



**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA**

**FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS**  
**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS**  
**Posgrado en Ecología Molecular y Biotecnología**



**ESTUDIO DEL METABOLISMO DE LA GLUCOSA BAJO DIFERENTES**  
**CONDICIONES GLICÉMICAS EN EL PEJELAGARTO (*Atractosteus***  
***tropicus*)**

**T E S I S**

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

**DOCTOR EN CIENCIAS EN ECOLOGÍA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA**

**PRESENTA**

**ROCIO GUERRERO ZARATE**

**ENSENADA, BAJA CALIFORNIA, MEXICO AGOSTO 2019**

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS  
POSGRADO EN ECOLOGÍA MOLECULAR y BIOTECNOLOGÍA

**ESTUDIO DEL METABOLISMO DE LA GLUCOSA BAJO DIFERENTES  
CONDICIONES GLICÉMICAS EN EL PEJELAGARTO (*Atractosteus  
tropicus*)**

**T E S I S**

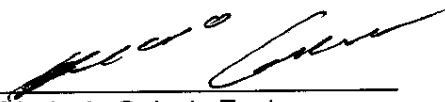
QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS  
PARA OBTENER EL GRADO DE


**DOCTOR EN CIENCIAS**

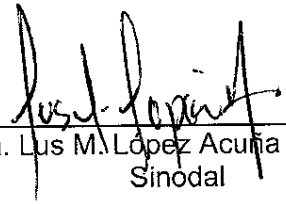
PRESENTA


Rocío Guerrero Zárate

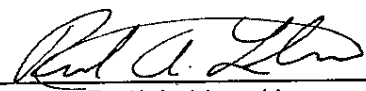
Aprobada por:

  
Dr. Mario A. Galaviz Espinoza  
Director de tesis

  
Dr. Carlos Alfonso Álvarez González  
Sinodal

  
Dra. Lus M. López Acuña  
Sinodal

  
Dr. Gustavo A. Rodríguez Montes de Oca  
Sinodal

  
Dr. Raúl A. Llera Herrera  
Sinodal

## RESUMEN

El estudio del metabolismo de carbohidratos en peces ha sido abordado a través de los años en distintas especies de peces. Hasta la fecha se sabe que el aprovechamiento de carbohidratos es altamente variable entre especies y parece estar relacionado con los hábitos alimenticios, de tal forma que las especies carnívoras muestran una menor tolerancia a la glucosa que las especies omnívoras y herbívoras. La mayoría de las investigaciones acerca del metabolismo de carbohidratos se han enfocado en peces teleósteos, especialmente en la trucha arcoíris y de entre los peces ancestrales solo se han estudiado a los esturiones, mientras que en los lepisosteidos la forma en que se regula su metabolismo es prácticamente desconocida. En este sentido investigaciones recientes han demostrado que el pejelagarto (*Atractosteus tropicus*) es capaz de mejorar su crecimiento durante la etapa larval al sustituir en su dieta el 15% del relleno de celulosa por almidón de maíz, no obstante, se desconoce cómo se regula el metabolismo de glúcidos. En la presente investigación se evaluó por medio de indicadores de rendimiento productivo, análisis bioquímicos de plasma, actividad de enzimas digestivas y del metabolismo intermediario, expresión genética diferencial e histología el efecto de la proporción carbohidratos (CHO) /lípidos (L) (D1: 0.75, D2: 1.27, D3: 2.10, D4: 2.54 y D5: 4.63) sobre el metabolismo intermediario del pejelagarto (*A. tropicus*). También se estudió si un estímulo nutricional prolongado durante la etapa de larvicultivo puede mejorar la utilización de carbohidratos en la etapa

adulta de *A. tropicus*. Los resultados muestran que a pesar de que el pejelagarto ha sido descrito como un pez carnívoro los parámetros de crecimiento, utilización de alimento, supervivencia y la actividad de enzimas digestivas no se ven afectados por la proporción CHO/L. La cantidad de lípidos en el hígado y en plasma, así como la concentración de triglicéridos y colesterol en plasma fueron incrementadas al disminuir la proporción CHO/L, demostrando que los lípidos dietarios contribuyen más a la acumulación de lípidos en el cuerpo que los carbohidratos. No obstante, la expresión genética diferencial muestra que con la D5 (CHO/L de 4.63) se sobreexpresan principalmente genes relacionados con la biosíntesis de ácidos grasos saturados, monoinsaturados y de cadena muy larga. También, a través de la actividad de enzimas del metabolismo hepático se observa una adecuada regulación de las rutas de la glucólisis y gluconeogénesis al menos hasta la proporción CHO/L de 2.10. Mientras que en la proporción CHO/L de 4.63 la actividad de las enzimas metabólicas y los análisis histológicos apuntan hacia un daño hepático (esteatosis). Por otro lado, la administración de una proporción CHO/L de hasta 2.10 durante la crianza larval y de cría puede mejorar de forma permanente la utilización de carbohidratos en pejelagartos durante su etapa adulta, sin embargo dietas muy grasas (CHO/L 0.75) provocan una concentración elevada de triglicéridos en plasma que permanece hasta la etapa adulta, mientras una dieta alta en carbohidratos (CHO/L 4.63) provoca un

falla en la regulación del metabolismo de la glucosa que persiste hasta la etapa adulta.

## DEDICATORIA

Este trabajo es dedicado a Dios, mi fuente de fortaleza,  
inspiración y conocimiento.

A mi familia: mi esposo Ronald, mi hijo Pablo y mis padres  
Federico y Ma. Eugenia, quienes fueron mi equipo de trabajo  
en casa, con su tiempo, comprensión y apoyo culminé esta meta.

## AGRADECIMIENTOS

A Dios, porque de Él obtuve la fortaleza, guía e inspiración para alcanzar esta meta.

A la Subsecretaría de Educación Superior-Dirección General de Educación Superior y a la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco (UJAT) por las becas otorgadas mediante sus programas PRODEP-Apoyo para Estudios de Posgrados de Alta Calidad y de Superación Académica, que me permitieron continuar con mi formación profesional.

A mis directores de tesis, Dr. Mario A. Galaviz Espinoza y Dr. Carlos Alfonso Álvarez González, por toda su ayuda y asesoría, sin las cuales esta investigación y la obtención de mi grado no hubieran sido posibles.

A mi comité revisor Dr. Mario A. Galaviz Espinoza, Dr. Carlos Alfonso Álvarez González, Dra. Lus M. López Acuña, Dr. Raúl Llera Herrera y Dr. Gustavo Rodríguez Montes de Oca, quienes con sus valiosas aportaciones y sugerencias contribuyeron a mejorar la presente investigación.

A mi esposo Ronald por su apoyo, comprensión y tiempo prestado para lograr mis metas y por su asesoría y consejos en la parte técnica de esta investigación.

A mi hijo Pablo Enrique por su comprensión y por el tiempo que llegue a tomar de él para trabajar y lograr esta meta.

A mis padres Federico Guerrero Lira y Ma. Eugenia Zárate Bosques porque siempre me han apoyado, aconsejado, comprendido e incitado a dar lo mejor de mí.

A mis compañeros del Laboratorio de Nutrición Acuícola (UABC) y de Bioquímica (UJAT) quienes de alguna u otra forma contribuyeron en lo personal o profesional en esta etapa de mi vida.

## ÍNDICE

RESUMEN	I
DEDICATORIA	IV
AGRADECIMIENTOS	V
ÍNDICE	VI
1.- INTRODUCCION	1
2. ANTECEDENTES	5
4. JUSTIFICACIÓN	11
5. HIPÓTESIS	12
6. OBJETIVOS	13
4. REFERENCIAS	14
5. ORGANIZACIÓN DE LA TESIS	26
6. EVALUATION OF CARBOHYDRATE/LIPID RATIOS ON GROWTH AND METABOLIC RESPONSE IN TROPICAL GAR ( <i>Atractosteus tropicus</i> ) JUVENILE.	27
7. TRANSCRIPTOMA DIFERENCIAL E HISTOLOGÍA DE HÍGADOS DE PEJELAGARTO ( <i>Atractosteus tropicus</i> ) ALIMENTADOS CON DIFERENTES PROPORCIONES DE CARBOHIDRATOS/ LÍPIDOS	69
8. PROGRAMACIÓN NUTRICIONAL DE LOS CARBOHIDRATOS Y LÍPIDOS DIETARIOS ADMINISTRADOS EN LARVAS SOBRE LA CONCENTRACIÓN DE METABOLITOS EN PLASMA EN ADULTOS DE PEJELAGARTO <i>Atractosteus tropicus</i>	116
9. CONCLUSIONES GENERALES	137
10. ANEXO 1	140

## 1.- INTRODUCCION

El estudio del metabolismo de carbohidratos en peces ha sido abordado a través de los años en distintas especies de peces (Hemre, Mommsen, & Krogh, 2002; Kamalam, Medale, & Panserat, 2017; Krogh, Hemre, & Mommsen, 2005; Moon, 2001; Polakof, Mommsen, & Soengas, 2011; Polakof & Panserat, 2016; Polakof, Panserat, Soengas, & Moon, 2012; Stone, 2003; Wilson, 1994). No obstante, los mecanismos de regulación y las razones por las cuáles algunas especies pueden utilizarlos de forma más eficiente que otras aún no han sido esclarecidos completamente (Polakof et al., 2012).

En los peces los carbohidratos son importantes debido a que sus tejidos cerebrales, renales, oculares y branquiales utilizan la glucosa como fuente preferente de energía (Polakof et al., 2011). A pesar de ello, no tienen un requerimiento específico de carbohidratos debido a que tienen la capacidad de sintetizar glucosa a partir de precursores como lactato, piruvato y aminoácidos (Kamalam et al., 2017). No obstante, el uso de carbohidratos en la formulación de sus dietas optimiza el aprovechamiento de macronutrientes como las proteínas y los lípidos. Esto es relevante en la fabricación de dietas para peces comerciales, ya que se disminuye los costos de elaboración al sustituir la harina de pescado por ingredientes de origen vegetal o inclusive por almidones (Krogh et al., 2005; Sørensen, 2012).

Sin embargo, está demostrado que la eficiencia en el aprovechamiento de carbohidratos es altamente variable entre especies. Las pruebas de tolerancia a la glucosa (por sus siglas en inglés, GTT) indican que la hiperglicemia, que se observa en algunas especies durante la prueba, parece estar relacionada con los hábitos alimenticios (Polakof et al., 2012), de tal forma que las especies carnívoras muestran una menor tolerancia a la glucosa que las especies omnívoras y herbívoras (Enes, Panserat, Kaushik, & Oliva-Teles, 2008; Hemre et al., 2002). Cabe señalar que, el término “intolerante a la glucosa” es un tecnicismo utilizado en clínica durante el diagnóstico de diabetes mellitus insulino-dependiente, y se refiere a la incapacidad de un organismo para recuperar rápidamente su nivel basal de glucosa (1-2 h en humanos) después de administrar una carga de glucosa oral durante una GTT (Moon, 2001).

Aunque los peces generalmente toleran la hiperglicemia sin mostrar síntomas clásicos como los reportados en mamíferos diabéticos, se han descrito desordenes metabólicos tales como disminución del crecimiento, alta deposición de lípidos, disminución del sistema inmune y daño hepático (Prisingkorn et al., 2017), además en el pez cebra (*Danio rerio*) y la perca india (*Anabas testudineus*) hiperglucémicos se desarrolló retinopatía e incremento en la hemoglobina glicosilada (Polakof et al., 2012).

En este sentido, la mayoría de las investigaciones acerca del metabolismo de carbohidratos se han enfocado en peces teleósteos, especialmente en la trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) (Polakof & Panserat, 2016) y de entre los peces

ancestrales solo se han estudiado a los esturiones (*Acipenser sp.*) (Deng, Refstie, & Hung, 2001; Fynn-Aikins, Hung, & Hughes, 1993). Mientras que en los Lepisosteidos (*Lepisosteus sp.* y *Atractosteus sp.*) y los amiiformes (*Amia calva*) la forma en que se regula su metabolismo es prácticamente desconocida, a excepción de una investigación realizada en *Lepisosteus platyrhincus*, en la que se estudió la estrategia metabólica empleada durante el incremento en la demanda de oxígeno y el uso de la vejiga natatoria como órgano accesorio de oxigenación (Frick, Bystriansky, & Ballantyne, 2007).

En otro orden de ideas, los Lepisosteidos son una familia de peces que tuvo origen en el cretácico durante la era Mesozoica (Wiley & Schultze, 1984). Estudio genómicos recientes en *Lepisosteus oculatus* los ubican entre los actinoptergios con una relación de sinténia (conservación en el contenido, orden y orientación de genes en sus cromosomas) más cercana al humano en comparación con los peces teleósteos (Amores, Catchen, Ferrara, Fontenot, & Postlethwait, 2011; Braasch et al., 2016).

Actualmente existen siete especies de Lepisosteidos divididas en dos géneros, todas ellas habitan en el continente americano (Wright, David, & Near, 2012). En México podemos encontrar dos especies: el catán (*Atractosteus spatula*) que se distribuye por el Golfo de México desde Florida, Estados Unidos hasta Veracruz, México y el pejelagarto (*Atractosteus tropicus*) que habita en el Sureste de México y Centro América.

Las investigaciones en nutrición han clasificado al pejelagarto como un carnívoro con capacidad para aprovechar ingredientes alternativos (Frías-Quintana, Álvarez-González, & Márquez-Couturier, 2010; Guerrero-Zárate et al., 2014), por lo que recientemente se ha demostrado que es capaz de mejorar su crecimiento durante la etapa larval al sustituir en su dieta el 15% del relleno de celulosa por almidón de maíz (Frías-Quintana, Domínguez-Lorenzo, Álvarez-González, Tovar-Ramírez, & Martínez-García, 2016). No obstante, se desconoce cómo se regula el metabolismo de glúcidos en esta especie, cómo responde frente a diferentes condiciones glicémicas y hasta qué punto la inclusión de carbohidratos en su dieta podría causarle desordenes metabólicos.

Por otro lado, en los últimos años se han incrementado las investigaciones respecto a la interacción de los carbohidratos y lípidos como fuente de energía en los peces, así como de la determinación de una proporción óptima entre ambos macronutrientes (Dias et al., 2004; Gao et al., 2010; Hu et al., 2007; Li, Wang, Liu, Jiang, & Zhu, 2013; Shuyan, Qin, Huijun, Wenbing, & Kangsen, 2016; Sterzelecki et al., 2017; Torfi Mozanzadeh, Yavari, Marammazi, Agh, & Gisbert, 2017; Zhou, Wang, Xie, Deng, & Zhou, 2016). Sin embargo, todos ellos se basan en análisis de indicadores de desempeño productivo, actividad de enzimas metabólicas y expresión de genes clave de las principales rutas del metabolismo de carbohidratos, pero la respuesta molecular aún permanece poco conocida, por esta razón resulta esencial un análisis global de expresión genética

(transcriptómico) en respuesta a la interacción de los lípidos y carbohidratos para comprender los mecanismos biológicos implicados en peces carnívoros.

Por lo anterior, el presente proyecto tiene como objetivo evaluar, por medio de indicadores de rendimiento, técnicas bioquímicas y un enfoque transcriptómico, el metabolismo de la glucosa en el pejelagarto (*A. tropicus*) bajo diferentes condiciones glicémicas y en interacción con lípidos. Así como analizar si un estímulo nutricional prolongado durante la etapa de larvicultivo puede producir un efecto duradero en la utilización de carbohidratos en la etapa adulta del pejelagarto *Atractosteus tropicus*.

## 2. ANTECEDENTES

Los inicios del estudio del metabolismo de carbohidratos y de la glucosa en peces, se remontan hacia 1800 con la investigación de Stannius y Langerhans, en la que describieron los cuerpos de Brockmann en peces teleósteos. A este le siguió el descubrimiento y cristalización de la insulina de peces en 1920. Como resultado de estas investigaciones, se utilizaron extractos de los cuerpos de Brockmann de peces para tratar clínicamente la diabetes en humanos; sin embargo, poco se sabía del papel de la insulina y del metabolismo de carbohidratos en los peces. Debido a la importancia que tienen los peces en acuicultura se desarrollaron numerosos trabajos en diversas especies, para estudiar la respuesta a la glucosa convencionalmente se sometían a una GTT. Para 1950 ya se había demostrado,

que al menos algunas especies de peces eran intolerantes a la glucosa (Polakof et al., 2012).

Por su parte, Moon (2001) brinda una revisión de especies de teleósteos estudiadas y descritas como intolerantes. Entre los puntos más destacados de estas investigaciones se encuentran: 1) el periodo de hiperglicemia es dependiente de la especie y la condición en que se encuentre, 2) en general, los carnívoros presentan una mayor hiperglicemia y que requieren de un tiempo más largo para recuperar su nivel basal de glucosa, entre 36 y 40 h para el salmón (Polakof et al., 2012), 3) la tolerancia a la glucosa puede variar entre variedades y poblaciones de la misma especie (Kamalam et al., 2012; Moon, 2001). Recientemente se describió que esta variación entre poblaciones puede estar asociada con una probable programación para la utilización de carbohidratos (Fang et al., 2014; Gong et al., 2015; Rocha et al., 2016).

Para tratar de explicar la pobre utilización de carbohidratos por los peces, especialmente los carnívoros, se han propuesto varias hipótesis. Entre ellas se descartaron: la deficiencia de amilasas e insulina, la carencia de receptores GLUT dependientes de insulina (Hemre et al., 2002; Krogdahl et al., 2005) y la pérdida de la glucoquinasa (GK) dependiente de glucosa (Borrebaek & Waagbo, 1993; Caseras, Metón, Fernandez, & Baanante, 2000; Caseras et al., 2002; Enes, Panserat, Kaushik, & Oliva-Teles, 2006; Enes et al., 2008; Panserat, Capilla, et al., 2001; Panserat, Médale, Blin, et al., 2000; Panserat, Médale, Brèque, Plagnes-

Juan, & Kaushik, 2000; Panserat, Plagnes Juan, Breque, & Kaushik, 2001; Tranulis, Dregni, Christophersen, Krogdahl, & Borrebaek, 1996).

Por otro lado, aún son consideradas hipótesis válidas: la baja capacidad de la glucosa respecto a algunos aminoácidos específicos como inductores de la secreción de insulina (Andoh, 2007; Plisetskaya, Buchelli-Narvaez, Hardy, & Dickhoff, 1991), un número relativamente bajo de receptores de insulina y la pérdida de un adecuado balance entre la captación de glucosa hepática (glucólisis) y la producción de glucosa endógena (gluconeogénesis) (Enes et al., 2006, 2008; Panserat, Médale, Blin, et al., 2000; Panserat, Médale, Brèque, et al., 2000; Polakof et al., 2011; Polakof, Skiba-Cassy, & Panserat, 2009), así como la escasa lipogénesis hepática inducida a partir de los carbohidratos ingeridos (Panserat et al., 2009; Polakof et al., 2011, 2012).

Aunque existe información acerca la inducción de la liberación de insulina por la glucosa, en especies como el mixino (*Myxine glutinosa*) (Polakof et al., 2012) y de algunos aspectos del metabolismo de la glucosa en elasmobranquios (Polakof et al., 2011), la que mayor cantidad de información que se ha generado respecto al metabolismo de carbohidratos en peces se concentra en los teleósteos, especialmente en la trucha arcoíris (*O. mykiss*) (Kamalam et al., 2017; Polakof & Panserat, 2016). Esto se debe a que la especie se utilizó como un modelo de pez intolerante a la glucosa, en cierta forma por su importancia comercial pero también porque se proponía que los peces pueden ser utilizados como modelo de diabetes mellitus no insulino-dependiente (tipo 2).

Una de las características que se ha señalado en la trucha, en relación con su intolerancia a la glucosa, es la ausencia de inhibición de la gluconeogénesis cuando los niveles de glucosa en sangre son altos (Panserat, Capilla, et al., 2001). La secuenciación de su genoma (Berthelot et al., 2014), arrojó más información acerca del proceso que contribuye a la hiperglicemia y pobre utilización de la glucosa. La radiación de los teleósteos fue precedida por tres duplicaciones completas del genoma (WGD), la VGD1y VGD2, que tuvieron lugar al inicio del linaje de los vertebrados y la tercera WGD específica de los teleósteos (Ts3R); se cree que esta última está involucrada con la diversificación de los teleósteos. Adicionalmente, en los salmónidos (como la trucha) se dio otra WGD, la cuarta WGD específica de los salmónidos (Ss4R). Los análisis filogenéticos de genes implicados en la gluconeogénesis en la trucha revelaron que los genes que codifican la fosfoenol piruvato carboxiquinasa citosólica y mitocondrial (pck1, pck2), la fructosa-1, 6-bisfosfatasa 1 (fbp1a) y la glucosa -6-fosfatasa 1 (g6pca) fueron retenidos como “singletons” (copias únicas de un conjunto), mientras que g6pcb1 (g6pcb1.a y g6pcb1.b), g6pcb2 (g6pcb2.a y g6pcb2.b) y fbp1b (fbp1b.1 y fbp1b.2) fueron mantenidos como ohnologos (parálogos formados por un evento de WGD, Berthelot et al., 2014) después de la Ss4R. Los ohnologos fueron atípicamente sobreexpresados en el hígado de truchas juveniles alimentadas con dietas ricas en carbohidratos (Marandel, Seiliez, Véron, Skiba-Cassy, & Panserat, 2015) y sobreexpresados por la insulina, en un estudio in vitro con hepatocitos (Marandel, Dai, Panserat, & Skiba-Cassy, 2016), lo que indica que los parálogos de la g6pcb2

pueden contribuir al fenotipo intolerante a la glucosa de la trucha (Panserat, Marandel, & Seilliez, 2019).

En este sentido, los Lepisosteidos son peces ancestrales que se han descrito como peces con un genoma en una “posición basal” respecto a los teleósteos, ya que su linaje divergió antes de que se diera la Ts3R, común a los teleósteos. Por lo que conservan una relación de sinténia con los humanos, mayor que la de especies de peces modelo como *Danio rerio* (Amores et al., 2011). Por ello, basado en el estudio del genoma de *Lepisosteos oculatus* se propuso que estos organismos pueden ser usados como modelos en estudios genéticos para facilitar la comparación entre teleósteos y humanos (Braasch et al., 2016).

No obstante, hasta la fecha no existe información respecto al metabolismo de carbohidratos en los Lepisosteidos. Esta familia de peces tuvo origen en el cretácico durante la era Mesozoica (Wiley & Schultze, 1984). Actualmente, existen siete especies todas ellas habitan en el continente americano (Wright et al., 2012).

En el Sureste de México y Centroamérica habita *A. tropicus*, esta especie ha sido investigada desde hace más de 30 años debido a la relevancia que tiene en la cultura tabasqueña y a que sus poblaciones silvestres se vieron presionadas por la sobrepesca. Entre las primeras investigaciones de la especie destacan las de Reséndez & Salvadores (1983) quienes hicieron una descripción de la biología reproductiva y hábitos alimenticios de la especie, posteriormente Chávez- Lomelí, Mattheeuws, & Pérez-Vega (1989) realizaron un descripción biológica de la

especie con el objetivo de determinar su potencial para la acuicultura. Para 1999, ya se disponía de información acerca de la tecnología para el manejo y reproducción en cautiverio del pejelagarto con fines de repoblación y se evaluaba su producción para consumo humano (Márquez-Couturier, 1999).

En nutrición destacan las investigaciones de Jesus-Contreras (2008) quien determino que los prejuveniles de pejelagarto (0.6 g) tienen un requerimiento de 49% de proteína y 400 Kcal/ 100g de dieta de energía, mientras los juveniles (7 g) el requerimiento de proteína disminuye a 46%, y el de energía permanece en 400 Kcal/ 100g de dieta. Huerta-Ortíz (2008) estableció que en los pejelagartos con peso de 0.5 g el requerimiento de lípidos es de 17%, mientras que en los que tienen un peso de 15 g el requerimiento es del 19%. Frías-Quintana et al. (2010) analizaron la digestibilidad *in vitro* de varios ingredientes alternos a la harina de pescado y desarrollaron dietas microparticuladas para larvas de pejelagarto. Posteriormente, se iniciaron los estudios de fisiología digestiva de la especie con la caracterización de las proteasas en juveniles de pejelagarto (Guerrero-Zárate et al., 2014) y la ontogenia enzimática de la especie (Frías-Quintana et al., 2015), que apoyaron la hipótesis de que el pejelagarto es capaz de aprovechar harinas diferentes a las de pescado. Las investigaciones más recientes describen que el pejelagarto es capaz de utilizar almidón de maíz durante su etapa larval, observando una mejora en su crecimiento (Frías-Quintana et al., 2016) e incluso es probable que pueda darse un ahorro de proteínas a partir de la inclusión de carbohidratos en sus dietas (Frías-Quintana et al., 2017).

#### 4. JUSTIFICACIÓN

El pejelagarto (*A. tropicus*) es un pez con gran importancia cultural en varias poblaciones mesoamericanas. En Tabasco, México, tiene importancia en la gastronomía, economía y el arte, por lo que hace más de 30 años se iniciaron las investigaciones para conocer la biología de la especie y desarrollar la tecnología para su cultivo. A pesar de ello, hasta la fecha varios aspectos de la fisiología de la especie, y de la familia Lepisosteidae en general, permanecen sin ser estudiados. La secuenciación del genoma de *L. oculatus* destacó la relevancia de esta familia como organismos modelo para investigaciones en genética y fisiología, pues pueden constituir un “puente” entra la información generada en teleósteos y los humanos. Esto debido a que no experimentaron la Ts3R común a los teleósteos y a que conservan onhologos de las duplicaciones VGD1 y VGD2; que fueron recíprocamente perdidos en los tetrápodos y teleósteos. En este sentido, el estudio del metabolismo de la glucosa bajo diversas condiciones glicémicas en el pejelagarto constituye la oportunidad de conocer el funcionamiento de un pez ancestral ante la inclusión de carbohidratos, sin los efectos de la sub y neo funcionalización que precede a las duplicaciones genómicas, lo que puede interferir diferencialmente en la regulación genética, tal como se ha descrito recientemente para la enzima gluconeogénica g6pasa en la trucha.

La información generada es por lo tanto relevante en el ámbito de la acuicultura pues permitirá comprender el efecto que los carbohidratos tienen sobre el metabolismo intermediario en los pejelagartos, tanto a corto como a mediano

plazo. Este conocimiento será de utilidad no solo para optimizar las dietas de la especie sino también para establecerlo como un organismo modelo para realizar estudios de fisiología comparada.

Por otro lado, son escasas las investigaciones que han evaluado la interacción carbohidratos: lípidos y su efecto sobre el metabolismo de la glucosa en peces comerciales y ninguna de ellas lo ha hecho con un enfoque transcriptómico, por lo que la presente investigación constituye el primer trabajo de este tipo.

## **5. HIPÓTESIS**

Ante la inclusión de almidón de maíz en su dieta *A. tropicus* es una especie que tiene la capacidad de regular eficientemente las rutas metabólicas de la glucólisis, gluconeogénesis y lipogénesis.

## 6. OBJETIVOS

### General

Evaluar el metabolismo de la glucosa en el pejelagarto (*A. tropicus*) bajo diferentes condiciones glicémicas y en interacción con lípidos por medio de indicadores de rendimiento, técnicas bioquímicas y de expresión génica diferencial en el hígado.

### Específicos

- Determinar el efecto de la interacción carbohidratos/lípidos sobre el metabolismo de carbohidratos en crías de pejelagarto (*Atractosteus tropicus*)
- Describir el transcriptoma diferencial en el hígado de pejelagarto (*Atractosteus tropicus*) alimentados con diferentes proporciones de carbohidratos y lípidos
- Estudiar el efecto de un estímulo nutricional prolongado durante la etapa de larvicultivo sobre la utilización de carbohidratos en la etapa adulta del pejelagarto *Atractosteus tropicus*

#### 4. REFENCIAS

- Amores, A., Catchen, J., Ferrara, A., Fontenot, Q., & Postlethwait, J. H. (2011). Genome evolution and meiotic maps by massively parallel DNA sequencing: Spotted gar, an outgroup for the teleost genome duplication. *Genetics*, *188*(4), 799–808. <https://doi.org/10.1534/genetics.111.127324>
- Andoh, T. (2007). Amino acids are more important insulinotropins than glucose in a teleost fish , barfin flounder ( *Verasper moseri* ). *General and Comparative Endocrinology*, *151*, 308–317. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2007.01.015>
- Berthelot, C., Brunet, F., Chalopin, D., Juanchich, A., Bernard, M., Noël, B., ... Guiguen, Y. (2014). The rainbow trout genome provides novel insights into evolution after whole-genome duplication in vertebrates. *Nature Communications*, *5*. <https://doi.org/10.1038/ncomms4657>
- Borrebaek, B., & Waagbo, R. (1993). Adaptable hexokinase with low affinity for glucose in the liver of Atlantic salmon (*Salmo Salar*). *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, *106*(4), 833–836. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0305-0491\(93\)90038-7](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0305-0491(93)90038-7)
- Braasch, I., Gehrke, A. R., Smith, J. J., Kawasaki, K., Manousaki, T., Pasquier, J., ... Postlethwait, J. H. (2016). The spotted gar genome illuminates vertebrate evolution and facilitates human-teleost comparisons. *Nature Genetics*, *48*(4), 427–437. <https://doi.org/10.1038/ng.3526>
- Caseras, A., Metón, I., Fernandez, F., & Baanante, I. V. (2000). Glucokinase gene

expression is nutritionally regulated in liver of gilthead sea bream ( *Sparus aurata* ). *Biochimica et Biophysica Acta*, 1493, 135–141.

[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0167-4781\(00\)00173-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0167-4781(00)00173-1)

Caseras, A., Metón, I., Vives, C., Egea, M., Fernandez, F., & Baanante, I. V.

(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. <https://doi.org/10.1079/BJN2002701>

Chávez- Lomelí, M. C., Mattheeuws, A. E., & Pérez-Vega, M. H. P. (1989).

*Biología de los peces del rio San Pedro en vista de determinar su potencial para la piscicultura* (1st ed.). Xalapa, Veracruz, México: Instituto Nacional de Investigaciones sobre Recursos Bióticos (INIREB).

Deng, D. F., Refstie, S., & Hung, S. S. O. (2001). Glycemic and glycosuric

responses in white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) after oral administration of simple and complex carbohydrates. *Aquaculture*, 199(1–2), 107–117. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00515-4](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00515-4)

Dias, J., Rueda-Jasso, R., Panserat, S., Da Conceição, L. E. C., Gomes, E. F., &

Dinis, M. T. (2004). Effect of dietary carbohydrate-to-lipid ratios on growth, lipid deposition and metabolic hepatic enzymes in juvenile Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup). *Aquaculture Research*, 35(12), 1122–1130.

