significativamente.

La palatabilidad del alimento que se le proporciona a los organismos en cultivo es un factor importante para atraer al pez y con ello exista una buena ingesta del alimento (Day y Plascencia-González, 2000). En el presente estudio, se sugiere que la palatabilidad con inclusiones de 15 a 45% del CPS no disminuyó la ingesta del alimento, por tal motivo los valores de la TCE, CDA, EA y REP fueron significativamente similares entre la dieta DC. No obstante, inclusiones mayores a 45% de CPS, los organismos mostraron una disminución en el consumo del alimento conforme se incorporó un mayor nivel de proteína vegetal, afectando de manera directa los valores de CDA, EA y PER. Una respuesta similar se observó en juveniles de cobia alimentados con dietas elaboradas a base de CPS sin la inclusión de atractantes. Los autores reportan un menor consumo de alimento por la poca palatabilidad de las dietas y por consecuencia un menor crecimiento (Trushenski et al., 2011). Los resultados del presente estudio, se observó un bajo consumo del alimento con la sustitución de porcentajes mayores a 45% de la proteína de origen vegetal. De acuerdo a Kader et al. (2010), la respuesta anterior se debe a la carencia de ciertos nutrientes como los ácidos grasos volátiles, aminoácidos libres, entre otros, que hicieron que el alimento fuera menos apetecible para los peces, lo cual puede llegar a afectar el desempeño de

los peces. En este sentido, Chong et al. (2003) y Hansen et al. (2007) comentan que existe una disminución en la palatabilidad de las dietas que están compuestas por altas inclusiones de proteína vegetal, lo que conlleva a un menor consumo de alimento y por consecuencia a una disminución en el crecimiento de los organismos, tal como se observó en el presente estudio con las dietas CPS60-CPS100.

II.9.2. Composición proximal

La inclusión del CPS influyó de manera significativa en la composición de los diferentes tejidos de los juveniles de *T. macdonaldi*. En especies como discus *S. aequifasciata* (Chong et al., 2003), lenguado japonés *Paralichthys olivaceus* (Deng et al., 2006), tambor cuneado *N. miichthioides* (Wang et al., 2006) dorada negra *Acanthopagrus schlegelii* (Ngandzali et al., 2011) reportan que el contenido de lípidos corporales fue disminuyendo conforme aumentaba el nivel de inclusión de CPS en la dieta, esto influenciado por la baja capacidad de digerir la proteína y lípidos de la dieta, debido a la presencia de FANs en las dietas. No obstante, una respuesta diferente se observó en el presente estudio, en particular en los resultados de la composición proximal de pez entero y músculo, ya que se presentó un aumento en el depósito de lípidos conforme se fue incorporando un mayor nivel de CPS en la dieta. Una respuesta similar se presentó en juveniles de lobina Europea *D. labrax*, donde se observó un ligero incremento de grasa en pez entero, los autores sugieren que se incrementó la lipogénesis en respuesta al incremento de la sustitución de la HP por CPS (Kaushik et al., 2004). Considerando los resultados del presente estudio aun no se tiene clara la respuesta del incremento de la síntesis *de novo* de lípidos en tejido muscular en las dietas con altos porcentajes de CPS, ya que a medida que se incrementa la

concentración de CPS, la disponibilidad de nutrientes es menor y con ello menor aporte para formación de lípidos, por lo que quizá esté relacionado con la producción de NADPH como demanda por una menor ingesta de nutrientes, esto con el propósito de reparar células dañadas por una posible situación de estrés metabólica (Pérez-Jiménez, 2008).

En otro orden de ideas, el hígado es un órgano que puede reflejar el efecto nutricional de las dietas experimentales en los organismos en cultivo, debido a que es donde se presenta una mayor homeostasis metabólica y se almacenan grandes reservas energéticas (Salway, 2004). Ngandzali et al. (2011), reportaron que el contenido de lípidos en hígado no mostró diferencias significativas al alimentar juveniles de besugo negro *Acanthopagrus schlegelii* con niveles de hasta 32% de CPS, sin embargo, el contenido de proteína se vio disminuido por el incremento de la CPS en la dieta. Resultados similares se obtuvieron en el presente estudio donde no se presentaron diferencias en el contenido de proteína lípidos y glucógeno en los hígados de los juveniles de *T. macdonaldi* alimentados con las dietas hasta inclusiones de 45% de CPS, por lo que en éstas dietas se sugiere que se indujo a la síntesis *de novo* de glucógeno y lípidos a partir de los aminoácidos y lípidos disponibles en el alimento (Bañuelos-Vargas et al., 2014), por lo contrario, una mayor concentración de CPS en la dieta de totoaba mostró un menor depósito energético, lo que pudiese estar relacionado con una menor digestibilidad, y con ello una menor disponibilidad de los nutrientes para el depósito energético. Respuesta similar se observó en juveniles de jurel *Seriola quinqueradiata* donde el contenido de lípidos en el hígado fue menor en los organismos alimentados con altos niveles de proteína de soya, ésta respuesta está

influenciada por la baja digestión y absorción de los nutrientes que trae consigo la alta incorporación de la proteína vegetal, provocando una menor acumulación de lípidos en el tejido hepático, por lo que sin duda en gran medida los lípidos absorbidos fueron aprovechados para cubrir sus requerimientos energéticos (Nguyen et al., 2011). En el presente estudio podrían indicarse que los juveniles de *T. macdonaldi* alimentados con las dietas CPS60-CPS100 promovieron el catabolismo de lípidos y glucógeno hepáticos en lugar de síntesis *de novo*, desfavoreciendo el depósito de éstas reservas energéticas en el hígado tal como se observa en la histología del hepatopáncreas (ver más adelante histología del hepatopáncreas).

II.9.3. Digestibilidad *In Vitro*

El destino de la proteína después de haber sido ingerida depende en gran medida de su hidrólisis, lo que a su vez es cuantificado a través de la digestibilidad del ingrediente (Ali et al., 2009); en este aspecto, la digestibilidad, es un indicador importante de la calidad de los ingredientes o las dietas, por lo que la biodisponibilidad de los nutrientes presentes en las dietas formuladas es un factor importante (Martínez-Montaña y Lazo, 2012), además de ser una herramienta base para conocer los requerimientos nutricionales para el organismo y aplicar dicha información para producir dietas costo-beneficio de alta calidad y poder elegir ingredientes con alto valor nutritivo (Hajen et al., 1993; Tibbetts et al., 2007). De ésta manera, la digestibilidad *In vitro* ha sido propuesta para generar estimaciones de la digestibilidad de los ingredientes de las dietas (Tibbetts et al., 2011), donde se evalúa el grado de ruptura de los enlaces peptídicos por la acción de diferentes proteasas presentes en el organismo (Dimes y Haard, 1994; Alarcón et al., 2002). El desarrollo de métodos *in*

vitro para peces marinos ha sido más fácil, reproducible y confiable (Moyano et al., 2001; Hamdan et al., 2009). No obstante, las estimaciones de la digestibilidad *In vitro* se han inclinado a realizar evaluaciones de proteínas alternativas tanto de origen animal como de origen vegetal (Dimes y Haard, 1994), y no propiamente en dietas completas, las cuales están compuestas de varios macro y micro nutrientes. Es así que nuestro estudio se enfoca en evaluar la digestibilidad *In vitro* de diversas dietas como una herramienta viable y poder determinar la respuesta de hidrólisis por parte de proteasas digestivas presentes en el sistema digestivo de *T. macdonaldi* hacia las distintas dietas que contienen diferentes niveles de CPS. De esta forma, el grado de hidrólisis (GH) mostró una relación directa con la incorporación del CPS, donde el valor más alto de GH (ácida y alcalina) se presentó en las dietas DC-CPS30 y posteriormente conforme al aumento de la inclusión del CPS mostró una disminución progresiva en la hidrólisis de la proteína. En la búsqueda de fuentes de proteínas alternativas se observó en juveniles de dorada *S. aurata* una disminución en el GH con fuentes proteínicas de origen vegetal, como la proteína de soya, en comparación con las proteínas de origen animal, los autores sugieren que esta respuesta posiblemente se debe a la presencia de altos contenidos de fibras indigestibles y a la presencia de FANs (inhibidores de proteasas) que están en las proteínas de origen vegetal (Alarcón et al., 2002). Una respuesta similar se presentó en juveniles de pejelagarto *Atractosteus tropicus*, donde al evaluar diferentes proteínas alternativas de la HP, tanto de origen animal y vegetal, se obtuvieron los valores más bajos de GH para los fuentes de origen vegetal y particularmente de los derivados de la soya, los autores asocian ésta respuesta a la presencia de los inhibidores de tripsina y quimotripsina que afectan

de manera importante a la digestibilidad de las fuentes alternativas de la harina de pescado (Frías-Quintana et al., 2010). En este sentido, una disminución paulatina en digestibilidad de las dietas en el presente estudio aparentemente está asociado a la presencia de los FANs (inhibidores de proteasas principalmente), que están presentes en muchas proteína de origen vegetal (Allan et al., 2000, Alarcón et al., 2002; Tibbetts et al., 2011). Otro aspecto relacionado con la baja digestibilidad, es la presencia de fitatos, que son difíciles de eliminar, por lo que el CPS aparentemente contiene altos niveles de estos compuestos químicos, los cuales quelan iones di y trivalentes de minerales como Ca^{+2} , Mg^{+2} , Zn^{+2} , Cu^{+2} y Fe que resultan ser no absorbidos por los organismos, además de formar complejos proteína/fitatos que hacen menos digestible la proteína ingerida (Richardson et al., 1985, Storebakken et al., 2000; Francis et al., 2001; Deak y Johnson, 2007) y estos mismos llegan a producir una inestabilidad de las proteasas digestivas como la tripsina (Cadwell, 1992) debido a que los fitatos llegan a inhibir a la secreción de proteasas digestivas (Francis et al., 2001). Considerando lo anterior, se debe tomar en cuenta que una baja digestibilidad de la proteína dietaria es ocasionada por deficiencias en la conformación del complejo enzima-sustrato, ya sea por medio de inhibiciones irreversibles o reversibles de proteasas gástricas y pancreáticas, y en consecuencia, la absorción de péptidos de cadena corta y aminoácidos se ve afectada de forma directa (Gertler et al., 1967). Respecto a lo anterior, puede ser una explicación a la respuesta de los juveniles del presente estudio, al observar un bajo valor del GH, y como resultado un menor porcentaje de digestibilidad de las dietas con inclusiones mayores a 45% de CSP, mientras que inclusiones entre 15 a 45% los valores de GH fueron similares a los obtenidos para la

DC, lo que es atribuido a la baja concentración de FANs, lo que permitió que *T. macdonaldi* aceptara sin problemas ese nivel de sustitución. No obstante, altos niveles de CPS en la dieta de *T. macdonaldi*, afectan no solo el GH, sino el crecimiento, ya que el organismo no está preparado fisiológicamente para hidrolizar esta proteína vegetal, de tal manera que se ve limitado en su capacidad de absorber y por ende en su requerimiento energético (Hamdan et al., 2009). En este sentido, Dimes et al. (1994), comentan que existe una relación directa entre la digestibilidad de los ingredientes y la tasa de crecimiento, por lo que sin duda, al relacionar el crecimiento de *T. macdonaldi* con respecto a la digestibilidad de las dietas, se aprecia una mejor respuesta en los parámetros de crecimiento al incluir entre 15 y 45% de CPS en la dieta. Por consiguiente, al hacer la sustitución de la HP por ingredientes vegetales, especialmente leguminosas como la soya y sus derivados, debe tomarse en cuenta la digestibilidad de los nutrientes y la capacidad fisiológica digestiva del organismos, logrando así formular dietas más adecuadas para su máximo aprovechamiento y optimizar los costos en los insumos de alimento bajo condiciones de cultivo.

II.9.4. Actividad enzimática

La respuesta de los organismos a los diferentes nutrientes depende en gran medida de la digestibilidad de los mismos y la capacidad fisiológica de la especie (Moyano et al., 1991). En este aspecto, Lundstedt et al. (2004) hacen mención que los cambios en los alimentos formulados tales como el tipo, fuente y cantidad de nutriente pueden llegar a alterar el perfil de las enzimas digestivas o la concentración de las mismas, y en consecuencia el aprovechamiento de los nutrientes, de manera que la

habilidad de los peces para hidrolizar los alimentos ingeridos depende también de la actividad de las enzimas digestivas presentes a lo largo del tracto digestivo, así como de la calidad y tipo de ingrediente con el que se fabrica el alimento (Ali et al., 2009). Por su parte, Tramati et al. (2005) argumentan que es fundamental relacionar los procesos digestivos de la especie con la composición del alimento que se le proporciona al organismo, ya que sin duda, responderán las enzimas digestivas conforme a su capacidad de hidrolizar el alimento que se le proporcione.

Considerando lo anterior, una de las proteasas digestivas más importantes es la tripsina, la cual es una enzima digestiva que presenta una gran sensibilidad a responder cuando hay presencia de alimento en el tracto digestivo, así como cuando existe presencia de alimento poco digestible o con presencia de factores que pueden afectar su actividad (Champhai et al., 2016; Klomklao et al., 2016). Aunado a ello, la actividad de esta enzima digestiva está muy relacionada con la digestibilidad de las dietas y la presencia de inhibidores de proteasas digestivas en los ingredientes, especialmente los de origen vegetal (Krogdahl et al., 1994; Rungruangsak-Torrissen y Male, 2000). De esta manera, el CPS utilizado en este estudio, aunque es un derivado de la soya con bajos niveles de FANs y de inhibidores de tripsina (Kaushik et al., 1995), no se descarta la posibilidad que ésta proteína de origen vegetal presente inhibidores de proteasas digestivas que afectan la hidrólisis de la proteína particularmente para un pez carnívoro como *T. macdonaldi*. En este sentido, en el presente estudio se observó que la tripsina, generalmente presente en la zona anterior del intestino, mostró una importante disminución en su nivel de actividad por la incorporación gradual de CSP, lo que se debe en gran medida a la presencia de los inhibidores de tripsina presente en la

proteína vegetal, que afectaron significativamente la actividad de esta proteasa digestiva. Una respuesta similar se presentó en juveniles de salmón del Atlántico (Kroghdal et al., 2003), al medir la actividad tipo tripsina en diferentes zonas del intestino, donde se encontró que la actividad fue disminuyendo a lo largo del intestino con dietas que contenía 24% y 30% de HS; esta respuesta negativa, está asociada a una elevada presencia de inhibidores de tripsina; asimismo, se detectó en la zona distal del intestino que el nivel de actividad se incrementó, como respuesta a un proceso inflamatorio en el intestino que induce a una elevada actividad proteolítica (Lilleeng et al., 2007). No obstante, la respuesta fisiológica depende de la especie, e inclusive llega a ser contradictoria como se detectó en juveniles de lenguado *Platichthys stellatus*, donde se mostró un incremento en la actividad de tripsina al incorporar 40% de CPS en dietas, lo que se atribuye a un aumento de la síntesis de tripsinógeno en el páncreas, mejorando así la hidrólisis del alimento; sin embargo, con una sustitución de 100% de CPS en la dieta, la actividad de tripsina disminuyó de manera significativa, ocasionada por el incremento de FANs, lo que provocó una disminución en la síntesis de zimógenos y en consecuencia una baja hidrólisis de proteínas del alimento (Li et al., 2015). En el presente estudio se aprecia que la actividad de esta enzima fue significativamente afectada por la posible presencia de inhibidores de tripsina, disminuyendo su actividad, lo que es similar a lo observado en lenguado del Atlántico, donde se detectó el daño en el parénquima pancreático, lo que indujo a una menor síntesis de zimógenos de tripsina y la inhibición de la proteasa digestiva, lo que afectó de manera significativa la hidrólisis de las proteínas, lo que pudo corroborarse por

cambios adversos en los acinos pancreáticos en las células del hepatopáncreas de *T. macdonaldi*.

Por otro lado, la quimotripsina es considerada como la segunda proteasa intestinal importante en la digestión de las proteínas ya que permite entender el desarrollo productivo y la eficiencia alimenticia de las especies de peces en respuesta a la incorporación de proteínas de origen vegetal. Los resultados del nivel de actividad de quimotripsina del presente estudio, mostraron una mejor respuesta con inclusiones entre 15 y 45% de CPS en la dieta, semejante a la DC. No obstante, se presentó una respuesta diferente en juveniles de trucha *O. mikkys* donde la actividad de quimotripsina se vio inhibida de manera importante al incluir proteína vegetal (harina de colza y gluten de trigo) como una respuesta directa a la presencia de FANs (inhibidores de quimotripsina) (Santigosa et al., 2008). De esta manera, la actividad de quimotripsina en *T. macdonaldi*, muestra un mecanismo compensatorio al generar un posible incremento en la síntesis de zimógenos y mantener los niveles de actividad, como una respuesta al bajo nivel de actividad de tripsina, la cual fue inhibida, por lo que la quimotripsina contribuyó de cierta manera en mantener la hidrólisis de la proteína de la dieta, por lo que éstas diferencias en los niveles de actividad enzimática digestiva, aparentemente están asociadas con el mecanismo de regulación de secreción/producción de tripsina y quimotripsina (Applebaum y Holt, 2003). Sin embargo, esta capacidad compensatoria de la quimotripsina, también se ve afectada con la presencia de FANs, especialmente con inclusiones mayores a 45% del CPS, aunado a un posible daño en el páncreas de *T. macdonaldi*, induciendo a una menor síntesis de las proteasas digestivas y con ello una menor actividad proteolítica.

Las enzimas digestivas como la fosfatasa alcalina y leucina aminopeptidasa actúan en el borde de cepillo intestinal, además de estar involucradas en la digestión, absorción y transporte de nutrientes (esto solo para fosfatasa alcalina), también están relacionadas con la integridad de las microvellosidades de los pliegues intestinales (mucosa intestinal) (Wahnon et al., 1992; Silva et al., 2010), por lo que al ser afectadas por el tipo de ingrediente en la dieta podrían dar señal del estado nutricional y salud de los peces (Urán et al., 2009). En el presente estudio la actividad de fosfatasa alcalina y leucina aminopeptidasa, respondieron de manera positiva con inclusiones entre 30 y 45% de CPS, esto podría atribuirse a que los juveniles de *T. macdonaldi* tuvieron la capacidad de hidrolizar los péptidos previamente hidrolizados por las endopeptidasas (principalmente quimotripsina), para su absorción, lo cual se ve reflejado de manera directa en el crecimiento y desempeño de los juveniles. Sin embargo, Tibaldi et al. (2006), reportan en juveniles de lobina Europea *D. labrax* que la actividad de leucina aminopeptidasa no se afectó al incluir altas concentraciones de CPS, no obstante, fosfatasa alcalina si presentó una disminución en su actividad con inclusiones arriba de 45%, observándose un daño en los enterocitos. Una respuesta similar se presentó, en juveniles dorada *S. aurata*, donde no se observaron diferencias en los niveles de actividad de leucina aminopeptidasa, aunque si se detectó una baja actividad de fosfatasa alcalina al incluir 20% de harinas vegetales (colza y lupino) (Silva et al., 2010), ya que sin duda el incluir este tipo de ingredientes alternativos pueden afectar la actividad de las enzimas digestivas por la presencia de una gran cantidad de FANs (inhibidores de proteasas digestivas, fitatos, tanino) (Francis et al., 2001). Por lo tanto, la inclusión de ingredientes vegetales alternativos a la HP en las dietas de peces

carnívoros puede afectar la actividad de las enzimas digestivas localizadas en la zona apical de los enterocitos y la respuesta de dichas enzimas puede ser considerada como una herramienta fundamental para valorar la susceptibilidad y tolerancia de la especie a la presencia de FANs, que pueden estar presentes en los derivados de las leguminosas (Tibaldi et al., 2006). En este sentido, los resultados del presente estudio sugieren que la capacidad fisiológica de *T. macdonaldi* le permite tolerar entre 15 y 45% de sustitución, aunque inclusiones mayores compromete la funcionalidad de las proteasas digestivas, efecto observado en los organismos que se alimentaron con las dietas CPS60-CPS100 ocasionando un descenso significativo en el nivel de actividad de la fosfatasa alcalina y la leucina aminopeptidasa, lo que podría deberse a un cambio en la integridad de las vellosidades intestinales, y en consecuencia en el transporte de nutrientes hacia el interior de los enterocitos (Álvarez-González et al., 2008), además podría ser señal de posibles alteraciones en la mucosa intestinal a nivel celular (Bakke-McKellep et al., 2000), tal como se ha observado en juveniles de trucha, donde al incorporar arriba de 50% de proteína de soya se observó pérdida en la integridad en la mucosa intestinal por la presencia de vacuolas y una severa inflamación en la submucosa intestinal, obstruyendo la absorción de nutrientes (Burrells et al., 1999). De ésta manera, la mala absorción de los nutrientes por los juveniles de *T. macdonaldi*, repercutió posiblemente en una menor síntesis y actividad de las proteasas digestivas, y por consiguiente un efecto adverso en el desarrollo productivo, tal como se ha reportado en salmón del Atlántico por la incorporación de CPS en sus dietas (Kokou et al., 2015). Algunos autores mencionan que el efecto adverso o negativo a nivel celular depende en gran medida al tipo y nivel de inclusión de la proteína vegetal, así como del

proceso de fabricación del ingrediente para la eliminación de FANs, por lo que el lograr desarrollar alimentos con mayores contenidos de proteínas vegetales, dependerá directamente de la especie, su capacidad fisiológica y los hábitos alimenticios (Francis et al., 2001; Barrows et al., 2007; Watson et al., 2014).

Con base en lo reportado en este estudio, es de suma relevancia considerar elaborar dietas acorde a los hábitos alimenticios y fisiología digestiva de la especie, ya que esto va a permitir una mayor hidrólisis por parte de las enzimas digestivas y una mejor absorción de los nutrientes (Zambonino-Infante y Cahu, 2007), y con ello incrementar el aprovechamientos de los nutrientes para poder incidir en los costos que el alimento representa durante su cultivo. Para el caso de la totoaba, se continúa realizando estudios nutricionales enfocados a la actividad y expresión de enzimas digestivas, al utilizar ingredientes alternativos a la proteína de pescado, con la finalidad de lograr elaborar dietas con sustituciones idóneas a su fisiología digestiva, y con ello, elaborar alimentos económicamente rentables y ambientalmente sostenibles para la acuacultura de la especie.

II.9. 5. Metabolismo intermediario

De manera general los peces tienen una capacidad de adaptarse de acuerdo a los macronutrientes que se les proporcione, y su metabolismo intermediario puede ser buen indicador de la condición nutricional y del desarrollo productivo en el cultivo (Meton et al., 1999, Pérez-Jiménez et al., 2009; Bañuelos-Vargas et al., 2014). No obstante, en respuesta a los macronutrientes ingeridos y a la adaptación metabólica, se

tiende a aumentar o disminuir la actividad de las rutas del metabolismo intermediario, particularmente en el hígado (Morales et al., 2004).

Las enzimas involucradas en el catabolismo de aminoácidos (ALAT y ASAT) juegan un papel importante en la obtención de energía (Pereira et al., 1995). El incremento de ALAT en el hígado después de haber ingerido dietas con alto nivel proteínico, denota el uso eficiente de los aminoácidos presentes en las dietas aprovechándolos para su crecimiento o como sustrato para la gluconeogénesis y lipogénesis (Meton et al., 1999). Por su parte GDH también es una enzima implicada en la degradación de aminoácidos y su actividad está influenciada por la disponibilidad de estos, y una alta actividad de la GDH suele estar relacionado con una de posible necrosis hepática (Salomón y Salomón, 2003).

En lo que se refiere a los resultados del presente estudio, el nivel de actividad de las enzimas ASAT y GDH, no se vieron afectadas de manera significativa por el nivel de inclusión de CPS en las dietas de los juveniles de *T. macdonaldi*, sin embargo, ALAT mostró una mejor actividad en las dietas DC-SP45 con respecto a las dietas con una mayor inclusión de CPS (a partir de 60%), lo que podría estar relacionado directamente con la menor ingesta de alimento aunado a una disminución de la proteína disponible para los organismos conforme se aumentó el nivel del CPS, tal como se observó en otros parámetros, donde la incorporación mayor a 45% afectó la digestibilidad, por tanto hubo una menor digestión y absorción de aminoácidos, lo que implica un menor aporte de piruvato para ser transformado en Acetil-CoA y participar en el ciclo de Krebs para obtención de energía, afectando el desarrollo de los juveniles de *T. macdonaldi*. Una respuesta similar se observó en un trabajo previo realizado con

totoaba al incorporar niveles altos de CPS sin taurina, donde se observó que el nivel de las actividades de ALAT, ASAT y GDH se vieron afectadas significativamente, los autores sugieren que ésta respuesta se presentó por una baja disponibilidad de aminoácidos presentes en la dieta por efecto de los altos niveles de CPS (Bañuelos-Vargas et al., 2014). De la misma forma en juveniles de dorada *S. aurata*, también observaron cambios en la actividad de ASAT, ALAT y GDH por la deficiencia y disponibilidad de aminoácidos en las dietas con mayor inclusión de proteína de soya, afectando de manera importante al metabolismo de la especie (Gómez-Requeni et al., 2003). En éste sentido, se ha visto que las enzimas que participan en el catabolismo de aminoácidos (ASAT, ALAT y GDH), están relacionadas a un desbalance del perfil de aminoácidos en las dietas de los organismos (Peres y Oliva-Teles, 2006, 2007). Por lo que en el presente estudio, la respuesta de un bajo nivel de actividad de ALAT en las dietas con inclusiones mayores a 45% de CPS quizá esté relacionado con la baja disponibilidad de aminoácidos. En este sentido, la disminución de ALAT tiende a ser una señal de una deficiencia de proteína digerida, ya que esta enzima es sensible al estado nutricional en peces como lubina Europea *D. labrax*, donde la ALAT fue señalada como indicador del estatus nutricional de los organismos por deficiencia de proteína (Viegas et al., 2014). Respecto a los resultados del presente estudio, indican que inclusiones mayores a 45% de CPS mostraron un efecto significativo en el catabolismo de aminoácidos lo que puede afectar la disminución de aporte de energía para los organismos.

Respecto a las enzimas que participan en la glicólisis (HK y GK), son enzimas claves con el metabolismo de carbohidratos tanto en organismos terrestres como en los

peces (Moon y Foster, 1995). En el presente estudio se logró observar que el nivel de actividad de ambas enzimas fue más alta en los juveniles de *T. macdonaldi* alimentados con DC-CPS45 con respecto al resto de las dietas a las cuales se les incorporó una mayor cantidad de CPS. Este efecto posiblemente se deba a la disponibilidad de carbohidratos en la dieta, debido a que ésta fuente de energía alternativa tiene una relación directa con la respuesta de la actividad de las enzimas de la glucólisis (HK y GK) (Enes et al., 2009). Se ha descrito, que la actividad de la GK tiende a ser más alta ante la incorporación de carbohidratos disponibles en la dieta y la actividad de HK puede ser extremadamente baja o no presentar cambios (Enes et al., 2008). No obstante, en el presente estudio se logró apreciar que el comportamiento de ambas enzimas fue muy similar, ya que los niveles más altos de actividad se presentaron en las dietas DC-CPS45, lo que puede sugerir un máximo de 45% de sustitución de harina de pescado por CPS, los organismos tuvieron la capacidad de fosforilar glucosa, similar a los de la DC. Por otro lado, se observó también en el presente estudio que con inclusiones mayores de CPS, el nivel de actividad de HK y GK fue disminuyendo paulatinamente, quizá influenciado por una baja digestibilidad de las dietas y por consecuencia una menor disponibilidad de carbohidratos presentes en las dietas, lo que sugiere una menor actividad para fosforilar glucosa a glucosa-6-fosfato para suministrar a las distintas rutas (formación de ATP, glucógeno o contribuir en la vía de pentosa fosfato). Esta misma respuesta se presentó en un estudio previo con la misma especie (juveniles de *T. macdonaldi*), donde al incluir CPS en dietas de los juveniles, disminuyó significativamente el nivel de actividad de ambas enzimas (HK y GK), sugiriendo que la proteína vegetal indujo a cambios en el metabolismo de

carbohidratos (Bañuelos-Vargas et al., 2014). Nuestros resultados sugieren que elevadas inclusiones de CSP puede afectar la actividad de las enzimas que participan en la glicólisis (HK y GK) y quizá generar un menor aporte de glucosa fosforilada, lo que contribuye a un menor aporte de energía (ATP). No obstante, se requieren continuar estudiando para conocer el comportamiento de éstas enzimas cuando se sustituya parcial y/o total la harina de pescado, y con ello, poder comprender la respuesta de éstas dos enzimas ya que existen comportamientos muy diversos en la respuesta de las enzimas glucogénicas en peces (Capilla et al., 2004) que no se han logrado correlacionar.

La gluconeogénesis es una ruta metabólica importante en la homeostasis de la glucosa, por lo que se ha venido estudiando desde años atrás en distintas especies, especialmente la fructosa-1, 6-bifosfatasa (FBPasa), la cual es una enzima clave en el metabolismo de la glucosa (Nie et al., 2015). En el presente estudio se observó que los juveniles de *T. macdonaldi* presentaron un mayor nivel de actividad en los hígados de los peces alimentados con las dietas DC-CPS45, sugiriendo que en éstas dietas se presentó una mayor disponibilidad de precursores para la gluconeogénesis provenientes principalmente del catabolismo de aminoácidos. Cowey et al. (1981) sugieren que el efecto en la actividad de las enzimas gluconeogénicas puede depender en gran medida de la disponibilidad de los aminoácidos de la dieta, principalmente de alanina y serina, los cuales son utilizadas como precursores de la glucosa para la vía de la gluconeogénesis. Por lo que nuestros resultados sugieren que hasta con sustituciones no mayores a 45% no se afecta el nivel de actividad de la FBPasa, quizá esto se deba a la disponibilidad de carbohidratos, lípidos y sobre todo de proteína

(aminoácidos) como precursores de la gluconeogénesis. No obstante, también en el presente estudio se presentó una disminución significativa en el nivel de actividad de la FBPasa a partir de una inclusión mayor a 45% de CPS y esta respuesta quizá está relacionada con la digestibilidad de las dietas, donde se refleja una menor disponibilidad de carbohidratos y proteína, nutrientes que al parecer regulan la respuesta de la enzima gluconeogénica en los peces carnívoros (Suárez et al., 2005). Una respuesta similar se reportó en juveniles de anguila Europea, donde encontraron que la actividad de las enzimas FBPasa disminuyó de manera significativa cuando se alimentó con dietas con bajos niveles de proteína (27%) y altos niveles de carbohidratos (42%), indicando una limitación del metabolismo por una baja disponibilidad de proteína dietaria (Suarez et al., 1995). De la misma forma, en trucha arcoíris *O. mykiss*, la actividad de FBPasa estuvo influenciada por la baja incorporación de proteína en las dietas del organismo, observando un decremento en la actividad de ésta enzima al ser alimentados con bajos niveles de proteína (Kirchner et al., 2003). Por su parte Kumar et al. (2009), encontraron que la actividad de FBPasa fue disminuyendo en los hígados de los juveniles de *Labeo rohita* con la incorporación de bajos niveles de proteína, los autores explican que el decremento de las enzimas gluconeogénicas es debido principalmente a una baja disponibilidad de aminoácidos digestibles. Por consiguiente, podemos sugerir en el presente estudio, el nivel de actividad de FBPasa en los organismos alimentados con las dietas CPS60-CPS100 fue menor con respecto al resto de las dietas, debido a una baja disponibilidad de precursores no glucosídicos (principalmente aminoácidos), para la síntesis *de novo* de glucosa (Moon y Foster, 1995).