<https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2004.01135.x>

Enes, P., Panserat, S., Kaushik, S., & Oliva-Teles, A. (2006). 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 - A Molecular and Integrative Physiology*, 143(1), 89–96. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2005.10.027>

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(1), 101–108. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.11.009>

Fang, L., Liang, X. F., Zhou, Y., Guo, X. Z., He, Y., Yi, T. L., ... Tao, Y. X. (2014). Programming effects of high-carbohydrate feeding of larvae on adult glucose metabolism in zebrafish, *Danio rerio*. *British Journal of Nutrition*, 111(5), 808–818. <https://doi.org/10.1017/S0007114513003243>

Frías-Quintana, C., Álvarez-González, C., & Márquez-Couturier, G. (2010). Diseño de microdietas para el cultivo de pejelagarto *Atractosteus tropicus*, Gill 1863. *Universidad y Ciencia*, 26(2), 265–282. Retrieved from <http://www.scielo.org.mx/pdf/uc/v26n3/v26n3a6.pdf>

Frías-Quintana, C., Álvarez-González, C., Tovar-Ramírez, D., Martínez-García, R., Camarillo-Coop, S., Peña, E., & Galaviz, M. (2017). Use of Potato Starch in Diets of Tropical Gar (*Atractosteus tropicus*, Gill 1863) Larvae. *Fishes*, 2(1), 3. <https://doi.org/10.3390/fishes2010003>

Frías-Quintana, C., Domínguez-Lorenzo, J., Álvarez-González, C., Tovar-Ramírez,

- D., & Martínez-García, R. (2016). Using cornstarch in microparticulate diets for larvicultured tropical gar (*Atractosteus tropicus*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 42(2), 517–528. <https://doi.org/10.1007/s10695-015-0156-4>
- Frías-Quintana, C., Márquez-Couturier, G., Alvarez-González, C., Tovar-Ramírez, D., Nolasco-Soria, H., Galaviz-Espinosa, M., ... Gisbert, E. (2015). Development of digestive tract and enzyme activities during the early ontogeny of the tropical gar *Atractosteus tropicus*. *Fish Physiology and Biochemistry*, 41(5), 1075–1091. <https://doi.org/10.1007/s10695-015-0070-9>
- Frick, N. T., Bystriansky, J. S., & Ballantyne, J. S. (2007). The metabolic organization of a primitive air-breting fish, the Florida gar (*Lepisosteus platyrhincus*). *Journal of Experimental Zoology*, 307A, 7–17. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jez.a.338>
- Fynn-Aikins, K., Hung, S. S. O., & Hughes, S. G. (1993). Effects of feeding a high level of D-glucose on liver function in juvenile white sturgeon ( *Acipenser transmontanus* ). *Fish Physiology and Biochemistry*, 12(4), 317–325. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/BF00004416>
- Gao, W., Liu, Y., Tian, L., Mai, K., Liang, G., Yang, H., ... Luo, W. (2010). Effect of dietary carbohydrate-to-lipid ratios on growth performance, body composition, nutrient utilization and hepatic enzymes activities of herbivorous grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Aquaculture Nutrition*, 16(3), 327–333. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2009.00668.x>

- Gong, G., Xue, M., Wang, J., Wu, X. feng, Zheng, Y. hua, Han, F., ... Su, X. ou. (2015). The regulation of gluconeogenesis in the Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) affected later in life by a short-term high-glucose programming during early life. *Aquaculture*, *436*, 127–136.  
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.10.044>
- Guerrero-Zárate, R., Alvarez-González, C., Olvera-Novoa, M., Perales-García, N., Frías-Quintana, C., Martínez-García, R., & Contreras-Sánchez, W. (2014). Partial characterization of digestive proteases in tropical gar *Atractosteus tropicus* juveniles. *Fish Physiology and Biochemistry*, *40*(4), 1021–1029.  
<https://doi.org/10.1007/s10695-013-9902-7>
- Hemre, G.-I., Mommsen, T. P., & Krogdahl, A. (2002). Carbohydrates in fish nutrition: effects on growth, glucose metabolism and hepatic enzymes. *Aquaculture Nutrition*, *8*(3), 175–194. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2095.2002.00200.x>
- Hu, Y. -H., Liu, Y. -J., Tian, L. -X., Yang, H. -J., Liang, G. -Y., & Gao, W. (2007). Optimal dietary carbohydrate to lipid ratio for juvenile yellowfin seabream (*Sparus latus*). *Aquaculture Nutrition*, *13*(4), 291–297.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2007.00476.x>
- Huerta-Ortíz, M. (2008). *Requerimientos de lípidos en larvas y juveniles de pejelagarto *Atractosteus tropicus**. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
- Jesus-Contreras, R. (2008). *Relación proteína/energía en juveniles de pejelagarto*

(*Atractosteus tropicus*) empleando dietas semipurificadas. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.

Kamalam, B., Medale, F., Kaushik, S., Polakof, S., Skiba-Cassy, S., & Panserat, S. (2012). Regulation of metabolism by dietary carbohydrates in two lines of rainbow trout divergently selected for muscle fat content. *Journal of Experimental Biology*, 215(15), 2567–2578. <https://doi.org/10.1242/jeb.070581>

Kamalam, B., Medale, F., & Panserat, S. (2017). Utilisation of dietary carbohydrates in farmed fishes: New insights on influencing factors, biological limitations and future strategies. *Aquaculture*, 467, 3–27. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.02.007>

Krogdahl, Å., Hemre, G. I., & Mommsen, T. P. (2005). Carbohydrates in fish nutrition: Digestion and absorption in postlarval stages. *Aquaculture Nutrition*, 11(2), 103–122. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2004.00327.x>

Li, X., Wang, Y., Liu, W., Jiang, G., & Zhu, J. (2013). Effects of dietary carbohydrate/lipid ratios on growth performance, body composition and glucose metabolism of fingerling blunt snout bream *Megalobrama amblycephala*. *Aquaculture Nutrition*, 19(5), 701–708. <https://doi.org/10.1111/anu.12017>

Marandel, L., Dai, W., Panserat, S., & Skiba-Cassy, S. (2016). The five glucose-6-phosphatase paralogous genes are differentially regulated by insulin alone or combined with high level of amino acids and/or glucose in trout hepatocytes.

*Molecular Biology Reports*, 43(4), 207–211. <https://doi.org/10.1007/s11033-016-3962-6>

Marandel, L., Seiliez, I., Véron, V., Skiba-Cassy, S., & Panserat, S. (2015). New insights into the nutritional regulation of gluconeogenesis in carnivorous rainbow trout ( *Oncorhynchus mykiss* ): a gene duplication trail. *Physiological Genomics*, 47(7), 253–263.  
<https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00026.2015>

Márquez-Couturier, G. (1999). Biología y tecnología para el cultivo del pejelagarto *Atractosteus tropicus* en el sureste de México. In *IV Reunión Nacional de REdes de Investigación en Acuicultura- REproducción y genética* (pp. 265–268). Cuernavaca, Morelos, México: INAPESCA. Retrieved from <https://docplayer.es/86099645-Memorias-iv-reunion-nacional-de-redes-de-investigacion-en-acuicultura-secretaria-de-medio-ambiente-recursos-naturales-y-pesca.html>

Moon, T. W. (2001). Glucose intolerance in teleost fish: fact or fiction? *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 129(2–3), 243–249. [https://doi.org/10.1016/S1096-4959\(01\)00316-5](https://doi.org/10.1016/S1096-4959(01)00316-5)

Panserat, S., Capilla, E., Gutierrez, J., Frappart, P. O., Vachot, C., Plagnes-Juan, E., ... Kaushik, S. (2001). Glucokinase is highly induced and glucose-6-phosphatase poorly repressed in liver of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by a single meal with glucose. *Comparative Biochemistry and Physiology - B*

*Biochemistry and Molecular Biology*, 128(2), 275–283.

[https://doi.org/10.1016/S1096-4959\(00\)00322-5](https://doi.org/10.1016/S1096-4959(00)00322-5)

Panserat, S., Marandel, L., & Seiliez, I. (2019). New Insights on Intermediary Metabolism for a Better Understanding of Nutrition in Teleosts, (November 2018), 1–26.

Panserat, S., Médale, C., Blin, J., Brèque, C., Vachot, E., Plagnes Juan, E., ... Kaushik, S. (2000). Hepatic glucokinase is induced by dietary carbohydrates in rainbow trout, gilthead seabream, and common carp. *American Journal of Physiology- Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 278, 1164–1170.

Panserat, S., Médale, F., Brèque, J., Plagnes-Juan, E., & Kaushik, S. (2000). Lack of significant long-term effect of dietary carbohydrates on hepatic glucose-6-phosphatase expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)<sup>11</sup>The Genbank accession number for the rainbow trout G6Pase sequence is AF120150. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 11(1), 22–29.  
[https://doi.org/10.1016/S0955-2863\(99\)00067-4](https://doi.org/10.1016/S0955-2863(99)00067-4)

Panserat, S., Plagnes Juan, E., Breque, J., & Kaushik, S. (2001). Hepatic phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression is not repressed by dietary carbohydrates in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Experimental Biology*, 204(2), 359–365. Retrieved from <http://jeb.biologists.org/content/204/2/359>

Panserat, S., Skiba-Cassy, S., Seilliez, I., Lansard, M., Plagnes-Juan, E., Vachot, C., ... Moon, T. W. (2009). Metformin improves postprandial glucose homeostasis in rainbow trout fed dietary carbohydrates: a link with the induction of hepatic lipogenic capacities? *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 297(3), R707–R715. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00120.2009>

Plisetskaya, E., Buchelli-Narvaez, L. I., Hardy, R. W., & Dickhoff, W. W. (1991). Effects of injected and dietary arginine on plasma insulin levels and growth of pacific salmo and rainbow trout. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 98A(1), 165–170. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0300-9629\(91\)90595-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0300-9629(91)90595-4)

Polakof, S., Mommsen, T. P., & Soengas, J. L. (2011). Glucosensing and glucose homeostasis: From fish to mammals. *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, 160(4), 123–149. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2011.07.006>

Polakof, S., & Panserat, S. (2016). How Tom Moon's research highlighted the question of glucose tolerance in carnivorous fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part - B: Biochemistry and Molecular Biology*, 199, 43–49. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2015.11.001>

Polakof, S., Panserat, S., Soengas, J. L., & Moon, T. W. (2012). Glucose metabolism in fish: A review. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*, 182(8), 1015–1045.

<https://doi.org/10.1007/s00360-012-0658-7>

Polakof, S., Skiba-Cassy, S., & Panserat, S. (2009). Glucose homeostasis is impaired by a paradoxical interaction between metformin and insulin in carnivorous rainbow trout. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative & Comparative Physiology*, 297, R1769–R1776.

<https://doi.org/10.1152/ajpregu.00369.2009>.

Prisingkorn, W., Prathomya, P., Jakovlić, I., Liu, H., Zhao, Y.-H., & Wang, W.-M. (2017). Transcriptomics, metabolomics and histology indicate that high-carbohydrate diet negatively affects the liver health of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*). *BMC Genomics*, 18(1), 856.

<https://doi.org/10.1186/s12864-017-4246-9>

Reséndez, A., & Salvadores, M. (1983). Contribución al conocimiento de la biología del pejelagarto *Lepisosteus tropicus* (Gill) y la tenguayaca *Petenia splendida* (Günther) del estado de Tabasco. *Biotica*, 8(4), 413–426.

Rocha, F., Dias, J., Geurden, I., Dinis, M. T., Panserat, S., & Engrola, S. (2016). Dietary glucose stimulus at larval stage modifies the carbohydrate metabolic pathway in gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles: An in vivo approach using <sup>14</sup>C-starch. *Comparative Biochemistry and Physiology -Part A : Molecular and Integrative Physiology*, 201, 189–199.

<https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2016.07.016>

Shuyan, M., Qin, N., Huijun, M., Wenbing, Z., & Kangsen, M. (2016). Effects of

Dietary Carbohydrate-to-Lipid Ratio on the Growth Performance and Feed Utilization of Juvenile Turbot (*Scophthalmus maximus*). *J. Ocean Univ. China (Oceanic and Coastal Sea Research)*, 15(4), 1672–5182.

<https://doi.org/10.1007/s11802-016-2934-8>

Sørensen, M. (2012). A review of the effects of ingredient composition and processing conditions on the physical qualities of extruded high-energy fish feed as measured by prevailing methods. *Aquaculture Nutrition*, 18(3), 233–248. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2011.00924.x>

Sterzelecki, F. C., Sugai, J. K., Baloi, M., Passini, G., Carvalho, C. V. A., Fracalossi, D. M., & Cerqueira, V. R. (2017). Effect of dietary carbohydrate to lipid ratios on growth, digestive enzyme and blood metabolites of juvenile Brazilian sardines, *Sardinella brasiliensis* (Steindachner, 1879). *Aquaculture Research*, 48(9), 5111–5121. <https://doi.org/10.1111/are.13330>

Stone, D. A. J. (2003). Dietary carbohydrate utilization by fish. *Reviews in Fisheries Science*, 11(4), 337–369. <https://doi.org/10.1080/10641260390260884>

Torfi Mozanzadeh, M., Yavari, V., Marammazi, J. G., Agh, N., & Gisbert, E. (2017). Optimal dietary carbohydrate-to-lipid ratios for silvery-black porgy (*Sparidentex hasta*) juveniles. *Aquaculture Nutrition*, 23(3), 470–483. <https://doi.org/10.1111/anu.12415>

Tranulis, M. A., Dregni, O., Christophersen, B., Krogdahl, Å., & Borrebaek, B. (1996). A glucokinase-like enzyme in the liver of Atlantic salmon (*Salmo salar*).

*Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, 114(1), 35–39. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(95\)02119-1](https://doi.org/10.1016/0305-0491(95)02119-1)

Wiley, E. O., & Schultze, H.-P. (1984). Family Lepisosteida (Gars) as Living Fossils. In *Living Fossils (Casebooks in Earth Sciences)* (pp. 160–165). [https://doi.org/10.1007/978-1-4613-8271-3\\_17](https://doi.org/10.1007/978-1-4613-8271-3_17)

Wilson, R. P. (1994). Utilization of dietary carbohydrate by fish. *Aquaculture*, 124(1–4), 67–80. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(94\)90363-8](https://doi.org/10.1016/0044-8486(94)90363-8)

Wright, J. J., David, S. R., & Near, T. J. (2012). Gene trees , species trees , and morphology converge on a similar phylogeny of living gars ( Actinopterygii : Holostei : Lepisosteidae ), an ancient clade of ray-finned fishes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 63(3), 848–856. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2012.02.033>

Zhou, P., Wang, M., Xie, F., Deng, D., & Zhou, Q. (2016). Effects of dietary carbohydrate to lipid ratios on growth performance, digestive enzyme and hepatic carbohydrate metabolic enzyme activities of large yellow croaker (*Larimichthys crocea*). *Aquaculture*, 452, 45–51. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.10.010>

## 5. ORGANIZACIÓN DE LA TESIS

La presente tesis esta compuesta por tres capitulos:

- 1. Capítulo:** Artículo en extenso preparado para la revista *Aquaculture Research* que estudia el efecto de la proporción de CHO/L en dietas administradas a crías de *Atractosteus tropicus* sobre indicadores productivos, análisis bioquímico de plasma, actividad de enzimas digestivas y del metabolismo intermediario. La versión publicada del artículo se encuentra en el Anexo 1.  
DOI: <https://doi.org/10.1111/are.14060>
- 2. Capítulo:** Artículo en extenso preparado para la revista *BMC genomics* que analiza el efecto de la proporción CHO/L en dietas para *Atractosteus tropicus* sobre la expresión de genes en el hígado con un enfoque transcriptómico e histológico. Las normas editoriales de la revista se pueden consultar en: <https://bmccgenomics.biomedcentral.com/submission-guidelines/preparing-your-manuscript/research-article>
- 3. Capítulo:** Artículo en extenso preparado para la revista *Fish Physiology and Biochemistry* que estudia si un estímulo nutricional prolongado durante la etapa de larvicultivo puede producir un efecto duradero en la utilización de carbohidratos en la etapa adulta del pejelagarto *Atratosteus tropicus*. Las normas editoriales de la revista se pueden consultar en: [https://www.springer.com/life+sciences/ecology/journal/10695?detailsPage=pltci\\_1060339](https://www.springer.com/life+sciences/ecology/journal/10695?detailsPage=pltci_1060339)

## 6. EVALUATION OF CARBOHYDRATE/LIPID RATIOS ON GROWTH AND METABOLIC RESPONSE IN TROPICAL GAR (*Atractosteus tropicus*) JUVENILE.

Rocío Guerrero-Zárate<sup>1,2</sup>, Carlos A. Álvarez-González<sup>1\*</sup>, Ronald Jesus-Contreras<sup>1</sup>, Emyr S. Peña-Marín<sup>1,3</sup>, Rafael Martínez-García<sup>1</sup>, Mario A. Galaviz<sup>2</sup>, Lus M. López<sup>2</sup>, Raul Llera-Herrera<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Acuicultura Tropical, División Académica de Ciencias Biológicas, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco (UJAT), Carretera Villahermosa-Cárdenas s/n, Km 0, C.P. 86039 Villahermosa, Tabasco, Mexico.

<sup>2</sup>Universidad Autónoma de Baja California (UABC), Facultad de Ciencias Marinas, Carretera Tijuana-Ensenada 3917, Playitas, C.P. 22860, Ensenada, B.C., Mexico

<sup>3</sup>Cátedra Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, CDMX C.P. 03940, Mexico.

<sup>4</sup>Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Cap. Joel Montes Camarena, Cerro del Vigía, 82040 Mazatlán, Sinaloa, Mexico.

\*Corresponding author: alvarez\_alfonso@hotmail.com

### **Abstract**

Five experimental diets with different carbohydrates / lipid ratio (CHO:L, 0.75, 1.28, 2.10, 2.52, 4.63) were formulated. Fish were randomly assigned by triplicate (10 fish per tank,  $0.50 \pm 0.01$  g). Growth was registered every 15 days until end of the experiment (45 days). Samples were taken for analysis of chemical carcass composition, blood chemistry,

glycogen and lipid liver content, digestive and metabolic enzyme activities. Results showed that survival, growth performance parameters and plasma glucose were not affected by treatments ( $P > 0.05$ ). Lipids of carcass and liver, as well as triglycerides and plasma cholesterol increase significantly as CHO:L ratio decreased. While an inversely proportional tendency was observed for carcass protein and liver glycogen ( $P < 0.05$ ). Digestive enzymes did not show significant differences among treatments ( $P > 0.05$ ). Finally, Hexokinase (HK), glucokinase (GK), phosphoenol pyruvate carboxykinase (PEPCK) and fructose-1,6-biphosphate (FBPase) showed high regulation by carbohydrates up to the CHO:L ratio of 2.10 ( $P < 0.05$ ), while pyruvate kinase (PK) activity was not significantly affected by the CHO:L ratio. By the other side, glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) tends to significantly increase as the CHO:L ratio increases. We conclude that *A. tropicus* fry have a high capacity to utilize carbohydrates substituting lipids as energy source in balanced diets.

**Key words:** Ancient fish; carbohydrates; cornstarch; gluconeogenesis; glycolysis; lipids

## 1 Introduction

A general trend in aquaculture industry is to optimize the use of nutrients in diets through other energy sources. Although it is a widely accepted fact that fish do not have a specific carbohydrate requirement, their use in elaboration of fish diets provides usable energy by optimizing the use of protein and dietary lipids, especially in herbivorous and omnivorous fish (Hemre, Mommsen, & Kroghdahl, 2002; Kroghdahl, Hemre, & Mommsen, 2005; Stone, 2003). In this regard, lipids are a major source of energy for fish, and at the same time,

providing them with the required fatty acids for proper growth and health conditions (Torfi Mozanzadeh, Yavari, Marammazi, Agh, & Gisbert, 2017). However, diets with high lipids levels may have adverse effect on immune response and disease resistance of fish (Dias et al., 2004). On the other hand, carbohydrates have advantage of being three to five times cheaper ingredients than proteins and lipids, they reduce the amount of nitrogen from effluents of farms and they help in the pellet binding, stability and buoyancy (Krongdhal, Hemre, & Mommsen, 2005). However, the capacity of fish to use carbohydrates depends on several factors, which can be grouped into biological, nutritional and environmental (Kamalam, Medale, & Panserat, 2017). An excess of dietary carbohydrates can generate problems in fish health such as prolonged hyperglycemia, decreased growth and in some cases increased glycosilated haemoglobin, retinopathy, hepatic steatosis and insulin resistance (Barma, Dey, Basu, Roy, & Bhattacharya, 2006; Gleeson, Connaughton, & Arneson, 2007; Prisingkorn et al., 2017).

Most of the studies related to the use of carbohydrates and their effect on metabolism in fish have been made in teleosts. In this context, tropical gar (*Atractosteus tropicus*), is a freshwater fish species belonging to Lepisosteidae family, a clade classified as holeostei (infraclass) that diverged during the Mesozoic before the Teleosts Genome Duplication (TGD) (Wiley & Schultze, 1984). The genome of spotted gar (*Lepisosteus oculatus*) was recently described and it was pointed out that gars could be used as an ancestral model of the function of genes and their implications in evolution, development and physiology of teleosts and tetrapods (Braasch et al., 2016).

Tropical gar has been described, morphologically and physiologically, as a carnivorous species in early stages (Reséndez & Salvadores, 1983; Frías-Quintana et al., 2015).

Additionally, it was recently reported that larvae of *A. tropicus* are able to improve their growth by replacing cellulose with cornstarch in formulation of their diets (Frías-Quintana, Domínguez-Lorenzo, Álvarez-González, Tovar-Ramírez, & Martínez-García, 2016). Also, favorable results in growth and survival were observed when adding potato starch to replace part of dietary protein (Frías-Quintana et al., 2017). Considering the above mentioned, it is unknown the effect of metabolism with the inclusion of dietary carbohydrates in lepisosteids. Thus, the objective of this study was to determinate the effect of different dietary carbohydrate to lipid ratios in diets for *A. tropicus* fry on growth performance, proximate composition, plasma biochemical parameters, digestive and hepatic enzyme activities.

## **2 Materials and methods**

### **2.1 Fish culture**

Tropical gar fry were obtained from the broodstock of the Laboratorio de Acuicultura Tropical, División Académica de Ciencias Biológicas, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Mexico. Once the larvae started free swimming, they were transferred to 70 L circular tanks. Fish were acclimated to a pelleted diet by a co-feeding regime with *Artemia* (nauplii and frozen adults) and a basal diet which was denoted as D1 (Table 1; Frías-Quintana, Álvarez-González, & Márquez-Couturier, 2010), until 17 days post-hatching (DPH) (Márquez-Couturier et al., 2006), then they only fed with the basal diet (Carbohydrate: Lipid, CHO:L ratio of 0.75) until the beginning of the experiment (30 DPH).

### **2.2 Experimental design and food preparation**

For this study a simple factor was designing to evaluate the effect of dietary CHO:L ratio in *A. tropicus* fry. Control diet was formulated according the protein, lipid and energy requirement (Márquez-Couturier et al., 2006), also we modified the diet considering the formulation proposed by Frías-Quintana et al. (2016) using fish meal as the main protein source with any addition of carbohydrates (Diet 1, 0.75 CHO: Lipid ratio). The other experimental diets were designed with gradual increments of 25% pregelatinized cornstarch, while the added lipids were reduced by 25% (Table 1). As a result, five isonitrogenous practical diets were prepared with different carbohydrate to lipid ratios (0.75, 1.28, 2.10, 2.52, and 4.63 respectively), and the gradually reduction of the gross energy content (19.6, 18.6, 18.2, 18.0 and 17.2 MJ Kg<sup>-1</sup> respectively). Each diet was assigned to three tanks in a completely randomized design. Diets were formulated using Mixit-Win V.5 software (San Diego, CA). Fish meal and fish hydrolysate were used as the main protein sources, whereas fish oil and soybean lecithin were used as main lipid sources, and using pregelatinized cornstarch as main digestible carbohydrates source, according to results obtained by Frías-Quintana et al. (2016) (Table 1). All dry ingredients were finely ground, then the macronutrients were mixed for 15 min, to this mixture was added vitamins and minerals and mixed for 15 min more. The liquid ingredients were added slowly and mixed for another 15 min, finally distilled water was added and mixed for 15 min more. The diets were pelleted and then dried at 50° C for 10 h, finally broken-up and sieved at 1mm. Subsequently; they were stored at -20° C. Fish were hand-fed to apparent satiation four times per day (8:00, 11:00, 14:00 and 17:00) for 45 days. Feed consumption was recorded for each experimental unit everyday.

### 2.3 Experimental facility and growth performance

Growth trial was conducted in an indoor recirculating freshwater system supplied with mechanical and biological filters and aeration in the main reservoir, temperature was maintained at  $28.9 \pm 1.2^\circ \text{C}$  under natural photoperiod (12:12). During the feeding trial, water quality parameters were monitored daily, water pH was  $8.0 \pm 0.4$  (pH pen meter ST10, Ohaus, Parsippany, NJ), dissolved oxygen  $5.1 \pm 0.5 \text{ mg L}^{-1}$  (DO instrument, YSI 55-12FT, Yellow Springs, OH) nitrite and ammonium  $0.19 \pm 0.13 \text{ mg L}^{-1}$  (Ammonia Test Kit, Mars Fishcare, Chalfont, PA). At the beginning of trial, 150 fry were allocated to 15 circular tanks of 70-L of volume, each tank stocked with 10 fish, 30 fish per treatment (initial body weight average  $0.50 \pm 0.01 \text{ g}$ ).

Length and body weight of all individuals was statistically analyzed to ensure that there were no statistically significant differences. All fish from each experimental unit were counted to estimate survival and weighed and measured (total length) individually each two weeks during the experiment.

#### 2.4 Sample collection

At the end of growth trial, all fish from each experimental unit were weighed individually.

To avoid that stress for manipulation of fish influenced the biochemical parameters of plasma, they were returned to their respective tanks and fed for an additional day.

Afterward, fish were fasted for 24 h, and they were anesthetized with clove oil ( $0.1 \text{ mL L}^{-1}$ ). Three fish from each tank were randomly selected. Blood sample was collected from the caudal vein using syringes contained EDTA ( $342 \text{ mmol L}^{-1}$ ) as anticoagulant and were immediately centrifuged at  $10\,000 \times g$  for 1 min; plasma samples were immediately analyzed for biochemical parameters. Fish still anesthetized were sacrificed by decapitation by trained personnel (NOM-062-ZOO-1999, from Mexico) then were rapidly dissected on

ice to obtain liver and intestines samples for analysis of digestive and metabolic enzyme activities. Three other fish from each experimental unit were anesthetized, slaughter and dissected, in the same way as previously explained, for the calculation of viscerosomatic and hepatosomatic indexes, as well as for proximal analysis of carcasses and livers.

#### 2.5 Growth and food quality indexes

In order to evaluate fish performance, following parameters were calculated: Survival (S as percentage) =  $100 [(Final\ fish\ number) / (Initial\ fish\ number)]$ . Weight gain (WG as percentage) =  $100 [(final\ mean\ body\ weight - initial\ mean\ body\ weight) / initial\ mean\ weight]$ . Specific growth rate (SGR as percentage of body weight gain per day) =  $100 (Ln\ final\ mean\ body\ weight - Ln\ initial\ mean\ body\ weight) / days$ . Feed conversion ratio (FCR) =  $(individual\ dry\ feed\ intake) / (individual\ wet\ weight\ gain)$ . Condition factor (K as percentage) =  $100 [final\ mean\ body\ weight\ (g) / standard\ length\ (cm)^3]$ .

#### 2.6 Hepatosomatic and viscerosomatic indexes

Whole fish, viscera and livers from three fish of each experimental unit were weighed for calculation of viscerosomatic index (VSI) =  $100 [(viscera\ weight) / (fish\ weight)]$  and hepatosomatic index (HSI) =  $100 [(liver\ weight) / (fish\ weight)]$ . The dressed carcasses were frozen and lyophilized for proximal chemical analysis. Livers and intestines of each fish were separated and immediately frozen and kept at -80°C until analyses for enzymatic activities, hepatic glycogen and lipid content.

#### 2.7 Proximate composition analysis of experimental diets

Proximate composition of experimental diets and carcass were determined according to Association of Official Analytical Chemist procedures (AOAC, 2000). Dry matter after

drying samples at 105°C for 24 h. Total ash content was determined by gravimetry after combustion at 550°C for 8h. Crude protein by Kjeldahl method using an automatic distillation system VAPODEST 10s, Gerhardt and automatic titration system TitroLine® 5000, SI Analytics. Lipids of diets, carcass and liver were determined by chloroform-methanol extracted as previously described by Folch, Lees, and Sloan Stanley (1957). Starch was determined in experimental diets by the gluco-amylase glucose oxydase method (Thivend, Mercier, & Guilbot, 1972).

## 2.8 Plasma and liver assays

Plasma metabolites were analyzed using commercial kits (Pointe Scientific, Canton, MI) adapted to a microplate (xMark™ Microplate Absorbance Spectrophotometer, Bio-Rad, Hercules, CA). Glucose in plasma was determined by glucose oxidase method, triglycerides by enzymatic reaction using glycerol phosphate oxidase, cholesterol was determined using cholesterol esterase and cholesterol oxidase, and albumin by Bromocresol Green method. Frozen liver samples were minced on a chilled petri dish into small pieces and divided into two different aliquots to assess enzyme activities and glycogen. Hepatic glycogen was evaluated using 50 mg of frozen liver tissue. Individual samples were homogenized by ultrasonic disruption with 7.5 vols of 600 mmol L<sup>-1</sup> perchloric acid (chilled) and then neutralized using 1 M potassium bicarbonate. The homogenate was centrifuged at 1000 × g for 10 min at -4 °C. Liver glycogen levels were measured using the Keppler and Decker (1974) method. Glucose obtained after glycogen breakdown was determined with a commercial kit (Pointe Scientific, Canton, MI). Hepatic fat content was determined by crude lipids determination (CL) where fat in the tissues were extracted after 12 h of

homogenization with dichloromethane-methanol (2:1 v:v) followed by separation and vacuum drying in 2 mL of chloroform, and quantified gravimetrically (Folch et al., 1957).

### 2.9 Intestinal enzyme activities

Three intestines from each experimental unit were homogenized in a pool with ice-cold buffer cold buffer 50 mmol L<sup>-1</sup> Tris-HCl, 25 mM CaCl<sub>2</sub> (pH 7.5) using an Ultra-Turrax IKA T18 basic tissue homogenizer. The homogenate was centrifuged at 16,000 × g for 15 min at -4 °C, resultant supernatant was separate and preserved in aliquots at -80 °C.

Alkaline proteases activity was determinate according to Walter (1984) using Hammarsten-grade casein 0.5% in buffer (100 mmol L<sup>-1</sup> Tris-HCl; 10 mmol L<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub>, pH 9); one unit of activity was defined as 1 µg of tyrosine released per minute at Abs<sub>280</sub>. Lipase activity was measure as previously described by Versaw, Cuppett, Winters, and Williams, (1989) but using β-naphthyl acetate 100 mmol L<sup>-1</sup> as substrate; one unit of activity was defined as 1 µg de naphthol released per minute at 540 nm. α-amylase activity (EC 3.2.1.1) was determined by the method of Robyt and Whelan (1968) using soluble starch (2%) in a buffer (100 mmol L<sup>-1</sup> citrate-phosphate; 50 mmol L<sup>-1</sup> NaCl, pH 7.5), one unit of amylase was defined as the amount of enzyme to produce 1 µmol L<sup>-1</sup> of maltose per minute at 600 nm. All enzyme activities were expressed per mg of protein. Protein concentration was determined according to Bradford (1976) using a standard curve with bovine seric albumin (BSA). All assays were performed in triplicate.