Las enzimas málica (EM) y G6PD están involucradas en catalizar la producción de NADPH (Wang et al., 2005), además las EM proveen de NADPH extra-mitocondrial y piruvato que posteriormente será convertido en acetil-CoA para la síntesis *de novo* de ácidos grasos (Likimani y Wilson, 1982). En el presente estudio sólo no se mostraron diferencias significativas en la actividad de EM en respuesta de la inclusión de CPS como alternativa de proteína para los juveniles de *T. macdonaldi*. Una respuesta similar reportó Bañuelos-Vargas et al. (2014) en la actividad de EM al incorporar altos niveles de CPS, indicando que no se presentó un estímulo para la síntesis *de novo* de lípidos en el tejido hepático. No obstante, en el presente estudio aunque no se presentaron diferencias significativas entre los distintos tratamientos, los hígados de los peces alimentados con CPS90 y CPS100 mostraron un nivel de actividad mayor en comparación al resto de los tratamientos y sobre todo con respecto a la DC. Por lo anterior, quizá esto no signifique que en dichas dietas se haya presentado una mayor síntesis *de novo* de lípidos en el tejido hepático, ya que de acuerdo con los proximales de hígados de los juveniles de éstas mismas dietas mostraron un menor depósito de lípidos en tejido hepático y cuerpo entero, por consiguiente podría sugerirse que el ligero incremento de la actividad de las enzimas lipogénicas quizá está relacionado a producir NADPH para labores metabólicas, entre ellas la protección frente al daño oxidativo ocasionado por una menor ingesta de nutrientes y/o daños ocasionados por una situación de estrés (Pérez-Jiménez, 2007). Se ha sugerido que NADPH actúa directamente sobre los radicales libres, reparando el daño ocasionado en las moléculas por medio de la donación de electrones (Kirsch y De Groot, 2001), por lo que en lugar de presentarse una acumulación de reservas energéticas corporales (principalmente en

hígado) se observó un menor depósito. Esta respuesta es congruente con los resultados registrados en el contenido de lípidos en el tejido hepático en juveniles de *T. macdonaldi* alimentados con niveles altos de CPS (inclusión mayores a 45%). No obstante, aunque en el presente estudio no se presentaron diferencias significativas en G6PDH, se observó que el nivel de actividad de EM fue mucho más bajo respecto a G6PDH, esta misma respuesta han sido reportado para lenguado *S. senegalensis* (Dias et al., 2004) y el besugo *Pagellus bogaraveo* (Figueiredo-Silva et al., 2009), en los que se ha encontrado una mayor actividad de G6PDH en comparación con la actividad de EM, produciendo un mayor aporte de NADPH. Algunos autores, mencionan que ésta respuesta quizá se deba a que G6PDH es clave para regulación de la actividad de enzimas antioxidantes (Castro et al., 2012; Pérez-Jiménez et al., 2012). Nuestros resultados sugieren que la respuesta en el nivel de actividad de EM y G6PDH con mayor nivel de soya (niveles superiores a 45% de CPS), no fue para generar depósito de grasa en el tejido hepático, si no para cubrir la demanda de NADPH y con ello contrarrestar el posible estrés oxidativo y los consecuentes daños generados en los juveniles de *T. macdonaldi*. De acuerdo a los resultados de composición proximal y sobre todo de los cortes histológicos, se observó que la lipogénesis se presentó en mayor proporción en los juveniles de las dietas DC a CPS45, a partir de esos niveles el depósito energético fue disminuyendo y al mismo tiempo se fueron presentando anomalías en el tejido hepático (ver más adelante análisis histológico), lo que podría sugerirse que la actividad de EM y G6PDH con éstas dietas fue para contrarrestar el estrés hepático de los juveniles de *T. macdonaldi*.

II.9.6. Hematología y química sanguínea

Los parámetros hematológicos son útiles para monitorear cambios fisiológicos y patológicos en peces, por lo que situaciones de malnutrición y deficiencia de nutrientes llegan a afectar los valores de hematocrito (Rikeiro et al., 2015). En este sentido hacer evaluaciones de ésta índole nos puede proporcionar información más concreta del estado nutricional de los peces alimentados con ingredientes alternativos. En el presente estudio se observó una mejor respuesta de los parámetros de hematología de las dietas con inclusiones de 15 a 45% de CPS. Sin embargo, con inclusiones mayores se presentó una disminución en el conteo de glóbulos rojos, hemoglobina y hematocrito en los juveniles de *T. macdonaldi*. Una respuesta similar se presentó en juveniles de esturión *Huso huso*, donde observaron una disminución en el porcentaje de hematocrito y hemoglobina en la sangre al ser alimentados con altos niveles de proteína vegetal, por lo que los peces mostraron inicios de una posible anemia por la deficiencia en la disponibilidad de nutrientes (Jahanbakhshi et al., 2012). Así mismo, los resultados del presente estudio indican un efecto por la inclusión del CPS, ya que se observó un decremento en el conteo de glóbulos rojos, hemoglobina y hematocrito, quizá ésta respuesta esté influenciada a la presencia de FANs (principalmente por fitatos), que son considerados como principales causantes de la limitación al aprovechamiento del CPS presente en alimentos para peces (Mendoza et al., 1998; Storebakken et al., 2000; Krogdahl et al., 2010). En este contexto, los fítatos son agentes quelantes, que hace menos disponibles la absorción de por ejemplo los minerales como hierro, zinc y calcio (Storebakken et al., 2000). De manera que los resultados en el presente estudio indican que posiblemente la disminución de

hemoglobina puede ser señal de inicios de anemia, la cual es causada por la deficiencia de hierro (Wick et al., 2011) influenciado por altos niveles de CPS (mayores a 45%), por lo que esto también se refleja en la disminución de MCV y MCHC, produciendo como consecuencia, una posible anemia hipocrómica y cambios en el metabolismo hepático en los juveniles de totoaba como se observó en la respuesta de metabolismo intermediario. No obstante, los peces alimentados con niveles menores a 45% de proteína alternativa en su alimentación, muestran altos valores hematología, lo cual podría ser el resultado de una excelente liberación de eritrocitos hacia la sangre (Svodova et al., 1994), esto en respuesta a un adecuado contenido nutricional de las dietas proporcionadas (CPS15 a CPS45), indicando así una buena absorción y metabolismo de los nutrientes presentes en las dietas. Por otro lado, la respuesta de los organismos al ser alimentados con las dietas altas en CPS disminuyeron el hematocrito, señal de posible inicios de anemia causada por una deficiencia nutricional de los peces (Ali y Mohamed, 2010), por lo que una mal nutrición aparente se presentó en los juveniles que fueron alimentados con dietas a las que se les incorporó niveles arriba 45% de CPS. Una respuesta similar fue reportada por López et al. (2015), también en juveniles de *T. macdonaldi* al ser alimentado con 60% de CSP sin taurina, los autores sugieren que ésta respuesta pudo deberse por la presencia de FANs (inhibidores de proteasa digestivas, saponinas y lectinas) que están presentes en CPS, las cuales llegan a generar cambios en los enterocitos que están presentes en la mucosa dando lugar a la enteritis (Krogdahl et al., 2003; Insuden et al., 2008; Bonaldo et al., 2008), y con ello generar una disminución en la hidrólisis y absorción de los nutrientes presentes en las dietas. Por lo que en los juveniles de totoaba el utilizar

porcentajes menores a 45% de CPS es lo idóneo para los peces, ya que a estos niveles no se ve afectada la absorción de nutrientes, ni presentan señales de posible anemia causada por una atrofia intestinal obstaculizando la absorción de los nutrientes presentes en la dieta, mostrando así señales de un buen estado nutricional (López et al., 2015).

Química sanguínea

Los parámetros de química sanguínea, son comúnmente utilizados como herramienta de bio-monitoreo, ya que se puede visualizar de manera rápida cambios patofisiológicos crónicos o agudos por causas nutricionales o por enfermedades (Adams et al., 1996; Burtis et al., 2008). Hrubec et al. (2001) reportan que los cambios en los parámetros bioquímicos en la sangre están influenciados por factores como la condición de vida y edad del pez. Por lo que un decremento en la cantidad de albumina y proteína total en los organismos podría ser una respuesta de una anormalidad en las funciones del hígado o del riñón (Akrami et al., 2003). Por otro lado Rehulka et al. (2005) y Atencio-García et al. (2007), reportan que la concentración de proteína plasmática es altamente relacionada con el estado nutricional y la calidad del alimento, así como también podría ser un reflejo del metabolismo y desarrollo productivo del organismo (Wang et al., 2016). En este contexto, en el presente estudio los niveles de proteína disminuyeron conforme se aumentó el reemplazo de la HP por CPS en las dietas de totoaba, esta respuesta quizá está relacionada por una baja disponibilidad de la proteína digestible aunado por la presencia de los FANs presentes en las dietas, lo que podría explicar la disminución de las proteínas totales en el plasma, en especial en

los tratamientos con inclusiones arriba de 60% de CPS. En base a lo anterior puede inferirse que baja concentración de la proteína plasmática y albúmina de los peces alimentados con las dietas CPS75-CPS100 pudieron verse afectados, disminuyendo la síntesis de proteínas, y quizá provocar falla hepática (Stockham et al., 2002; Thrall et al., 2006) lo que traería como consecuencia cambios no positivos en el metabolismo de los organismos y posibles patologías en hígado.

En cuanto a la relación Alb:Glb en los juveniles de *T. macdonaldi*, en ambas proteínas fueron en decremento por la incorporación del CPS, donde los valores más bajos se presentaron en las dietas CPS90 y CPS100, por lo tanto no se presentaron diferencias en la relación Alb:Glb en estos grupo de peces. De acuerdo a los resultados previos, es posible que el decremento de la síntesis de proteínas esté relacionado a una deficiencia en los procesos de digestión y absorción, los cuales están ligados con la digestibilidad de las dietas, así como una disminución en actividad enzimática y metabólica, esto en respuesta a altos niveles de sustitución de HP por CPS.

La concentración de la glucosa en el plasma de los organismos alimentados con las diferentes dietas experimentales fue muy variable entre las dietas utilizadas, lo cual no permitió obtener una respuesta clara con respecto a los niveles de inclusión de CPS. Los valores más altos encontrados en el presente estudio fueron valores similares a los reportados por López et al. (2015), quienes indicaron que los valores altos se debieron a la alta inclusión de CPS, provocando una alteración en las actividades de las enzimas glucolíticas y dando lugar a una disminución de homeostasis para el transporte de glucosa. No obstante, los altos niveles de glucosa en

el presente estudio aparentemente no estuvieron relacionados con la inclusión de CPS. La glucosa presente en la sangre además de ser influenciada por el almidón proveniente del alimento, también se ha visto relacionada al estrés, lo cual provoca una estimulación de las vías alternas en la liberación de glucosa por medio de la gluconeogénesis y liberación de glucagón, causando un estado de resistencia a la insulina y llegar a producir hiperglicemia (Thrall et al., 2012). Esta respuesta se ha visto en *S. aurata*, *O. niloticus*, *O. mykiss* y *Piaractus mesopotamicus* donde los altos niveles de glucosa han sido en respuesta inmediata a un agente estresor. Así mismo diversos autores han reportado que niveles altos de glucosa están relacionados con el estrés en condiciones de cultivo, manejo y aplicación de antibióticos (Coz-Rokavac, et al., 2005; Trenzado et al., 2006), por lo que quizá en el presente estudio el efecto del CPS no influenció de manera significativa en los valores de glucosa. Aunque esto no se sabe con certeza debido a que no se realizaron pruebas como determinación de cortisol para medir el estrés por manejo de los peces, ya que no fue objetivo de estudio, aunque quizá es importante realizar este tipo de evaluaciones aunados a cuestiones nutricionales para poder entender la respuesta de los juveniles y en especial de cuando llegan a presentarse variaciones en la glucosa en la sangre que no están estrechamente relacionadas a una respuesta del estado nutricional de los organismos.

II.9.7. Histología del parénquima hepático de los juveniles de totoaba

El hígado en los peces está localizado en la zona anterior de la cavidad peritoneal, presenta dos lóbulos de distinto tamaño (Rust, 2002), sin embargo, en la mayoría de los peces a diferencia de los mamíferos, no se encuentran por separado

hígado y páncreas. En la conformación microscópica el hígado de los peces su organización celular es muy diferente a otros vertebrados superiores (Genten, 2009). En especies como tilapia y bagre el tejido hepático está representado por dos componentes anatómicos congregados: el hepático y el pancreático (Torres et al., 2010, Guzmán-Beltrán et al., 2013), de la misma forma se encuentra integrado el tejido hepático de totoaba, por lo que en el presente trabajo sólo por medio de cortes histológicos se logró identificar con claridad los hepatocitos con su característica forma poliédrica e incluidos en el parénquima hepático, el parénquima pancreático con su región exocrina formada por acinos o adenómeros pancreáticos y la porción endocrina con los islotes de Langerhans (Figura 3D), de la misma forma que ha sido identificado en bagre (Guzmán-Beltrán et al., 2013). En pez cebra se ha visto que los hepatocitos no se muestran organizados o acordonados como en los mamíferos, así como no se logró observar la presencia de la típica triada portal y células Kuffer (Menke et al., 2011). Esto quizá sea una característica común en los peces debido al escaso tejido conjuntivo hepático, en el presente trabajo al analizar los cortes histológicos del hígado de totoaba no se lograron apreciar los lobulillos hepáticos asociados a la triada que caracteriza a los mamíferos, con una estructura clásica acordonada; sino más bien tramas de cordones desordenados asociados a capilares sinusoides tal como se ha observado en la tilapia y pez cebra (Torres et al., 2010; Menke et al., 2011). Sin embargo, para verificar dicha información se requiere realizar cortes histológicos del tejido hepático de totoaba en distintas etapas de su vida y lograr establecer diferencias en el acomodo de las células hepáticas y obtener información más certera en tejido hepático sano, con relación a la parte exocrina y endócrina del páncreas.

Cambios en tejido hepático de juveniles de totoaba por efecto de las distintas dietas

El hígado de los vertebrados superiores y en peces es un órgano importante en el metabolismo intermediario (carbohidratos, proteínas y lípidos); síntesis de proteínas, albúmina y destoxificación (Passantino et al., 2014). Por consiguiente, puede llegar a ser afectado por factores bióticos, xenobióticos y nutricionales (Braunbeck et al., 1990; Van der Oost et al., 2003; Bolla et al., 2011). En diversas ocasiones las alteraciones que llegan a presentarse en el hígado son a causa del alimento artificial con deficiencia en el perfil de nutrientes lo que provoca patologías por mal nutrición (Coz-Rakovac et al., 2005). Dichas alteraciones, pueden ser mejor evaluadas con la ayuda de cortes histológicos, donde se logra distinguir la presencia de posibles alteraciones patológicas en respuesta a la variable de estudio (Hu et al., 2013). Los resultados de los cortes histológicos del presente estudio, donde los juveniles de *T. macdonaldi* que fueron alimentados durante dos meses con las dietas con diferentes niveles de inclusión de CPS, se observaron alteraciones en el tejido hepático, estos cambios al parecer están relacionados con la disponibilidad de los nutrientes. En las dietas CPS15-CPS60, se apreció la severa presencia de células adiposas y una abundante presencia de hepatocitos con alteraciones en el citoplasma (desplazamiento de núcleo a la periferia), en consecuencia a la presencia de micro y macrovacuolizaciones, como una posible señal de principios de esteatosis. Esta respuesta es similar a la reportada por Bañuelos-Vargas 2014; López et al. (2015), con la misma especie (juveniles de *T. macdonaldi*), donde se presentó una gran cantidad de hepatocitos con macrovesículas y con desplazamientos del núcleo, sobre todo en las dietas con 60% de CSP, los

autores mencionan que esta respuesta está vinculada a compuestos alergénicos que están presentes en los alimentos formulados con ingredientes de origen vegetal como lo es CSP, induciendo cambios en el hígado de los peces. En particular, los organismos alimentados con hasta 60% de CPS se observó la numerosa presencia de células adiposas tanto en los hepatocitos como en el páncreas de los juveniles de *T. macdonaldi* como respuesta a un exceso de energía disponible (lípidos y carbohidratos), almacenándose en el tejido hepático en forma de glucógeno y grasa (Morais et al., 2001). Este hecho se encuentra respaldado por los resultados de la composición proximal del hígado, en particular de los juveniles alimentados con las dietas DC-CPS60, mostrando una relación con la digestibilidad de las dietas, presentando una mayor disponibilidad de nutrientes para su desarrollo productivo y disponibilidad para almacenarlo en el tejido hepático. Una respuesta similar reporta Pereira et al. (2002), quienes observaron en trucha *O. mykiss* una abundante presencia de macrovesículas en el tejido hepático de la dieta control, las cuales fueron disminuyendo conforme se aumentó el nivel de sustitución de la harina de pescado por la harina de vegetal (a base de repollo); los autores sugieren que esta respuesta estuvo ligada a la incorporación de un alto nivel de energía disponible para los peces que fueron alimentados con la DC, por lo que se presentó un exceso de glucógeno y lípidos depositados en el tejido hepático. Por otra parte, en juveniles de bacalao del Atlántico no se encontraron cambios en el tejido hepático al ser alimentados con diferentes niveles de proteína vegetal (gluten de trigo y CPS) (Hansen et al., 2006). De la misma forma en juveniles de pacu *Piaractus mesopotamicus* al ser alimentadas con 50% de CPS y en besugo *Diplodus puntazzo*, no se mostraron alteraciones en el tejido hepático

por la inclusión de proteína vegetal (harina de girasol) (Nogales-Mérida et al., 2010). Por consiguiente, las alteraciones en el tejido hepático debida a la ingestión de fuentes alternativas de proteína, quizá está en función a la capacidad fisiológica de los organismos. No obstante, los resultados de los cortes histológicos del hígado de los peces alimentados con CPS75-CPS100 se logró apreciar de moderada a ligera la presencia de hepatocitos con micro y macrovesículas e infiltración de adipocitos entre los hepatocitos e islotes pancreáticos, lo que podría inferirse que la disponibilidad de los nutrientes fue menor conforme a la inclusión del CPS. En este sentido Glencross et al. (2004), mencionan que una disminución de gotas lipídicas en hígado, está relacionado a una pobre retención de energía, inducida por las proteínas de origen vegetal.

En el presente estudio podemos suponer que los compuestos alergénicos y los factores antinutricionales (FANs) afectaron el hígado de los peces, ya que la presencia de microvesículas fue más frecuente en las dietas CPS75-CPS100 aunado a la presencia de hepatocitos con núcleos picnóticos tal como se ha observado también en juveniles de trucha *O. mykiss* por efecto de CPS en sus dietas (Ostaszewska et al., 2005). Así mismo, también se presentaron células mononucleares en los hígados, las cuales podrían ser señal de alteraciones patológicas por cuestiones nutricionales. Cabe hacer mención que con estas mismas dietas también se logró apreciar una disminución del tamaño de los acinos pancreáticos mostrando un cambio en la distribución de las células pancreáticas y la presencia de posible necrosis. Estos cambios en el parénquima pancreático sugieren un efecto en la síntesis y secreción de las proteasas digestivas, lo que quizá esté relacionado con una disminución en actividad de dos

principales proteasas digestivas (tripsina y quimotripsina), sobre todo en las dietas CPS75-CPS100, tal como se mencionó con anterioridad. Una respuesta similar la reportaron Ostaszewska et al. (2005), en juveniles de trucha *O. mykiss*, donde se presentó una disminución en la síntesis y secreción del páncreas, así como una disminución de la actividad de las enzimas digestivas en respuesta a la incorporación del CPS, los autores reportan cambios en la densidad óptica del citoplasma y reducción del volumen de las células pancreáticas (señal de pseudohipertrofia) por efecto de los inhibidores de proteasas digestivas y fibras indigestibles que están presentes en la proteína vegetal. Algunos autores sugieren que altos niveles de derivados de soya llegan a causar hipertrofia en páncreas, asociado por la presencia de inhibidores de proteasas digestivas (inhibidores de tripsina y quimotripsina) (Abbey et al., 1979; Silva y Silva, 2000). En este sentido, los resultados del presente estudio sugiere que la incorporación de niveles mayores a 45% de inclusión de CPS pueden traer cambios en la densidad del citoplasma, aunque para poder confirmar esto se requiere realizar estudios más específicos (por.ejem. de microscopia electrónica y tinciones más específicas) para verificar dicho cambio o un posible daño en los organelos especializados en la síntesis de proteínas por efecto de la proteína alternativa.

No obstante, el hígado puede llegar a tener efectos reversibles (auto-regenerarse) por alteraciones, cuando se re-alimenta con una dieta balanceada acorde a su fisiología, por lo que las alteraciones causadas por dietas formuladas pueden llegar a desaparecer (Caballero et al., 2004). En su momento, si se desea revertir el daño causado por las dietas experimentales suministradas, es necesario proporcionarle al organismo la dieta idónea a su capacidad fisiológica de los peces de cultivo.

II.10.0. DISCUSIONES GENERALES

Los resultados de los parámetros de crecimiento y desempeño fisiológico de los juveniles de *T. macdonaldi* indican que utilizar niveles de sustitución máximo de 34.17% del CPS en sus dietas, promueven el mejor desempeño, ingesta de alimento y retención de nutrientes. No obstante, con inclusiones mayores los organismos causo un efecto significativo en los parámetros de crecimiento y retención de nutrientes. Resultados similares se han reportado para cobia (Trushenski et al., 2011). Esto quizá se deba en parte a la baja atractabilidad que presentan las proteínas vegetales, sobre todo en peces carnívoros (Chong et al., 2003 y Hansen et al., 2007), lo que en consecuencia provoca un bajo consumo de alimento y con ello, el crecimiento de los organismos se vio afectado (Day y Placencia-González, 2000). Se ha reportado que la eficiencia alimenticia está en función de la digestibilidad de las dietas (Stone et al., 2000), por lo que en el presente estudio se logró observar una mejor digestibilidad en las dietas CPS15-CPS45, lo que indujo la obtención de una mejor eficiencia alimenticia y con ello un mejor desempeño en los juveniles de *T. macdonaldi*. No obstante, con inclusiones mayores a 45% de CPS la digestibilidad de las dietas se redujo de manera importante, esta respuesta quizá se deba a la presencia de FANs como los fitatos que son químicos que forman complejos proteína/fitatos que hacen menos digestible a la proteína, además de ser difíciles de eliminar por lo que el CPS utilizado en el presente estudio aparentemente contiene dichos factores antinutricionales que afectan la digestibilidad y asimilación de los nutrientes (Storebakken et al., 2000; Deak y Johnson, 2007), aunado también a la presencia de inhibidores de proteasas digestivas (Alarcón

et al., 2002). En este sentido, los resultados sugieren que la digestibilidad no muestra un efecto negativo con una sustitución menor a 45% de CPS, mostrando similitud con la DC, por lo que con dichas sustituciones permite una buena hidrólisis de la proteína de las dietas, obteniendo aminoácidos que serán utilizados para posteriores procesos de síntesis de proteínas, metabolismo, mantenimiento, crecimiento y respuesta inmune (Li et al., 2008).

Al analizar los resultados de las dos proteasas digestivas principales que cumplen su función en la hidrólisis de la proteína presente en el alimento, logramos observar en primer instancia una inhibición de la actividad de tripsina por la incorporación de la proteína vegetal, por lo que se sugiere que quimotripsina contribuyó en mantener la hidrólisis de la proteína de la dieta como mecanismo compensatorio para hidrolizar la proteína de la dieta. No obstante, con inclusiones mayores se presentó un descenso significativo, por lo que podemos sugerir que CPS contiene inhibidores de proteasas digestivas (inhibidores de tripsina y quimotripsina) que afectan la actividad de las enzimas digestivas tal como se ha visto en el presente estudio y en especies como en lenguado *P. stellatus* (Li et al., 2015), lo que podría ser señal de una deficiencia nutricional, ya que dichas proteasas digestivas son señaladas como marcadores del estado nutricional en los peces (Applebaum y Holt, 2003; Champhai et al., 2016; Klomklao et al., 2016). Así mismo, con los resultados de los cortes histológicos del hepatopáncreas sugieren un cambio en el parénquima pancreático (reducción en el tamaño de los islotes pancreáticos y una aparente necrosis pancreática) de los juveniles de *T. macdonaldi* inducido por los FANs, los cuales también afectaron en la síntesis de proenzimas (zimógenos de tripsina y quimotripsina)

dando lugar a un decremento en la actividad de estas proteasas digestivas, principalmente en los juveniles alimentados con las dietas CPS60-CPS100, tal como se ha visto en juveniles de trucha, por la incorporación de altos niveles de CPS en su dieta (Ostaszewska et al., 2005).

Por otro lado, se logró apreciar que la mejor respuesta en el nivel de actividad de las enzimas que actúan en el borde de cepillo (fosfatasa alcalina y leucina aminopeptidasa) se presentó en los organismos alimentados con las dietas con sustituciones menores a 45%, sugiriendo que con estos niveles de sustitución los juveniles de *T. macdonaldi* no presentaron cambios en los enterocitos, esto como señal de un buen estado de salud del sistema digestivo (intestino) (Smith 1993). No obstante, al suministrar a los juveniles porcentajes mayores se logró apreciar un descenso significativo en el nivel de actividad de dichas enzimas, lo que podría estar relacionado a un cambio en la integridad de las vellosidades intestinales, por consiguiente, esto puede llevar a una disminución en la absorción y transporte de nutrientes hacia el interior de los enterocitos (Álvarez-González et al., 2008). Así mismo, se ha observado que la disminución progresiva del nivel de actividad por parte de las proteasas digestivas están relacionados con la pérdida de microvellosidades y presencia de vesículas en los enterocitos, impidiendo así la absorción de los aminoácidos necesarios para las funciones de los juveniles (Olli et al., 1994; Krogdahl et al., 1994, 2003), en el presente estudio por la presencia de altos niveles de FANs (inhibidores de proteasas digestivas) que obstruyen la digestión y absorción de los nutrientes afectando el desempeño de los juveniles de *T. macdonaldi*. Por consiguiente, al existir una baja disponibilidad de nutrientes y en especial de aminoácidos, puede llegar a inducirse un

cambio en el metabolismo intermediario (Aragão et al., 2003) de los juveniles, tal como se observó en el presente estudio al evaluar la respuesta de las enzimas del catabolismo de aminoácidos, mostrando un reflejo en la pobre disponibilidad de estos mismos. Esta misma respuesta se reporta en un estudio previo con la inclusión de CPS en juveniles de *T. macdonaldi* (Bañuelos-Vargas et al., 2014). De manera general la respuesta del metabolismo intermediario estuvo influenciado por la incorporación del CPS, en ese sentido, los peces al ser alimentados con las dietas CPS60-CPS100 quizá presentaron un estrés oxidativo hepático, por lo que se sugiere que la función principal de las enzimas G6PDH y EM no fue generar reservas energéticas, sino producir NADPH para disminuir el estrés oxidativo (Pérez Jiménez et al., 2009), ya que NADPH puede actuar como un antioxidante para eliminar los radicales libres y posiblemente en la reparación de biomoléculas dañadas (Kirch y De Groot, 2001) causados por una baja disponibilidad de nutrientes y la presencia de FANs en las dietas generado por la alta incorporación del CPS, tal como se observó en el trabajo de Bañuelos-Vargas et al. (2014) en juveniles de *T. macdonaldi* al ser alimentados con 30 y 60% de CPS sin taurina.

Por otro lado, las herramientas como la hematología, química sanguínea e histología, son de gran utilidad para valorar el estado de salud relacionado al estado nutricional de los peces de cultivo (Stockham y Scott, 2008; Hu et al., 2013). Dichas herramientas fueron utilizadas en el presente estudio para el monitoreo de la salud de los juveniles de *T. macdonaldi* al ser alimentados con distintos niveles de CSP, donde se logró determinar que los niveles aceptables del sustituto proteínico estuvieron entre 15 y 45% de inclusión, de tal manera que al valorar los resultados de hematología y

química sanguínea en esos niveles de sustitución se logró observar una similitud en los distintos parámetros con la DC, por lo tanto podría sugerirse que los peces mostraron una buena respuesta en la digestión, absorción y metabolismo de los nutrientes, principalmente de la proteína dietaria suministrada, los cuales se reflejaron en los altos valores de hematocrito, hemoglobina, albúmina y proteínas totales principalmente, sugiriendo así mismo, una eficiencia de los hepatocitos para metabolizar los distintos nutrientes, ya que sin duda al observar los cortes del tejido hepático logramos observar una similitud en el parénquima hepático de la DC con las dietas CPS15-CPS45. No obstante, deficiencia de nutrientes se reflejó en una posibilidad de anemia causada por los altos niveles de CPS que indujo a una deficiencia de hierro y de proteínas como se mencionó con anterioridad, por lo que los organismos alimentados con las dietas CPS60-CPS100 mostraron señales de un deterioro en su salud, esto quizá esté relacionado a una deficiencia nutricional (Meyer y Harvey, 2004; Jackson, 2007), produciendo a su vez cambios histomorfológicos en el parénquima hepático y pancreático en respuesta a la proteína alternativa, afectando a toda la actividad metabólica y generar en el hígado una inmuno-deficiencia (Coz-Rakovac et al., 2005, Iwashita et al., 2008). En este sentido, con los resultados generales de la presente investigación podemos sugerir que los juveniles de *T. macdonaldi* no están fisiológicamente preparados para digerir y metabolizar niveles de sustitución mayores a 45% de CPS, ya que muestran efectos negativos relacionados quizá al sistema digestivo y metabólico, lo cual conlleva a un deterioro en el desempeño y la salud de los juveniles, no obstante, las mejores respuestas en el desempeño productivo,

digestivo y metabólico se observaron con inclusiones menores a 45% de CPS, niveles que pueden ser óptimos para el cultivo de la especie.