### 2.10 Hepatic enzyme activities

A frozen sample of liver (500 mg) was homogenized in a Potter-Elvehjem homogenizer with 9 vols of an ice- cold buffer 50 mmol L<sup>-1</sup> Tris (pH 7.6), 5 mmol L<sup>-1</sup> EDTA, 2 mmol L<sup>-1</sup> 1,4 dithiothreitol (DTT), and a commercial protease inhibitor cocktail (AEBSF 2 mmol L<sup>-1</sup>,

aprotinin  $0.3 \mu\text{mol L}^{-1}$ , bestatin  $116 \mu\text{mol L}^{-1}$ , E-64  $14 \mu\text{mol L}^{-1}$ , leupeptin  $1 \mu\text{mol L}^{-1}$  and EDTA  $1 \text{mmol L}^{-1}$ ) (Conde-Sieira, Soengas, & Valente, 2015). The homogenate was centrifuged at  $900 \times g$  for 10 min, and resultant supernatant was separated and divided in two aliquots. One aliquot was used for measurement of hexokinase (EC 2.7.1.1; HK), glucokinase (EC 2.7.1.2; GK), fructose-1, 6-biphosphatase (EC 3.1.3.11; FBPase) and glucose-6-phosphate dehydrogenase (EC 1.1.1.49; G6PD) activities. The second aliquot was centrifuged at  $10\,000 \times g$  for 20 min, the resultant cytosolic fraction was used for measure pyruvate kinase activity (EC 2.7.1.40; PK) (Kirchner, Kaushik, & Panserat, 2003). The HK and GK activities were measured using  $50 \text{mmol L}^{-1}$  imidazole (pH 8),  $7 \text{mmol L}^{-1}$  ATP,  $5 \text{mmol L}^{-1}$   $\text{MgCl}_2$ ,  $2 \text{mmol L}^{-1}$  NADP,  $0.15 \text{U mL}^{-1}$  G6PD,  $0.1 \text{U mL}^{-1}$  6-phosphogluconate dehydrogenase and  $1 \text{mmol L}^{-1}$  of glucose (except the controls) (Borrebaek & Waagbo, 1993; Sangiao-Alvarellos et al., 2003; Tranulis, Dregni, Christophersen, Krogdahl, & Borrebaek, 1996).

FBPase was assessed using  $85 \text{mmol L}^{-1}$  imidazole (pH 7.7),  $0.5 \text{mmol L}^{-1}$  NADP,  $5 \text{mmol L}^{-1}$   $\text{MgCl}_2$ ,  $2 \text{U mL}^{-1}$  G6PD,  $2 \text{U mL}^{-1}$  phosphoglucose isomerase, and  $1 \text{mmol L}^{-1}$  fructose-1, 6-biphosphate (except the controls) (Sangiao-Alvarellos et al., 2003).

G6PD activity was assayed using  $78 \text{mmol L}^{-1}$  imidazole (pH 7.7),  $5 \text{mmol L}^{-1}$   $\text{MgCl}_2$ ,  $0.5 \text{mmol L}^{-1}$  NADP,  $1 \text{mmol L}^{-1}$  glucose-6-phosphate (except the controls) (Sangiao-Alvarellos et al., 2003).

In order to measure the phosphoenol pyruvate carboxykinase activity (EC 4.1.1.32; PEPCK) a piece of liver tissue (500 mg) was homogenized with 10 vols of ice-cold buffer ( $10 \text{mmol L}^{-1}$  4-(2-hydroxyethyl) piperazine-1-ethanesulfonic acid,  $250 \text{mmol L}^{-1}$  saccharose,  $1 \text{mmol L}^{-1}$  DTT). The homogenate was centrifuged at  $900 \times g$  for 10 min, the

resultant supernatant was centrifuged at  $10\,000 \times g$  for 20 min. The cytosolic phase was recovered and frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$  until analysis of enzymatic activity (Kirchner et al., 2003). The activity of PK was measured as previously described by Laiz-Carrión, Martín Del Río, Míguez, Mancera, & Soengas (2003) using in a final volume  $50\text{ mmol L}^{-1}$  imidazole-HCl (pH 7.4),  $5\text{ mmol L}^{-1}$   $\text{MgCl}_2$ ,  $100\text{ mmol L}^{-1}$  KCl,  $0.15\text{ mmol L}^{-1}$  NADH,  $1\text{ mmol L}^{-1}$  ADP,  $2\text{ mmol L}^{-1}$  PEP (except the controls) and 2 U of lactate dehydrogenase. PEPCk activity was determined using  $50\text{ mmol L}^{-1}$  Tris-HCl (7.5),  $1\text{ mol L}^{-1}$   $\text{MnCl}_2$ ,  $20\text{ mmol L}^{-1}$   $\text{NaHCO}_3$ ,  $0.3\text{ mmol L}^{-1}$  NADH,  $1.5\text{ mmol L}^{-1}$  PEP, 2 U malate dehydrogenase, and  $0.2\text{ mmol L}^{-1}$  deoxyguanosine 5'-diphosphate (dGDP, omitted for controls) (Petrescu et al., 1979; Polakof, Míguez, & Soengas, 2008).

All enzyme activities were determined using an xMark™ Microplate Absorbance Spectrophotometer (Bio-Rad, Hercules, CA). Reaction rates of enzymes were determined at  $37^{\circ}\text{C}$  by the increased or decreased in absorbance of NAD(P)H at 340 nm. All enzyme activities were expressed per mg of hepatic soluble protein. Protein concentration of each type of enzyme extract were determined using the Quick Start™ Bradford protein assay (Bio-Rad, Hercules, CA) and a standard curve with bovine serum albumin (BSA), according to Bradford (1976). All assays were performed in triplicate.

### 2.11 Statistical analysis

Data were statistically analyzed by one-way ANOVA, previously verified the assumptions of normality (Kolmogorov-Smirnov test) and homoscedasticity (Levine test). Where significant differences were found applying a Tukey test. Analyses were performed with the statistical software Statistica™ v.8.0 (Statsoft, Inc., Tulsa, OK) using a significance value of  $P < 0.05$ . The results were presented as Mean  $\pm$  Standard Deviation, SD.

### 3 Results

#### 3.1 Growth performance, feed utilization and survival

In the present study, growth performance (FBW, WG, SGR and K) and feed utilization (FI, FCR) did not show significant differences among diets. The survival of fish ranged from 80 to 96% without statistical differences between treatments ( $P > 0.05$ ) (Table 2).

#### 3.2 Hepatosomatic and viscerosomatic indexes

HSI was significantly influenced by the dietary CHO:L ratios, where the highest index was obtained in fish fed a CHO:L ratio of 2.10, which was not significantly different from those of 1.28 and 2.52 (Table 3), although higher than those fed with ratios of 0.75 and 4.63 ( $P < 0.05$ ). By the other side, VSI was not significantly different among treatments.

#### 3.3 Dressed carcass and liver composition

Proximate composition of dressed carcass and liver of *A. tropicus* fry are show in table 4.

Crude lipid content of carcass significantly decreased with dietary CHO:L ratios increasing from 2.10 to 4.63 ( $P < 0.05$ ), where the highest lipid content is observed in fish fed a CHO:L ratio of 4.63. No significant differences were observed in moisture, ash and protein content of carcass among dietary treatments.

The amount of lipids in the liver was significantly higher in fish fed with CHO:L ratios of 0.75, without showing differences with the fish that received the CHO:L ratio of 1.28; and tended to decrease according to CHO:L ratio increase ( $P < 0.05$ ). On the contrary, hepatic glycogen showed an opposite trend, so that fish fed a CHO:L ratio of 0.75 had a liver glycogen concentration significantly lower than those of the other groups ( $P < 0.05$ ).

#### 3.4 Plasma biochemical composition

Cholesterol and triglycerides were markedly affected by CHO:L ratios (Table 5). Lowest cholesterol and triglycerides concentrations were observed in fish fed a CHO:L ratio of 4.63, and they were significantly different from those fed CHO:L ratios of 0.75, 1.28 and 2.10 ( $P < 0.05$ ). Albumin and glucose did not show any significant difference among dietary treatments ( $P > 0.05$ ).

### 3.5 Intestinal enzyme activities

Proteases, lipases and  $\alpha$ -amylase activities didn't showed differences among treatments ( $P > 0.05$ ). However,  $\alpha$ -amylase and lipase activities showed a tendency to increase as the CHO:L ratio increased (Table 6).

### 3.6 Hepatic enzyme activities

Except for PK, hepatic enzyme activities were markedly affected by experimental diets (Table 7). GK and HK activities increased as dietary CHO:L ratios increased from 0.75 to 2.10 but decreased significantly ( $P < 0.05$ ) with the further increasing CHO:L ratios (2.52 and 4.63); whereas the opposite was true for PEPCK. FBPase showed the same pattern of PEPCK but the lowest enzymatic activity was observed in fish fed a CHO:L ratio of 2.53. Hepatic PK enzyme showed little difference among all the treatments ( $P > 0.05$ ). On the other hand, G6PD activity increased significantly as dietary CHO:L ratios increased ( $P < 0.05$ ).

## 4 Discussion

*Atractosteus tropicus* has been described as carnivore species (Reséndez & Salvadores, 1983; Frías-Quintana et al., 2015); however, our results in terms of growth performance parameters indicated that the replacement of lipids by dietary carbohydrates in diets did not

significantly affect fish performance. Even though, it is possible to observe a slight tendency to WG and SGR increase as CHO:L ratio increases from 0.75 to 2.10 and then decrease towards higher levels of carbohydrate inclusion.

In this regard, it is known that a high energy intake in the diet decreases the feed intake, which has negative effects on growth due to the reduction in the consumption of nutrients, such as proteins (Borba, Fracalossi, & Pezzato, 2006). In the present investigation, gross energy was greater as the CHO: L ratio decreased. Although our results did not show significant differences with respect to food consumption, it was possible to observe a trend towards a decrease in food consumption in the diets with the highest energy content. (CHO:L ratios of 0.75 and 1.28), while in the CHO: L ratio of 2.10 the feed intake increased, which coincides with the trend observed in the WG.

On the other hand, it must be taken into account that of the gross energy contributed by the food only a part is absorbed by the organism (digestible energy) and a part of the assimilated energy (metabolizable energy) is lost in several biological processes such as digestion and excretion (Kaushik & Seiliez, 2010). Our results indicate that the diet 3 (22.5% of carbohydrates and 10.7% of lipids content) had the right balance in terms of energy input for growth and less loss due to the use of nutrients, which agrees with the results of Frías-Quintana et al., (2017, 2016) about the use of starch as a non-protein energy resource to improve growth in *A. tropicus*, however, more studies are required that deepen the use of these nutrients and energy metabolism in the tropical gar.

Similarly, it is likely that the decrease in growth observed in the CHO: L ratios of 2.52 and 4.63, it is due to the decrease in the supply of essential fatty acids that the increase of carbohydrates in the diet. In this regard, it is widely known that lipids, in addition to

providing energy, also provide fatty acids that play important roles in physiological processes such as growth, food efficiency, immune response and health conditions, especially during the larval stage (Tocher, 2003; Tocher, Bendiksen, Campbell, & Bell, 2008).

In the present study, survival was not affected by the experimental diets, this varied from 80 to 96%, which agreed with previous studies in tropical gar such as Frías-Quintana et al. (2016) who reported survival of 97.8% and decreased cannibalism when using diets contained 15% of corn starch instead of cellulose. Likewise, Huerta-Ortiz et al. (2009) who reported a survival between 56 and 86% in a study about the substitution of fish oil by vegetable oil. On the other hand, the lipid content of carcass significantly decreased with the increase of dietary CHO:L ratios from 2.10 to 4.63, this indicates that lipids for *A. tropicus* play a major role in the deposition of lipids in the whole body in comparison with carbohydrates, which is consistent with reported in other fish species such as Senegalese sole (*Solea senegalensis*) (Dias et al., 2004), grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) (Gao et al., 2010), *R. quelen* (Moro, Camilo, Moraes, & Fracalossi, 2010), yellow croaker (*Larmichthys crocea*) (Zhou, Wang, Xie, Deng, & Zhou, 2016) and Brazilian sardine (*Sardiniella braziliensis*) (Sterzelecki et al., 2017). Moreover, in *A. tropicus* there was also no significant variation in carcass protein content; however, studies in red drum (*Sciaenops ocellatus*) (Ellis & Reigh, 1991), Asian seabass (*Lates calcarifer*) (Catacutan & Coloso, 1997), *M. amblycephala* (Li, Wang, Liu, Jiang, & Zhu, 2013) and golden pompano (*Trachinotus ovatus*) (Zhou et al., 2015) reported an increase in protein content as the CHO:L ratio increased, which was only attributed to the inverse relationship between lipid

and protein content of tissues that is often observed when this data are expressed as a percentage of dry weight (Ellis & Reigh, 1991).

In our study, HSI of the fish fed with CHO:L ratio of 2.10 was significantly higher than fish that received the diets with CHO:L ratios of 0.75 and 4.63. Concerning this, liver proximal composition showed a significantly lower deposition of hepatic glycogen in fish that received the cornstarch free diet (diet 0.75) with respect to the fish feed diets contained higher CHO:L ratio (2.10, 2.52 and 4.53). Contrary, the level of liver fat decreases as CHO:L ratio increase. Then, the highest HSI observed in the fish that were fed with CHO:L ratio diet of 2.10 shows the effect of both energy reserves accumulation (fat and glycogen) in the liver. Considering the above mentioned, HSI tends to decrease toward the CHO:L ratio of 0.75 because of the lower content of glycogen, while it also decreases towards the CHO:L ratio of 4.63 due to the lower accumulation of lipids. This indicates that *A. tropicus* fry can better use lipids than dietary carbohydrates for lipid accumulation.

Regarding blood chemistry analysis, plasma glucose levels after 24 hours of fasting did not show significant differences among treatments, which agree with Zhou et al. (2016) where the absorption of glucose released by digestion is very efficient and allows the increase of blood glucose in most of fish. However, the intensity of blood glucose peak and its duration are species-specific and condition the tolerance of each species to carbohydrates (Moon, 2001). Many fish species (mainly carnivores) tend to exhibit a persistent postprandial hyperglycemia after a meal high in carbohydrates (Hemre et al., 2002). Nevertheless, the glucose tolerance test in *A. tropicus* showed that after an intraperitoneal injection of 1.2 g kg<sup>-1</sup> dextrose, the basal glucose level is recovered in less than 10 h (unpublished data). This is in agreement with our results, which suggest that *A. tropicus* fry have a capacity to

metabolize glucose faster than other carnivorous fish species such as *S. brasiliensis* (Sterzelecki et al., 2017).

Accordance to our results, plasma triglyceride and cholesterol levels were significantly increased as CHO:L ratio decreased, this coincides with that reported for yellowfin seabream (*Sparus latus*) (Hu et al., 2007), *C. idella* (Gao et al., 2010), *L. crocea* (Zhou et al., 2016) and *O. niloticus* (Xie et al., 2017). Plasma profiles reflect the general metabolism and physiological status of tissues, especially the liver, therefore, the increase in plasma triglycerides and cholesterol is attributed to active lipid transport in response to a high level of dietary fat (Xie et al., 2017).

Another important aspect has been detected in digestive enzyme activities; for instance, proteases, lipases, and amylases are secreted in digestive system, usually in response to dietary protein, lipid and carbohydrate content (Buddington & Krogdahl, 2004). In this context, alfa-amylase activity generally correlates positively with dietary carbohydrate level (Polakof, Panserat, Soengas, & Moon, 2012); however, this ability to secrete more  $\alpha$ -amylase for dietary polysaccharides hydrolysis seems to be more efficient in herbivorous and omnivorous species, while in carnivorous species such as rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) this digestive enzyme is not efficiently expressed, which provokes adverse effects when high levels of carbohydrates are incorporated into the diet (Krogdahl, Hemre, & Mommsen, 2005). In the case of lipase activity regarding to the inclusion of carbohydrates, the response is variable, since species such as *C. idella* and *L. crocea* showed a decrease in lipase activity as CHO:L ratio increases (Gao et al., 2010; Zhou et al., 2016) while in *S. brasiliensis* the activity tends to increase in accordance to CHO:L ratio (Sterzelecki et al., 2017).

Previous studies on *A. tropicus* larvae described a significant increase in  $\alpha$ -amylase activity as dietary carbohydrates increase (Frías-Quintana et al., 2017, 2016). In our research, the same trend was observed, although there are no significant differences between treatments. We consider that  $\alpha$ -amylase activity increases in fish fed with CHO:L ratios from 0.75 to 2.52 in response to the increase of cornstarch in their diet. Then, the activity decreases in the CHO:L ratio of 4.63 because the excess of carbohydrates in diet (28.94%), coupled with the pelleting process produced harder pellets that resisted longer the digestive disintegration by the gastrointestinal tract transit (personal observation). In agreement with our results, Sørensen (2012) indicates that there is a moderate but positive correlation between amount of purified wheat starch inclusion and the durability and hardness of the pellet. This author also describes that higher water stability of pellets results in longer gastric retention time and prolonged evacuation time of chyme through the gastrointestinal tract. Furthermore, pellets that were too hard caused digestive disturbances in the fish.

Our study showed an increase in lipase activity as the CHO:L ratio increases, this deal with results obtained by Frías-Quintana et al. (2017, 2016) despite the fact that in these authors used isolipidics diets. Therefore, the increase in lipase activity is due to the reduction of lipids in diets, in addition to the hardness of the pellet, particularly in the D5 (4.63 CHO:L ratio). However, further studies are needed to evaluate the effect of ingredients composition and processing conditions on physical characteristics of diets and how this affects the digestibility and availability of nutrients.

Considering the above-mentioned, liver plays an important role in the regulation of intermediary metabolism in response to nutritional status. Under aerobic conditions, glucose is catabolized by means of glycolysis, Krebs cycle and respiratory chain to produce

ATP or via the pentose phosphate pathway to generate nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP). The excess can be stored as glycogen (glycogenesis) or lipids (lipogenesis). While, under fasted conditions, the lack of glucose is satisfied by means *de novo* synthesis from pyruvate, lactate, glycerol and some amino acids (gluconeogenesis) or by means of the degradation of glycogen into glucose (glycogenolysis) (Polakof et al., 2012; Rui, 2014).

For this reason, an adequate regulation of these pathways is necessary to maintain glucose homeostasis. These mechanisms are regulated in herbivorous such as common carp (*Cyprinus carpio*) (Shimeno, Kheyyali, & Shikata, 1995) or omnivores such as *O. niloticus* (Chen et al., 2017). However, in carnivorous fish such as gilthead seabream (*Sparus aurata*) (Enes, Panserat, Kaushik, & Oliva-Teles, 2011), perch (*Perca fluviatilis*) (Borrebaek & Christophersen, 2000), *O. mykiss* (Kirchner, Panserat, Lim, Kaushik, & Ferraris, 2008; Panserat, Capilla, et al., 2001; Panserat, Plagnes Juan, Breque, & Kaushik, 2001), European seabass (*Dicentrarchus labrax*) (Enes, Panserat, Kaushik, & Oliva-Teles, 2006; Enes et al., 2011) and *L. crocea* (P. Zhou et al., 2016), have been shown a low inhibition of hepatic gluconeogenesis related to the inclusion of carbohydrates in their diet, both at molecular level and enzymatic activity (Enes, Panserat, Kaushik, & Oliva-Teles, 2009). Furthermore, in rainbow trout (*O. mykiss*) it has been shown that the activity of key enzymes in gluconeogenesis (PEPCK, FBPase and G6Pase) are regulated by amino acids (Kirchner et al., 2003) and could be modify by starvation (Kirchner et al., 2008). The absence of gluconeogenesis inhibition induced by carbohydrates is a hypothesis for postprandial hyperglycemia and the poor use of carbohydrates in carnivorous fish. On the contrary, our results showed that *A. tropicus* fry, increases glycolytic enzyme activity for HK and GK as

a response of the inclusion of carbohydrates ranged 13.8 to 22.5% (CHO:L ratios of 0.75 to 2.10) while gluconeogenic enzymes (PEPCK and FBPase) showed the opposite tendency. This confirms an efficient regulation of metabolic pathways, glycolysis and gluconeogenesis, by dietary carbohydrates for this species. For example, a carbohydrate level above 25% (CHO:L ratio of 2.52) causes a greater activity of gluconeogenic enzymes and decrease in the activity of glycolytic enzymes. This effect is also observed in plasma glucose concentration, since it tends to rise in the fish fed the diets with CHO:L ratio of 2.52 and 4.63, although not significantly with respect to the other experimental groups. It is likely that this failure in the regulation of metabolic pathways in the fish that received diets with highest carbohydrate content out because a possible liver malformation due to an excessive accumulation of glycogen, as has been described for *O. mykiss* (Hemre et al., 2002) although further studies are required to clarify this issue.

Additionally, PK is another key glycolytic enzyme, although it has been accepted that this enzyme has a nutritional regulation, although in some fish species its regulation by carbohydrates is still controversial (Enes et al., 2009; Kamalam et al., 2017). In our investigation with *A. tropicus* fry, no effect of dietary carbohydrate intake on liver PK activity was observed, this is in accordance with previous studies carried out in *O. mykiss* (Fideu, Soler, & Ruiz-Amil, 1983; Hilton & Atkinson, 1982; Skiba-Cassy et al., 2013; Suarez, Sanz, Bazoco, & Garcia-Gallego, 2002), *S. senegalensis* (Conde-Sieira et al., 2015; Dias et al., 2004) and *S. aurata* (Enes, Panserat, Kaushik, & Oliva-Teles, 2008). However, an effect has been observed in PK activity dependent on the type of carbohydrate supplied. In European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) was observed a higher induction of liver PK by glucose than by starch, whereas in gibel carp (*Carassius auratus*) and Chinese longsnout

catfish (*Leiocassis longirostris*) PK was significantly higher in fish fed diets containing sucrose than glucose, dextrin or starch. In *C. carpio* the protein substitution by 30% of starch, glucose or fructose had no effect on hepatic PK activity, but 30% of galactose depressed PK activity. On the other hand, the starvation in species such as *O. mykiss* and *S. aurata* cause a significant decrease in PK activity (Enes et al., 2009).

Meanwhile, lipogenesis is not directly linked to carbohydrate metabolism; this pathway plays an important role in homeostasis because it converts excess glucose into fatty acids. In this sense, glucose entering exogenously can activate lipogenesis by generating carbon backbones or reduced form of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH), the key-reducing co-factor generated by the oxidative branch of the pentose phosphate pathway. The enzymes responsible for catalyzing the reactions to generate NADPH are G6PD and 6-phosphogluconate dehydrogenase (Rui, 2014). However, studies in fish using radiolabeled glucose indicate that carbohydrates appear to stimulate lipid biosynthesis by increasing the availability of cytosolic reducing equivalents, like NADPH, rather than contributing with carbon backbones (Hemre et al., 2002).

Investigations conducted in *O. mykiss* reported that the administration of metformin is associated with an improvement of postprandial hyperglycemia, due to the induction of lipogenesis in the liver (Panserat et al., 2009). This generated the hypothesis that in carnivorous fish the low hepatic lipogenesis can explain, at least in part, the poor glucose homeostasis (Polakof et al., 2012). Furthermore, studies with primary trout hepatocytes revealed that amino acids regulate hepatic fatty acid biosynthetic gene expression more efficiently than carbohydrates (Dai et al., 2016; Dai, Panserat, Plagnes-Juan, Seiliez, & Skiba-Cassy, 2015). In our study with *A. tropicus* fry an increase in G6PD activity was

observed as the CHO:L ratio increased, which agrees with results obtained in *S. senegalensis* (Dias et al., 2004), suggesting the activation *de novo* lipogenesis pathway. This, together with the reduction of gluconeogenesis, previously mentioned, may have contributed to the similar concentrations of plasma glucose regardless of treatment applied. In conclusion, even though tropical gar has been described as a carnivorous fish, our results regarding growth parameters, feed utilization and survival were not affected by varying dietary CHO:L ratios (0.75 - 4.63) when these were tested for 45 days. Likewise, protease, lipase and amylase activities were not affected by diets. However, lipase showed an increase in its activity when the CHO:L ratio was increased, which was attributed to reduction of lipids in diets in addition to the hardness of pellet. Lipid content of carcass and liver, as well as, plasma triglyceride and cholesterol levels were significantly increased as CHO:L ratio decreased, demonstrating that dietary lipids contribute to the accumulation of fat in body and liver while carbohydrates have little contribution in this process. On the other hand, plasma glucose level after 24 h fasted was not affected by dietary CHO:L ratios. However, glycolytic enzyme activities HK and GK were increased in response to dietary CHO:L ratios from 0.75 to 2.10, while gluconeogenic enzymes PEPCK and FBPase showed the opposite tendency. These results show that *A. tropicus* fry have the capacity to adequately metabolize glucose up to a carbohydrate inclusion of 22.5% (CHO:L ratio of 2.10).

### **Acknowledgements**

R. Guerrero-Zárate thanks the Programa para el Desarrollo Profesional Docente (PRODEP) for providing the graduate scholarship. This research was supported by the project SEP-

CONACYT Ciencia Básica “Estudio de la fisiología digestiva en larvas y juveniles de pejelagarto (*Atractosteus tropicus*) con base en técnicas histológicas, bioquímicas y moleculares” No. 282765.

### **Conflict of Interest and Ethical statement**

Conflict of Interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethical approval: “All applicable international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals were followed by the authors.”

### **References**

- AOAC. (2000). Official Methods of Analysis, 17th Edition. *Association of Official Analytical Chemists*.
- Barma, P., Dey, D., Basu, D., Roy, S. S., & Bhattacharya, S. (2006). Nutritionally induced insulin resistance in an Indian perch: A possible model for type 2 diabetes. *Current Science*, 90(2), 188–194. Retrieved from <https://www.jstor.org/stable/24088980>
- Borba, M. R., Fracalossi, D. M., & Pezzato, L. E. (2006). Dietary energy requirement of piracanjuba fingerlings, *Brycon orbignyanus*, and relative utilization of dietary carbohydrate and lipid. *Aquaculture Nutrition*, 12(3), 183–191. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2006.00401.x>
- Borrebaek, B., & Christophersen, B. (2000). Hepatic glucose phosphorylating activities in perch (*Perca fluviatilis*) after different dietary treatments. *Comparative Biochemistry*

*and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, 125(3), 387–393.

[https://doi.org/10.1016/S0305-0491\(99\)00185-6](https://doi.org/10.1016/S0305-0491(99)00185-6)

Borrebaek, B., & Waagbo, R. (1993). Adaptable hexokinase with low affinity for glucose in the liver of Atlantic salmon (*Salmo Salar*). *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, 106(4), 833–836.

[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0305-0491\(93\)90038-7](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0305-0491(93)90038-7)

Braasch, I., Gehrke, A. R., Smith, J. J., Kawasaki, K., Manousaki, T., Pasquier, J., ...

Postlethwait, J. H. (2016). The spotted gar genome illuminates vertebrate evolution and facilitates human-teleost comparisons. *Nature Genetics*, 48(4), 427–437.

<https://doi.org/10.1038/ng.3526>

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)

Buddington, R. K., & Krogdahl, Å. (2004). Hormonal regulation of the fish gastrointestinal tract. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*, 139(3), 261–271. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2004.09.007>

Catacutan, M. R., & Coloso, R. M. (1997). Growth of juvenile Asian seabass, *Lates calcarifer*, fed varying carbohydrate and lipid levels. *Aquaculture*, 149(1–2), 137–144. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(96\)01432-9](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(96)01432-9)

Chen, Y. J., Zhang, T. Y., Chen, H. Y., Lin, S. M., Luo, L., & Wang, D. S. (2017). An

evaluation of hepatic glucose metabolism at the transcription level for the omnivorous GIFT tilapia, *Oreochromis niloticus* during postprandial nutritional status transition from anabolism to catabolism. *Aquaculture*, 473, 375–382.

<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.03.009>

Conde-Sieira, M., Soengas, J. L., & Valente, L. M. P. (2015). Potential capacity of Senegalese sole (*Solea senegalensis*) to use carbohydrates: Metabolic responses to hypo- and hyper-glycaemia. *Aquaculture*, 438, 59–67.

<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.12.042>

Dai, W., Panserat, S., Kaushik, S., Terrier, F., Plagnes-Juan, E., Seiliez, I., & Skiba-Cassy, S. (2016). Hepatic fatty acid biosynthesis is more responsive to protein than carbohydrate in rainbow trout during acute stimulations. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 310(1), R74–R86.

<https://doi.org/10.1152/ajpregu.00281.2015>

Dai, W., Panserat, S., Plagnes-Juan, E., Seiliez, I., & Skiba-Cassy, S. (2015). Amino acids attenuate insulin action on gluconeogenesis and promote fatty acid biosynthesis via mTORC1 signaling pathway in trout hepatocytes. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 36(3), 1084–1100. <https://doi.org/10.1159/000430281>

Dias, J., Rueda-Jasso, R., Panserat, S., Da Conceição, L. E. C., Gomes, E. F., & Dinis, M. T. (2004). Effect of dietary carbohydrate-to-lipid ratios on growth, lipid deposition and metabolic hepatic enzymes in juvenile Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup).

*Aquaculture Research*, 35(12), 1122–1130. <https://doi.org/10.1111/j.1365->

2109.2004.01135.x

- Ellis, S. C., & Reigh, R. C. (1991). Effects of dietary lipid and carbohydrate levels on growth and body composition of juvenile red drum, *Sciaenops ocellatus*. *Aquaculture*, 97(4), 383–394. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(91\)90330-A](https://doi.org/10.1016/0044-8486(91)90330-A)
- Enes, P., Panserat, S., Kaushik, S., & Oliva-Teles, A. (2006). 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 - A Molecular and Integrative Physiology*, 143(1), 89–96. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2005.10.027>
- 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(1), 101–108. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.11.009>
- Enes, P., Panserat, S., Kaushik, S., & Oliva-Teles, A. (2009). Nutritional regulation of hepatic glucose metabolism in fish. *Fish Physiology and Biochemistry*, 35(3), 519–539. <https://doi.org/10.1007/s10695-008-9259-5>
- Enes, P., Panserat, S., Kaushik, S., & Oliva-Teles, A. (2011). Dietary carbohydrate utilization by European Sea Bass (*Dicentrarchus labrax* L.) and gilthead sea bream (*Sparus Aurata* L.) Juveniles. *Reviews in Fisheries Science*, 19(3), 201–215. <https://doi.org/10.1080/10641262.2011.579363>

- Fideu, M. D., Soler, G., & Ruiz-Amil, M. (1983). Nutritional regulation of glycolysis in rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.). *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, 74(4), 795–799. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(83\)90148-7](https://doi.org/10.1016/0305-0491(83)90148-7)
- Folch, J., Lees, M., & Sloan Stanley, G. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry*, 226, 497–509. <https://doi.org/10.1016/j.ultrasmedbio.2011.03.005>
- Frías-Quintana, C., Álvarez-González, C., & Márquez-Couturier, G. (2010). Diseño de microdietas para el cultivo de pejelagarto *Atractosteus tropicus*, Gill 1863. *Universidad y Ciencia*, 26(2), 265–282. Retrieved from <http://www.scielo.org.mx/pdf/uc/v26n3/v26n3a6.pdf>
- Frías-Quintana, C., Álvarez-González, C., Tovar-Ramírez, D., Martínez-García, R., Camarillo-Coop, S., Peña, E., & Galaviz, M. (2017). Use of potato starch in diets of tropical gar (*Atractosteus tropicus*, Gill 1863) larvae. *Fishes*, 2(1), 3. <https://doi.org/10.3390/fishes2010003>
- Frías-Quintana, C., Domínguez-Lorenzo, J., Álvarez-González, C., Tovar-Ramírez, D., & Martínez-García, R. (2016). Using cornstarch in microparticulate diets for larvicultured tropical gar (*Atractosteus tropicus*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 42(2), 517–528. <https://doi.org/10.1007/s10695-015-0156-4>
- Frías-Quintana, C., Márquez-Couturier, G., Alvarez-González, C., Tovar-Ramírez, D., Nolasco-Soria, H., Galaviz-Espinosa, M., ... Gisbert, E. (2015). Development of

digestive tract and enzyme activities during the early ontogeny of the tropical gar *Atractosteus tropicus*. *Fish Physiology and Biochemistry*, 41(5), 1075–1091.