II.11.0. CONCLUSIONES GENERALES

De acuerdo a los resultados generados en la presente investigación se demuestra que la inclusión menor a 45% de concentrado de proteína de soya en las dietas de juveniles de *Totoaba macdonaldi* mostró la mejor respuesta digestiva y metabólica, reflejando un mejor desempeño de los juveniles aunado un buen estado de salud de los peces. Mientras tanto, los resultados obtenidos y con el modelo de línea quebrada, se sugiere que los juveniles *T. macdonaldi* pueden tolerar el reemplazo de la harina de pescado por CPS hasta un máximo nivel del 34.17%. Quizá, estos niveles de inclusión podrían representar ideales para incorporarse en futuras dietas de totoaba como especie con potencial acuícola en México y poder reducir los costos en los insumos de los alimentos para la especie.

12.0. RECOMENDACIONES

- Los resultados sugieren que es importante equilibrar los requerimientos de aminoácidos esenciales en dietas con sustituciones parciales para no presentar signos de desnutrición y afectar el desarrollo de los juveniles de *T. macdonaldi*.
- Es recomendable realizar estudios de digestibilidad *in vitro* de las harinas alternativas de proteína, para poder garantizar buenos resultados cuando se les proporcione a los juveniles de *T. macdonaldi* a nivel experimental.
- Se sugiere hacer evaluaciones de las respuestas de estrés oxidativo hepático para poder comprender la respuesta del metabolismo intermediario ante deficiencias nutricionales causadas por ingredientes alternativos.
- La histología es una herramienta útil en el monitoreo de la salud de los organismos cuando son sometidos a dietas experimentales, generando información del estado nutricional de los organismos, por lo que se sugiere seguir realizando estudios a nivel histológico del sistema digestivo para lograr evaluar el efecto que conllevan los diferentes sustitutos proteínicos, más aún, si se trata de ingredientes de origen vegetal.

13.0. BIBLIOGRAFÍA

- Abbey, B.W., Norton, G., Neale, R.J. 1979. Effects of dietary proteinase inhibitors from field bean (*Vicia faba* L.) and field-bean meal on pancreatic function in the rat. *British Journal of Nutrition*, London, v.41, n.1, 39-45 p.
- Adams, S.K., Ham, K., Greeley, M.S., LeHew, R. F., Hinton, D.E. Saylos, C. F. 1996. Downstream gradients in bioindicators responses: point source contaminant effect on fish health. *Canadian Journal of Fish Aquatic Science* 53: 2177-2187.
- Akrami, R., Razeghi Mansour ,M, Ghobadi, S., Ahmadifar E, Shaker Khoshroudi, M., Moghimi Haji M. S. 2013. Effect of prebiotic mannan oligosaccharide on hematological and blood serum biochemical parameters of cultured juvenile great sturgeon (*Huso huso* Linnaeus, 1754). *Journal of Applied Ichthyology* 29: 1214-1218.
- Alami Durante, H., Médale, M., Cluzead, M., Kaushik, S.J. 2010. Skeletal Muscle growth dynamics and expression of related genes in white and red muscles of rainbow trout fed diets with graded levels of a mixture of plant protein sources as substitutes for fishmeal. *Aquaculture* 303: 50-58.
- Alarcón, F.J., Moyano, F.J., Díaz, M. 2002. Evaluation of different protein source for equafeeds by an optimised pH-Stat system. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 82: 697-704.
- Allan, G., Parkinson, S., Booth, Mark, A., Stone, D.A.J., Rowland, S.J., Frances, J., Warner-Smith,R. 2000. Replacement of fish meal in diets for Australian silver perch, *Bidyanus bidyanus*: I. Digestibility of alternative ingredients. *Aquaculture* 186: 293-310.
- Alexis, M.N. 1997. Fish meal and fish oil replacers in Mediterranean marine fish diets. *Cahiers Options Méditerranéennes* 22: 183-204.
- Alexis, M.N., Nengas, I. 2001. Current State of Knowledge Concerning the use of Soy Products in Diets for Feeding Sea Bass and Sea Bream. Needs for Future Research. American Soybean Association. Athens, Greece 32 pp.

- Ali, H., Haque M. M., Chowdhury M. M. R., Shariful M. I. 2009. *In vitro* protein digestibility of different feed ingredients in Thai koi (*Anabas testudineus*). *Journal of the Bangladesh Agricultural University* 7(1): 205–210.
- Álvarez González, C.A., Moyano-López, F.J., Civera Cerecedo, R., Carrasco Chávez, V., Ortiz-Galindo, J.L., Dumas, S. 2008. Development of digestive enzyme activity in larvae of spotted sand bass *Paralabrax maculatofasciatus* 1. Biochemical analysis. *Fish Physiology and Biochemistry* 34: 373-384.
- Aragão, C., Conceição, L.E.C., Dias J., Marquez, A.C., Gomez, E., Dinis, M.T. 2003. Soy protein concentrate as a protein source for Senegalese sole (*Solea senegalensis*. Kaup 1858) diets: effects on growth and amino acid metabolism of postlarvae. *Aquaculture Research* 34:1443-1452.
- Arvizu, J., Chávez, H. 1972. Sinopsis sobre la Biología de la *Totoaba Cynoscion macdonaldi* Gilbert, 1891. Fisheries Synopsis N° 108. UN Food and Agriculture Organization, Roma, Italia. 26 pp.
- 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: 291-300.
- Applebaum, S. L., Holt, G. J. 2003. The digestive protease, chymotrypsin, as an indicator of nutritional condition in larval red drum (*Sciaenops ocellatus*) *Marine Biology* 142: 1159-1167.
- Atencio García, V., Genes López, F., Madariaga Mendoza, D., Pardo Carrasco, S. 2007. Hematology and Blood Chemistry of Juveniles Rubio (*Salminus affinis* Pisces: Characidae) Captured in the River Sinú. *Acta Biológica Colombiana* 12(S): 27-40.
- Balch, P. 1997. Recetas nutritivas que curan. Segunda edición. Penguin group. New York, USA. 664 pp.
- Bañuelos-Vargas, I., López, L.M., Pérez-Jimenez, A., Peres, H. 2014. Effect of fishmeal replacement by soy protein concentrate with taurine supplementation on hepatic intermediary metabolism and antioxidant status of totoaba juveniles (*Totoaba macdonaldi*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 170: 18-25.

- Bañuelos-Vargas, I. 2014. Tesis de Doctororado en Oceanografía Costera. Universidad Autónoma del Estado de Baja California, Ensenada, Méx. 184 pp..
- Barrows, F.T., Stone, D.A.J., Hardy, R.W. 2007. The effects of extrusion conditions on the nutritional value of soybean meal for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 265: 244-252.
- Barrows, F.T., Gaylord, T.G., Sealey, W.M., Smith, C.E., Porter, L. 2010. Supplementation of plant-based diets for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with macro-minerals and inositol. *Aquaculture Nutrition* 16: 654-661.
- Bautista, J.M., Garrido-Pertiera, A., Soler, G. 1988. Glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Dicentrarchus labrax* liver: kinetic mechanism and kinetics of NADPH inhibition. *Biochemistry Biophysics Acta* 967 (3): 354-363.
- Blaxhall, P.C., Daisley, K.W. 1973. Routine hematological methods for use with fish blood. *Journal of Fish Biology* 5: 771-782.
- Bell, J.G., Henderson, R.J., Tocher, D.R., McGhee, F., Dick, J.R., Porter, A., Smullen, R.P., Sargent, J.R., 2002. Substituting fish oil with crude palm oil in the diet of Atlantic salmon (*Salmo salar*) affects muscle fatty acid composition and hepatic fatty acid metabolism. *Journal Nutrition* 132: 222-230.
- Berge, G.M., Grisdale-Helland, B., Helland, S.J. 1999. Soy protein concentrate in diets for Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus*. *Aquaculture* 178: 139-148.
- Bergmeyer, H.U. 1974. Methods of Enzymatic Analysis. Bergmeyer, Editores, New York: Academic Press, 574-579 pp.
- Bell, J.G., McGhee, F., Dick, J.R., Tocher, D.R. 2005. Dioxin and dioxin-like polychlorinated biphenyls (PCBs) in Scottish farmed salmon: effects of replacement of dietary marine fish oil with vegetable oils. *Aquaculture* 243: 305-314.
- Berdegúe, A.J., 1955. La pesquería de la totoaba (*Cynoscion macdonaldi*), en San Felipe, Baja California. *Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural* 16(1-4), 45-78.
- Bolla, S., Nicolaisen, O., Amin, A. 2011. Liver alterations induced by long term feeding on commercial diets in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) females. Histological and biochemical aspects. *Aquaculture* 312: 117-125.

- Bonaldo, A., Roem, A.J., Fagioli, P., Pecchini, A., Cipolini, 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. *Aquaculture Research* 39: 970-978.
- Bonilla, J.F., Sánchez, MC., Chuairé, L. 2007. Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD). Respuesta de los hematíes y otras células humanas a la disminución en su actividad. *Colómbia Médica* 38: 68-75.
- Bureau, D., Harris, A., Cho, Y. 1999. Apparent digestibility of rendered animal protein ingredients for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 08: 345-358.
- Bonamusa, L, Garcia de Frutos P., Fernandez, F., Baanante, IV. 1992. Nutritional effects on key glycolytic-gluconeogenic enzyme activities and metabolite levels in the liver of the teleost fish *Sparus aurata*. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 1:113-124
- Burrells, C., Williams, P.D., Southgate, P.J., Crampton, V.O. 1999. Immunological, physiological and pathological responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to increasing dietary concentrations of soybean proteins. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 72: 277-288.
- Braunbeck, T., Gorge, G., Storch, V., Nagel, R. (1990) Hepatic steatosis in zebra fish (*Brachydanio rerio*) induced by long-term exposure to gamma-hexachlorocyclohexane. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 19: 355–374.
- Brown, P.B., Kaushik, S.J., Peres, H. 2008. Protein feedstuffs originating from soybeans. En: Alternative protein sources in aquaculture diets. Lim C., Webster, C.D., Cheng-Sheng, L.(Eds). Taylor & Francis Group (Editorial). New York, NY. pp 205-250. ISBN: 978-1-56022-148-7.
- Caballero, M.J., López-Calero, G., Socorro, J., Roo, F.J., Izquierdo, M.S., Fernández, A.J. (1999) Combined effect of lipid level and fish meal quality on liver histology of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 179: 277-290.
- Caballero, M J., Izquierdo, M. S., Kjørsvik, E, Fernández, A. J. Rosenlund, G. 2004. Histological alterations in the liver of sea bream, *Sparus aurata* L., caused by

- short- or long-term feeding with vegetable oils. Recovery of normal morphology after feeding fish oil as the sole lipid source. *Journal Fish Diseases* 27: 531-541.
- Cabral, E.M., Bcelar, M., Batista, S., Castro-Cunha, M., Ozório, R.O.A. Valente, L.M.P. Replacement of fishmeal by increasing level of plant protein blend in diets for Senegalese sole (*Solea senegalensis*) juveniles. *Aquaculture* 323: 74-81.
- Cadwell, R.A. 1992. Effect of calcium and phytic acid on the activation of trypsinogen and the stability of trypsin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 40: 43-47.
- Capilla, E., Médale, F., Navarro, I., Panserat, S., Vachot, C., Kaushik, S., Gutiérrez, J. 2003. Muscle insulin binding and plasma levels in relation to liver glucokinase activity, glucose metabolism and dietary carbohydrates in rainbow trout. *Regulatory Peptides* 110:123-132.
- Capilla, E., Médale, F., Panserat, S., Vachot, C., Rema, P., Gomes E., Gutiérrez, F. 2004. Response of hexokinase enzymes and the insulin system to dietary carbohydrates in the common carp, *Cyprinus carpio*. *Reproduction Nutrition Development*, 44:233-242.
- Caseras, A., Metón, I., Vives, C., Egea, M., Fernández, F., Baanante, IV. 2002. Nutritional regulation of glucose-6-phosphatase gene expression in liver of the gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *British Journal of Nutrition* 88:607-614.
- Castro, C., Pérez-Jiménez, A., Guerreiro, I., Peres, H., Castro-Cunha, M., Oliva-Teles, A. 2012. Effects of temperature and dietary protein level on hepatic oxidative status of Senegalese sole juveniles (*Solea senegalensis*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 163: 372-378.
- Chou, R.L., Her, B.Y., Su, M.S., Hwang, G., Wu, Y.H., Chen, H.Y. 2004. Substituting fish meal with soybean meal in diets of juvenile cobia *Rachycentron canadum*. *Aquaculture* 229: 325-333.
- Chou, C.Y., Kaushik, S. 1993. Effects of protein intake of fish diets. En: Nutrition and feeding fish. Cowey, Mackie y Bell (ed). Academic Press, Londres, 95-117 pp.
- Cisneros-Mata, M., Botsford, L.W., Quinn, J.F., 1997. Projecting of *Totoaba macdonaldi*, a population with unknown age-dependent variability. *Ecol. Appl* 7, 968–980.

- CITES. 2010. Review of CITES Appendixes Based on Resolution Conf. 9.24 (Rev.) *Totoaba macdonaldi* (Mexican seabass). Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres. México. 10 pp.
- Cho, C.Y., Kaushik, S.J. 1990. Nutritional energetics in fish: energy and protein utilization in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). World Rev Nut Diet Karger, Basel 6, 132–172.
- Chong, A., Hashim, R., Ali, A. 2003. Assessment of soybean meal in diets for discus (*Symphysodon aequifasciata* HECKEL) farming through a fishmeal replacement study. *Aquaculture Research* 34: 913-922.
- Chute, R. 1928. The totoaba fishery at the California Gulf. *Calif. Fish Game* 14: 275-281.
- Craig, J.A. 1926. A new fishery in Mexico. *Calif. Fish Game* 12: 166-169.
- Córdova Murueta, J.H., García Carreño, F.L. 2002. Nutritive value of squid and hydrolyzed protein supplement in shrimp feed. *Aquaculture* 210: 371-384.
- Cowey C.B., De la Higuera M., Adron, J.W. 1977. The effect of dietary composition and of insulin on gluconeogenesis in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *British Journal of Nutrition* 38: 385-395.
- Cowey, C.B., Adron, J.W., Brown, D.A. 1975. Studies on the nutrition of marine flatfish. The metabolism of glucose by plaice (*Pleuronectes platessa*) and the effect of dietary energy source on protein utilization in place. *British Journal of Nutrition* 33:219-231.
- Cowey, C.B., Knox, D., Walton, M.J., Adron, J.W. 1977. The regulation of gluconeogenesis by diet and insulin in rainbow trout. *British Journal of Nutrition* 38: 463-470.
- Cowey, C.B., Cooke, D.J., Matty, A.J., Adron, J.W. 1981. Effect of quantity and quality of dietary protein on certain enzymes activities in rainbow trout. *Journal of Nutrition* 111: 336-345.
- Cowey, C.B. y Luquet, P. 1983. Protein metabolism and nutrition. INRA, Paris, 365-384 pp.
- Cowey, C.B., Walton, M.J. 1989. Intermediary metabolism. En: Fish Nutrition 2da Ed. Halver, J.E. (Ed). Academic Press, London, 260-329 pp.

- Coz- Rakovac, R., Strunjak-Perovic, I., Hacmanjek, M., Topic Popovic, N., Lipej, Z., Sostaric, B. 2005. Blood chemistry and histological properties of wild and cultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) in the North Adriatic Sea. *Veterinary Research Communications* 29: 677-687.
- Díaz-Viloria, N., Sánchez-Velazco, L., Pérez-Enriquez, R., Jimenez-Rosenberg, A. 2013. Molecular identification and morphological description of totoaba *Totoaba macdonaldi* and curvina *Cynoscion reticulatus* preflexion larvae (Perciformes: Sciaenidae). *Ichthyological Research* 60: 390-395.
- Day, O.J., Plascencia González, H.G. 2000. Soybean protein concentrate as a protein source for turbot *Scophthalmus maximus* L. *Aquaculture Nutrition* 6: 221-228.
- Debnath, D., Pal, A.K., Sahu, N.P., Yengkokpam, S., Baruah, K., Choudhury, D., Venkateshwarlu, G. 2007. Digestive enzymes and metabolic profile of *Labeo rohita* fingerlings fed diets with different crude protein levels. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B* 146: 107-114.
- De la Higuera M. and Cárdenas P. 1986. Influence of dietary composition of gluconeogenesis from L-(U-14C)-glutamate in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Comparative Biochemistry and Physiology B* 81: 391-395.
- De la Higuera M., García-Gallego M., Sanz A., Hidalgo M.C. and Suárez M.D. 1989. Utilization of dietary protein by the eel (*Anguilla anguilla*), Optimum dietary protein level. *Aquaculture* 79: 53-61.
- Deak, N.A., Johnson, L.A. 2007. Fate of phytic acid in producing soy protein ingredients. *J. Amer. Oil Chem. Soc.* 84: 369-376.
- Deng, J., Maik, K., Ai, Q., Zhang, W., Wang, X., Xu, W., Luifu, Z. 2006. Effects of replacing fish meal with soy protein concentrate on feed intake and growth of juvenile Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture* 258: 503-513.
- De Pedro, N., Guijarro, A., López-Patiño, M.A., Martínez-Álvarez, R.M., Alonso-Bedate, M., Delgado, M.J. 2004. Parámetros hematológicos y bioquímicos en la Tenca (Tinca tinca): ritmos diarios y estacionales. *Comunicación Científica CIVA*, 173-190.

- Dimes, L. E, Haard, N. F. 1994. Estimation of protein digestibility- I. Development of an in vitro method for estimating protein digestibility in salmonids (*Salmo gairdneri*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A, Physiology* 108: 349-362.
- Dimes, L.E., Garcia-Carreno, F.L., Haard,N.F. 1994. Estimation of protein digestibility III. Studies on the digestive enzymes from the pyloric ceca of rainbow trout and salmon. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A, Physiology.*, 109: 349-360.
- Douglas, S.E., Gallant, J.W., Bullerwell, C.E. 1999. Molecular investigation of aminopeptidase N expression in the winter flounder *Pleuronectes americanus*. *Journal Applied Ichthyology* 15: 80-86.
- Durazo, E., Cruz, A. C., López, L.M., Lazo, J.P., Drawbridge, M. Viana, M.T. 2010. Effects of digestible protein levels in isonitrogenous diets on growth performance and tissue composition of juvenile *Atractoscion nobilis*. *Aquaculture Nutrition* 16 (1): 54-60.
- Drabrowski, K., Takashima, F., Law, K. 1989. Bioenergetic model for the analysis of the ontogenetical aspects of coregonid fish growth. *Ecological Modelling* 44 (3-4):195-208.
- Drabowski, K., Guderley, H. 2002. Intermediary metabolism. En: Halver, J.E., Hardy, R.W. 2002. *Fish Nutrition*. Academic Press. E.U.A. 824 pp.
- Enes, P. Panserat, S. Kaushik, S., Oliva-Teles, A. 2009. Nutritional regulation of hepatic glucose metabolism in fish. *Fish Physiology and Biochemistry* 35: 519-539.
- Enes, P., Panserat, S, Kaushik, S, Oliva-Teles, A. 2006a. Effect of normal and waxy maize starch on growth, food utilization and hepatic glucose metabolism in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, 143:89–96
- Enes, P, Panserat, S, Kaushik, S, Oliva-Teles, A. 2006b. Rapid metabolic adaptation in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles fed different carbohydrate sources after heat shock stress. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, 145:73–81

- Enes P, Panserat S, Kaushik S, Oliva-Teles A 2008. Growth performance and metabolic utilization of diets with native and waxy maize starch by gilthead sea bream (*Sparus aurata*) juveniles. *Aquaculture* 274:101–108.
- Erlanger, B. F., Kokowsky N., Cohen, W. 1961. The propagation and proprieties of two new chromatogenic substrates of trypsin. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 95: 271-278.
- FAO 2010. Estado mundial de la pesca y acuicultura. FAO, Roma, 242pp. ISBN 978-92-5-306675-9.
- FAO 2016. Estado mundial de la pesca y acuicultura. FAO, Roma, 204pp. ISBN 978-92-5-109185-2.
- Ferre, T., Riu, E., Bosh, F., Valera, A., 1996. Evidence from transgenic mice that glucokinase is rate limiting for glucose utilization in the liver. *FASEB J.* 10, 1213-1218.
- Figueiredo-Silva, A.C., Corraz, G., Rema, P., Sanchez-Gurmaches, J., Gutiérrez, J., Valente, L.M.P. 2009. Blackspot seabream *Pagellus bogaraveo* lipogenic and glycolytic pathways appear to be more related to dietary protein level than dietary starch type. *Aquaculture* 291: 101–110.
- Fischer, W., Krupp F., Schneider W., Sommer C., Carpenter K.E.; Niem V.H. 1995. Guía FAO para la Identificación de Especies para los Fines de la Pesca. Pacífico centro-oriental Volumen III. Vertebrados - Parte 2. Roma, pp 245.
- Flanagan, C. A., Hendrickson, J.R., 1976. Observations on the comercial fishery and reproductive biology of the Totoaba (*Totoaba macdonaldi*) Gilbert 1890 in the northern Gulf of California. *Fishery Bulletin* 74(3): 531-544.
- Fauconneau, B., Andre, S., Chmaitilly, J., Le Bail, Y., Krieg, F., Kaushik, J. 1997. Control of sketeletal muscle fibres and adipose cells size in the flesh of rainbow trout. *Journal of Fish Biology* 50: 296-314.
- Folch, J., Lees M., Stanley G. 1957. A simple method of the isolation and purification of total lipids from animal tissue. *The Journal of Biological Chemistry* 226: 497-509.

- Fountoulaki, E., Alexis, M.N., Nengas, I., Venou, B., 2005. Effect of diet composition on nutrient digestibility and digestive enzyme levels of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *Aquaculture Research* 36: 1243-1251.
- Furné, M., Hidalgo, M.C., López, A., García-Gallego, M., Moreles, A.E., Domezain, A., Domezainé, J., Sanz, A. 2005. Digestive enzymes activities in Adriatic sturgeon *Acipenser naccarii* and rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. A comparative study. *Aquaculture* 250: 391-398.
- 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* 3-4:197-227.
- Frías Quintana C.A., Álvarez González C.A., Márquez Couturier, G. 2010. Diseño de microdietas para el larvicultivo de pejelagarto *Atractosteus tropicus*. *Universidad y Ciencia y Desarrollo, Trópico Húmedo* 26(2): 265-282.
- Galaviz Espinoza, M.A. 2011. Expresión de enzimas digestivas durante el desarrollo del tracto digestivo de *Totoaba macdonaldi*, *Atractoscion nobilis* y *Lutjanus guttatus* bajo condiciones de cultivo. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Baja California, Ensenada, B.C., México. pp 262.
- Gamboa-Delgado, J., Vay, L.L., Fernández-Díaz, C., Canavate, P., Ponce, M., Zerolo, R., Manchado. M. 2011. Effect of different diets on proteolytic enzyme activity, tripsinogen gene expression and dietary carbon assimilation in Senegalese sole (*Solea senegalensis*) larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B* 158: 251-258.
- Gao W., Liu, Y. J., Mai, g., Tian, L., Liang, G. 2011. Protein-sparing capability of dietary lipid in herbivorous and omnivorous freshwater finfish: a comparative case study on grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) and tilapia (*Oreochromis niloticus* × *O. aureus*). *Aquaculture Nutrition* 17: 2-12.
- García-Ortega, A., Muy-Rangel, D., Puello-Cruz, A., Villa-López, Yeni, Escalante-Rojas, M., Preciado-Iñiguez, K. 2010. Uso de ingredientes de origen vegetal como fuentes de proteína y lípidos en alimentos balanceados para peces marinos

- carnívoros. Memorias del X Simposio Internacional de Nutrición Acuícola, 8-10 de Noviembre, San Nicolás de las Garza, N.L., México. pp 324-343.
- Gatlin, D. Barrows, F., Brown, P., Dabrowski, K., Gaylord, G. Hardy, R. Hu, G., Kroghdahl, A., Nelson, R., Overturf, K. Sealey, D., Souza, E., Stone, D. Wilson, R. Wurtele, E. 2007, Expanding the utilization of sustainable plant products in aquafeeds: a review. *Aquaculture Research* 38: 551-579.
- Geay, F., Santiagosa, E., Corporeau, C., Boudry, P., Dreano, Y., Corso, L., Bodin, N., Vandeputte, M., Zambonino-Infante, J.L., Mazurais, D., Cahu, C.L. 2010. Regulation of FADS2 expression and activity in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.) fed a vegetable diet. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B* 156: 237-243.
- Genten, F., Terwinghe, E., Danguy, A. 2009. Atlas of Fish Histology. Science Publisers.
- Gertler, A., Birk, Y. Bondi, A. 1967. A comparative study of the nutritional and physiological significance of pure soybean trypsin inhibitors and of ethanolextracted soybean meals in chicks and rats. *Journal of Nutrition* 91: 358-370.
- Gjellesvik, D. R., D. Lombardo y B. T. Walther. 1992. Pancreatic bile salt dependent lipase from cod (*Gadus morhua*): purification and properties. *Biochemical et Biophysical Acta*. 1124:123-134 p.
- Glencross, B.D., Boot, M., Allan, G.L. 2007. A feed is only as good as its ingredients – a review of ingredient evaluation strategies for aquaculture feeds. *Aquaculture Nutrition* 13: 17-34.
- González Acevedo, D. 2011. Respuesta en crecimiento de juveniles de *Totoaba macdonaldi* alimentados con dietas con diferentes niveles de almidón y lípidos, y adicionadas con un probiótico. Tesis de maestría, Facultad de Ciencias Marinas, UABC. Ensenada, México.
- Guzmán Beltran, L., Santana, D.V., Verdugo, H.M., Gómez-Ramirez, E.,Hernán-Hurtado, G. 2013. Descripción anatómica e histológica del tracto digestivo de Nicuro *Pimelodus blochii* (Valenciennes, 1840). *Orinoquia* [online]. vol.17, n.1 ISSN 0121-3709.

- Hamdan, M., Moyano F.J., Schuhardt, D. 2009. Optimization of a gastrointestinal model applicable to the evaluation of bioaccessibility in fish feeds. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 89(7):1195-1201.
- Haard, N.F., Simpson, B.K. Enzymes. 2000. Utilization and influence on postharvest seafood quality. Marcel Dekker, Inc. New York. 681 p.
- Hardy, R. 1999. Collaborative opportunities between fish nutrition and other disciplines in aquaculture: an overview. *Aquaculture* 177 (1-4): 217-230.
- Hardy, R. 2002. Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*. In: Webster, D. C., Lim, C. (Eds.), Nutrient Requirements and Feeding of Finfish for Aquaculture. CABI Publishing. pp. 184-203.
- Hardy, R.W. 2010. Utilization of plant proteins in fish diets: effects of global demand and supplies of fishmeal. *Aquaculture Research* 41: 770-776.
- Hardy, R., B., Barrows, F. 2002. Diet formulation and manufacture. En: Fish Nutrition (J.E. Halver y R. Hardy, editores). Academic Press. New York .824 p.
- Heikkinen, J., Vielma, J., Kemilainen, O., Tirola, M., Kiuru, T., Navia-Paldanios, D., Wright, A. 2006. Effects of soybean meal based diet on growth performance, gut histopathology and intestinal microbiota of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 26: 259-268.
- Helland, G., Helland S., Baevefjord, G., Berge, M. 2002. Full-fat soybean meal in diets for Atlantic halibut: growth, metabolism and intestinal histology. *Aquaculture Nutrition* 8: 265-270.
- Hemre G.I., Lie Oe and Sundby A. 1993. Dietary carbohydrate utilization in cod (*Gadus morhua*): Metabolic responses to feeding and fasting. *Fish Physiology and Biochemistry* 10: 455-463.
- Hemre, G.I., Sanden, M., Bakke-Mckellep, A.M., Sagstad, A., Krogdahl, A. 2005. Growth, feed utilization and health of Atlantic salmon *Salmo salar* L. fed genetically modified compared to non-modified commercial hybrid soybeans. *Aquaculture Nutrition* 11: 157-167.

- Hernández, M.D., Martínez, F.J., Jover, M., García-García, B. 2007. Effects of partial replacement of fish meal by soybean meal in sharpsnout seabream (*Diplodus puntazzo*) diet. *Aquaculture* 263: 159-167.
- Hidalgo, M.C., Urea, E., Sanz, A. 1999. Comparative study of digestive enzymes in fish with different nutritional habits. Proteolytic and amylase activities. *Aquaculture* 170: 267-283.
- Hochachka, P.W., Mommsen, T.P. 1995. Biochemistry and Molecular Biology of Fishes Vol. 4. Oxford, Uni. Press. 551 pp.
- Hrubec, T.C., Smith, S.A., Robertson, J.L. 2001. Age-related changes in hematology and plasma chemistry values of hybrid striped bass (Morone chsops; Morone saxatilis). *Veterinary Clinical Pathology* 30: 8-15.
- Jackson, M.L. 2007. Veterinary Clinical Pathology: An Introduction. Blackwell, Iowa, USA.
- Jahanbakhshi A., Imanpoor, M. R., Taghizadeh , V., Shabani, A. 2012. Hematological and serum biochemical indices changes induced by replacing fish meal with plant protein (sesame oil cake and corn gluten) in the Great sturgeon (Huso huso). *Comparative Clinical Pathology* 22 (6): 1087-1092.
- Jordal, A., Lie, O., Torstensen, B. 2007. Complete replaced of dietary fish oil with a vegetable oil blend affect live lipid and plasma lipoprotein levels in Atlantic salmon (*Salmo salar* L). *Aquaculture Nutrition* 13: 114-130.
- Jordal, A.E.O., Torstensen, B.E., Tsoi, S., Tocher, D.R., Lall, S.P., Douglas, S.E., 2005. Dietary rapeseed oil affects the expression of genes involved in hepatic lipid metabolism in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Journal Nutritional* 135: 2355-2361.
- Karalazos, V., Bendiksen, E.Å., Dick, J.R., Bell, J.G., 2007. Effects of dietary protein and fat level and rapeseed oil on growth and tissue fatty acid composition and metabolism in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) reared at low water temperatures. *Aquaculture Nutrition* 13: 256–265.
- Karapanagiotidis, I.T. 2014. The Re-Authorization of Non-Rumiant Processed Animal Proteins in European Aqua feeds. *Fisheries and Aquaculture Journal* 5:111.