<https://doi.org/10.1007/s10695-015-0070-9>

Gao, W., Liu, Y., Tian, L., Mai, K., Liang, G., Yang, H., ... Luo, W. (2010). Effect of dietary carbohydrate-to-lipid ratios on growth performance, body composition, nutrient utilization and hepatic enzymes activities of herbivorous grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Aquaculture Nutrition*, 16(3), 327–333.

<https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2009.00668.x>

Gleeson, M., Connaughton, V., & Arneson, L. S. (2007). Induction of hyperglycaemia in zebrafish (*Danio rerio*) leads to morphological changes in the retina. *Acta Diabetologica*, 44(3), 157–163. <https://doi.org/10.1007/s00592-007-0257-3>

Hemre, G.-I., Mommsen, T. P., & Kroghdahl, A. (2002). Carbohydrates in fish nutrition: effects on growth, glucose metabolism and hepatic enzymes. *Aquaculture Nutrition*, 8(3), 175–194. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2095.2002.00200.x>

Hilton, J. W., & Atkinson, J. L. (1982). Response of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) to increased levels of available carbohydrate in practical trout diets, 47, 597–607.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1079/BJN19820071>

Hu, Y. -H., Liu, Y. -J., Tian, L. -X., Yang, H. -J., Liang, G. -Y., & Gao, W. (2007). Optimal dietary carbohydrate to lipid ratio for juvenile yellowfin seabream (*Sparus latus*).

*Aquaculture Nutrition*, 13(4), 291–297. [https://doi.org/10.1111/j.1365-](https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2007.00476.x)

[2095.2007.00476.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2007.00476.x)

- Huerta-Ortiz, M., Alvarez-González, C., Márquez-Couturier, G., Contreras-Sánchez, W., Civera-Cerecedo, R., & Goytortúa-Bores, E. (2009). Sustitución total de aceite de pescado con aceite vegetal en larvas de pejelagarto *Atractosteus tropicus*. *Kuxulkab´*, *15*(28), 51–58. <https://doi.org/10.19136/kuxulkab.a15n28.443>
- Kamalam, B. S., Medale, F., & Panserat, S. (2017). Utilisation of dietary carbohydrates in farmed fishes: New insights on influencing factors, biological limitations and future strategies. *Aquaculture*, *467*, 3–27. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.02.007>
- Keppler, D., & Decker, K. (1974). Glycogen determination with amyloglucosidase. *Methods of Enzymatic Analysis. Vol. 3*, 1127–1131.
- Kaushik, S.J. & Seiliez, I. (2010). Protein and amino acid nutrition and metabolism in fish: current knowledge and future needs. *Aquaculture Research*, *41*, 322-332  
[doi:10.1111/j.1365-2109.2009.02174.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02174.x)
- Kirchner, S., Kaushik, S., & Panserat, S. (2003). Effect of partial substitution of dietary protein by a single gluconeogenic dispensable amino acid on hepatic glucose metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, *134*(2)A, 337-347. [https://doi.org/10.1016/S1095-6433\(02\)00267-2](https://doi.org/10.1016/S1095-6433(02)00267-2)
- Kirchner, S., Panserat, S., Lim, P., Kaushik, S., & Ferraris, R. (2008). The role of hepatic, renal and intestinal gluconeogenic enzymes in glucose homeostasis of juvenile rainbow trout. *Journal of Comparative Physiology*, *178*(3)B, 429–438.  
<https://doi.org/10.1007/s00360-007-0235-7>

- Krogdahl, Å., Hemre, G. I., & Mommsen, T. P. (2005). Carbohydrates in fish nutrition: Digestion and absorption in postlarval stages. *Aquaculture Nutrition*, *11*(2), 103–122. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2004.00327.x>
- Laiz-Carrión, R., Martín Del Río, M., Miguez, J., Mancera, J., & Soengas, J. (2003). Influence of cortisol on osmoregulation and energy metabolism in gilthead seabream *Sparus aurata*. *Journal of Experimental Zoology Part A: Comparative Experimental Biology*, *298A*(2), 105–118. <https://doi.org/10.1002/jez.a.10256>
- Li, X., Wang, Y., Liu, W., Jiang, G., & Zhu, J. (2013). Effects of dietary carbohydrate/lipid ratios on growth performance, body composition and glucose metabolism of fingerling blunt snout bream *Megalobrama amblycephala*. *Aquaculture Nutrition*, *19*(5), 701–708. <https://doi.org/10.1111/anu.12017>
- Márquez-Couturier, G., Alvarez-González, C. A., Contreras-Sánchez, W., Hernández-Vidal, U., Hernández-Franyutti, A., Mendoza-Alfaro, R., ... E, G.-B. (2006). Avances en la alimentación y nutrición del pejelagarto *Atractosteus tropicus*. In L. Cruz Suárez, D. Ricque Marie, M. Tapia Salazar, M. Nieto López, D. Villarreal Cabazos, A. Puello, & A. García Ortega (Eds.), *Avances en Nutrición Acuícola VIII. VIII Simposio Internacional de Nutrición Acuícola* (pp. 446–523). Monterrey, Nuevo León, México: Universidad Autónoma de Nuevo León. Retrieved from [www.nutricionacuicola.uanl.mx/numeros/8/28Alvarez.pdf](http://www.nutricionacuicola.uanl.mx/numeros/8/28Alvarez.pdf)
- Moon, T. W. (2001). Glucose intolerance in teleost fish: fact or fiction? *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, *129*(2–3),

243–249. [https://doi.org/10.1016/S1096-4959\(01\)00316-5](https://doi.org/10.1016/S1096-4959(01)00316-5)

Moro, G., Camilo, R., Moraes, G., & Fracalossi, D. (2010). Dietary non-protein energy sources: Growth, digestive enzyme activities and nutrient utilization by the catfish jundiá, *Rhamdia quelen*. *Aquaculture Research*, *41*(3), 394–400.

<https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02352.x>

Panserat, S., Capilla, E., Gutierrez, J., Frappart, P. O., Vachot, C., Plagnes-Juan, E., ...

Kaushik, S. (2001). Glucokinase is highly induced and glucose-6-phosphatase poorly repressed in liver of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by a single meal with glucose. *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, *128*(2), 275–283. [https://doi.org/10.1016/S1096-4959\(00\)00322-5](https://doi.org/10.1016/S1096-4959(00)00322-5)

Panserat, S., Plagnes Juan, E., Breque, J., & Kaushik, S. (2001). Hepatic

phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression is not repressed by dietary carbohydrates in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Experimental Biology*, *204*(2), 359–365. Retrieved from <http://jeb.biologists.org/content/204/2/359>

Panserat, S., Skiba-Cassy, S., Seiliez, I., Lansard, M., Plagnes-Juan, E., Vachot, C., ...

Moon, T. W. (2009). Metformin improves postprandial glucose homeostasis in rainbow trout fed dietary carbohydrates: a link with the induction of hepatic lipogenic capacities? *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, *297*(3), R707–R715. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00120.2009>

Petrescu, I., Bojan, O., Saied, M., Bâzdu, O., Schmidt, F., & Kühnle, H. F. (1979).

Determination of phosphoenolpyruvate carboxykinase activity with deoxyguanosine

5'-diphosphate as nucleotide substrate. *Analytical Biochemistry*, 96(2), 279–281.

[https://doi.org/10.1016/0003-2697\(79\)90582-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(79)90582-7)

Polakof, S., Míguez, J. M., & Soengas, J. L. (2008). Dietary carbohydrates induce changes in glucosensing capacity and food intake of rainbow trout. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 295(2), R478-89.

*Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 295(2), R478-89.

<https://doi.org/10.1152/ajpregu.00176.2008>

Polakof, S., Panserat, S., Soengas, J. L., & Moon, T. W. (2012). Glucose metabolism in fish: A review. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*, 182(8), 1015–1045. <https://doi.org/10.1007/s00360-012-0658-7>

Prisingkorn, W., Prathomya, P., Jakovlić, I., Liu, H., Zhao, Y.-H., & Wang, W.-M. (2017). Transcriptomics, metabolomics and histology indicate that high-carbohydrate diet negatively affects the liver health of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*).

*BMC Genomics*, 18(1), 856. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-4246-9>

Reséndez, A., & Salvadores, M. (1983). Contribución al conocimiento de la biología del pejelagarto *Lepisosteus tropicus* (Gill) y la tenguayaca *Petenia splendida* (Günther) del estado de Tabasco. *Biotica*, 8(4), 413–426.

Robyt, J. F., & Whelan, W. J. (1968). The  $\beta$ -amylase. In J. Radley (Ed.), *Starch and its derivatives* (pp. 477–497). London: Chapman and Hall.

Rui, L. (2014). Energy Metabolism in the Liver. *Comprehensive Physiology*, 4(1), 177–

197. <https://doi.org/10.1002/cphy.c130024>.Energy

Sangiao-Alvarellos, S., Laiz-Carrion, R., Guzman, J. M., Del Rio, M. P. M., Miguez, J. M., Mancera, J. M., & Soengas, J. L. (2003). Acclimation of *S. aurata* to various salinities alters energy metabolism of osmoregulatory and nonosmoregulatory organs. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative & Comparative Physiology*, 285(4), R897–R907. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00161.2003>

Shimeno, S., Kheyyali, D., & Shikata, T. (1995). Metabolic response to dietary carbohydrate to protein ratios in carp. *Fisheries Science*, 61(2), 277–281. <https://doi.org/https://doi.org/10.2331/fishsci.61.277>

Skiba-Cassy, S., Panserat, S., Larquier, M., Dias, K., Surget, A., Plagnes-Juan, E., ... Seiliez, I. (2013). Apparent low ability of liver and muscle to adapt to variation of dietary carbohydrate:protein ratio in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *British Journal of Nutrition*, 109(8), 1359–1372. <https://doi.org/10.1017/S0007114512003352>

Sørensen, M. (2012). A review of the effects of ingredient composition and processing conditions on the physical qualities of extruded high-energy fish feed as measured by prevailing methods. *Aquaculture Nutrition*, 18(3), 233–248. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2011.00924.x>

Sterzelecki, F. C., Sugai, J. K., Baloi, M., Passini, G., de Carvalho, C. V. A., Fracalossi, D. M., & Cerqueira, V. R. (2017). Effect of dietary carbohydrate to lipid ratios on growth, digestive enzyme and blood metabolites of juvenile Brazilian sardines, *Sardinella brasiliensis* (Steindachner, 1879). *Aquaculture Research*, 48(9), 5111–

5121. <https://doi.org/10.1111/are.13330>

Stone, D. A. J. (2003). Dietary carbohydrate utilization by fish. *Reviews in Fisheries*

*Science*, 11(4), 337–369. <https://doi.org/10.1080/10641260390260884>

Suarez, M. D., Sanz, A., Bazoco, J., & Garcia-Gallego, M. (2002). Metabolic effects of changes in the dietary protein: carbohydrate ratio in eel (*Angilla anguilla*) and trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture International*, 10(2), 143–156.

<https://doi.org/10.1023/A:1021371104839>

Thivend, P., Mercier, C., & Guilbot, A. (1972). Determination of starch with glucoamylase.

In R. Whistler & J. Bemiller (Eds.), *Methods in Carbohydrate Chemistry* (pp. 100–105). New York, USA: Academic Press.

Tocher, D. R. (2003). Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish.

*Reviews in Fisheries Science*, 11(2), 107–184.

Tocher, D. R., Bendiksen, E. Å., Campbell, P. J., & Bell, J. G. (2008). The role of

phospholipids in nutrition and metabolism of teleost fish. *Aquaculture*, 280(1–4), 21–34. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.04.034>

Torfi Mozanzadeh, M., Yavari, V., Marammazi, J. G., Agh, N., & Gisbert, E. (2017).

Optimal dietary carbohydrate-to-lipid ratios for silvery-black porgy (*Sparidentex hasta*) juveniles. *Aquaculture Nutrition*, 23(3), 470–483.

<https://doi.org/10.1111/anu.12415>

Tranulis, M. A., Dregni, O., Christophersen, B., Krogdahl, Å., & Borrebaek, B. (1996). A

glucokinase-like enzyme in the liver of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, 114(1), 35–39.  
[https://doi.org/10.1016/0305-0491\(95\)02119-1](https://doi.org/10.1016/0305-0491(95)02119-1)

Versaw, W. K., Cuppett, S., Winters, D., & Williams, L. (1989). An improved calorimetric assay for bacterial lipase in nonfat dry Milk. *Journal of Food Science*, 54(6), 232–254.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1989.tb05159.x>

Walter, H. (1984). Proteinases: Methods with hemoglobin, casein and azocoll as substrates. In H. J. Bergmeyer (Ed.), *Methods of Enzymatic Analysis. Vol. 5* (pp. 270–277). Verlag Chemie. Weinham.

Wiley, E. O., & Schultze, H.-P. (1984). Family Lepisosteida (Gars) as Living Fossils. In *Living Fossils (Casebooks in Earth Sciences)* (pp. 160–165).  
[https://doi.org/10.1007/978-1-4613-8271-3\\_17](https://doi.org/10.1007/978-1-4613-8271-3_17)

Xie, D., Yang, L., Yu, R., Chen, F., Lu, R., Qin, C., & Nie, G. (2017). Effects of dietary carbohydrate and lipid levels on growth and hepatic lipid deposition of juvenile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture*, 479, 696–703.  
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.07.013>

Zhou, C., Ge, X., Niu, J., Lin, H., Huang, Z., & Tan, X. (2015). Effect of dietary carbohydrate levels on growth performance, body composition, intestinal and hepatic enzyme activities, and growth hormone gene expression of juvenile golden pompano, *Trachinotus ovatus*. *Aquaculture*, 437, 390–397.  
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.12.016>

Zhou, P., Wang, M., Xie, F., Deng, D., & Zhou, Q. (2016). Effects of dietary carbohydrate to lipid ratios on growth performance, digestive enzyme and hepatic carbohydrate metabolic enzyme activities of large yellow croaker (*Larmichthys crocea*). *Aquaculture*, 452, 45–51. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.10.010>

Table 1. Chemical composition and proximal analysis of the experimental diets to tropical gar

Ingredients (g kg <sup>-1</sup> )	Carbohydrate: lipid ratio diets				
	0.75	1.28	2.10	2.52	4.63
Sardine meal <sup>1</sup>	546	546	546	546	546
Fish protein hydrolyzate <sup>1</sup>	100	100	100	100	100
Sardine oil <sup>1</sup>	72	54	35	17.9	0
Soybean lecithin <sup>2</sup>	36	27	18	9	0
Pregelatinized cornstarch <sup>3</sup>	0	62.5	125	188	250
Grenetin <sup>6</sup>	20	20	20	20	20
Vitamin and Mineral premix <sup>7</sup>	15	15	15	15	15
Vitamin C <sup>4</sup>	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8
Sorghum meal 8-10% <sup>5</sup>	210	175	140	104	68
<b>Proximate composition (g kg<sup>-1</sup>)</b>					
Dry matter	975	974	983	950	976
Crude protein	425	420	418	418	415
Crude lipid	183	141	107	99.9	62.4
Carbohydrate	138	180	225	252	289
Ash	98	110	114	108	118
Carbohydrate:lipid	0.75	1.28	2.10	2.52	4.63

ratio

Gross energy (MJ

kg <sup>-1</sup> ) <sup>6</sup>	19.6	18.6	18.2	18.0	17.2
---------------------------------	------	------	------	------	------

---

<sup>1</sup> Proteínas Marinas y Agropecuarias, S.A. de C.V., Guadalajara, Jalisco, Mexico. <sup>2</sup> Pronat

Ultra, Mérida, Yucatán, Mexico. <sup>3</sup> MSA Industrializadora de Maíz, S.A. de C.V., Guadalajara, Jalisco,

Mexico <sup>4</sup> DMS (Heerlen, Netherlands, active agent 35%). <sup>5</sup> GALMEX Comercializadora de Insumos

Agrícolas, Villahermosa, Tabasco, Mexico. <sup>6</sup> D'gari Productos alimenticios y dietéticos Relámpago, Tlalpan,

Edomex, Mexico. <sup>7</sup> Consorcio Súper Sociedad Anónima de Capital Variable. (for trout by courtesy),

Guadalajara, Jalisco, Mexico. <sup>6</sup> Calculated using values of 23.6 KJ g<sup>-1</sup> for protein, 39.56 KJ g<sup>-1</sup> for lipid and

17.2 for carbohydrate (Gao et al., 2010).

Table 2. Growth performance parameters of tropical gar fed experimental diets. Values are presented as mean  $\pm$  SD, n=3.

	<b>Carbohydrate: lipid ratio diets</b>				
	0.75	1.28	2.10	2.52	4.63
S <sup>1</sup>	86.7 $\pm$ 18.8	93.3 $\pm$ 9.4	80.0 $\pm$ 8.2	90.0 $\pm$ 14.1	96.7 $\pm$ 4.7
IBW <sup>2</sup>	0.50	0.51	0.51	0.50	0.50
FBW <sup>3</sup>	12.54 $\pm$ 1.24	14.23 $\pm$ 1.51	17.12 $\pm$ 1.45	13.82 $\pm$ 2.84	14.68 $\pm$ 0.77
WG <sup>4</sup>	2387.5 $\pm$ 245.2	2637.1 $\pm$ 406.8	3129.7 $\pm$ 348.1	2677.8 $\pm$ 560.6	2814.2 $\pm$ 123.2
SGR <sup>5</sup>	7.13 $\pm$ 0.22	7.41 $\pm$ 0.23	7.81 $\pm$ 0.19	7.36 $\pm$ 0.44	7.49 $\pm$ 0.09
FCR <sup>6</sup>	1.06 $\pm$ 0.46	0.97 $\pm$ 0.19	1.00 $\pm$ 0.10	1.12 $\pm$ 0.61	1.10 $\pm$ 0.23
FI <sup>7</sup>	0.29 $\pm$ 0.13	0.29 $\pm$ 0.04	0.37 $\pm$ 0.04	0.31 $\pm$ 0.12	0.34 $\pm$ 0.05
K <sup>8</sup>	1.36 $\pm$ 0.16	1.07 $\pm$ 0.13	1.06 $\pm$ 0.11	1.27 $\pm$ 0.32	1.33 $\pm$ 0.20

<sup>1</sup> S, survival. <sup>2</sup> IBW, initial mean body weight. <sup>3</sup> FBW, Final mean body weight. <sup>4</sup> WG, Weight gain. <sup>5</sup> SGR, specific growth rate. <sup>6</sup> FCR, feed conversion ratio. <sup>7</sup> FI, feed intake (g day<sup>-1</sup>). <sup>8</sup> K, condition factor.

Table 3. Viserosomatic and hepatosomatic indexes in tropical gar fed experimental diets.

	<b>Carbohydrate: lipid ratio diets</b>				
	0.75	1.28	2.10	2.52	4.63
VSI <sup>1</sup>	8.76 $\pm$ 1.18	8.84 $\pm$ 0.87	8.88 $\pm$ 0.77	8.97 $\pm$ 1.61	9.6 $\pm$ 1.16
HSI <sup>2</sup>	3.19 $\pm$ 0.51 <sup>bc</sup>	3.72 $\pm$ 0.33 <sup>ab</sup>	4.06 $\pm$ 0.42 <sup>a</sup>	3.67 $\pm$ 0.48 <sup>abc</sup>	3.11 $\pm$ 0.37 <sup>c</sup>

<sup>1</sup> VSI, Viscerosomatic index. <sup>2</sup> HSI, Hepatosomatic index. Values are presented as mean  $\pm$  SD, n=3. Means with different superscripts in the same row are significantly different (P < 0.05).

Table 4. Dressed carcass and liver proximate composition in tropical gar fed experimental diets.

<b>Carbohydrate: lipid ratio diets</b>					
	0.75	1.28	2.10	2.52	4.63
<i>Dressed carcass (g kg<sup>-1</sup> of wet weight basis)</i>					
Moisture	709.0 ± 20.3	722.4 ± 24.3	705.4 ± 9.5	726.4 ± 31.3	735.7 ± 14.8
Crude protein	191.5 ± 10.7	186.9 ± 8.6	203.0 ± 4.2	197.5 ± 17.7	197.2 ± 7.7
Crude lipids	43.7 ± 4.5 <sup>a</sup>	39.3 ± 6.5 <sup>a</sup>	40.9 ± 2.2 <sup>a</sup>	28.3 ± 2.6 <sup>b</sup>	23.1 ± 2.3 <sup>b</sup>
Ash	31.2 ± 2.1	31.2 ± 4.5	27.5 ± 1.8	34.8 ± 0.7	31.8 ± 5.4
<i>Liver</i>					
Lipids (g kg <sup>-1</sup> )	126.1 ± 7.3 <sup>a</sup>	135.1 ± 7.2 <sup>a</sup>	114.5 ± 16.5 <sup>ab</sup>	86.0 ± 6.4 <sup>bc</sup>	82.39 ± 12.4 <sup>c</sup>
Glycogen (µmol g <sup>-1</sup> )	26.16 ± 3.1 <sup>b</sup>	31.62 ± 4.1 <sup>ab</sup>	35.25 ± 3.6 <sup>a</sup>	35.25 ± 8.0 <sup>a</sup>	36.78 ± 5.2 <sup>a</sup>

Values are presented as mean ± SD, n=3. Means with different superscripts in the same row are significantly different (P < 0.05).

Table 5. Plasma biochemical parameters of tropical gar fed experimental diets after 24 h fasted.

Parameter	Carbohydrate: lipid ratio diets				
	0.75	1.28	2.10	2.52	4.63
Glucose (mg dL <sup>-1</sup> )	115.23 ± 26.48	114.56 ± 8.10	107.98 ± 12.26	127.48 ± 26.26	123.18 ± 18.05
Triglycerides (mg dL <sup>-1</sup> )	273.96 ± 45.48 <sup>a</sup>	277.69 ± 42.82 <sup>a</sup>	277.36 ± 35.32 <sup>a</sup>	227.31 ± 36.64 <sup>ab</sup>	189.3 ± 34.90 <sup>b</sup>
Cholesterol (mg dL <sup>-1</sup> )	137.34 ± 23.22 <sup>ab</sup>	141.72 ± 20.89 <sup>a</sup>	137.42 ± 13.47 <sup>ab</sup>	121.41 ± 22.28 <sup>bc</sup>	116.28 ± 9.54 <sup>c</sup>
Albumin (g dL <sup>-1</sup> )	7.64 ± 3.18	7.34 ± 2.15	7.98 ± 2.14	5.83 ± 2.51	5.14 ± 0.88

Values are presented as mean ± SD, n=9 fish by treatment. Means with different superscripts in the same row are significantly different (P < 0.05).

Table 6. Intestinal enzyme activities of tropical gar fed experimental diets after 24 h fasted.

Values are presented as mean ± SD, n=3.

Activity (U mg protein <sup>-1</sup> )	Carbohydrate: lipid ratio diets				
	0.75	1.28	2.10	2.52	4.63
Proteases	79.9 ± 14.4	73.8 ± 1.7	77.7 ± 12.3	77.6 ± 18.6	83.8 ± 4.5
Lipases	527.6 ± 30.6	508.7 ± 80.8	580.9 ± 55	601.2 ± 114.9	622.8 ± 48.5
Amylases	21.4 ± 11.5	24.3 ± 8.9	33.0 ± 13.6	42.9 ± 11.0	31.9 ± 10.4

Table 7. Hepatic enzyme activities of tropical gar fed experimental diets after 24 h fasted.

		<b>Carbohydrate: lipid ratio diets</b>				
Activity (U mg	0.75	1.28	2.10	2.52	4.63	
protein <sup>-1</sup> )						
<i>Glycolytic enzymes</i>						
HK	0.81 ± 0.04 <sup>b</sup>	1.13 ± 0.34 <sup>b</sup>	1.97 ± 0.20 <sup>a</sup>	1.05 ± 0.06 <sup>b</sup>	1.82 ± 0.17 <sup>a</sup>	
GK	0.15 ± 0.05 <sup>d</sup>	0.59 ± 0.27 <sup>bc</sup>	1.1 ± 0.05 <sup>a</sup>	0.69 ± 0.05 <sup>ab</sup>	0.19 ± 0.04 <sup>cd</sup>	
PK	104.9 ± 19.6	99.4 ± 14.0	86.1 ± 3.7	89.9 ± 24.5	88.9 ± 5.6	
<i>Gluconeogenic enzymes</i>						
PEPCK	3.2 ± 0.13 <sup>a</sup>	3.3 ± 0.63 <sup>a</sup>	1.5 ± 0.42 <sup>b</sup>	2.5 ± 0.71 <sup>ab</sup>	2.8 ± 0.42 <sup>ab</sup>	
FBPase	61.4 ± 1.7 <sup>a</sup>	56.1 ± 2.7 <sup>ab</sup>	53 ± 2.8 <sup>ab</sup>	47.7 ± 6.9 <sup>b</sup>	57.1 ± 3.7 <sup>ab</sup>	
<i>Lipogenic enzyme</i>						
G6PD	7.5 ± 0.05 <sup>b</sup>	8.3 ± 1.7 <sup>b</sup>	12.1 ± 0.8 <sup>a</sup>	9.7 ± 2.1 <sup>ab</sup>	12.5 ± 1.0 <sup>a</sup>	

Values are presented as mean ± SD, n=3. Means with different superscripts in the same row are significantly different (P < 0.05).

## 7. TRANSCRIPTOMA DIFERENCIAL E HISTOLOGÍA DE HÍGADOS DE PEJELAGARTO (*Atractosteus tropicus*) ALIMENTADOS CON DIFERENTES PROPORCIONES DE CARBOHIDRATOS/ LÍPIDOS

Rocío Guerrero-Zárate<sup>1,2</sup>, Carlos Alfonso Alvarez-González<sup>1</sup>, Mario A. Galaviz<sup>3</sup>, Lus M. López<sup>3</sup>, Otilio Mendéz-Marín<sup>1</sup>, Raúl Llera-Herrera<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Acuicultura Tropical, División Académica de Ciencias Biológicas, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco (UJAT), Carretera Villahermosa-Cárdenas s/n, Km 0, C.P. 86039 Villahermosa, Tabasco, Mexico.

<sup>2</sup>Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Cap. Joel Montes Camarena, Cerro del Vigía, 82040 Mazatlán, Sinaloa, Mexico.

<sup>3</sup>Universidad Autónoma de Baja California (UABC), Facultad de Ciencias Marinas, Carretera Tijuana-Ensenada 3917, Playitas, C.P. 22860, Ensenada, B.C., Mexico

\*Corresponding author: raul.llera@gmail.com

### Resumen

Introducción: La mayoría de las investigaciones acerca de la regulación del metabolismo intermediario en peces en respuesta a la inclusión de carbohidratos en sus dietas se ha centrado en peces teleósteos con resultados que apuntan a una intolerancia a la glucosa en los peces carnívoros debida a una falta de regulación en las rutas metabólicas. No obstante estudios recientes en el pez carnívoro ancestral *Atractosteus tropicus* muestran que es capaz de mejorar su crecimiento con la inclusión de carbohidratos y aparentemente regular eficientemente las rutas del metabolismo intermediario.

Resultados: En la presente investigación realizamos un experimento con diferentes proporciones de carbohidratos y lípidos en dietas para pejelagarto (D1: 18% lípidos/13% carbohidratos; D2: 10% lípidos/22% carbohidratos; D3: 6% lípidos, 29% carbohidratos). El análisis diferencial de transcriptoma de hígados reveló escasas diferencias a nivel de genes y una decena de genes relacionados con el metabolismo intermediario sobreexpresados a nivel de isoformas entre los que destacan; APOA4 con la D1, PLPL9, CHKA con la D2 y ACACA, ELOV4, ELOV2, ANGL8, FAS, ACOD, HMCS1 con la D3. En los peces alimentados con la D3, se observan hepatocitos con vacuolas de mayor tamaño en comparación con los tratamientos D1 y D2, lo que generan deformación celular y desplazamiento total del núcleo y cambios en la estructura de los cordones hepáticos.

Conclusiones: La sobreexpresión del gen APOA4 con la D1 sugiere esteatosis causada por un exceso de lípidos dietarios. En los peces alimentados con la D2 se observa hidrólisis y biosíntesis de fosfolípidos. Con la D3 se sobreexpresan genes relacionados con la biosíntesis de ácidos grasos saturados y monoinsaturados, y la elongación hasta ácidos grasos de cadena muy larga. El análisis histológico revela un potencial daño hepático con la D3.

**Keywords:** Lepisosteidae, pez ancestral, metabolismo de carbohidratos, lipogénesis

## **Introducción**

En los peces los carbohidratos son importantes debido a que sus tejidos cerebrales, renales, oculares y branquiales utilizan la glucosa como fuente preferente de energía (1). A pesar de ello, no tienen un requerimiento específico de carbohidratos debido a que tienen la

capacidad de sintetizar glucosa de novo (2). Sin embargo, la eficiencia en el aprovechamiento de carbohidratos es altamente variable entre especies, de tal forma que las especies carnívoras muestran una menor tolerancia a la glucosa que las especies omnívoras y herbívoras (3,4). Especies herbívoras como la carpa (*Cyprinus carpio*) (5) u omnívoras como *Oreochromis niloticus* (6) son eficientes en la regulación de las rutas del metabolismo intermediario (glucólisis, gluconeogénesis, lipogénesis, glucogenólisis y glicogénesis). Sin embargo, especies carnívoras como la dorada (*Sparus aurata*) (7), perca (*Perca fluviatilis*) (8), trucha (*Oncorhynchus mykiss*) (9–11), lubina (*Dicentrarchus labrax*) (7,12) y *Larimichthys crocea* (13), han mostrado una escasa inhibición (a nivel molecular y enzimático) de la gluconeogénesis hepática relacionada con la inclusión de carbohidratos en su dieta (14). Estudios recientes han asociado este fenotipo “intolerante a la glucosa” con una sobreexpresión atípica de ohnologos (parálogos formados por un evento de duplicación completa del genoma (WGD), (15)) de la glucosa 6 fosfatasa (g6pca) en el hígado de truchas juveniles alimentadas con dietas ricas en carbohidratos (16) y sobreexpresados por la insulina, en un estudio in vitro con hepatocitos (17).

En este sentido, la mayoría de las investigaciones acerca del metabolismo de carbohidratos en peces carnívoros se han enfocado en peces teleósteos, especialmente en la trucha arcoiris (*O. mykiss*) (18). Por otro lado, en los últimos años se han incrementado las investigaciones respecto a la interacción de los carbohidratos y lípidos como fuente de energía en los peces, así como de la determinación de una proporción óptima entre ambos macronutrientes (13,19–25) Todos estas investigaciones se basan en análisis de indicadores de desempeño productivo, actividad de enzimas metabólicas y expresión de genes clave de las principales

rutas del metabolismo de carbohidratos, pero la respuesta molecular aún permanece poco conocida.

Estudios recientes en el pejelagarto *Atractosteus tropicus*, un pez carnívoro ancestral que habita en ríos y pantanos del Sureste de México y Centroamérica (26,27), han demostrado que es capaz de mejorar su crecimiento y supervivencia al utilizar almidón en sus dietas (28,29) y se sugiere una adecuada regulación de las rutas de la glicólisis, gluconeogénesis y lipogénesis usando 22% de carbohidratos dietarios (30).