- Kasper, C., Watkins, B. Brown, P. 2007. Evaluation of two soybean meal fed to yellow perch (*Perca flavescens*). *Aquaculture Nutrition* 13: 431-438.
- Kaushik, S., Cravedi, J., Lalles, J., Sumpter, J., Fauconneau, B., Laroche, M. 1995. Partial or total replaced of fish meal by soybean protein on growth, protein utilization, potential estrogenic or ontogenic effects, cholesterolemia and flesh quality in rainbow trout. *Aquaculture* 133: 257-274.
- Kikuchi, K. 1999. Use of soybean meal as a substitute for fish meal in diets of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquaculture* 179: 3–11.
- Klomklao, S., Benjakul, S., Kishimura, H., Osako, K., Simpson, B.K. 2016. Trypsin inhibitor from yellowfin tuna (*Thunnus albacores*) roe: Effects on gel properties of surimi from bigeye snapper (*Priacanthus macracanthus*). *Food Science and Technology* 65: 122-127.
- Knudsen, D., Jutfelt, F., Sundh, H., Sundell, K., Koppe, W., Frøkiær, H. 2008. Dietary soya saponins increase gut permeability and play a key role in the onset of soyabean induced enteritis in Atlantic salmon (*Salmo salar* L). *British Journal Nutritional* 100: 120–129.
- Kirsch, M. y De Groot, H. 2001. NAD(P)H, a directly operating antioxidant?. *The FASEB Journal* 15: 1569-1574.
- Kirchner, S., Kaushik, S., Panerat, S. 2003. Low Protein Intake Is Associated with Reduced Hepatic Gluconeogenic Enzyme Expression in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Nutrition* 133: 2561-2564.
- Kokou, F., Sarropoulou, E., Cotou, E., Rigos, G., Henry, M., Alexis, M. 2015 Effects of Fish Meal Replacement by a Soybean Protein on Growth, Histology, Selected Immune and Oxidative Status Markers of Gilthead Sea Bream, *Sparus aurata*. *Journal of the World Aquaculture Society* 46 (2): 115-128.
- Krogdahl, A., Bkke-McKellep., A.M., Baevefjord, 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, A., Hemre, G.I., Mommsen, T.P., 2005. Carbohydrates in fish nutrition: digestion and absorption in postlarval stages. *Aquaculture Nutrition* 11: 103–122.

- Kumar, V., Sahu, N.P., Pal, A.K., Kumar, S., Kumar, A.S., Ranjan, J., Baruah, K. 2010. Modulation of keyenzymes of glycolysis, gluconeogenesis, amino acid catabolism, and TCA cycle of the tropical freshwater fish *Labeo rohita* fed gelatinized and non-gelatinized starch diet. *Fish Physiological and Biochemistry* 36: 491-499.
- Li, P.Y., Wang, J.Y., Song, Z.D., Zhang, L.M., Li, X.X. Pan, Q. 2015. Evaluation of soy protein concentrate as a substitute for fishmeal in diets for juvenile starry flounder (*Platichthys stellatus*). *Aquaculture* 448: 578-585.
- Hu, L., Yun, B., Xue, M., Wang, J., Wu, X., Zheng, Y., Han, F. 2013. Effects of fish meal quality and fish meal substitution by animal protein blend on growth performance, flesh quality and liver histology of Japanese seabass (*Lateolabrax japonicus*). *Aquaculture* (372-373): 52-61.
- Likimani, T.A., Wilson, R.P. 1982. Effects of Diet on Lipogenic Enzyme Activities in Channel Catfish Hepatic and Adipose Tissue. *Journal of Nutrition* 112: 112-117.
- Lilleeng, E., Froystead, M., Ostby, G.C., Kroghdahl, A. 2007. Effects of diets containing soybean meal on trypsin mRNA expression and activity in Atlantic salmon (*Salmo salar* L). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 147: 25-36.
- Lim, S.R., Choi, S.M., Wang, X.J., Kim, K.W., Shin, I.S., Min, T.S., Bai, S.C. 2004. Effects of dehulled soybean meal as a fish meal replacer in diets for fingerling and growing Korean rockfish *Sebastes schlegeli*. *Aquaculture* 231: 457-468.
- López, L.M., Durazo, E., Rodríguez Gómez, A., True, C.D., Viana, M.T. 2006. Composición proximal y perfil de ácidos grasos de juveniles silvestres y cultivados de *Totoaba macdonaldi*. *Ciencias Marinas* 32: 303-309.
- López, L.M., Durazo, E., Viana, M.T., Drawbridge, M., Bureau, D.P. 2009. Effect of dietary lipid levels on performance, body composition and fatty acid profile of juvenile white seabass, *Atractoscion nobilis*. *Aquaculture* 289: 101-105.
- López, L.M., Torres, A.L., Durazo, E., Drawbridge, M., Bureau, D.P. 2006. Effects of lipid on growth and feed utilization of white seabass (*Atractoscion nobilis*) fingerlings. *Aquaculture* 253: 557-563.
- López, L.M., Flores-Ibarra M., Bañuelos-Vargas I., Galaviz M.A., True C.D. 2015. Effect of fishmeal replacement by soy protein concentrate with taurine supplementation

- on growth performance, hematological and biochemical status, and liver histology of totoaba juveniles (*Totoaba macdonaldi*). *Fish Physiology and Biochemistry* 41: 921-936.
- Lundstedt, L.M., Bibiano, Melo J. F., Moraes, G. 2004. Digestive enzymes and metabolic profile of *Pseudoplatystoma corruscans* (Teleostei: Siluriformes) in response to diet composition. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 137: 331-339.
- Martinez-Montaña, E., Lazo J.P. 2012. *In vitro* protein digestibility of dietary ingredients throughout ontogeny of California halibut, *Paralichthys californicus*, larvae. *Journal of the World Aquaculture Society* 43: 51–62.
- Maraux, S, Louvard, D., Baratti, J. 1973. The aminopeptidase from hog-intestinal brush border. *Biochemica et Biophysica Acta* 321: 282-295.
- Mata-Sotres, J.A., Lazo, J.P., Baron-Sevilla, B. 2015. Effect of age on weaning success in totoaba (*Totoaba macdonaldi*) larval culture. *Aquaculture* 437: 292-296.
- Mbahinzireki, G.B., Dabrowski, K., Lee, K.-J., El-Saidy, D., Wisner, E.R. 2001. Growth, feed utilization and body composition of tilapia (*Oreochromis sp.*) fed with cottonseed meal-based diets in a recirculating system. *Aquaculture Nutrition* 7: 189-200.
- Menke, A. L., Spitsbergen, J. M., Wolterbeek, A. P. M., Woutersen, R. A. 2011. Normal Anatomy and Histology of the Adult Zebrafish. *Toxicologic Pathology* 39: 759-775.
- Meyer, D.J y Harvey, J.W. 2004. *Veterinary Laboratory Medicine Interpretation and Diagnosis*. Saunders Elsevier.
- Minjarez-Osorio, C., González-Félix, M.L., Pérez-Velázquez, M. 2012. Biological performance of *Totoaba macdonaldi* in response to dietary protein level. *Aquaculture* 50-54.
- Moon, T.W., Foster, G.D. 1995. Tissue carbohydrate metabolism, gluconeogenesis and hormonal and environmental influences. En: Hochachka y Mommsen (eds.), *Biochemistry and molecular biology of fishes*, vol. 4. Elsevier Science.

- Moraes, G., Bidinotto, P.M. 2000. Induced changes in the amylohydrolytic profile of the gut of *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1885) fed different levels of soluble carbohydrate: its correlation with metabolic aspects. *Revista de Ictiología* 8: 47-51.
- Morais, S., Gordon Bell, J., Robertson, D.A., Roy, W.J., Morris, P.C.. 2001. Protein:lipid ratios in extruded diets for Atlantic cod *Gadus morhua* L.: effects on growth, feed utilisation, muscle composition and liver histology. *Aquaculture* 203: 101–119.
- Morales, A.E, Pérez-Jiménez, A., Carmen Hidalgo, M., Abellán, E., Cardenete, G. 2004. Oxidative stress and antioxidant defenses after prolonged starvation in *Dentex dentex* liver. *Comparative Biochemistry and Physiology C* 139: 153-161.
- Morales-Ortíz, C. 1999. Descripción del desarrollo embrionario de totoaba (*Totoaba macdonaldi*) bajo condiciones de laboratorio. Tesis de licenciatura, Universidad Autónoma de Baja California, Ensenada, B.C., México. 56 p.
- Moreira, I.S., Peres, H., Cuoto, A., Enes, P., Oliva-Teles, A. 2008. Temperature and dietary carbohydrate level effects on performance and metabolic utilisation of diets in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. *Aquaculture* 274: 153-160.
- Moyano, F.J., Savoie, L. 2001. Comparison of in vitro systems of protein digestion using either mammal or fish proteolytic enzymes. *Comparative Biochemistry and Physiology A* 128:359–368.
- Murray, M.H., Lall, S.P., R., Rajaselvam, R., Boutilier, L.A., Blanchard, B., Fligth, R.M., Colombo, S., Mohindra, V., Douglas, S.E. 2010. A nutrigenomic analysis of intestinal response to partial soybean meal replacement in diets for juvenile Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus*, L. *Aquaculture* 298: 282-293.
- Nogales-Mérida, S., Tomás-Vidal, A., Martínez-Llorens, S., Jover-Cerdá, M. 2010. Sunflower meal as a partial substitute in juvenile sharpsnout sea bream (*Diplodus puntazzo*) diets: Amino acid retention, gut and liver histology. *Aquaculture* 298: 275-281.
- New, M. B y Wijkström U.N. 2002. Use of Fismal and Oil in Aquafeeds. Further thoughts on the fishmeal trap. FAO Fisheries Circular No. 975, 71 pp.
- Oliva Teles, A. 2012. Review article. Nutrition and health of aquaculture fish. *Journal of Fish Diseases* 35: 83-108.

- Olli, J.J., Hjelmeland, K., Krogdahl, A. 1994. Soybean trypsin inhibitors in diets for Atlantic salmon (*Salmo salar*, L): effects on nutrient digestibilities and trypsin in pyloric caeca homogenate and intestinal content. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* 109: 923-928.
- Olsen, R.E., Hansen, A.C., Rosenlund, G., Hemre, G.I., Mayhew, T.M., Knudsen D.L., Eroldoğan, O.T., Myklebust, R., Karlsen, Ø. 2007. Total replacement of fish meal with plant proteins in diets for Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) II — Health aspects. *Aquaculture* 272: 612-624.
- Ostaszewska, T., Dabrowski, K., Palacio, M.E., Olejniczak, M., Wieczorek, M. 2005. Growth and morphological changes in the digestive tract of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and pacu (*Piaractus mesopotamicus*) due to casein replacement with soybean proteins. *Aquaculture* 245: 273-286.
- Panserat, S., Médale, F., Blin, C., Breque, J., Vachot, C., Plagnes-Juan, E., Gomes, R., Krishnamoorthy, S., Kaushik, S. 2000a. Hepatic glucokinase is induced by dietary carbohydrates in rainbow trout, gilthead seabream, and common carp. *American Journal Physiology, Regulatory Integrative and Comparative Physiology*. 278: R1164–R1170.
- Panserat, S., Médale, F., Brèque J., Plagnes-Juan E, Kaushik S. 2000b. Lack of significant long-term effect of dietary carbohydrates on hepatic glucose-6-phosphatase expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Nutritional and Biochemistry* 11: 22-29.
- Passantino, L., Santamaria, N., Zupa, R., Pousis, C., Garofalo, R., Cianciotta, A., Jirillo, E., Acone, F., Corriero, A. 2014. Liver melanomacrophage centres as indicators of Atlantic bluefin tuna, *Thunnus thynnus* L. well-being. *Journal of Fish Diseases* 37: 241-250.
- Pereira, C., Vijayan, M. M., Storey, K.B., Jones, R.A., Moon, T.W. 1995. Role of glucose and insulin in regulating glycogen synthase and phosphorylase activities in rainbow trout hepatocytes. *Journal Comparative Physiology B*. 165: 62-70.

- Peres, H., Oliva-Teles, A. 2007. Effect of the dietary essential amino acid pattern on growth, feed utilization and nitrogen metabolism of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture* 267: 119-128.
- Pérez Arvizu, Ma. del Pilar. 2015. Efecto de dietas formuladas con diferentes niveles de harina y aceite de soya sobre la actividad de enzimas digestivas, parámetros productivos y hematológicos en juveniles de *Totoaba macdonaldi*. Tesis doctorado en Ecología Molecular y Biotecnología. Universidad Autónoma de Baja California, Mexico. 122 pp
- Pérez Jiménez, A. 2007. Respuesta nutritiva, metabólica y balance redox del dentón (*Dentex dentex*) bajo diferentes condiciones nutricionales. Tesis de doctorado, Facultad De Ciencias, Universidad De Granada, España.
- Pérez Jiménez, A., Guedes, M.J., Morales, A.E, Oliva-Teles, A. 2007. Metabolic responses to short starvation and refeeding in *Dicentrarchus labrax*. Effect of dietary composition. *Aquaculture* 265:325-335.
- Pérez-Jiménez, A., Hidalgo, M.A., Morales, A.E., Arizcun, M., Abellán, E., Cardenete, G. 2009. Use of different combinations of macronutrients in diets for dentex (*Dentex dentex*). Effects on intermediary metabolism. *Comp. Biochem. Physiol. Part A* 15: 314–321.
- Pérez Jiménez, A., Peres, H., Rubio, V.C., Oliva-Teles, A. 2012. The effect of dietary methionine and white tea on oxidative status of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *British Journal Nutrition* 108: 1202-1209.
- Plummer, D.T. 1987. Glycogen determination in animal tissues. An introduction to practical biochemistry (3erd edn.) McGraw Hill Book, Maidenhead 322 p.
- Richardson, N.L., Higg, D.A., Beames Andjack, R., Mcbride, M. R. 1985. Influence of Dietary Calcium, Phosphorus, Zinc and Sodium Phytate Level on Cataract Incidence, Growth and Histopathology in Juvenile Chinook Salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Journal of Nutrition* 115: 553-5567.
- Refstie, S., Korsøen, J., Storebakken, T., Baeverfjord, G., Lein, I., Roem, A. 2000. Differing nutritional rsponses to dietary soybean meal in rainbow trout

- (*Oncorhynchus mykiss*) and Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* 190: 49-63.
- Refstie, S., Storebakken, T., Roem, A. 1998. Feed consumption and conversion in Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed diets with fish meal, extracted soybean meal or soybean meal with reduced content of oligosaccharides, trypsin inhibitors, lectins and soya antigens. *Aquaculture* 162: 301-312
- Robina, L., Schuchardt, D. 2009. Proteína en dietas para peces. 2009. En: La nutrición y alimentación en piscicultura. Saenz Fernando. Fundación Observatorio Español de Acuicultura. Consejo Superior de Investigaciones Científicas Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino. Madrid, España. 803 pp.
- Robbins, K.R., Saxton, A.M., Southern, L.L. 2006: Estimation of nutrient requirements using broken-line regression analysis. *Journal of Animal Science* 84 (E. Suppl.), E155-E165.
- Rodríguez Covadonga, L. A., Martín, V. 2009. Nutrición lipídica. Robina, L. y Schuchardt, D. 2009. En: Proteína en dietas para peces. 2009. En: La nutrición y alimentación en piscicultura. Saenz Fernando. Fundación Observatorio Español de Acuicultura. Consejo Superior de Investigaciones Científicas Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino. Madrid, España. 803 pp.
- Roman Rodriguez, M.J., Hammann G. 1997 Age and growth of totoaba, *Totoaba macdonaldi*; (Sciaenidae), in the upper Gulf of California. *Fishery Bulletin* 95 (3): 620-627.
- Rosas, A., Vázquez-Duhalt, R., Tinoco, R., Shimada, A., Dabramo, L.R., Viana, M.T. 2008. Comparative intestinal absorption of amino acids (*Totoaba macdonaldi*) and Pacific bluefin tuna (*Thunnus orientalis*). *Aquaculture Nutrition* 14: 481-489.
- Rungruangsak-Torrissen, K. y Male, R. 2000. Trypsin isozymes: Development, digestion and structure. En: *Seafood Enzymes, utilization and influence on post-harvest seafood quality*. (ed. por N.F. Haard y B.K. Simpson). Marcel Dekker, Inc., New York. 215–269 pp.