La familia a la que pertenece esta especie ha sido descrita como peces con un genoma en una “posición basal” respecto a los teleósteos, ya que su linaje divergió antes de que se diera la tercera WGD común a los teleósteos (Ts3R) y la cuarta WGD específica de los salmónidos (Ss4R) (31) Por ello, basado en el estudio del genoma de *Lepisosteos oculatus* se propuso que estos organismos pueden ser usados como modelos en estudios genéticos y fisiológicos (32).

Por esta razón resulta de gran interés un análisis global de expresión genética en respuesta a la interacción de los lípidos y carbohidratos a fin de comprender los mecanismos biológicos implicados en el metabolismo de carbohidratos en peces carnívoros. El objetivo de la presente investigación fue analizar, desde un enfoque transcriptómico e histológico, cómo la sustitución de lípidos por carbohidratos en dietas para pejelagarto puede afectar el metabolismo intermediario en el hígado.

## Resultados

### *Efecto de la proporción CHO /L sobre el transcriptoma de hígados de pejelagarto*

El análisis de expresión diferencial de genes (DEG) de los hígados de pejelagarto, a nivel de genes, mostró escasa diferencia entre las tres dietas probadas, con solamente una decena de genes diferencialmente expresados. Además, no pudo observarse un patrón claro de agrupación entre las repeticiones de cada dieta (Figura 1). La mayor diferencia entre perfiles de expresión se encontró entre los peces que fueron alimentados con la dieta 1 contra los alimentados con la dieta 3 (38 genes expresados diferencialmente), entre ellos destaca la sobreexpresión con la D3 de los genes ACACA\_HUMAN (acetil-CoA carboxilasa 1), ELOV2 (elongasa 2) que corresponden en su mayoría al metabolismo de ácidos grasos; (Tabla 3). Los grupos más homogéneos en cuanto a expresión fueron los de los peces alimentados con la dieta 2 contra la dieta 3 (6 genes expresados diferencialmente) (Tabla 2). En cuanto a la expresión diferencial entre las muestras de los peces alimentados con la D1 vs la D2 destacan los genes APOA4\_FELCA con la D1, ACACA\_HUMAN Y ACACA\_RAT sobreexpresados con la D2 (Tabla 1).

No obstante, cuando el análisis se realizó a nivel isoformas pudo observarse una mayor diferencia entre los perfiles de expresión (Figura 2). En los perfiles de expresión de los hígados de peces alimentados con la D1 vs D2 se observaron 46 genes expresados diferencialmente (Tabla 4). Entre ellos destacan como implicados en el metabolismo de lípidos: el gen APOA4 (Apolipoproteína A-IV) sobreexpresado en peces alimentados con la D1 y ACACA-RAT (acetil-CoA carboxilasa 1), ACOD\_CYP4A (Acil-CoA desaturasa)

y ANGL8 isoformas 1, 2 y 3 (Proteína similar a la angiopoyetina 8) sobreexpresados con la D2.

Al comparar los hígados de los peces alimentados con la D2 vs D3, 34 genes fueron expresados diferencialmente (Tabla 5). Entre ellos destacan los siguientes por estar asociados al metabolismo de carbohidratos o lípidos: Con la D2 se sobreexpresaron los PLPL9\_MOUSE (fosfolipasa A2 independiente de calcio de 85/88 KDa), CHKA\_HUMAN (Colina quinasa alfa) y sobreexpresado con la dieta 3 HMCS1\_CHICK (hidroximetilglutaril-CoA-sintasa). Otro gen sobreexpresado con la D3 que resulta de interés es PPT2A\_XENLA (Tioesterasa lisosomal PPT2-A).

Mientras en la comparación de hígados entre la D1 vs D3 se observaron 68 genes distintos (Tabla 6). Entre ellos destacan por su participación en el metabolismo intermediario; sobreexpresados con la D3 ACACA-RAT (acetil-CoA carboxilasa 1), ELOV4\_HUMAN isoformas 1, 2, 5, 12 (elongasa 4), ELOV2\_HUMAN (elongasa 2), ANGL8 isoforma 3 (Proteína similar a la angiopoyetina 8), FAS\_CHICK (ácido graso sintasa), ACOD\_CYPCA (Acil-CoA desaturasa). Otro gen sobreexpresado con la D3 que resulta de interés es MASY\_MYXXD (malato sintasa)

### *Histología del hígado*

El hígado de *A. tropicus* presenta células hepáticas (hepatocitos) El arreglo de los hepatocitos, en general, muestra un núcleo con cromosomas plumosos, numerosos nucléolos basófilos, y citoplasma vacuolado acidófilo.

En la presente investigación, los hígados de los peces alimentados con la D1 presentan numerosos hepatocitos con un núcleo central basófilo, citoplasma acidófilo con pequeñas y escasas vacuolas (figura 3 d,g) en comparación con los alimentados con la D2 y D3. Los hepatocitos se encuentran arreglados en cordones hepáticos separados entre si por un espacio o sinusoide, rodeando venas o arterias (Figura 3 a). En los peces alimentados con la D2 se observa un incremento en el tamaño vacuolas dentro de los hepatocitos y los núcleos presenta un ligero desplazamiento a la periferia (Figura 3 e, h), es evidente el arreglo de los los hepatocitos en cordones hepáticos que rodean las arterias y vena central (Figura 3b) Mientras que, en los peces alimentados con la D3, en todo el hígado se observan hepatocitos con vacuolas de mayor tamaño (Figura 3c), en comparación con los tratamientos D1 y D2, lo que generan cambios en la estructura de los cordones hepáticos. La vacuolización del citoplasma de los hepatocitos provoca deformación celular y desplazamiento total del núcleo. Los hepatocitos vacuolados se asocian entre ellos formando una estructura de roseta, con menor presencia de núcleos picnóticos, los cuales en algunos casos están ausentes (Figura 3 f, i).

## **Discusión**

Los resultados de la presente investigación indican que independientemente de la cantidad de carbohidratos consumidos no existe una modificación significativa sobre los perfiles de expresión genética de los hígados de pejelagartos 24 h después de la última alimentación. Lo que concuerda con los parámetros de bioquímica sanguínea descritos en un estudio previo (30) donde el nivel de glucosa en plasma de pejelagartos 24 h después de la última alimentación fue de  $118 \pm 20$  mg/dL y no se vio afectado por la proporción de CHO:L.

Esto puede explicarse con los resultados obtenidos en una prueba de tolerancia a la glucosa en *A. tropicus*, los cuales muestran que el nivel basal de glucosa es recuperado en menos de 10 h después de una inyección intraperitoneal de 1.2 g<sup>1</sup> de dextrosa/kg de peso (datos no publicados). Todo lo anterior confirma que el pejelagarto es capaz de metabolizar la glucosa en menos de 24 h sin un efecto permanente en cuanto a metabolitos en plasma y expresión genética.

El análisis DEG de los hígados de pejelagarto alimentados con las tres dietas experimentales muestra que, tanto a nivel de genes como de isoformas, en la D1 en comparación con la D2 se sobreexpresa el gen APOA4, el cual codifica para la apolipoproteína A-IV. Hasta ahora se sabe que esta lipoproteína participa en múltiples procesos biológicos como absorción y metabolismo de lípidos, transporte reverso del colesterol, protección contra la aterosclerosis, agregación plaquetaria y trombosis, homeostasis de la glucosa e ingesta de alimento (33). De todos ellos, quizá el más notable es la asociación entre una activa absorción intestinal y la inducción de la expresión APOA4. Se sabe que este gen se expresa en el intestino de los mamíferos (especialmente el yeyuno) y también en una pequeña porción del hígado de los roedores, adicionalmente se ha detectado en el hipotálamo, tronco cerebral y células dendríticas (2). En el caso de la expresión de APOA4 en hígado, un estudio realizado por Verhage et al. (34) reveló que el incremento en la expresión de este gen se da por condiciones que incrementen la acumulación de triacilglicéridos en los hepatocitos (esteatosis), por ejemplo por la ingesta de una dieta alta en grasas y colesterol, esto mismo ha sido descrito en otros casos en que se utilizan ratones como modelos de esteatosis. El estudio además demostró que la expresión

del gen APOA4 mejora la secreción de lipoproteínas de muy baja densidad unidas a triglicéridos (VLDL-TG) e incrementa el tamaño de partícula de las VLDL, de tal forma que se ha relacionado la expresión de este gen con la exportación de lípidos desde los hepatocitos como un mecanismo de defensa ante una acumulación excesiva de lípidos.

En nuestro estudio los análisis histológicos demuestran una vacuolización en los hepatocitos en los peces alimentados con la D1, la cual contenía el mayor porcentaje de lípidos (18%) de las 3 dietas probadas, por lo que la sobreexpresión del gen APOA4 con esta dieta sugiere una movilización de los lípidos fuera de los hepatocitos ante una probable esteatosis hepática, tal como ha sido descrito para ratones. Estos resultados concuerdan con una investigación anterior en la que se observó que pejelagartos alimentados con una dieta que contenía 18% de lípidos y 13% de carbohidratos muestran una mayor cantidad de lípidos hepáticos que los alimentados con una dieta con 11% de lípidos y 22% de carbohidratos, aunque estas diferencias no fueron significativas (30).

Por otro lado, en los peces alimentados con la D2 en comparación con la D3 se sobreexpresaron genes relacionados con el metabolismo de fosfolípidos. PLP9 codifica para la fosfolipasa A2 que cataliza la liberación de ácidos grasos a partir de los fosfolípidos para que sean absorbidos por las células de la mucosa intestinal. En peces son escasos los estudios acerca de digestión de fosfolípidos, sin embargo, se ha reportado actividad fosfolipasa A2 en el hepatopáncreas de carpa y crías de lubina rayada (*Morone saxatilis*) pero es incierto si su actividad se refleja a nivel del intestino o de forma intracelular. También mediante análisis inmunohistoquímicos se describió su presencia en células intestinales en la dorada (35). El otro gen sobreexpresado fue CHKA que codifica a la

colina quinasa, una enzima citosólica que cataliza la fosforilación de la colina para formar fosfocolina en presencia de ATP y magnesio, este es el primer paso en la síntesis de fosfatidilcolina. Las rutas de biosíntesis de fosfolípidos no han sido profundamente estudiadas en peces pero debido a estudios genómicos realizados en el pez fugu (*Takifugo rubripes*) y el pez cebra (*Danio rerio*) se sabe que cuentan con las enzimas y proteínas descritas como necesarias para el proceso (36). En las células de mamíferos se han descrito tres isoformas (CHKA-1, CHKA-2 y CHKB) (37). En nuestro estudio, la sobreexpresión de estos genes en los peces alimentados con la dieta 2 puede explicarse debido a que a esta se le adicionó una mezcla de aceite de pescado y lecitina de soya (como recurso de fosfolípidos), a diferencia de la D3 en la que no se añadieron lípidos en su elaboración y el único aporte de lípidos dietarios provenía de la harina de pescado (ya que esta no fue desgrasada). Entonces, los peces alimentados con la D2 activan la ruta de hidrólisis de fosfolípidos y se da una biosíntesis de fosfolípidos de novo o a través del recambio de fosfolípidos.

En contraste el gen sobreexpresado en los peces alimentados con la dieta 3 en comparación con la dieta 2 está implicado en la biosíntesis de colesterol. HMGS1 codifica para la enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA) sintasa, que cataliza la segunda reacción de la ruta del mevalonato, esta consiste en la condensación de acetoacetyl CoA para producir HMG-CoA que es rápidamente convertida a mevalonnato por la HMG-CoA reductasa. En los mamíferos se han encontrado dos isoformas del gen HMGS1 y HMGS2, el primero se asocia con la biosíntesis de colesterol mientras el segundo participa en el control de la cetogénesis (38).

En la comparación de los hígados de peces alimentados con la D1 vs la D3, es donde se observa la mayor diferencia en perfiles de expresión. La mayoría de los genes sobreexpresados implicados en el metabolismo intermediario se encuentran en la D3, (algunos de ellos también se sobreexpresaron en la D2), y están relacionados con la biosíntesis de lípidos. Tal es el caso del gen ACACA, que codifica para la enzima acetil-Co carboxilasa la cual interviene en la primera reacción, considerada un paso limitante, de la biosíntesis de ácidos grasos catalizando la formación de malonil CoA a partir de acetil-CoA y bicarbonato (39). Continuando el proceso de biosíntesis de ácidos grasos, se encontró al gen FAS que codifica para el complejo multienzimático ácido graso sintasa, el cual cataliza la síntesis de ácidos grasos de cadena larga de novo, a partir de malonil-CoA y acetil CoA en presencia de NADPH. También se encontraron sobreexpresados los genes implicados en la desaturación y elongación de ácidos grasos (39). ACOD codifica para la enzima acil-CoA desaturasa que introduce el primer enlace doble en los ácidos grasos saturados, sintetizando de esta forma ácidos grasos monoinsaturados. La reacción global implica la oxidación de dos electrones provenientes de la enzima citocromo b5 reductasa (39). Así mismo, se sobreexpresaron los genes ELOV2 y 4, que codifican para enzimas elongasas implicadas en la biosíntesis de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA). La actividad enzimática ELOV2 ha sido descrita en el pez cebra, salmón del Atlántico (*Salmo salar*), trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) y el bagre (*Clarias gariepinus*)(40). El sustrato sobre los que actúa esta enzima con los ácidos grasos C<sub>20</sub> (20:4n-3 y 20:3n-6) y C<sub>22</sub> (22:5n-3 y 22:4n-6), aunque también puede elongar en menor grado los C<sub>18</sub> (18:n4-3 y 18:n3-6)(39). La habilidad de la ELOV 2 para elongar ácidos grasos de C<sub>22</sub> a C<sub>24</sub> la ubican como una enzima clave para la síntesis del ácido graso docosahexaenoico (DHA). ELOV4 ha sido

caracterizada en el pez cebra y varias especies de peces comerciales como la cobia (*Rachycentron canadum*), el Salmon del Atlántico, el bagre africano, *Larimichthys crocea*, *Epinephelus coioides*. Hasta ahora se han descrito dos isoformas de es la enzima ELOV4a y ELOV4b, ambas tienen la capacidad de producir ácidos grasos de cadena muy larga (mayor a C<sub>24</sub>) (40).

Con base en lo anterior, los resultados de la presente investigación demuestran que el pejelagarto cuenta con las enzimas requeridas para la síntesis y desaturación de ácidos grasos de novo a partir de carbohidratos y la elongación de ácidos grasos de cadena muy larga (VLC-PUFA). Esto concuerda con una conclusión previa generada en pejelagartos a partir de la observación del incremento en la actividad de la glucosa 6 fosfato deshidrogenasa hepática (G6PDH) conforme se incrementa la proporción CHO:L (30).

Debido a que la G6PDH regula la ruta de las pentosas fosfato, la cual entre otras cosas genera poder reductor (NADPH) utilizado en la síntesis de lípidos. Esto también corrobora la hipótesis de que el pejelagarto es eficiente en activar la ruta de lipogénesis a partir de carbohidratos (30) de tal forma que la inclusión de hasta 29% de almidón en su dieta no afecta la concentración de glucosa en plasma después de 24h de haberse alimentado, debido a que el exceso de glucosa es canalizado hacia la síntesis de lípidos.

Por otro lado, es ampliamente conocido que los lípidos además de proveer energía también aportan ácidos grasos que desempeñan papeles importantes en procesos fisiológicos como el crecimiento, eficiencia alimentaria, respuesta inmune y condiciones de salud, especialmente durante la etapa larval (36,41). Por lo que es probable que el incremento en los niveles de expresión de los genes ACACA, FAS, ELOV y ACOD en los hígados de los

peces alimentados con la dieta 5, se debiera a una estrategia fisiológica para compensar la disminución en el aporte de ácidos grasos dietarios. En todo caso, la biosíntesis de lípidos y la elongación de ácidos grasos a partir de carbohidratos como reserva de energía y/o para compensar la deficiencia de ciertos ácidos grasos en las dietas indican que el pejelagarto es eficiente en el uso de carbohidratos como fuente de energía.

En cuanto al gen ANGL8 (también llamado ANGPTL8, lipasina, refeeding-induced fat and liver protein [RIFL] y TD26), pertenece a un grupo de proteínas conocidas como angiopoietinas (ANGPTL3, ANGPTL4 y ANGPTL8). Son conocidas como reguladoras de los niveles de triacilglicerol en plasma debido a que inhiben la actividad de la lipoproteínlipasa (LPL) una enzima clave para la hidrólisis de triglicéridos, por ello resultan de interés en tratamientos para prevenir enfermedades cardiovasculares. Aunque en un principio la expresión del gen ANGPTL8 se describió en el hígado y tejido adiposo de ratones modelo de insulino resistencia como inductor de la proliferación de células beta, mejorando con ello su estado glicémico (42) esto no pudo ser corroborado por estudios posteriores (43). Recientemente surgió la hipótesis que este gen puede estar relacionado con la movilización de lípidos hacia el tejido adiposo subcutáneo en lugar de hacia el hígado y otros órganos previniendo la esteatosis hepática, hígado graso y la resistencia a la insulina en organismos que consumen dietas ricas en grasas (44,45). Por lo anterior, la mayoría de los estudios en este gen se han enfocado en su regulación e implicaciones en el metabolismo de lípidos. En nuestro estudio este gen fue sobreexpresado en los hígados de peces que consumieron la dieta con menor contenido de lípidos probablemente disminuyendo la hidrólisis de triacilglicéridos por inhibición de la LPL en este órgano. No

obstante, debido a que esto no fue evaluado se requieren de estudios que profundicen acerca de cómo la proporción CHO/L están implicados en la regulación del gen y que implicaciones tiene sobre el metabolismo de lípidos y carbohidratos.

Otros genes sobreexpresados que resultaron de interés son: el gen MASY, sobreexpresado en los peces alimentados con la dieta 3 y el gen PPT2A en los peces que recibieron las dietas 1 y 2.

El gen MASY codifica para la enzima malato sintasa, la cual cataliza la reacción del glioxilato con acetil\_CoA para producir malato. La malato sintasa es una enzima clave para sintetizar carbohidratos a partir de lípidos mediante una vía alterna al ciclo de Krebs denominada ciclo del glioxilato. Este ha sido bien caracterizado en plantas y microorganismos pero se pensaba que era ausente en vertebrados; sin embargo, se ha demostrado la presencia de malato sintasa en cartílago e hígado de ratas (44,46). Se ha propuesto que el ciclo del glioxilato puede estar implicado en inducir resistencia hepática a la insulina debido a la activación de la ruta de la gluconeogénesis teniendo como precursores los ácidos grasos en ratones alimentados con dietas altas en grasas (47). Por lo que resulta de interés que en el presente estudio este gen se haya sobreexpresado en la dieta con menor porcentaje de lípidos y mayor contenido de carbohidratos.

Por otro lado, en los peces alimentados con las dietas 1 y 2 en comparación con los alimentados con la dieta 3 se sobreexpresó el gen PPT2A que codifica a la enzima tioesterasa lisosomal, esta cataliza la hidrólisis de los enlaces tioester con ácidos grasos de cadena larga, especialmente palmitoil-CoA. Mutaciones en su homólogo (PPT1) se asocian

con un conjunto de enfermedades neurodegenerativas conocidas como lipofusciosis neuronal ceroida (NCL) caracterizada por una acumulación de lipofusina en el cerebro. Estudios con ratones knockout para PPT2 han mostrado que al igual que PPT1 también puede producir un tipo de NCL (48,49) caracterizada por neurodegeneración, histiocitosis de la médula ósea, visceromegalia y oscurecimiento del páncreas, aunque la deficiencia de PPT2 hasta ahora no ha sido descrita en humanos (50). Se cree que PPT2 tiene papel distinto al de PPT1 en la hidrólisis de lípidos en los lisosomas, no obstante, su función fisiológica no ha sido investigada, por lo que resulta necesario investigar como dietas altas en grasas afectan la regulación de PPT2 en el hígado y otros órganos.

El análisis histológico de los hígados de peces alimentados con las diferentes dietas muestra que conforme se incrementa la inclusión de carbohidratos aumenta la vacuolización e hipertrofia de los hepatocitos, además de que en los peces que consumieron la D3 se observa un arreglo anormal en las áreas cercanas a los vasos circulatorios e infiltraciones. Estas características son similares a los resultados obtenidos en un estudio realizado en el ciprínido *Megalobrama amblycephala*, en el que dietas ricas en carbohidratos se asociaron con síntesis de lípidos de novo y acumulación patológica de lípidos en los hepatocitos, que pueden preceder al síndrome de hígado graso no alcohólico. La acumulación de lípidos pudo verificarse por el contenido de lípidos hepáticos y mediante la tinción histológica con rojo oleoso O (51). En el presente estudio no contamos con muestras para el análisis específico del tipo de biomolécula que contenían las vacuolas de los hepatocitos, no obstante un estudio previo en *A. tropicus* muestra que el contenido de lípidos disminuye mientras el contenido de glucógeno aumenta en el hígado conforme se incrementa la

inclusión de almidón en la dieta(30), lo que contradice la hipótesis de que la mayor vacuolización de los hepatocitos se debe a una excesiva acumulación de lípidos. Sin embargo, es claro que la estructura y arreglo de los hepatocitos, así como las infiltraciones en el hígado de los peces alimentados con la D3 indican un potencial daño hepático.

## **Conclusiones**

La sobreexpresión del gen APOA4 con la D1 sugiere una probable esteatosis causada por un exceso de lípidos dietarios. Mientras que en los peces alimentados con la D2 se observa ya la sobreexpresión de genes relacionados con la síntesis de lípidos, así como la hidrólisis y biosíntesis de fosfolípidos. Mientras en los peces alimentados con la D3 encontramos sobreexpresados a los genes relacionados con la biosíntesis de ácidos grasos saturados y monoinsaturados, así como la elongación hasta ácidos grasos de cadena muy larga. El análisis histológico revela un potencial daño hepático en los peces alimentados con la dieta rica en carbohidratos (D3).

## **Métodos**

### *Preparación de dietas y análisis proximales*

Se formularon tres dietas prácticas con diferente proporción CHO:L utilizando el programa Mixit-Win V.5 (Agricultural Software Consultants, Inc, San Diego, CA). La dieta control (D1) se basó en la formulación con harina de pescado propuesta para pejelagartos en etapa larval (52), las otras dos dietas se diseñaron con incrementos graduales del 50% de almidón de maíz mientras se disminuía la cantidad de lípidos añadidos a la dieta en 50% (Tabla 7). Cada dieta se asignó a tres tinas en un diseño experimental completamente aleatorio. Para

la elaboración de las dietas experimentales, los ingredientes secos fueron molidos, tamizados y mezclados durante 15 min, a esta mezcla se añadió la premezcla de vitaminas y minerales y se mezcló durante 15 min más. Posteriormente se agregaron lentamente los ingredientes líquidos y se mezcló por 15 min y finalmente se añadió agua destilada y se mezcló por 15 min. Las mezclas fueron peletizadas y secadas a 50°C por 10 h. Después fueron trituradas y cribadas para cubrir el rango de tamaño de partícula requerido durante la crianza larvaria (250-1000  $\mu\text{m}$ ). Las dietas fueron almacenadas en refrigeración a 20°C. La composición proximal de las dietas fue determinada de acuerdo a la Association of Official Analytical Chemist procedures (AOAC) (53). La humedad fue calculada por gravimetría después de secar las muestras a 105°C por 24 h. El contenido de proteína cruda fue determinado por el método Kjendahl usando un sistema de destilación automática VAPODEST 10s, (Gerhardt, Königswinter, Alemania) y un sistema de titulación automática TitroLine® 5000 (SI Analytics, College Station, TX). Los lípidos totales fueron determinados por la extracción con metanol-cloroformo (54). El almidón fue determinado por el método con amilasa y glucosa oxidasa (55). El contenido de cenizas totales fue determinado por gravimetría después de la combustión de las muestras a 550 °C por 8 h (Tabla 7).

#### *Crianza de organismos y procedimientos experimentales*

Las larvas de pejelagarto fueron obtenidas a partir del lote de reproductores del Laboratorio de Acuicultura Tropical ubicado en la División Académica de Ciencias Biológicas de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. El desove fue inducido en una hembra de *A. tropicus* con una inyección intraperitoneal de la hormona GnRH (0.35  $\mu\text{g}$  por Kg de peso).

La hembra fue colocada junto con 3 machos en un estanque de 2000 L, el cual contaba con sustrato artificial para la adhesión de los huevos. Una vez que las larvas iniciaron el nado (4 días después de la eclosión, DDE) se transfirieron a tinas con volumen de 70 L conectadas a un sistema de recirculación con temperatura controlada. Las larvas fueron adaptadas a las dietas experimentales por una coalimentación con nauplios de *artemia* (4-13 DDE) y posteriormente con biomasa congelada de *artemia* adulta (14-17 DDE) (56), después de este periodo se les suministró únicamente la dieta experimental.

Al inicio del experimento un total de 150 larvas de pejelagarto, con peso inicial de  $0.50 \pm 0.01$  g, fueron colocadas en 9 tinas, a razón de 10 peces por tina. Se seleccionaron al azar tres tinas y estas fueron asignadas a cada uno de los tres tratamientos (D1, D2 o D3).

Durante los 45 días del experimento los peces fueron alimentados con sus respectivas dietas 4 veces por día (8:00, 11:00, 14:00 y 17:00), a saciedad aparente.

Las unidades experimentales eran parte de un sistema de recirculación con temperatura controlada de  $28.9 \pm 1.2$  °C. El sistema contaba también con filtración mecánica y biológica y oxígeno suplementario. Los peces fueron mantenidos bajo un fotoperiodo natural (12:12). Los parámetros de calidad de agua fueron monitoreados durante el periodo experimental: el pH fue de  $8.0 \pm 0.4$  (pH pen meter ST10, Ohaus, Parsippany, NJ), el oxígeno disuelto de  $5.1 \pm 0.5$  mg L<sup>-1</sup> (DO instrument, YSI 55-12FT, Yellow Springs, OH) el nitrito y amonio de  $0.19 \pm 0.13$  mg L<sup>-1</sup> (Ammonia Test Kit, Mars Fishcare, Chalfont, PA).

### *Toma de muestras*

Al finalizar el periodo experimental (75 DDE) los peces fueron privados de la alimentación durante 24 h. Posteriormente, fueron anestesiados con aceite de clavo ( $0.1 \text{ ml L}^{-1}$ ). Tres peces de cada unidad experimental (9 por tratamiento) fueron seleccionados al azar y sacrificados por personal capacitado mediante decapitación (NOM-062-ZOO-1999, de México) y se disecaron rápidamente para extraer muestras de hígado. Para el análisis histológico, se tomaron dos fragmentos de hígado y fueron inmediatamente sumergidas en formalina neutra al 10% durante 24 h. Para el análisis de expresión genética, un fragmento de hígado de aproximadamente 5 mm fue colocado en RNA later (5 volúmenes), y conservado a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 24 h. Posteriormente fue almacenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis.

### *Análisis histológico*

Las muestras se deshidrataron en gradientes de etanol ( $50^{\circ}$ ,  $70^{\circ}$ ,  $80^{\circ}$ ,  $96^{\circ}$  y  $100^{\circ}$ ) y fueron aclaradas en alcohol  $100^{\circ}$ -xilol, xilol, posteriormente embebidas en bloques de parafina. Se realizaron cortes de  $7\mu\text{c}$  con un microtomo Reichert-Jung (model Hn40) y fueron teñidas con el método de hematoxilina y eosina (H&E) para observaciones histológicas generales (Humason 1979, Hinton 1990, Aguilar 1996). Un microscopio UNICO (modelo G380 LED) fue utilizado para las descripciones y mediciones morfológicas, equipado con una cámara digital MDC 560. Mediciones morfométricas del área de 50 núcleos de hepatocitos (aNh) de cada organismo fueron determinados a partir de imágenes procesadas por el software AXIOVISION LE 4.5.

### *Análisis transcriptómico*

De las 9 muestras de hígado colectadas por tratamiento, se seleccionaron al azar 3 muestras para la secuenciación individual del transcriptoma. Estas fueron enviadas para su procesamiento a la UUSMB-IBT, UNAM, México.

Extracción de RNA, preparación de librerías y secuenciación: El ARN total de las muestras individuales de hígado fue extraído usando el método de TRIzol (57) La calidad del ARN total fue comprobada mediante electroforesis capilar automatizada con un bioanalizador Agilent 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). El RNA de alta calidad fue usado para la preparación y secuenciación de bibliotecas utilizando el Kit TruSeq Stranded mRNA (Illumina Inc, San Diego, CA) y la plataforma NextSeq (2x75pb)

Ensamble de transcriptoma de Novo: Las lecturas fueron limpiadas para remover los adaptadores y lecturas de mala calidad con el software Trimmomatic V 0.33 (58). El transcriptoma fue ensamblado de novo usando el software Trinity V 2.3.2 (59)

Anotación: Después del ensamble, se realizó la anotación funcional de los transcritos utilizando Trinotate, el cual predice las regiones codificantes usando TransDecoder.

También, busca los transcritos completos y las regiones codificantes contra SwissProt, HMMER/PFAM (<https://github.com/Trinotate/Trinotate.github.io/wiki>).

Análisis de expresión diferencial: Para cuantificar la abundancia de transcritos se utilizó el programa Kallisto (<https://pachterlab.github.io/kallisto/about>). Los análisis de expresión diferencial fueron realizados usando edgeR

(<https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/edgeR.html>), para los análisis se utilizó un nivel de significancia de  $P < 0.001$  y un  $FDR < 0.01$ .

### **Agradecimientos**

R. Guerrero-Zárte agradece al Programa para el Desarrollo Profesional Docente (PRODEP) por el apoyo brindado a través de la beca para estudios de posgrado. Esta investigación fue financiada por el proyecto SEP-CONACYT Ciencia Básica “Estudio de la fisiología digestiva en larvas y juveniles de pejelagarto (*Atractosteus tropicus*) con base en técnicas histológicas, bioquímicas y moleculares” No. 282765.

### **Conflicto de interés y declaraciones éticas**

Los autores siguieron todas las pautas internacionales, nacionales o institucionales aplicables para el cuidado y uso de los animales.

### **Referencias**

1. Polakof S, Mommsen TP, Soengas JL. Glucosensing and glucose homeostasis: From fish to mammals. *Comp Biochem Physiol - B Biochem Mol Biol* [Internet]. 2011;160(4):123–49. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpb.2011.07.006>
2. Kamalam B, Medale F, Panserat S. Utilisation of dietary carbohydrates in farmed fishes: New insights on influencing factors, biological limitations and future strategies. *Aquaculture* [Internet]. 2017 Jan [cited 2017 Oct 12];467:3–27. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0044848616300540>

3. Enes P, Panserat S, Kaushik S, Oliva-Teles A. Growth performance and metabolic utilization of diets with native and waxy maize starch by gilthead sea bream (*Sparus aurata*) juveniles. *Aquaculture*. 2008;274(1):101–8.
4. Hemre G-I, Mommsen TP, Krogdahl A. Carbohydrates in fish nutrition: effects on growth, glucose metabolism and hepatic enzymes. *Aquac Nutr* [Internet]. 2002;8(3):175–94. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2095.2002.00200.x>
5. Shimeno S, Kheyyali D, Shikata T. Metabolic response to dietary carbohydrate to protein ratios in carp. *Fish Sci*. 1995;61(2):277–81.
6. Chen YJ, Zhang TY, Chen HY, Lin SM, Luo L, Wang DS. An evaluation of hepatic glucose metabolism at the transcription level for the omnivorous GIFT tilapia, *Oreochromis niloticus* during postprandial nutritional status transition from anabolism to catabolism. *Aquaculture* [Internet]. 2017;473:375–82. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.03.009>
7. Enes P, Panserat S, Kaushik S, Oliva-Teles A. Dietary carbohydrate utilization by European Sea Bass (*Dicentrarchus labrax* L.) and gilthead sea bream (*Sparus Aurata* L.) Juveniles. *Rev Fish Sci*. 2011;19(3):201–15.
8. Borrebaek B, Christophersen B. Hepatic glucose phosphorylating activities in perch (*Perca fluviatilis*) after different dietary treatments. *Comp Biochem Physiol - B Biochem Mol Biol*. 2000;125(3):387–93.
9. Panserat S, Plagnes Juan E, Breque J, Kaushik S. Hepatic phosphoenolpyruvate

- carboxykinase gene expression is not repressed by dietary carbohydrates in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J Exp Biol* [Internet]. 2001;204(2):359–65. Available from: <http://jeb.biologists.org/content/204/2/359>
10. Panserat S, Capilla E, Gutierrez J, Frappart PO, Vachot C, Plagnes-Juan E, et al. Glucokinase is highly induced and glucose-6-phosphatase poorly repressed in liver of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by a single meal with glucose. *Comp Biochem Physiol - B Biochem Mol Biol*. 2001;128(2):275–83.
  11. Kirchner S, Panserat S, Lim P, Kaushik S, Ferraris R. The role of hepatic, renal and intestinal gluconeogenic enzymes in glucose homeostasis of juvenile rainbow trout. *J Comp Physiol B Biochem Syst Environ Physiol*. 2008;178(3):429–38.
  12. Enes P, Panserat S, Kaushik S, Oliva-Teles A. Effect of normal and waxy maize starch on growth, food utilization and hepatic glucose metabolism in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. *Comp Biochem Physiol - A Mol Integr Physiol*. 2006;143(1):89–96.
  13. Zhou P, Wang M, Xie F, Deng D, Zhou Q. Effects of dietary carbohydrate to lipid ratios on growth performance, digestive enzyme and hepatic carbohydrate metabolic enzyme activities of large yellow croaker (*Larimichthys crocea*). *Aquaculture* [Internet]. 2016;452:45–51. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.10.010>
  14. Enes P, Panserat S, Kaushik S, Oliva-Teles A. Nutritional regulation of hepatic glucose metabolism in fish. *Fish Physiol Biochem*. 2009;35(3):519–39.

15. Berthelot C, Brunet F, Chalopin D, Juanchich A, Bernard M, Noël B, et al. The rainbow trout genome provides novel insights into evolution after whole-genome duplication in vertebrates. *Nat Commun.* 2014;5.
16. Marandel L, Seiliez I, Véron V, Skiba-Cassy S, Panserat S. New insights into the nutritional regulation of gluconeogenesis in carnivorous rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): a gene duplication trail. *Physiol Genomics* [Internet]. 2015;47(7):253–63. Available from: <http://physiolgenomics.physiology.org/lookup/doi/10.1152/physiolgenomics.00026.2015>
17. Marandel L, Dai W, Panserat S, Skiba-Cassy S. The five glucose-6-phosphatase paralogous genes are differentially regulated by insulin alone or combined with high level of amino acids and/or glucose in trout hepatocytes. *Mol Biol Rep.* 2016;43(4):207–11.
18. Polakof S, Panserat S. How Tom Moon's research highlighted the question of glucose tolerance in carnivorous fish. *Comp Biochem Physiol Part - B Biochem Mol Biol* [Internet]. 2016;199:43–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpb.2015.11.001>
19. Dias J, Rueda-Jasso R, Panserat S, Da Conceição LEC, Gomes EF, Dinis MT. Effect of dietary carbohydrate-to-lipid ratios on growth, lipid deposition and metabolic hepatic enzymes in juvenile Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup). *Aquac Res.* 2004;35(12):1122–30.

20. Shuyan M, Qin N, Huijun M, Wenbing Z, Kangsen M. Effects of Dietary Carbohydrate-to-Lipid Ratio on the Growth Performance and Feed Utilization of Juvenile Turbot (*Scophthalmus maximus*). *J Ocean Univ China (Oceanic Coast Sea Res.* 2016;15(4):1672–5182.
21. Li X, Wang Y, Liu W, Jiang G, Zhu J. Effects of dietary carbohydrate/lipid ratios on growth performance, body composition and glucose metabolism of fingerling blunt snout bream *Megalobrama amblycephala*. *Aquac Nutr [Internet]*. 2013;19(5):701–8. Available from: <http://doi.org/10.1111/anu.12017>
22. Hu Y - H., Liu Y - J., Tian L - X., Yang H - J., Liang G - Y., Gao W. Optimal dietary carbohydrate to lipid ratio for juvenile yellowfin seabream (*Sparus latus*). *Aquac Nutr [Internet]*. 2007;13(4):291–7. Available from: <http://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2007.00476.x>
23. Torfi Mozanzadeh M, Yavari V, Marammazi JG, Agh N, Gisbert E. Optimal dietary carbohydrate-to-lipid ratios for silvery-black porgy (*Sparidentex hasta*) juveniles. *Aquac Nutr.* 2017;23(3):470–83.
24. Gao W, Liu Y, Tian L, Mai K, Liang G, Yang H, et al. Effect of dietary carbohydrate- to- lipid ratios on growth performance, body composition, nutrient utilization and hepatic enzymes activities of herbivorous grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Aquac Nutr [Internet]*. 2010;16(3):327–33. Available from: <http://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2009.00668.x>
25. Sterzelecki FC, Sugai JK, Baloi M, Passini G, Carvalho CVA, Fracalossi DM, et al.

- Effect of dietary carbohydrate to lipid ratios on growth, digestive enzyme and blood metabolites of juvenile Brazilian sardines, *Sardinella brasiliensis* (Steindachner, 1879). *Aquac Res.* 2017;48(9):5111–21.
26. Wiley EO, Schultze H-P. Family Lepisosteida (Gars) as Living Fossils. In: *Living Fossils (Casebooks in Earth Sciences)*. 1984. p. 160–5.
  27. Wright JJ, David SR, Near TJ. Gene trees , species trees , and morphology converge on a similar phylogeny of living gars ( Actinopterygii : Holostei : Lepisosteidae ), an ancient clade of ray-finned fishes. *Mol Phylogenet Evol* [Internet]. 2012;63(3):848–56. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ympev.2012.02.033>
  28. Frías-Quintana C, Domínguez-Lorenzo J, Álvarez-González C, Tovar-Ramírez D, Martínez-García R. Using cornstarch in microparticulate diets for larvicultured tropical gar (*Atractosteus tropicus*). *Fish Physiol Biochem.* 2016;42(2):517–28.
  29. Frías-Quintana C, Álvarez-González C, Tovar-Ramírez D, Martínez-García R, Camarillo-Coop S, Peña E, et al. Use of Potato Starch in Diets of Tropical Gar (*Atractosteus tropicus*, Gill 1863) Larvae. *Fishes* [Internet]. 2017;2(1):3. Available from: <http://www.mdpi.com/2410-3888/2/1/3>
  30. Guerrero-Zárate R, Álvarez-González C, Jesus-Contreras R, Peña-Marín E, Martínez-García R, Galaviz M, et al. Evaluation of carbohydrate / lipid ratios on growth and metabolic response in tropical gar ( *Atractosteus tropicus* ) juvenile. *Aquac Res.* 2019;50(March):1812–23.
  31. Amores A, Catchen J, Ferrara A, Fontenot Q, Postlethwait JH. Genome evolution

- and meiotic maps by massively parallel DNA sequencing: Spotted gar, an outgroup for the teleost genome duplication. *Genetics*. 2011;188(4):799–808.
32. Braasch I, Gehrke AR, Smith JJ, Kawasaki K, Manousaki T, Pasquier J, et al. The spotted gar genome illuminates vertebrate evolution and facilitates human-teleost comparisons. *Nat Genet*. 2016;48(4):427–37.
  33. Qu J, Ko C, Tso P, Bhargava A. Apolipoprotein A-IV : A Multifunctional Protein involved in protection againts atherisclerosis and diabetes. *Cells*. 2019;8(4):319–37.
  34. Verhague MA, Cheng D, Weinberg RB, Shelness GS. Apolipoprotein A-IV expression in mouse liver enhances triglyceride secretion and reduces hepatic lipid content by promoting very low density lipoprotein particle expansion. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013;33(11):2501–8.
  35. Tocher DR. Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish. *Rev Fish Sci*. 2003;11(2):107–84.
  36. Tocher DR, Bendiksen EÅ, Campbell PJ, Bell JG. The role of phospholipids in nutrition and metabolism of teleost fish. *Aquaculture*. 2008;280(1–4):21–34.
  37. Wu G, Vance DE. Choline kinase and its function. *Biochem Cell Biol* [Internet]. 2010;88(4):559–64. Available from:  
<http://www.nrcresearchpress.com/doi/10.1139/O09-160>
  38. Liao P, Wang H, Hemmerlin A, Nagegowda DA, Bach TJ, Wang M, et al. Past achievements, current status and future perspectives of studies on 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase (HMGS) in the mevalonate (MVA) pathway. *Plant*

- Cell Rep. 2014;33(7):1005–22.
39. Mathews CK, Van Holde KE, Ahern KG. *Bioquímica*. 3rd ed. España: Pearson Addison Wesley; 2002. 1368 p.
  40. Monroig O, Tocher DR, Filipe Castro LC. Chapter 3 - Polyunsaturated Fatty Acid Biosynthesis and Metabolism in Fish [Internet]. *Polyunsaturated Fatty Acid Metabolism*. Elsevier Inc.; 2018. 31–60 p. Available from:  
<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-811230-4.00003-X>
  41. Tocher DR. Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish. *Rev Fish Sci*. 2003;11(2):107–84.
  42. Yi P, Park JS, Melton DA. Betatrophin: A hormone that controls pancreatic  $\beta$  cell proliferation. *Cell*. 2013;153(4):747–58.
  43. Gusarova V, Alexa CA, Na E, Stevis PE, Xin Y, Bonner-Weir S, et al. ANGPTL8/betatrophin does not control pancreatic beta cell expansion. *Cell* [Internet]. 2014;159(3):691–6. Available from:  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2014.09.027>
  44. Davis WL, Jones RG, Farmer GR, J M, P GB. Glyoxylate cycle in the epiphyseal growth plate: Isocitrate lyase and malate synthase identified in mammalian cartilage. *Anat Rec* [Internet]. 1989;223:357–62. Available from:  
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ar.1092230402/abstract%5Cnpapers2://publication/uuid/77EABF37-C739-420B-B96F-81ADC993CD80>
  45. Vatner DF, Goedeke L, Camporez JPG, Lyu K, Nasiri AR, Zhang D, et al. Angptl8

- antisense oligonucleotide improves adipose lipid metabolism and prevents diet-induced NAFLD and hepatic insulin resistance in rodents. *Diabetologia*. 2018;61(6):1435–46.
46. Morgunov IG, Kondrashova MN, Kamzolova S V, Sokolov AP, Fedotcheva NI, Finogenova T V. Evidence of the glyoxylate cycle in the liver of newborn rats. *Med Sci Monit [Internet]*. 2005;11(2):BR57-60. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15668627>
47. Song S. Can the glyoxylate pathway contribute to fat-induced hepatic insulin resistance? *Med Hypotheses*. 2000;54(5):739–47.
48. Soyombo AA, Hofmann SL. Molecular cloning and expression of palmitoyl-protein thioesterase 2 (PPT2), a homolog of lysosomal palmitoyl-protein thioesterase with a distinct substrate specificity. *J Biol Chem*. 1997;272(43):27456–63.
49. Hammer RE, Hofmann SL, Wisniewski KE, Atashband A, Richardson JA, Gupta P, et al. Disruption of PPT1 or PPT2 causes neuronal ceroid lipofuscinosis in knockout mice. *Proc Natl Acad Sci [Internet]*. 2002;98(24):13566–71. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11717424><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC61081>
50. Gupta P, Soyombo AA, Shelton JM, Wilkofsky IG, Wisniewski KE, Richardson JA, et al. Disruption of PPT2 in mice causes an unusual lysosomal storage disorder with neurovisceral features. *Proc Natl Acad Sci*. 2003;100(21):12325–30.
51. Prisingkorn W, Prathomya P, Jakovlić I, Liu H, Zhao Y-H, Wang W-M.

- Transcriptomics, metabolomics and histology indicate that high-carbohydrate diet negatively affects the liver health of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*). *BMC Genomics* [Internet]. 2017;18(1):856. Available from: <https://bmcgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12864-017-4246-9>
52. Frías-Quintana C, Álvarez-González C, Márquez-Couturier G. Diseño de microdietas para el cultivo de pejelagarto *Atractosteus tropicus*, Gill 1863. *Univ y Cienc* [Internet]. 2010;26(2):265–82. Available from: <http://www.scielo.org.mx/pdf/uc/v26n3/v26n3a6.pdf>
  53. AOAC. *Official Methods of Analysis*, 17th Edition. Association of Official Analytical Chemists. 2000.
  54. Folch J, Lees M, Sloan Stanley G. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem*. 1957;226:497–509.
  55. Thivend P, Mercier C, Guilbot A. Determination of starch with glucoamylase. In: Whistler R, Bemiller J, editors. *Methods in Carbohydrate Chemistry*. New York, USA: Academic Press; 1972. p. 100–5.
  56. Márquez-Couturier G, Vázquez-Navarrete C, Contreras-Sánchez W, Alvarez-González C. *Acuicultura tropical sustentable: Una estrategia para la producción y conservación del pejelagarto (*Atractosteus tropicus*) en Tabasco, México* [Internet]. 2ª. Villahermosa, Tabasco: Universidad Juárez Autónoma de Tabasco; 2015. 87 p. Available from: <http://publicaciones.ujat.mx/cientificas/Documentos/Biología/36/Acuicultura>

tropical sustentable 11.pdf

57. Rio DC, Ares M, Hannon GJ, Nilsen TW. Purification of RNA using TRIzol (TRI Reagent). Cold Spring Harb Protoc. 2010;5(6):1–4.
58. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. Bioinformatics. 2014;30(15):2114–20.
59. Grabherr M, Haas B, Yassour M, Levin J, Thompson D, Amit I, et al. Trinity: reconstructing a full-length transcriptome without a genome from RNA-Seq data. Nat Biotechnol. 2013;29(7):644–52.

#### Leyendas de figuras

**Figura 1.** Análisis de componentes principales de genes diferencialmente expresados en los hígados de pejelagartos alimentados diferentes proporciones de CHO/L. n=3 peces por repetición

**Figura 2.** Heatmap de isoformas diferencialmente expresadas en los hígados de pejelagartos alimentados diferentes proporciones de CHO/L. n=3 peces por repetición.

**Figura 3.** Fotomicrografías de secciones histológicas representativas de hígados de *A. tropicus* alimentados con la D1 (a,d,g), D2 (b,e,h) y D3 (c,f,i). Magnificación 10X (a,b,c), 40X (d,e,f) y 100X (g,h,i).

## Tablas

Tabla 1. Genes diferencialmente expresados en D1 vs D3

Gene-id		full name	logF C	logCP M	PValu e	FD R	D1- R1	D1- R2	D1-D3- R3	D3- R1	D3- R2	D3- R3	D5- R1	D5- R2	D5- R3
TRINITY_DN33943_c0					5.0E-2.4E-										
_g1	NA	NA	7.82	0.41	11 07	2.5	2.4	1.7	0.0	0.0	0.0	0.0	1.2	0.0	
TRINITY_DN27688_c0					4.1E-6.0E-										
_g2	NA	NA	7.82	0.39	07 04	1.3	1.5	3.4	0.0	0.0	0.0	1.9	0.0	0.0	
TRINITY_DN51680_c0					1.5E-5.7E-										
_g1	NA	NA	7.62	0.23	09 06	1.8	1.9	1.9	0.0	0.0	0.0	0.0	1.3	0.0	
TRINITY_DN52491_c0					9.6E-2.2E-										
_g1	NA	NA	7.58	0.20	08 04	1.1	2.2	2.2	0.0	0.0	0.0	1.0	0.0	0.0	
TRINITY_DN55134_c0					1.0E-2.2E-										
_g1	NA	NA	7.45	0.09	07 04	1.8	2.5	0.9	0.0	0.0	0.0	0.0	2.6	0.0	
TRINITY_DN29513_c0		Apolipoprote			3.3E-1.1E-	498.	430.	499.							106.
_g1	APOA4_FELCA	in A-IV	2.82	8.20	08 04	1	0	3	61.4	108.7	44.3	76.4	13.7	1	
TRINITY_DN29114_c0		COCH_CHICK													
_g1		Cochlin, Coagulation factor C homolog	-3.14	1.92	07 04	0.8	0.4	0.9	7.6	3.7	8.1	3.0	5.8	1.8	
TRINITY_DN27883_c0		ANGL8_HUMA													
_g2	N	Angiopoietin -like protein 8	-3.69	6.20	12 08	13.9	7.0	8.4	191.6	109.3	8	4	47.0	60.7	
TRINITY_DN21711_c0		NA			5.5E-6.7E-										
_g1	NA	NA	-4.20	0.65	07 04	0.1	0.3	0.0	3.9	2.1	2.1	5.4	0.8	2.4	
TRINITY_DN28043_c0		MIIIB_DANRE			5.5E-6.7E-	135.		194.	3757.	4455.	847.	850.	221.	915.	
_g2		Mid1- interacting protein 1-B	-4.38	10.66	07 04	5	61.7	7	5	7	5	3	7	1	
TRINITY_DN30521_c0		ACACA_RAT			4.5E-2.4E-										
_g1		Acetyl-CoA carboxylase 1	-4.52	1.30	11 07	0.3	0.1	0.1	5.7	3.8	3.6	4.9	4.3	3.8	
TRINITY_DN46987_c0		ACACA_HUM			4.8E-6.6E-										
_g1	AN	Acetyl-CoA carboxylase 1	-5.77	0.12	07 04	0.0	0.1	0.0	2.9	1.1	1.5	2.5	2.0	1.2	
TRINITY_DN52956_c0		NA			3.6E-5.8E-										
_g1	NA	NA	-7.28	-0.08	07 04	0.0	0.0	0.0	1.6	1.3	1.7	0.0	3.6	0.0	
TRINITY_DN42539_c0		NA			2.1E-3.6E-										
_g1	NA	NA	-7.33	-0.04	07 04	0.0	0.0	0.0	1.7	1.4	1.8	0.0	1.3	0.9	
TRINITY_DN48839_c0		NA			8.2E-8.8E-										
_g1	NA	NA	-7.59	0.18	07 04	0.0	0.0	0.0	0.8	2.6	2.5	0.0	0.0	0.0	
TRINITY_DN58676_c0		NA			5.8E-1.6E-										
_g1	NA	NA	-8.06	0.59	08 04	0.0	0.0	0.0	1.9	4.8	1.4	0.9	1.9	0.5	
TRINITY_DN56636_c0		NA			1.4E-2.7E-										
_g1	NA	NA	-8.15	0.69	07 04	0.0	0.0	0.0	4.3	0.8	3.4	0.9	0.0	1.9	
TRINITY_DN67284_c0					2.4E-4.6E-										
_g1	NA	NA	-8.48	0.98	13 09	0.0	0.0	0.0	4.1	4.1	2.6	6.2	4.8	2.6	

Tabla 2. Genes diferencialmente expresados en D3 vs D5

Gene-Id	full name	logFC	logCPM	PValue	FDR	D1-R1	D1-R2	D1- R3	D3-R1	D3- R2	D3- R3	D5- R1	D5- R2	D5- R3
TRINITY_DN39877_c0_g1	NA	8.26	1.10	5.2E-08	0.00	2.5	2.7	0.0	4.5	1.1	5.9	0.0	0.0	0.0

TRINITY_DN31197_c1_g1	NA	7.96	0.82	1.6E-09	1.6E-05	0.9	6.2	0.9	1.8	2.9	4.6	0.0	0.0	0.0
TRINITY_DN70420_c0_g1	NA	7.95	0.82	2.3E-08	0.00	0.0	2.2	0.0	3.9	1.3	4.0	0.0	0.0	0.0
TRINITY_DN18003_c0_g1	NA	-2.38	2.25	5.0E-09	3.3E-05	2.2	3.9	2.0	1.3	1.4	1.7	5.9	8.3	7.2
TRINITY_DN58286_c0_g1	NA	-7.66	0.51	9.3E-10	1.6E-05	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.6	2.5	2.7

Tabla 3. Genes diferencialmente expresados en D1 vs D5

Gene-Id	Full name	logF	logCP	PValu	FDR	D1- R1	D1- R2	D1- R3	D3- R1	D3- R2	D3- R3	D5- R1	D5- R2	D5- R3
TRINITY_DN30649_c0_g2	NA	12.36	4.72	3.4E-20	5.9E-16	24.3	111.1	41.9	45.5	201.1	0.0	0.0	0.0	0.0
TRINITY_DN61452_c0_g1	LNX1_HUMAN E3 ubiquitin-protein ligase LNX	8.52	1.03	7.7E-09	1.5E-05	4.5	6.7	1.2	0.7	0.3	0.3	0.0	0.0	0.0
TRINITY_DN30396_c1_g6	NA	8.17	0.72	1.7E-07	1.7E-04	5.1	3.8	0.8	1.5	1.2	0.8	0.0	0.0	0.0
TRINITY_DN28754_c12_g1	NA	8.15	0.68	2.1E-07	2.0E-04	1.6	1.8	5.1	0.8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
TRINITY_DN65036_c0_g1	NA	8.01	0.55	1.1E-06	6.0E-04	1.5	1.4	4.7	0.5	0.0	0.5	0.0	0.0	0.0
TRINITY_DN66037_c0_g1	NA	7.55	0.18	1.1E-06	6.0E-04	0.7	3.0	2.2	1.5	0.0	1.5	0.0	0.0	0.0
TRINITY_DN49065_c0_g1	NA	7.47	0.11	1.3E-08	2.3E-05	1.9	2.0	1.9	4.7	0.0	2.0	0.0	0.0	0.0
TRINITY_DN60844_c0_g1	NA	7.47	0.11	1.1E-06	6.0E-04	3.2	1.7	0.8	1.6	9.3	1.7	0.0	0.0	0.0
TRINITY_DN67267_c0_g1	NA	7.42	0.07	3.8E-07	2.9E-04	1.3	2.9	1.4	1.4	0.0	8.5	0.0	0.0	0.0
TRINITY_DN59466_c0_g1	NA	7.37	0.03	1.4E-06	7.2E-04	0.8	2.9	1.7	1.7	1.4	4.3	0.0	0.0	0.0
TRINITY_DN30028_c11_g1	NA	7.35	0.01	1.7E-07	1.7E-04	1.6	1.8	1.7	2.2	0.0	0.3	0.0	0.0	0.0
TRINITY_DN7238_c0_g2	NA	7.13	-0.18	9.6E-07	6.0E-04	1.4	1.5	1.5	0.0	1.2	0.0	0.0	0.0	0.0
TRINITY_DN3602_c0_g1	NA	7.11	-0.18	1.7E-06	8.3E-04	1.7	1.9	0.9	0.0	1.5	2.7	0.0	0.0	0.0
TRINITY_DN14898_c0_g1	NA	4.58	3.21	5.2E-08	6.5E-05	18.5	36.6	4.9	4.2	1.0	2.1	1.1	0.7	0.5
TRINITY_DN31738_c0_g1	PLC_LISMO phosphatidylinositol phosphodiesterase	3.93	2.62	2.3E-06	1.0E-03	16.0	7.8	11.4	2.1	10.8	1.7	0.8	1.5	0.1
TRINITY_DN62275_c0_g1	NA	3.91	2.96	8.3E-15	7.3E-11	14.2	22.6	10.4	0.0	0.9	2.2	1.0	1.5	0.5
TRINITY_DN26109_c0_g1	F-box only protein 50	3.12	4.00	8.6E-14	5.0E-10	36.8	29.6	24.8	10.7	45.8	2.8	3.4	3.3	3.4
TRINITY_DN64095_c0_g1	FBX50_DANRE	2.92	0.89	3.1E-07	2.7E-04	2.8	3.9	2.8	1.0	2.0	1.8	0.5	0.5	0.3
TRINITY_DN31798_c0_g1	S13A5_HUMAN Solute carrier family 13 member 5	2.42	2.62	1.0E-06	6.0E-04	11.4	16.7	5.5	3.1	0.9	19.3	2.2	2.4	1.4
TRINITY_DN31866_c1_g3	LCE_ORYLA Low choriolytic enzyme	2.22	4.81	3.5E-07	2.8E-04	70.3	46.3	32.9	10.3	53.0	12.2	9.2	10.9	10.6

TRINITY_DN12923_c0_g1	IOD3_SPAAU	Thyroxine 5-deiodinase	2.17	5.79	5.5E-07	3.8E-04	85.8	84.4	112.4	106.5	6.3	79.0	18.2	20.7	23.1
TRINITY_DN19052_c0_g1	FGL1L_CHICK	Fibrinogen-like protein 1-like protein	2.11	4.59	1.4E-06	7.2E-04	43.8	53.0	30.9	5.9	18.7	7.3	8.1	7.1	12.3
TRINITY_DN28407_c0_g1	THIC_MOUSE	Acetyl-CoA acetyltransferase, cytosolic	-2.13	2.52	2.1E-06	9.4E-04	2.1	2.8	1.9	3.7	5.5	7.4	8.9	6.9	12.0
TRINITY_DN30121_c0_g1	SERC_RABIT	Phosphoserine aminotransferase	-2.46	1.86	4.8E-07	3.5E-04	0.9	1.8	0.8	3.5	3.6	3.8	4.4	10.2	4.8
TRINITY_DN8056_c0_g1	ANGL3_HUMAN	Angiopoietin-related protein 3	-2.63	3.40	1.1E-06	6.0E-04	4.1	2.0	3.1	14.2	16.8	12.7	9.5	28.2	20.5
TRINITY_DN31409_c0_g3	NA	NA	-3.23	7.21	2.7E-07	2.5E-04	38.1	47.3	11.3	125.8	141.9	330.4	174.5	499.6	205.2
TRINITY_DN50051_c0_g1	ACACA_HUMAN	Acetyl-CoA carboxylase 1	-4.30	0.64	2.1E-08	3.4E-05	0.3	0.2	0.0	3.6	2.7	1.1	3.5	3.0	2.2
TRINITY_DN30521_c0_g1	ACACA_RAT	Acetyl-CoA carboxylase 1, acetyl-CoA carboxylase biotin carboxylase	-4.62	1.20	7.9E-13	3.4E-09	0.3	0.1	0.1	5.7	3.8	3.6	4.9	4.3	3.8
TRINITY_DN46987_c0_g1	ACACA_HUMAN	Acetyl-CoA carboxylase 1	-5.88	0.05	1.0E-07	1.2E-04	0.0	0.1	0.0	2.9	1.1	1.5	2.5	2.0	1.2
TRINITY_DN40566_c0_g1	NA	NA	-7.31	-0.14	8.0E-07	5.4E-04	0.0	0.0	0.0	1.8	0.0	0.0	1.7	1.3	1.9
TRINITY_DN29492_c2_g7	NA	NA	-7.46	0.00	2.1E-06	9.4E-04	0.0	0.0	0.0	1.4	0.0	0.0	1.5	3.5	0.8
TRINITY_DN67801_c0_g1	NA	NA	-7.73	0.23	5.6E-10	1.2E-06	0.0	0.0	0.0	0.7	2.2	4.2	2.5	1.9	2.1
TRINITY_DN58286_c0_g1	NA	NA	-7.80	0.29	7.1E-11	1.8E-07	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.6	2.5	2.7
TRINITY_DN28441_c1_g5	NA	NA	-7.84	0.29	2.2E-06	9.6E-04	0.0	0.0	0.0	1.5	1.2	0.8	4.2	1.1	1.5
TRINITY_DN6589_c0_g1	NA	NA	-7.92	0.40	3.3E-07	2.7E-04	0.0	0.0	0.0	1.4	0.0	1.4	2.6	1.0	3.6
TRINITY_DN62690_c0_g1	NA	NA	-8.10	0.56	5.1E-08	6.5E-05	0.0	0.0	0.0	3.8	0.0	4.9	3.6	4.1	1.0
TRINITY_DN40933_c0_g1	NA	NA	-8.18	0.66	3.3E-08	4.9E-05	0.0	0.0	0.0	0.0	0.7	0.0	0.8	4.2	4.3
TRINITY_DN67284_c0_g1	NA	NA	-8.79	1.21	1.1E-12	3.8E-09	0.0	0.0	0.0	4.1	4.1	2.6	6.2	4.8	2.6

TRINITY_DN25389_c0_g1	ELOV2	Elongation of very long chain fatty acids protein	-	10.31	2.69	3.9E-12	1.1E-08	0.0	0.0	0.0	2.7	2.4	0.6	6.8	5.9	26.0
-----------------------	-------	---	---	-------	------	---------	---------	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	------

Tabla 4. Genes por isoforma diferencialmente expresados en D1 vs D3

GENE-ID	CLAV E	FULL NAME	logF C	logC PM	PV alu e	FDR	D1 R1	D1 R2	D1 R3	D3 R1	D3 R2	D3 R3	D5 R1	D5 R2	D5 R3
TRINITY_DN30841_c0_g3_i8	CIRBP_RAT	Cold-inducible RNA-binding protein	13,97	6,375	7,5	2E-35	23	26	14	0,0	6,8	2,2			0,9
TRINITY_DN30841_c0_g3_i6	CIRBP_RAT	Cold-inducible RNA-binding protein	12,08	4,496	5,1	1E-19	19	23	37	0	0	0	0	0	0
TRINITY_DN31672_c0_g1_i2	F210B_MOUS E	Protein FAM210B	10,70	3,136	3,4	6E-17	1,70	7,0	4,6	3,6	0	0	0	0	0,3
TRINITY_DN29789_c2_g1_i1	RBP1_HUMA N	RalA-binding protein 1	10,25	2,692	2,5	1E-17	9,88	2,0	3,6	1,8	0,0	0	0	0,0	3,4
TRINITY_DN19920_c0_g1_i2	CSK_C HICK	Tyrosine-protein kinase CSK	9,046	1,529	1,2	4E-07	7,49	1,0	0,6	2,9	0	0	0	0	0
TRINITY_DN27922_c0_g4_i2	ASCC2_HUM AN	Activating signal cointegrator 1 complex subunit 2	8,787	1,292	3,7	3E-13	8,16	1,3	1,6	1,0	0	0	0,0	1,5	2,8
TRINITY_DN29593_c3_g2_i2	SCMC2_XENT R	Calcium-binding mitochondrial carrier protein SCaMC-2	2874	9959	4	13	E-10	19	26	4	0	0	0,0	12	71
TRINITY_DN23097_c0_g1_i1	RAD1_RAD1	Cell cycle checkpoint protein RAD1	8,604	1,117	1,2	8E-07	7,49	0,8	0,2	1,0	0	0	0	0	0,5
TRINITY_DN30967_c0_g1_i4	RAD1_RAD1	Cell cycle checkpoint protein RAD1	1053	9080	8E-07	7,49	0,8	0,2	1,0	0	0	0	0	0	0,2
TRINITY_DN26439_c0_g1_i1	AKIB1_HUM AN	Ankyrin repeat and IBR domain-containing protein 1	8,441	0,974	2,5	3E-11	3,32	1,9	3,2	2,4	0	0	0	0	4,2
TRINITY_DN31460_c0_g1_i4	TI17B_HUMA N	Mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim17-B	1603	6722	3E-11	E-08	68	68	22	0	0	0	0	0	0,4
TRINITY_DN31201_c1_g1_i8	NEK1_HUMA N	Serine/threonine-protein kinase Nek1	8,422	0,958	6,2	9E-09	9,39	0,9	1,1	0,9	0	0	0	1,4	0,6
TRINITY_DN30239_c0_g1_i4	COFA1_MOUS SE	Collagen alpha-1(XV) chain	95	2	12	E-09	99	07	68	0	0	0	68	0	11
TRINITY_DN28330_c0_g2_i3	DPOE3_PONA B	DNA polymerase epsilon subunit 3	8,410	0,946	7,9	8E-11	8,73	0,6	0,9	0,4	0	0	0	0	0,9
TRINITY_DN29888_c0_g1_i1	MARK2_MOUSE	Serine/threonine-protein kinase MARK2	7785	9784	8E-11	E-08	7	82	42	0	0	0	0	0	3
TRINITY_DN31027_c1_g5_i5	ELOA1_MOUSE SE	Elongin-A	8,361	0,903	1,5	7E-09	1,48	0,8	1,7	0,6	0	0	0,0	1,1	0,2
TRINITY_DN24125_c0_g1_i1	SE_MOUSE	Elongin-A	4372	6941	7E-09	E-06	08	85	63	0	0	0,0	7	46	32