- Rungruangsak-Torrissen K., Moss R., Andresen L.H., Berg A., Waagbø R. 2006. Different expressions of trypsin and chymotrypsin in relation to growth in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Fish Physiology and Biochemistry* 32: 7-23.
- Rowell, K., True, C., Flessa, K.W., Dettman D.L. 2008. Peces sin agua: Validación y aplicación de $\delta^{18}\text{O}$ en los otolitos de *Totoaba macdonaldi*. *Ciencias Marinas* 34(1): 55-68.
- Rust, M.B. 2002. Nutritional physiology. En: *Fish Nutrition*. (ed. por J.H. Halver y R.W. Hardy). 3er ed. Academic Press. San Diego, Cal.USA. 368-452 pp.
- Salomón Ricardo y Salomón M. Corina. 2003. Temas de Gastroenterología. Editorial Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico. Universidad Central Venezuela. Caracas, Ven. Vol .IV. 595 pp.
- Salze, G., McLean, E., Battle, P., Schwarz, M., Craig, S. 2010. Use of soy protein concentrate and novel ingredients in the total elimination of fish meal and fish oil in diets for juvenile cobia, *Rachycentron canadum*. *Aquaculture* 298: 294-299.
- Sandoval Garibaldi G. 2001. Desarrollo morfológico de la totoaba (*Totoaba macdonaldi*) (Gilbert, 1890) durante su estadio larval en condiciones de laboratorio. Tesis de licenciatura, Universidad Autónoma de Baja California, Ensenada, B.C., México. 75 pp.
- Sarath, G., De la Monte, R.S., Warner, F.W., 1989. Protease assay methods. Pages 25–56. In: R.J. Beyon and J.S. Bond, editors. *Proteolytic enzymes: a practical approach*. Oxford University Press, New York, New York, USA.
- Silva, F.C.P., Nicoli, J.R., Zambonino-Infante, J.L. Gall, L.M.M., Kaushik, S., Gatesoupe, F.J. 2010. Influence of partial substitution of dietary fish meal on the activity of digestive enzymes in the intestinal brush border membrane of gilthead sea bream, *Sparus aurata* and goldfish, *Carassius auratus*. *Aquaculture* 306: 233-237.
- Silva, M.R., Silva, M.A. 2000. Antinutritional Factors: Protease Inhibitors And Lectins. *Revista de Nutricion Campinas* 13(1): 3-9
- Skugor, S., Gridale-Helland, B., Refstie, S., Afanasyev, S., Vielma, J., Krasnov, A. 2011. *Aquaculture Nutrition* 17: 505-517.

- Smith, M.W., 1993. Genetic regulation of enterocyte differentiation. *Proc. Nutr. Soc.* 52: 293- 300.
- Soengas, J.L., Polakof, S., Chen, X., Sangiao-Alvarellos, S., Moon, T.W. 2006 Glucokinase and hexokinase expression and activities in rainbow trout tissues: changes with food deprivation and refeeding. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 291: R810-R821.
- Solórzano Salazar, Y. 2006. Efecto de niveles de alimentación sobre el crecimiento y composición química de juveniles de *Totoaba macdonaldi*. Tesis de Maestría Universidad Autónoma de Baja California. Facultad de ciencias marinas.
- Sørensen, M., Penn, M., El-Mowafi, A., Storebakken, T., Chunfang, C., Øverland, M., Kroghdahl, Å. Effect of stachyose, raffinose and soya-saponins supplementation on nutrient digestibility, digestive enzymes, gut morphology and growth performance in Atlantic salmon (*Salmo salar*, L). *Aquaculture* 314: 145-152.
- Spisni, E., Tugnoli, M., Ponticelli, A., Mordenti, T., Tomasi, V. 1998. Hepatic steatosis in artificially fed marine teleosts. *Journal of Fish Diseases* 21: 177-184.
- Squires, J., Haard, N.F., Feltham, L.A.W., 1986. Pepsin isozymes from Greenland cod (*Gadus ogac*). 2. Substrate specificity and kinetic properties. *Canadian Journal of Biochemistry and Cell Biology* 6: 215-222.
- Stockham, S.L. y Scott, M.A. 2008 Fundamentals of veterinary clinical pathology. Blackwell Publishing, Iowa.
- Stone, D.A.J. 2003. Dietary carbohydrate utilization by fish. *Reviews in Fisheries Science* 11: 337-369.
- Stone, D.A.J., Allan, G.L., Parkinson, S., Rowland, S.J. 2000. Replacement of fishmeal in diets for Australian silver perch, *Bidyanus bidyanus* III. Digestibility and growth using meat meal products. *Aquaculture* 186: 311-326.
- Storebakken, T., Refstie, S., Ruyter, B. 2000. Soy products as fat and protein sources in fish feeds for intensive aquaculture. *Soy in Animal Nutrition* (ed. by Drackley, J.K), Fed. Anim. Sci. Soc., Savoy, IL, USA, 127-170 p.
- Suárez M.D., Hidalgo M.C., García-Gallego M., Sanz A. and De la Higuera M. 1995. Influence of the relative proportion of energy yielding nutrients on liver intermediary

- metabolism of the European eel. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* 111: 421–428.
- Suonder, R.M., Conner, M.A., Booth, A.N., Bickoff, E.M., Kohler, G.O. 1972. Measurement of digestibility of alfalfa concentrates by in vivo and vitro methods. *Journal of Nutrition* 103: 530-535.
- Svodova, Z., Vykusova, B., Machova, J. 1994. The effects of pollutants on selected haematological and biochemical parameters in fish. In: Müller, R., Lloyd, R. (Eds.), *Sublethal and Chronic Effects of Pollutants on Freshwater Fish*. FAO Fishing News Books, Great Britain, 39-52 pp.
- Sundby, A., Hemre, G.I., Borrebaek, B., Christophersen, B., Blom, A.K. 1991. Insulin and glucagon family peptides in relation to activities of hepatic hexokinase and other enzymes in fed and starved Atlantic salmon (*Salmo salar*) and cod (*Gadus morhua*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B* 100: 467-470.
- Svodova, Z., Vykusova, B., Machova, J. 1994. The effects of pollutants on selected haematological and biochemical parameters in fish. En: *Sublethal and Chronic Effects of Pollutants on Freshwater Fish*. (Ed. por R. Müller y R., Lloyd) FAO Fishing News Books, Great Britain, 39-52 pp.
- Tacon, A.G.J. 2008. Compound aqua feeds in a more competitive market: alternative protein sources for a more sustainable future. L.E. Cruz Suárez, D. Ricque Marie, M.Tapia Salazar, M.G. Nieto López, D.A. Villarreal Cavazos, J.P. Lazo Corvea and M.T. Viana (eds). *Avances en Nutrición Acuícola IX. Memorias del Noveno Simposium. Internacional de Nutrición Acuícola*, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, México, 24-26 Noviembre 2008.
- Tacon, A., Metian, M. 2008. Global overview on the use of fish meal and fish oil in industrially compounded aquafeeds: Trends and future prospects. *Aquaculture* 285: 146-158.
- Talamas Rohana, E. Efecto de la temperatura sobre la preferencia térmica y el metabolismo de juveniles de *Totoaba macdonaldi* (gilbert, 1890) (pisces:sciaenidae). Tesis de maestría del Centro De Investigación Científica Y De Educación Superior De Ensenada. 71 p.

- Takagi, S., Shimeno, S., Hosokawa, H., Ukawa, M., 2001. Effect of lysine and methionine supplementation to a soy protein concentrate diet for red sea bream *Pagrus major*. *Fish and Science* 67: 1088-1096.
- Tejada, I. 1992. Control de calidad y análisis de alimentos para animales. Secretaría de Educación Pública. México, D.F. 397 pp.
- Thanuthong, T., Francis, D., Manickam, E., Senadheera, S.D. Fish oil replacement in rainbow trout diets and total dietary PUFA content; II) Effects on fatty acid metabolism and *in vitro* fatty acid bioconversion. *Aquaculture* 323: 99-108.
- Thrall, M.A. 2004. Hematology of fish. In: Thrall, M.A., Baker, D.C., Campbell, T.W., DeNicola, D., Fettman, M.J., Lassen, D.E., Rebar, A., Weiser, G. Veterinary Hematology And Clinical Chemistry. Lippincott Williams y Wilkins (1st ed.). Maryland, U.S.A. 618 pp.
- Tibaldi, E., Yaniv, H., Uni, Z., Tulli, F., Francesco, M., Luzzana, U., Harpaz, S. 2006. Effects of the partial substitution of dietary fish meal by differently processed soybean meals on growth performance, nutrient digestibility and activity of intestinal brush border enzymes in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture* 262: 182-193.
- Tibbetts, S.M., Verreth, J.A.J. Lall, S.P. 2011. *In vitro* pH-Stat protein hydrolysis of feed ingredients for Atlantic cod, *Gadus morhua*. 2. *In vitro* protein digestibility of common and alternative feed ingredients. *Aquaculture* 319:407-416.
- Torres, R.G.A., González, P.S., Peña, S.E. 2010. Descripción Anatómica, Histológica y Ultraestructural de la Branquia e Hígado de Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Int. J. Morphol.* 28: 703-712.
- Tramati C., Savona B., Mazzola A. (2005) A study of the pattern of digestive enzymes in *Diplodus puntazzo* (Cetti, 1777) (Osteichthyes, Sparidae): evidence for the definition of nutritional protocols. *Aquaculture International* **13**, 89-95.
- Tranulis, M.A., Dregni, O., Christophersen, B., Krogdahl, A., Borrebaek, B. 1996. A glucokinase-like enzyme in the liver of Atlantic salmon *Salmo salar*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 114 (1): 35-39.

- Trenzado, C. E., Morales, A.E., De la Higuera M. 2006. Physiological effects of crowding in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, selected for low and high stress responsiveness. *Aquaculture* 258: 583-593.
- Torstensen, B.E., Bell, J.G., Rosenlund, G., Henderson, R.J., Graff, I.E., Tocher, D.R., Lie, O., Sargent, J.R. 2005 Tailoring of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) flesh lipid composition and sensory quality by replacing fish oil with a vegetable oil blend. *Journal Agriculture Food and Chemistry* 53: 10166-10178.
- Torstensen, B.E., Espe, M., Sanden, M., Stubhaug, I., Waagbo, R., Hemre, G.I., Fontanillas, R., Nordgarden, U., Hevroy, E.M., Olsvik, P., Berntssen, M.H.G. 2008. Novel production of Atlantic salmon (*Salmo salar*) protein based on combine replacement of fish meal and fish oil with plant meal and vegetable oil blends. *Aquaculture* 285: 193-200.
- Trushenski, J., Laporte J., Lewis, H. 2011. Fish Meal Replacement with Soy-derived Protein in feeds for Juvenile Cobia: Influence of Replacement Level and Attractant Supplementation. *Journal of The World Aquaculture Society* 42 (3): 435-443.
- Urán, P.A., Schrama, J.W., Jaafari, S., Baardsen, G., Rombout, J.H.W.M., Koppe, W., Verreth, J.A.J. 2009. Variation in commercial sources of soybean meal influences the severity of enteritis in Atlantic salmon (*Salmon salar* L.). *Aquaculture Nutrition* 15: 492-499.
- Uscanga, A., Moyano, F.J., Álvarez, C.A. 2010. Assessment of enzymatic efficiency on protein digestion in the tilapia *Oreochromis niloticus*. *Fish Physiology and Biochemistry* 36: 1079-1085
- Viegas, I., Caballero-Solares, A., Rito, J., Giralt, M., Pardal, M.A., Metón, I., Jones, J.G., Baanante, I.V. 2014. Expressional regulation of key hepatic enzymes of intermediary metabolism in European seabass (*Dicentrarchus labrax*) during food deprivation and refeeding. *Comparative Biochemistry and Physiology A* 174: 38-44.
- Vizcaíno Pérez, E. 2008. Efecto en el crecimiento, consumo, sobrevivencia y composición proximal de juveniles de *Totoaba macdonaldi*, alimentados con

- dietas isprotéicas formuladas con distintos niveles de energía. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Baja California. Facultad de ciencias marinas, Ensenada, B.C..
- Wahnon, R., Cogan U., Mokady, S. 1992. Biochemucal and Molecular Roles of Nutients. Dietary Fish Oil Modulates the Alkaline Phosphatase Activity and not the Fluidity of Rat Intestinal Microvillus Membrane. *Journal of Nutrition* 1077-1084.
- Walter, H.E. 1984. Proteinases: methods with hemoglobin, casein and azocoll as substrates. En: H.J. Bergmeyern (ed). *Methods of Enzymatic Analysis*. Vol.V. Verlag Chemie. Weinham. 270-277 pp.
- Wang, J.T., Liu, Y.J., Tian, L.X., Mai, K.S., Du, Z.Y., Wang, Y., Yan, H.J. 2005. Effect of dietary lipid level on growth performance, lipid deposition, hepatic lipogenesis in juvenile cobia (*Rachycentron canadum*). *Aquaculture* 249: 439-447.
- Wang, X.F., Li, X.Q., Leng, X.J., Shan, L.L., Zhao, J.X., Wang, Y.T. 2014. Effects of dietary cottonseed meal level on the growth, hematological indices, liver and gonad histology of juvenile common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquaculture* 428-429: 79-87.
- Wang, J. Jiang, Y., Li, T., Yang, Y., Hu, S., Yang, M. 2016. Dietary protein requirement of juvenile red spotted grouper (*Epinephelus akaara*). *Aquaculture* 450: 289-294.
- Walsh K.A. 1970. Trypsinogens and trypsins of various species. In: GE Perlmann, L Lorand, eds. *Proteolytic enzymes, Methods of Enzymology*, Vol. 19. New York and London: Academic Press. 41-63 pp.
- Walton, M.J. 1986. Metabolic effects of feeding of a high protein/low carbohydrate diet as compared to a low protein/high carbohydrate diet to rainbow trout *Salmo gairdneri*. *Fish Physiological and Biochemistry* 1: 7-15.
- Watanabe, T., Verakunpiriya, V., Watanabe, K., Viswanath, K., Satoh, S., 1998. Feeding of rainbow trout with non-fish meal diets. *Fisheries Science* 63: 258–266.
- Watanabe, K., Ura, K., Yada, T., Kiron, V., Satoh, S., Watanabe, T. 2000. Energy and protein requirements of yellowtail for maximum growth and maintenance of body weight. *Fisheries Science* 66: 1053-1061.

- Wilson, R.P. 2002. *Dicentrarchus labrax*, D. C., Lim, C. (Eds.), En: Nutrient Requirements and Feeding of Finfish for Aquaculture. CABI Publishing. 144-175 pp.
- Whitaker, J.R. 1994. Classification and Nomenclature of Enzymes. In: Principles of Enzymology for the Food Sciences, 2nd ed. New York: Marcel Dekker. 367–385 pp.
- Yamamoto, T., Suzuki, N., Furuita, H., 1 Sugita, T., Tanaka, N., Goto, T. 2007. Supplemental effect of bile salts to soybean meal-based diet on growth and feed utilization of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Fisheries Science* 73: 123-131.
- Yue, Y.R., Zhou, Q.C. 2008. Effect of replacing soybean meal with cottonseed meal on growth, feed utilization, and hematological indexes for juvenile hybrid tilapia, *Oreochromis niloticus*×*O. aureus*. *Aquaculture* 284: 185-189.
- Zambonino-Infante J.L., Cahu C.L. 2007. Dietary modulation of some digestive enzymes and metabolic processes in developing marine fish: Applications to diet formulation. *Aquaculture* 268: 98-105.