TRINITY_D N30788_c0_g 2_i2	NA	NA	7,638 1484 05	0,263 5691 63	1,6 7E- 07	9,15 E-05	0,9 58	2,2 16	1,7 29	0	0	0	0	0	0	
TRINITY_D N30579_c1_g 1_i3	DPYL1 _HUM	Dihydropyrimidinase-related protein 1	7,446 7575 35	0,100 9661 92	7,6 1E- 07	0,000 3656 62	0,8 0,5 0,7	0,5 0,3 0,5	0,3 0,3 0,5	0	0	0	0	0	0,3 61	
TRINITY_D N25397_c0_g 1_i1	SC23A _CHIC	Protein transport protein Sec23A	6,753 6571 62	1,347 8546 74	2,1 7E- 10	2,25 E-07	1,3 19	0,9 89	1,1 73	0,0 0	0,2 25	1,4 0	0,0 46	0,2 66	0,0 04	
TRINITY_D N29513_c0_g 1_i5	APOA4	Apolipoprotein A-IV	2,763 1763 68	9,122 3997 92	2,2 7E- 06	0,000 9716 09	47 9,8 67	34 5,3 99	44 7,7 75	56, 0,7 3	10 01 97	42, 58 5	66, 51 2	11, 51 4	10 1,1 03	
TRINITY_D N29114_c0_g 1_i1	COCH_ CHICK	Cochlin	3,108 0967 2	3,512 0670 45	1,8 3E- 06	0,000 8387 06	0,7 62	0,3 81	0,9 33	7,3 87	3,7 36	8,4 85	2,9 61	5,5 31	2	
TRINITY_D N27883_c0_g 2_i1	ANGL8 _HUM	Angiotensin-like protein 8	3,622 0059 2	6,273 6839 93	2,9 4E- 08	10, 2,14 E-05	52 8	3,4 94	4,9 03	6,4 84	27 2	67, 74	73 9	85, 73	28, 90	44, 18
TRINITY_D N27883_c0_g 2_i2	ANGL8 _HUM	Angiotensin-like protein 8	3,630 4662 4	3,477 3347 07	5,2 3E- 08	3,55 E-05	0,6 43	0,7 47	1,0 3	38 8	5,0 78	42 9	8,7 17	1,5 44	4,0 93	
TRINITY_D N27883_c0_g 2_i3	ANGL8 _HUM	Angiotensin-like protein 8	4,004 0993 3	5,280 1156 82	4,1 2E- 11	5,07 E-08	2,5 02	2,5 57	2,3 37	65, 54	31, 63	26, 47	30, 83	14, 46	17, 68	
TRINITY_D N21711_c0_g 1_i1	NA	NA	4,359 4601 7	1,870 1814 94	1,1 3E- 07	7,40 E-05	0,0 66	0,2 62	0,0 35	3,8 38	2,1 03	2,1 58	5,3 51	0,7 69	2,5 55	
TRINITY_D N20954_c0_g 1_i1	CMC2_ HUMA	Calcium-binding mitochondrial carrier protein Aralar2	4,413 2489 2	1,490 0243 92	1,3 6E- 08	1,12 E-05	0,0 48	0,0 47	0,0 0,1	1,8 97	1,1 24	1,4 39	0,7 85	2,5 71	2,2 32	
TRINITY_D N28043_c0_g 2_i1	M111B _DAN	Mid1-interacting protein 1- B	4,425 3777 2	9,965 5267 26	2,0 8E- 06	0,000 9097 63	13 3,5	59, 77	19 2,2	36 75,	44 85,	88 8,3	84 2,4	21 1,7	99 3,7	
TRINITY_D N30521_c0_g 1_i1	ACAC A_RAT	Acetyl-CoA carboxylase 1	4,529 1191 1	9,309 41	5,2 5E- 14	1,48 E-10	0,2 74	0,1 29	0,1 42	5,6 16	3,8 06	3,7 48	4,8 93	4,1 13	4,0 79	
TRINITY_D N31917_c0_g 1_i2	NA	NA	5,462 9906 6	0,621 8881 15	2,4 4E- 07	0,000 1299 03	0,0 08	0,0 0	0,0 11	0,7 05	0,3 56	0,4 23	0,1 0	36 0	0	
TRINITY_D N31494_c0_g 1_i11	RB11A _RAT	Ras-related protein Rab-11A	5,800 8486 9	1,905 3238 53	3,7 1E- 09	3,32 E-06	0,0 19	0,0 36	0,0 19	0,6 59	2,5 94	2,0 48	0,8 33	1,2 78	0,0 02	
TRINITY_D N31641_c0_g 1_i6	NA	NA	6,564 1379 1	0,907 9051 44	4,6 1E- 07	0,000 2327 98	0,0 0	0,0 15	0,0 68	3,2 57	1,1 48	1,2 5	0,3 69	0,0 69	0,3 29	
TRINITY_D N28782_c0_g 1_i3	NA	NA	7,097 0183 8	0,235 2555 9	2,0 5E- 06	0,000 9097 63	0 0	0 0	0 0	0,7 64	0,5 66	0,9 46	0,6 54	0 0	0	
TRINITY_D N28253_c0_g 1_i4	CLC4F _RAT	C-type lectin domain family 4 member F	7,611 0335 6	0,204 6776 66	7,5 3E- 07	0,000 3656 62	0 0	0 0	0 0	1,6 56	0,5 63	1,5 39	0,8 9	4,4 77	1,1 63	
TRINITY_D N26198_c0_g 1_i1	CND3_ XENL	Condensin complex subunit 3	7,816 0959 8	0,375 0865 03	3,0 1E- 07	0,000 1558 19	0 0	0 0	0 0	0,4 26	0,9 61	0,4 25	0,4 64	0 0	0	

TRINITY_D N28932_c0_g 1_i13	SHLB2 _CHIC K	Endophilin-B2	8,248 3762 3	0,761 3058 51	1,0 7E- 06	0,000 5013 14	0	0	0	0,7 33	1,2 4	0,2 53	0,2 0	86	0	
TRINITY_D N26009_c0_g 1_i2	EPC1_ HUMA N	Enhancer of polycomb homolog 1	8,322 1868 7	0,835 3310 22	1,6 8E- 08	1,27 E-05	0	0	0	0,3 38	0,9 98	0,8 09	1,5 55	0	0,5 02	
TRINITY_D N28330_c0_g 2_i2	COFA1 _MOU SE	Collagen alpha-1(XV) chain	8,523 2675 6	1,023 9259 41	2,5 9E- 12	4,63 E-09	0	0	0	0,6 75	0,6 38	0,7 19	0,3 73	0,2 14	0,4 92	
TRINITY_D N31649_c2_g 2_i4	PURA2 _MOU SE	Adenylosuccinate synthetase isozyme 2	8,699 8775 1	1,188 8247 58	1,4 3E- 11	2,00 E-08	0	0	0	1,1 98	2,0 78	1,7 97	0,7 68	0	1,5 67	
TRINITY_D N27409_c0_g 1_i1	ACOD _CYPC A	Acyl-CoA desaturase	8,739 9703 3	1,226 2166 77	1,0 1E- 12	1,99 E-09	0	0	0	1,1 23	1,0 42	1,4 57	0,7 73	0,2 45	1,7 99	
TRINITY_D N27077_c0_g 1_i1	NA NA	NA	8,862 8133	1,342 41	3,0 12	5,07 E-09	0	0	0	0,9 19	1,3 43	0,8 78	0	1,1 81	0,9 67	
TRINITY_D N27922_c0_g 4_i1	ASCC2 _HUM AN	Activating signal cointegrator 1 complex subunit 2	8,923 9827 3	1,399 8489 37	6,6 3E- 14	1,63 E-10	0	0	0	1,4 03	1,4 2	1,6 79	0	0	1,8 61	
TRINITY_D N31491_c0_g 1_i2	K0100_ HUMA N	Protein KIAA0100	8,956 7679 8	1,434 6501 01	4,2 5E- 09	3,64 E-06	0	0	0	1,5 02	0,3 89	0,9 74	0,4 21	0,8 49	0,9 05	
TRINITY_D N24571_c0_g 1_i3	ABHG A_RAT	Protein ABHD16A	9,521 7439 1	1,971 6016 78	4,8 4E- 08	3,40 E-05	0	0	0	0,5 9	2,9 63	5,7 93	1,9 41	0	0	
TRINITY_D N24316_c0_g 1_i1	NA NA	NA	10,81 5490 8	3,234 3368 72	4,0 5E- 15	1,33 E-11	0	0	0	19, 26	7,9 2	6,0 92	11, 1	8,1 65	15 1	
TRINITY_D N29911_c1_g 1_i3	MACD _RAT	acetyl-ADP-ribose deacetylase MACROD1	10,85 8525 9	3,276 8671 91	9,5 7E- 24	9,43 E-20	0	0	0	10, 8	12, 3	96 65	93 99	8,0 0	4,6 0	7,9 38

Tabla 5. Genes por isoforma diferencialmente expresados en D3 vs D5

GENE-ID	CLAVE	FULL NAME	logF C	logC PM	PVa lue	FDR	D1	D1	D1	D3	D3	D3	D5	D5	D5
							R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
TRINITY_DN 30208_c0_g1_ i2	HPRT_ CHICK	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase	12.45 9867 19	5.170 6069 41	3.3 0E- 35	6.45E -31	14. 43	8.8 17	15. 57	16. 70	15. 19	15. 35	0	0	0
TRINITY_DN 30716_c0_g1_ i3	ABHEB _HUMA N	Protein ABHD14B	11.11 0179 52	3.834 3.834 6752	1.5 5E- 21	1.52E -17	13. 81	18. 0	11. 38	11. 51	11. 13.	11. 7.1	0	0	0
TRINITY_DN 30698_c2_g1_ i3	HNRL1 _HUMA N	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like protein 1	9.765 0502 58	2.522 3302 16	1.9 0E- 16	7.42E -13	1.9 0	1.5 18	2.6 51	1.2 48	2.0 88	2.0 78	0	0	0
TRINITY_DN 30989_c0_g1_ i3	CNOT1 _DANR	CCR4-NOT transcription complex subunit 1	9.713 6939	2.472 9825	9.0 7E- 13	4.43E -13	0.7 47	1.6 86	0.7 72	2.2 26	1.4 57	1.6 5	0	0	0



30901_c0_g1_i3	_CHIC K	CoA synthase	6.383 649	6.383 6485	361 9	-12 ##	## ##	62	85	45	1	19	09	6	79	
TRINITY_DN 29901_c1_g2_i2	SEPT6_ HUMA N	Septin-6	7.121 9954	0.093 8334	6.8 5E-	0.000 4054		0.7						0.5	0.8	0.5
TRINITY_DN 31278_c0_g1_i3	SSRA_ ONCM Y	Translocon-associated protein subunit alpha	7.266 1415	0.213 0273	1.9 6E-	0.000 1365		0.7						0.4	0.5	0.7
TRINITY_DN 24125_c0_g1_i1	ELOA1 _MOUS E	Elongin-A	7.650 2650	0.542 7422	3.4 1E-		3.34E	1.7	0.9	0.7				1.5	1.1	1.1
TRINITY_DN 31326_c1_g1_i2	NA	NA	7.775 1628	0.653 4053	5.6 4E-		6.48E							0.6	0.6	0.5
TRINITY_DN 30331_c0_g1_i6	NPL_R AT	acetylneuraminate lyase	7.856 6973	0.721 6079	5.7 4E-		5.10E	0.0						1.0	0.5	0.6
TRINITY_DN 25118_c0_g1_i2	NA	NA	8.339 9332	1.163 6512	2.6 0E-		3.39E		0.0	1.0				0.6	1.8	2.0
TRINITY_DN 31201_c1_g1_i8	NEK1_ HUMA N	Serine/threonine-protein kinase Nek1	- 8.865 3	1.651 8547	3.1 2E-		7.63E	0.5	0.7	0.6				1.2	1.5	1.0
TRINITY_DN 29632_c0_g1_i14	ARLY_ LITCT	Argininosuccinate lyase	9.071 1054	1.845 3618	1.2 0E-		3.90E		1.7					1.7	2.0	2.8
TRINITY_DN 30331_c0_g1_i2	NPL_R AT	acetylneuraminate lyase	9.627 1330	2.378 7130	1.6 0E-		1.04E	0.0						2.7	3.5	3.5

Tabla 6. Genes por isoforma diferencialmente expresados en D1 vs D5

Gene-ID	CLAVE	FULL NAME	logF C	logC PM	PV alue	FDR	D1 R1	D1 R2	D1 R3	D3 R1	D3 R2	D3 R3	D5 R1	D5 R2	D5 R3
TRINITY_DN 30208_c0_g1_i2	HPRT_ CHICK	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase	12.52 4758	4.903 7061	8.2 6E-		14.		15.	16.	15.	15.			
TRINITY_DN 30841_c0_g3_i6	CIRBP_ RAT	Cold-inducible RNA- binding protein	11.98 6622	4.369 8470	1.9 5E-	1.55E	43	8.8	57	70	19	35			
TRINITY_DN 25001_c0_g2_i1	NA	NA	9.909 1542	2.337 5431	2.7 1E-	2.21E	10.	18	1.3	7.7		6.2			
TRINITY_DN 30649_c0_g2_i1	NA	NA	9.510 3479	1.955 7388	2.2 8E-		23.	10		44.	20				
TRINITY_DN 31119_c0_g1_i2	NA	NA	9.413 7315	1.862 3521	6.5 5E-	2.04E	1.5	2.3	1.9	0.3	0.9	2.0			
TRINITY_DN 30841_c0_g3_i8	CIRBP_ RAT	Cold-inducible RNA- binding protein	9.276 0553	6.252 0423	1.5 5E-	4.14E	0.0	6.8	2.2					0.9	

TRINITY_DN 30989_c0_g1_	CNOT1 _DANR	CCR4-NOT transcription complex subunit 1	9.244 6075	1.702 4326	1.1 5E-	2.16E	0.7	1.6	0.7	2.2	1.4	1.6						
i1	E		91	48	12	-09	47	86	72	26	57	5	0	0	0			
TRINITY_DN 29655_c0_g1_	GLCTK _DANR		9.121 8557	1.586 7086	1.1 4E-	5.42E	5.0	1.7	0.7	1.8	0.9	3.3						
i4	E	Glycerate kinase	96	68	07	-05	02	25	14	41	48	66	0	0	0			
TRINITY_DN 31639_c0_g3_	GIMA4 _HUMA	GTPase IMAP family member 4	9.067 7436	1.538 4675	1.2 2E-	7.89E	2.1	2.1	0.4	2.4		1.2						
i3	N		61	07	08	-06	16	3	78	97	0	73	0	0	0			
TRINITY_DN 19920_c0_g1_	CSK_C HICK	Tyrosine-protein kinase CSK	8.944 1523	1.414 7190	1.7 2E-	7.67E	1.0	0.6	2.9									
i2			28	58	07	-05	88	69	65	0	0	0	0	0	0			
TRINITY_DN 28179_c0_g1_	TPPC1_ RAT	Trafficking protein particle complex subunit 1	8.808 9345	1.295 5596	1.7 8E-	1.96E	3.2	3.2	5.0		4.2							0.0
i1			35	03	10	-07	76	47	3	0	55	0	0	0	0			1
TRINITY_DN 30079_c1_g1_	ALKB3 _RAT	Alpha-ketoglutarate- dependent dioxygenase alkB homolog 3	8.802 3854	1.289 9866	1.1 3E-	1.51E	3.1	2.8	1.3		2.0	1.7						
i2			1	35	10	-07	8	83	26	0	33	77	0	0	0			
TRINITY_DN 30734_c0_g1_	PRC2B_ HUMA		8.749 4530	1.237 4707	2.4 7E-	1.44E	0.9	0.2			1.8							
i2	N	Protein PRRC2B	22	65	08	-05	56	55	0.6	0	68	0	0	0	0			
TRINITY_DN 28497_c0_g1_	RRF2M _DANR		8.438 9571	0.956 9944	2.8 0E-	4.03E	1.1	1.3	0.8		1.3							
i1	E	ribosome-releasing factor 2	41	45	11	-08	63	69	86	0	94	0	0	0	0			
TRINITY_DN 27629_c1_g1_	NA	NA	8.259 8350	0.796 2753	5.6 2E-	2.93E	1.3	0.8	0.4	1.4		0.5						
i2			88	17	08	-05	02	39	6	61	0	64	0	0	0			
TRINITY_DN 27646_c0_g1_	BMAL1 _TYTA	Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like protein 1	8.176 7845	0.721 6491	4.7 9E-	4.48E	0.8	1.3	0.9	1.4		1.7						
i2	L		91	97	10	-07	96	47	2	49	0	93	0	0	0			
TRINITY_DN 29001_c1_g4_	PPT2A_ XENLA	Lysosomal thioesterase PPT2-A	8.161 4869	0.708 1116	1.3 8E-	8.61E	1.3	0.9	1.4	1.3	0.2	1.3						
i5			72	01	08	-06	58	25	01	95	26	2	0	0	0			
TRINITY_DN 31249_c1_g4_	HGH1_ DANRE		7.971 0418	0.536 2696	2.2 9E-	9.76E	1.6	0.6	1.4		2.3							
i4		Protein HGH1 homolog	34	64	07	-05	6	3	78	0	0	49	0	0	0			
TRINITY_DN 27157_c0_g1_	MUL1A	Mitochondrial ubiquitin ligase activator of nfkb 1-A	7.827 6172	0.415 5421	8.1 1E-	4.10E	1.5	0.9	0.9	1.1	0.4	1.0	0.0					
i1			57	09	08	-05	71	56	84	76	07	18	01	0	0			
TRINITY_DN 30143_c2_g1_	MGST3 _HUMA	Microsomal glutathione S- transferase 3	7.791 3184	4.445 0965	3.7 9E-	3.73E	29	9.3	12	49			0.0	0.0	0.2			
i2	N		77	94	10	-07	6	5	4	7	0	0	27	03	11			
TRINITY_DN 29001_c1_g4_	PPT2A_ XENLA	Lysosomal thioesterase PPT2-A	7.709 5126	0.312 4595	6.6 3E-	0.000	2332	1.4	0.6	0.5	1.9	2.2	1.6					
i1			1	45	07	78	93	5	28	33	78	6	0	0	0			
TRINITY_DN 28528_c0_g1_	NA	NA	7.693 4874	0.299 5256	1.1 6E-	5.42E	03	24	10.	8.2		5.1						
i4			18	2	07	-05	8	2	4	13	0	33	0	0	0			
TRINITY_DN 30959_c6_g2_	NA	NA	7.653 2585	0.266 6018	6.0 6E-	0.000	2226	2.0	2.7	0.9	3.2	1.9	2.2					
i2			7	21	07	73	24	04	67	04	1	61	0	0	0			
TRINITY_DN 27888_c0_g1_	E4F1_D ANRE	Transcription factor E4F1	7.542 1875	0.174 3319	6.3 7E-	0.000	2295	0.5	0.7	0.2	0.5	0.1	0.2					
i2			13	82	07	5	61	69	13	22	78	48	0	0	0			
TRINITY_DN 30788_c0_g2_	NA	NA	7.538 9256	0.169 1496	1.8 3E-	7.97E	0.9	2.2	1.7									
i2			21	49	07	-05	58	16	29	0	0	0	0	0	0			
TRINITY_DN 29719_c0_g2_	NFYA_ RAT	Nuclear transcription factor Y subunit alpha	7.536 3476	0.166 7159	5.0 8E-	0.000	1901	0.3	0.4	0.4	0.0		0.3					
i1			22	36	07	81	04	62	66	56	0	5	0	0	0			
TRINITY_DN 31921_c0_g3_	VMA5A _HUMA	Von Willebrand factor A domain-containing protein	7.442 5824	0.085 8859	6.7 9E-	0.000	2332	0.6	0.3	0.5	0.1	0.0			0.0			
i16	N		66	52	07	78	51	25	17	75	47	0	0	0	08	0		
TRINITY_DN 30053_c0_g1_	CCD84_ HUMA	Coiled-coil domain- containing protein 84	7.414 7539	0.064 9241	3.1 7E-	0.000	1288	1.2	0.9	0.5		1.8	0.3					
i3	N		53	29	07	52	48	51	55	0	39	62	0	0	0			

TRINITY_DN 23178_c0_g1_ i5	NA	NA	7.381 5790 5	0.037 4264 38	6.8 5E- 07	0.000 2332 78	1.6 17	1.4 37	1.0 49	1.2 3	1.3 65	0.2 95	0	0	0
TRINITY_DN 31488_c1_g1_ i11	RGS8_ MOUSE	Regulator of G-protein signaling 8	7.229 2299 87	0.088 4469 71	9.8 2E- 07	0.000 3025 24	1.5 33	1.0 52	1.0 27	0.1 5	1.1 73	0.6 24	0	0	0
TRINITY_DN 31021_c3_g1_ i1	RXRBA _DANR E	Retinoic acid receptor RXR-beta-A	7.101 5008 19	0.190 6784 67	4.0 4E- 06	0.000 9945 55	0.7 37	0.6 36	0.3 5	1.0 97	0.7 0	0.7 15	0	0	0
TRINITY_DN 30529_c0_g1_ i1	LIMC1_ HUMA N	LIM and calponin homology domains- containing protein 1	7.037 8083 37	0.242 4697 48	2.4 6E- 06	0.000 6407 77	0.1 95	0.2 23	0.2 31	0.0 02	0.0 06	0.1 64	0.0 04	0.0 01	0.0 04
TRINITY_DN 27990_c0_g1_ i4	FARP1_ RAT	FERM, RhoGEF and pleckstrin domain- containing protein 1	7.028 8247 77	0.249 3314 21	2.2 4E- 06	0.000 6071 16	0.2 17	0.2 9	0.2 63	0.1 85	0	0	0	0	0
TRINITY_DN 31544_c0_g1_ i5	USO1_ MOUSE	General vesicular transport factor p115	6.724 9549 73	1.310 6341 2	9.8 5E- 07	0.000 3025 24	0.3 54	0.8 15	1.7 44	0.9 69	1.8 48	0.9 13	0	0	0.0 11
TRINITY_DN 28669_c0_g1_ i1	TI161A_ DANRE	Transmembrane protein 161A	6.182 8736 09	0.865 2067 92	6.1 9E- 09	0.000 4.61E -06	1.5 76	1.0 42	1.0 24	1.3 58	0.3 77	0	0	0.0 26	0
TRINITY_DN 29144_c0_g1_ i2	MRP_B OVIN	MARCKS-related protein	5.872 4184 07	0.677 2952 07	4.1 1E- 06	0.000 9993 24	3.2 42	3.9 75	1.2 13	1.9 64	0	0	0.1 78	0	0
TRINITY_DN 14898_c0_g1_ i1	NA	NA	4.587 7758 14	2.980 9736 14	4.8 7E- 07	0.000 1866 35	18. 21	35. 40	18. 4.8	35. 4.1	0.9 0.9	2.1 1.0	1.0 0.6	0.6 0.5	0.5 21
TRINITY_DN 62275_c0_g1_ i1	NA	NA	3.911 3047 01	0.467 0665 34	2.3 0E- 06	0.000 6149 43	13. 97	21. 87	10. 25	0.8 0	2.2 85	0.9 94	1.4 88	0.5 94	0.5
TRINITY_DN 26109_c0_g1_ i4	FBX50_ DANRE	F-box only protein 50	3.000 8418 72	3.851 8036 26	1.6 5E- 10	0.000 1.96E -07	34. 89	96 8	25 8	9.5 1	13 4	2.9 46	3.3 91	3.1 89	3.3 78
TRINITY_DN 31750_c0_g1_ i4	NA	NA	2.971 2749 01	2.637 5399 18	1.9 1E- 08	0.000 1.16E -05	10. 93	10. 9.8	10. 7.5	2.9 52	45 01	3.0 15	1.1 39	1.7 58	0.7 38
TRINITY_DN 31139_c2_g1_ i3	GRAG_ MOUSE	Granzyme G	2.598 4157 86	3.510 6685 07	1.6 4E- 06	0.000 4729 4	3.6 22	9.4 66	5.3 09	2.1 12	1.5 64	4.5 98	1.0 28	0.7 88	1.0 72
TRINITY_DN 19052_c0_g1_ i1	FGL1L_ CHICK	Fibrinogen-like protein 1- like protein	2.235 9005 36	4.910 4091 22	8.0 7E- 07	0.000 2605 49	42. 36	48. 42	28. 73	18. 5.3	18. 86	6.9 6.9	5.8 5.8	6.8 6.8	17 4
TRINITY_DN 31866_c1_g3_ i1	LCE_O RYLA	Low choriolytic enzyme	2.210 0316 14	5.577 1620 4	1.4 7E- 06	0.000 4365 27	69. 32	44. 80	32. 47	10. 03	53. 39	12. 73	10. 9.0	11. 39	11. 52
TRINITY_DN 12923_c0_g1_ i1	IOD3_S PAAU	Thyroxine 5-deiodinase	2.147 4699 01	6.608 0673 66	1.6 4E- 06	0.000 4729 4	84. 57	81. 73	11 0.9	10 4.1	82. 6.3	18. 77	19. 06	25. 76	11 7
TRINITY_DN 30082_c0_g1_ i2	SCLY_ BOVIN	Selenocysteine lyase	2.880 5363 8	1.792 3865 85	7.1 9E- 07	0.000 2402 93	0.7 14	0.4 26	0.3 19	1.8 51	2.1 38	2.3 92	2.3 93	3.7 17	4.4 87
TRINITY_DN 31443_c0_g1_ i1	NA	NA	2.896 0767 4	1.915 9197 61	3.8 6E- 06	0.000 9763 73	0.2 39	0.1 22	0.1 11	0.3 45	0.2 66	0.4 46	1.0 6	0.8 2	1.5 1
TRINITY_DN 27883_c0_g2_ i3	ANGL8 _HUMA N	Angiotensin-like protein 8	3.180 8397 5	4.397 3349 11	3.9 8E- 08	0.000 2.19E -05	2.5 02	2.5 57	2.3 37	65. 3	31. 2	26. 2	30. 3	14. 2	17. 68
TRINITY_DN 31409_c0_g3_ i4	NA	NA	3.936 9528 22	2.173 9031 22	2.7 4E- 08	0.000 1.55E -05	5.4 68	25 8	2.8 02	01 8	40 8	34 5	59 1	6.7 4	88 8

			2														
TRINITY_DN			-														
25746_c0_g1_	FAS_C		4.293	1.586	1.0												
i1	HICK	Fatty acid synthase	7971	4358	3E-	5.08E	0.0	0.1	0.0	2.7	0.6	1.5	2.1	1.2	1.1		
			2	16	07	-05	91	2	24	95	84	05	46	02	52		
TRINITY_DN			-														
30521_c0_g1_	ACACA		4.638	3.769	1.8												
i1	_RAT	Acetyl-CoA carboxylase 1	7055	5661	9E-	4.43E	0.2	0.1	0.1	5.6	3.8	3.7	4.8	4.1	4.0		
			9	65	15	-12	74	29	42	16	06	48	93	13	79		
TRINITY_DN	CMC2_	Calcium-binding	4.772	1.697	7.1												
20954_c0_g1_	HUMA	mitochondrial carrier	4509	3138	0E-	4.93E	0.0	0.0		1.8	1.1	1.4	0.7	2.5	2.2		
i1	N	protein Aralar2	3	77	09	-06	48	47	0.1	97	24	39	85	71	32		
TRINITY_DN	FBX48_		-														
18902_c0_g1_	HUMA		5.043	0.533	1.7												
i3	N	F-box only protein 48	3948	3648	0E-	7.67E	0.0	0.0	0.0		2.4	2.0	3.9	2.2	3.0		
			6	32	07	-05	52	48	92	0	42	57	65	82	1		
TRINITY_DN	C4BPA		-														
31881_c0_g1_	_HUMA	C4b-binding protein alpha	5.159	0.756	2.2	0.000											
i2	N	chain	7894	8318	2E-	6071			0.0	0.4	0.3	1.7	1.0	0.7	1.0		
			5	35	06	16	0	0	8	59	18	73	3	62	79		
TRINITY_DN	CELA1		-														
19555_c0_g1_	_MACF	Chymotrypsin-like elastase	5.251	5.527	3.2	0.000				22.		49.	16	29.	54		
i1	A	family member 1	1352	8237	0E-	8211	5.7	6.2	6.7	40	3.2	43	4.0	48	7.1		
			4	02	06	49	84	34	86	5	39	4	1	4	3		
TRINITY_DN			-														
30826_c0_g1_	NA	NA	7.243	0.165	3.9	0.000											
i2			8096	8245	2E-	9799				0.4	1.0		0.5	0.9	0.4		
			4	66	06	86	0	0	0	33	04	0	45	48	23		
TRINITY_DN			-														
29719_c0_g2_	NFYA_	Nuclear transcription factor	-	0.118	2.0	0.000											
i5	RAT	Y subunit alpha	7.299	1353	4E-	5793				0.5			0.2	0.5	0.2		
			2133	45	06	76	0	0	0	24	0	0	78	28	49		
TRINITY_DN	CNKR3		-														
30330_c2_g2_	_HUMA	Connector enhancer of	7.405	0.027	3.1	0.000											
i3	N	kinase suppressor of ras 3	8971	5265	5E-	1288					0.5		0.8	0.6	0.7		
			9	94	07	52	0	0	0	0	57	0	7	69	23		
TRINITY_DN	COFA1		-														
28330_c0_g2_	_MOUS	Collagen alpha-1(XV)	7.632	0.169	3.9	0.000											
i2	E	chain	3878	8045	0E-	1553				0.6	0.6	0.7	0.3	0.2	0.4		
			2	94	07	36	0	0	0	75	38	19	73	14	92		
TRINITY_DN	MASY_		-														
26981_c0_g1_	MYXX		7.900	0.409	7.3	0.000											
i1	D	Malate synthase	5274	6087	4E-	2411				0.0	2.2		1.2	0.5	1.9		
			5274	01	07	76	0	0	0	02	33	0	42	45	77		
TRINITY_DN			-														
30331_c0_g1_	NA	NA	7.903	0.401	1.2	0.000											
i7			4225	7839	3E-	3721							1.6	0.4	1.2		
			9	46	06	5	0	0	0	0	0	0	56	89	35		
TRINITY_DN			-														
28507_c0_g1_	NA	NA	7.916	0.424	6.4												
i4			3982	4487	0E-	4.61E					0.9	2.4	1.2	0.8	1.4		
			1	15	09	-06	0	0	0	0	77	28	53	78	94		
TRINITY_DN			-														
31326_c1_g1_	NA	NA	7.996	0.498	7.3												
i2			7508	3922	7E-	6.27E								0.6	0.6	0.5	
			2	21	10	-07	0	0	0	0	0	0	77	43	63		
TRINITY_DN	ABCB6		-														
25226_c0_g1_	_XENT	ATP-binding cassette sub-	8.014	0.513	4.4												
i1	R	family B member 6	8961	9700	4E-	3.47E				0.5	0.2		0.5	0.4	0.9		
			3	11	09	-06	0	0	0	92	73	0	93	74	06		
TRINITY_DN			-														
30331_c0_g1_	NPL_R		8.077	0.567	1.2												
i6	AT	N-acetylneuraminatase lyase	2161	0168	0E-	7.89E	0.0						1.0	0.5	0.6		
			5	76	08	-06	03	0	0	0	0	0	19	78	83		
TRINITY_DN	CLC4F_		-														
28253_c0_g1_	RAT	C-type lectin domain	-	0.788	9.6	0.000				1.6	0.5	1.5	0.8	4.4	1.1		
		family 4 member F	8.306	6681	3E-	3025	0	0	0	56	63	39	9	77	63		

i4				6006	42	07	24										
				1													
				-													
TRINITY_DN				8.413	0.884	2.1	0.000										
27409_c0_g1_	ACOD_			2945	2247	7E-	6052			1.1	1.0	1.4	0.7	0.2	1.7		
i1	CYPCA	Acyl-CoA desaturase		9	84	06	77	0	0	0	23	42	57	73	45	99	
				-													
TRINITY_DN	K0100_			8.531	0.990	2.0											
31491_c0_g1_	HUMA			8194	9575	8E-	3.54E			1.5	0.3	0.9	0.4	0.8	0.9		
i2	N	Protein KIAA0100		2	11	11	-08	0	0	0	02	89	74	21	49	05	
				-													
TRINITY_DN				9.160	1.582	1.7											
16311_c0_g1_	IF2A_C	Eukaryotic translation		9773	7175	2E-	1.96E		0.0	1.5	2.1		5.1	3.0	2.1		
i1	HICK	initiation factor 2 subunit 1		3	84	10	-07	0	01	0	27	04	0	81	33	07	
				-													
TRINITY_DN				9.850	2.255	9.9											
30331_c0_g1_	NPL_R			7793	6674	7E-	4.67E	0.0						2.7	3.5	3.5	
i2	AT	N-acetylneuraminate lyase		1	18	22	-18	02	0	0	0	0	0	92	69	33	
				-													
TRINITY_DN				10.72	3.117	2.3								11.		12.	
24316_c0_g1_				8325	4616	9E-	1.49E			19.	7.9	6.0	02	8.1	15		
i1	NA	NA		4	77	23	-19	0	0	0	26	2	92	1	65	1	
				-	3.339	2.1								10.			
TRINITY_DN				10.95	8286	4E-	8.00E					3.5	7.6	37	5.5	9.9	
28507_c0_g1_	H33_XE			4006	26	20	-17	0	0	0	0	71	67	6	51	63	
i1	NTR	Histone H3.3		-													
				-													
TRINITY_DN	ELOV2			11.20	3.592	6.2											27.
25389_c0_g1_	_HUMA	Elongation of very long		6992	6816	3E-	5.55E			2.3	2.3	0.3	5.2	3.2	95		
i1	N	chain fatty acids protein 2		2	09	10	-07	0	0	0	57	89	49	54	05	8	
				-													
TRINITY_DN	ELOV4			11.64		3.3											
29113_c0_g1_	_HUMA	Elongation of very long		7002	4.024	0E-	6.87E				2.6	0.5	9.5	1.9	4.4		
i2	N	chain fatty acids protein 4		1	0719	13	-10	0	0	0	0	06	93	51	82	99	
				-													
TRINITY_DN	ELOV4			11.73	4.114	4.9											
29113_c0_g1_	_HUMA	Elongation of very long		8501	6839	5E-	2.65E				9.6	1.0	9.7	0.4	7.5		
i12	N	chain fatty acids protein 4		4	11	08	-05	0	0	0	0	08	37	07	2	12	
				-													
TRINITY_DN	ELOV4			11.95	4.328	2.5											
29113_c0_g1_	_HUMA	Elongation of very long		2524	8381	7E-	4.01E				3.3	2.0	9.2	1.1	9.7		
i5	N	chain fatty acids protein 4		3	28	11	-08	0	0	0	0	7	15	01	73	61	
				-													
TRINITY_DN	ELOV4			12.25	4.633	4.8	0.000				12.						16.
29113_c0_g1_	_HUMA	Elongation of very long		7397	0133	8E-	1866				27	3.5	9.3	0.2	47		
i1	N	chain fatty acids protein 4		8	05	07	35	0	0	0	0	5	64	37	5	7	

Tabla 7. Composición química y análisis proximal de las dietas experimentales para pejelagarto

Ingredientes (g Kg <sup>-1</sup> )	D1 (100%L/ 0% CHO)	D2 (50%L/ 50% CHO)	D3(0% L/ 100 CHO)
Harina de sardina <sup>1</sup>	546	546	546
Aceite de sardina <sup>1</sup>	72	35	0
Hidrolizado de pescado <sup>1</sup>	100	100	100
Lecitina de soya <sup>2</sup>	36	18	0
Almidón de maíz pregelatinizado <sup>3</sup>	0	125	250
Grenetina <sup>4</sup>	20	20	20
Premezcla de vitaminas y minerales <sup>5</sup>	15	15	15
Vitamina C	0.8	0.8	0.8
Harina de sorgo 8-10%	210	140	68
Materia seca	975	983	976
Proteína cruda	425	418	415
Lípidos	183	107	62.4
Carbohidratos	138	225	289
Cenizas	98	114	118
Proporción carbohidrato: lípidos	0.75	2.10	4.63

<sup>1</sup> Proteínas Marinas y Agropecuarias, S.A. de C.V., Guadalajara, Jalisco, Mexico. <sup>2</sup> Pronat Ultra, Mérida, Yucatán, Mexico. <sup>3</sup> MSA Industrializadora de Maíz, S.A. de C.V., Guadalajara, Jalisco, Mexico. <sup>4</sup> D'gari Productos alimenticios y dietéticos Relámpago, Tlalpan, Edomex, Mexico. <sup>5</sup> DMS (Heerlen, Netherlands, active agent 35%).

## Figuras

Figura 1

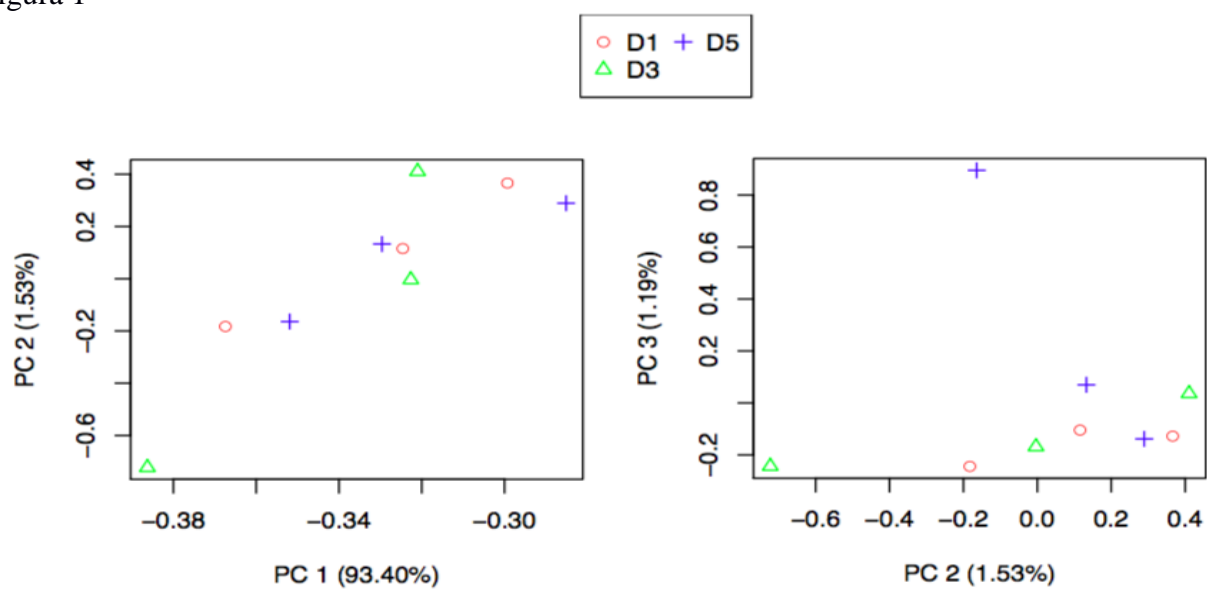


Figura 2

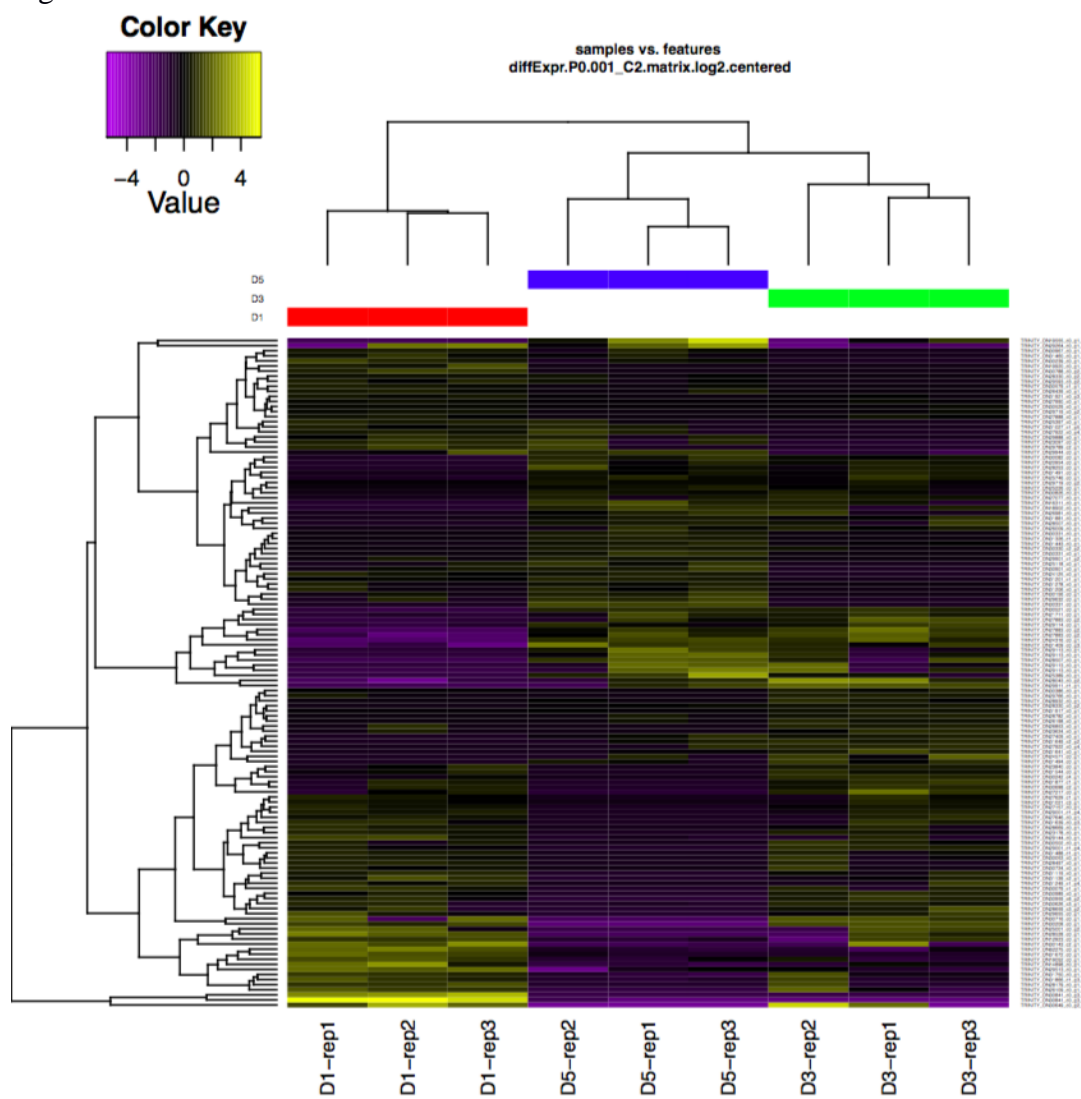
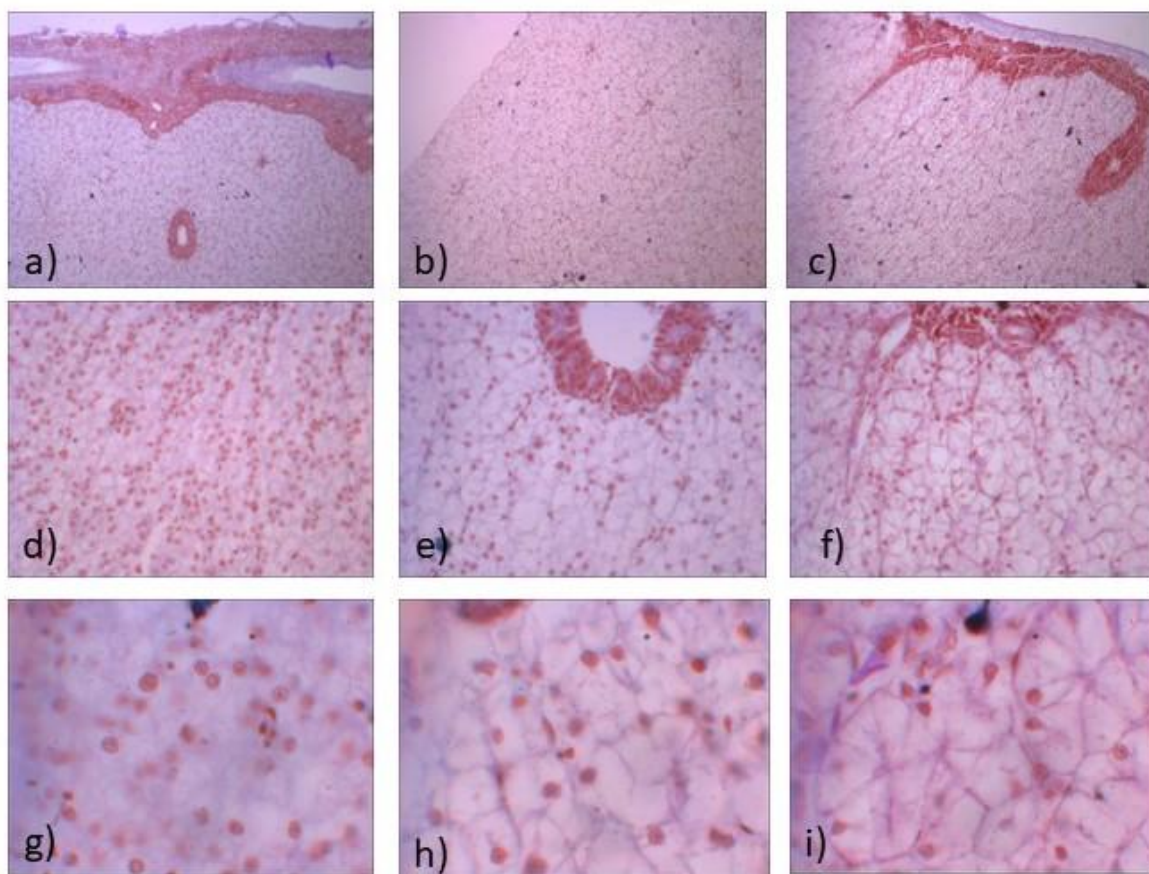


Figura 3



## **8. PROGRAMACIÓN NUTRICIONAL DE LOS CARBOHIDRATOS Y LÍPIDOS DIETARIOS ADMINISTRADOS EN LARVAS SOBRE LA CONCENTRACIÓN DE METABOLITOS EN PLASMA EN ADULTOS DE PEJELAGARTO *Atractosteus tropicus***

Rocío Guerrero-Zárate<sup>1,2</sup>, Carlos A. Álvarez-González<sup>1\*</sup>, Ronald Jesus-Contreras<sup>1</sup>, Mario A. Galaviz<sup>2</sup>, Lus M. López<sup>2</sup>, Raúl Llera-Herrera<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Acuicultura Tropical, División Académica de Ciencias Biológicas, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco (UJAT), Carretera Villahermosa-Cárdenas s/n, Km 0, C.P. 86039 Villahermosa, Tabasco, Mexico.

<sup>2</sup>Universidad Autónoma de Baja California (UABC), Facultad de Ciencias Marinas, Carretera Tijuana-Ensenada 3917, Playitas, C.P. 22860, Ensenada, B.C., Mexico

<sup>3</sup>Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Cap. Joel Montes Camarena, Cerro del Vigía, 82040 Mazatlán, Sinaloa, Mexico.

### **Introducción**

El rápido crecimiento de la acuicultura a nivel internacional, así como la falta de estabilidad de producción y el incremento en los costos de la harina de pescado han orientado las investigaciones en nutrición acuícola hacia la búsqueda de ingredientes alternativos, varios de estos ingredientes son de origen vegetal por lo que contienen considerables cantidades de carbohidratos (Panserat et al. 2019). Así mismo, el uso de carbohidratos digeribles (almidón) aporta ventajas como ligación, flotabilidad y estabilidad de las dietas y disminución de descargas de nitrógeno a los efluentes, además de ser de tres

a cinco veces más baratos que las proteínas y lípidos (Wilson 1994; Kamalam and Panserat 2016). Si embargo, está demostrado que la eficiencia en el aprovechamiento de carbohidratos es altamente variable entre especies (Polakof et al. 2012), de tal forma que las especies carnívoras muestran una menor tolerancia a la glucosa que las especies omnívoras y herbívoras (Hemre et al. 2002; Enes et al. 2008).

Estudios realizados en mamíferos y humanos demuestran que estímulos aplicados durante ciertos periodos durante etapas tempranas de vida de un organismo pueden tener repercusión a largo plazo en sus funciones fisiológicas en etapas adultas, a esto se le conoce como programación nutricional (Lucas 1998; Panserat et al. 2019). Usando este concepto se ha propuesto que un estímulo hiperglucídico intenso aplicado durante un periodo crítico en el desarrollo temprano en los peces es capaz de mejorar la capacidad de utilización de los carbohidratos durante la etapa juvenil o adulta, resultados satisfactorios han sido obtenidos en el pez cebra y el esturión siberiano (Fang et al. 2014; Gong et al. 2015).

En este sentido, el pejelagarto *Atractosteus tropicus*, un pez dulceacuícola descrito como carnívoro con capacidad para aprovechar ingredientes alternativos (Frías-Quintana et al. 2010; Guerrero-Zárate et al. 2014), investigaciones recientes han demostrado que es capaz de mejorar su crecimiento durante la etapa larval al agregar almidón de maíz en sus dietas (Frías-Quintana et al. 2016) y además es capaz de regular eficientemente las rutas del metabolismo intermediario en respuesta a la ingestión de dietas hasta con un 23% de carbohidratos (Guerrero-Zárate et al. 2019). Sin embargo, se desconoce si la inclusión de carbohidratos durante la etapa de larvicultivo tiene repercusiones a largo plazo. Por ello, el objetivo de la presente investigación fue determinar si un estímulo nutricional prolongado

durante la etapa de larvicultivo puede producir un efecto duradero en la utilización de carbohidratos en la etapa adulta del pejelagarto *A. tropicus*.

## **Materiales and métodos**

### *Preparación de dietas y análisis proximales*

Se formularon tres dietas practicas con diferente proporción CHO:L utilizando el programa Mixit-Win V.5 (Agricultural Software Consultants, Inc, San Diego, CA). La dieta control (D1) se basó en la formulación con harina de pescado propuesta para pejelagartos en etapa larval (Frías-Quintana et al. 2010), las otras dos dietas se diseñaron con incrementos graduales del 50% de almidón de maíz mientras se disminuía la cantidad de lípidos añadidos a la dieta en 50% (Tabla 1). Cada dieta se asignó a tres tinas en un diseño experimental completamente aleatorio. Para la elaboración de las dietas experimentales, los ingredientes secos fueron molidos, tamizados y mezclados durante 15 min, a esta mezcla se añadió la premezcla de vitaminas y minerales y se mezcló durante 15 min más. Posteriormente se agregaron lentamente los ingredientes líquidos y se mezcló por 15 min y finalmente se añadió agua destilada y se mezcló por 15 min. Las mezclas fueron peletizadas y secadas a 50°C por 10 h. Después fueron trituradas y cribadas para cubrir el rango de tamaño de partícula requerido durante la crianza larvaria (250-1000 µm). Las dietas fueron almacenadas en refrigeración a 20°C.

La composición proximal de las dietas fue determinada de acuerdo a la Association of Official Analytical Chemist procedures (AOAC) (AOAC 2000). La humedad fue calculada por gravimetría después de secar las muestras a 105°C por 24 h. El contenido de proteína

cruda fue determinado por el método Kjendahl usando un sistema de destilación automática VAPODEST 10s, (Gerhardt, Königswinter, Alemania) y un sistema de titulación automática TitroLine® 5000 (SI Analytics, College Station, TX). Los lípidos totales fueron determinados por la extracción con metanol-cloroformo (Folch et al. 1957). El almidón fue determinado por el método con amilasa y glucosa oxidasa (Thivend et al. 1972). El contenido de cenizas totales fue determinado por gravimetría después de la combustión de las muestras a 550 °C por 8 h (Tabla 7).

#### *Crianza de organismos y procedimientos experimentales*

Las larvas de pejelagarto fueron obtenidas a partir del lote de reproductores del Laboratorio de Acuicultura Tropical ubicado en la División Académica de Ciencias Biológicas de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. El desove fue inducido en una hembra de *A. tropicus* con una inyección intraperitoneal de la hormona GnRH (0.35 µg por Kg de peso). La hembra fue colocada junto con 3 machos en un estanque de 2000 L, el cual contaba con sustrato artificial para la adhesión de los huevos. Una vez que las larvas iniciaron el nado (4 días después de la eclosión, DDE) se transfirieron a tinas con volumen de 70 L conectadas a un sistema de recirculación con temperatura controlada. Las larvas fueron adaptadas a las dietas experimentales por una coalimentación con nauplios de *artemia* (4-13 DDE) y posteriormente con biomasa congelada de *artemia* adulta (14-17 DDE) (Márquez-Couturier et al. 2015), después de este periodo se les suministraron únicamente las dietas experimentales (Figura 1).

Al inicio del experimento un total de 360 larvas de pejelagarto, con peso inicial de  $0.03 \pm 0.002$  g y longitud de  $1.76 \pm 0.05$  cm, fueron colocadas en 3 tinas, a razón de 120 peces por tina. A cada tina se le asignó uno de los tres tratamientos (D1, D2 o D3). Los peces fueron alimentados con sus respectivas dietas 4 veces por día (8:00, 11:00, 14:00 y 17:00) a saciedad aparente durante 73 días con las dietas experimentales (77DDE). Posteriormente, se alimentaron los peces de las 3 tinas con alimento comercial para trucha (Silver Cup, El pedregal, proteína 52%, lípidos 16%) durante 24 días más (97 DDE).

#### *Prueba de tolerancia a la glucosa (GTT)*

Transcurrido este tiempo, los peces de cada una de las 3 tinas que recibieron las dietas experimentales durante la etapa de larvas y crías fueron pesados y se verificó su estado de salud. 36 peces de peso homogéneo ( $22 \pm 4.6$  g) y con características de salud adecuadas (sin heridas, aletas rotas, indicios de agresión) fueron asignados al azar a 12 unidades experimentales, a razón de 3 peces por tina. Cada uno de los tratamientos (0, 1.5, 3 y 5 h después de la inyección de glucosa) fueron asignados al azar a las unidades experimentales, por triplicado. Finalmente se tuvo un diseño bifactorial (3 x 4), con los factores dieta (D1, D2 y D3) y tiempo después de la aplicación de glucosa (0, 1.5, 3 y 5 h), cada uno evaluado por triplicado. Los peces fueron sometidos a 24 h de ayuno. Posteriormente se realizó la GTT, para ello los peces fueron anestesiados con aceite de clavo (0.1 ml/L) cada pez fue inyectado con jeringas de insulina intraperitonealmente con dextrosa (1.2 g / kg de peso) y devuelto al contenedor que le correspondía. De acuerdo con cada tiempo establecido por el tratamiento asignado, se tomó una muestra individual de 200 $\mu$ l de sangre mediante punción de la vena caudal con jeringas de insulina. La sangre fue preservada en microtubos con

EDTA e inmediatamente centrifugada a  $10\,000 \times g$  por 1 min, las muestras individuales de plasma fueron analizadas (el mismo día de la extracción) para determinar la concentración de glucosa, triglicéridos y colesterol en plasma.

#### *Sistema de cultivo*

El sistema experimental utilizado era parte de un sistema de recirculación con temperatura controlada de  $28.9 \pm 1.2$  °C. El sistema contaba también con filtración mecánica y biológica y oxígeno suplementario. Los peces fueron mantenidos bajo un fotoperiodo natural (12:12). Los parámetros de calidad de agua fueron monitoreados durante el periodo experimental: el pH fue de  $8.0 \pm 0.4$  (pH pen meter ST10, Ohaus, Parsippany, NJ), el oxígeno disuelto de  $5.1 \pm 0.5$  mg L<sup>-1</sup> (DO instrument, YSI 55-12FT, Yellow Springs, OH) el nitrito y amonio de  $0.19 \pm 0.13$  mg L<sup>-1</sup> (Ammonia Test Kit, Mars Fishcare, Chalfont, PA).

#### *Análisis de química sanguínea*

Los metabolitos en plasma fueron analizados utilizando kits comerciales de Pointe scientific (Michigan, USA) adaptados a microplacas (xMark™ Microplate Absorbance Spectrophotometer, Bio-Rad, California, USA). La glucosa en plasma fue determinada por el método de glucosa oxidase (G7521), los triglicéridos por reacción enzimática usando glicerol fosfato oxidasa (T7532), y el colesterol fue determinado usando las enzimas colesterol esterasa y colesterol oxidasa colesterol (C7510).

### *Análisis estadísticos*

Los datos fueron analizados estadísticamente mediante un ANOVA de 2 vías, previa verificación de los supuestos de normalidad y homocedasticidad. Donde se encontraron diferencias significativas se realizó la prueba a posteriori de Tukey para determinar las medias estadísticamente diferentes. Los análisis fueron realizados con el software Statistica TM v.8.0 (Statsoft) utilizando un valor de significancia de 0.05.

### **Resultados**

Los resultados muestran que la concentración de glucosa en plasma se ve significativamente afectada tanto por la dieta suministrada al inicio de la alimentación ( $P=0.005$ ) como por el tiempo transcurrido después de aplicar una carga de dextrosa ( $P=0.004$ ). La concentración de glucosa en plasma tiende a ser menor en los peces alimentados con la dieta 2, mientras las mayores concentraciones de glucosa se observan en los peces alimentados con la D3 (Figura 2). En cuanto al tiempo después del tratamiento, la menor concentración de glucosa se observa en el tiempo 0 y la mayor concentración se observó 1.5 h después del tratamiento. Los tiempos 3 y 5 h posteriores al tratamiento son estadísticamente semejantes a los tiempos 0 y 1.5 h.

La concentración de triglicéridos en plasma mostró diferencias altamente significativas ( $P<0.0001$ ) debidas al tipo de dieta recibida, sin embargo, no se observaron diferencias estadísticas debidas al tiempo después de la aplicación de la dextrosa ( $P=0.3510$ ). La concentración de triglicéridos en plasma fue mayor en los peces alimentados con la D1,

seguidos de los alimentados con la D2, observándose la menor concentración en los peces alimentados con la D3 (Figura 3).

La concentración del colesterol en plasma no se vio significativamente afectada ni por la dieta suministrada ( $P= 0.2375$ ) ni por el tiempo transcurrido después de la aplicación del tratamiento ( $P= 0.1260$ ) (Figura 4).

## **Discusión**

De acuerdo con los resultados de nuestra investigación, existe diferencia significativa en la concentración de glucosa en plasma después de que los organismos fueron sometidos a una prueba de tolerancia a la glucosa durante la etapa juvenil debida a la dieta que ingirieron los pejelagartos durante sus primeras etapas de desarrollo. Los peces alimentados con la dieta que contenía mayor cantidad de carbohidratos (D3: 29% de carbohidratos) durante la fase de crianza larvaria mostraron niveles de glucosa en plasmas más altos respecto a los alimentados con la D2 (22% de carbohidratos). Resultados similares fueron descritos en el esturión siberiano (*Acipenser baerii*) (Liang et al. 2017), Liang y colaboradores realizaron un experimento en el que alimentaron un grupo de esturiones durante su primera etapa de desarrollo una dieta rica en carbohidratos (57%) y tuvieron otro grupo como control (3.6 CHO), posteriormente dividieron estos grupos y los sometieron a dietas con un alto (35%) y bajo contenido (3.6%) de carbohidratos, seguido de un periodo de inanición y realimentación. Sus resultados muestran que tanto un estímulo en etapas tempranas con glucosa como el nivel de carbohidratos presente en la dieta afecta la respuesta de la gluconeogénesis en los periodos de inanición y realimentación. De tal forma que los peces

que recibieron el estímulo temprano de una dieta alta en carbohidratos mostraron menos capacidad para regular la gluconeogénesis. También encontraron que los peces alimentados con dietas ricas en carbohidratos mostraban niveles más altos de glucosa durante la etapa de realimentación.

Uno de los factores que ha sido señalado como factor común en las especies de peces intolerantes a la glucosa es la falta de regulación de la gluconeogénesis cuando se les suministran carbohidratos (de forma oral o intraperitoneal) (Panserat et al. 2000b, a; Enes et al. 2006, 2008; Polakof et al. 2009, 2011). Un estudio realizado en el pez cebra reveló que dietas ricas en carbohidratos pueden disminuir la concentración de glucosa en plasma en los organismos adultos, así como la expresión del gen que codifica para la enzima gluconeogénica fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK), de tal forma que los autores concluyen que es posible modificar permanentemente el metabolismo de los peces cebra adultos por una programación nutricional temprana (Fang et al. 2014).

En la presente investigación no se midieron los niveles de actividad de enzimas clave en la regulación del metabolismo intermediario (rutas de la glucólisis, gluconeogénesis) pero una investigación previa realizada en pejelagartos muestra que en los peces alimentados con dietas con hasta 22% de carbohidratos disminuye la actividad de las enzimas PEPCK y fructosa-1,6-bisfosfatasa que son clave en la ruta de la gluconeogénesis. Sin embargo, una dieta con 28% de carbohidratos tiende a incrementar la actividad de estas enzimas metabólicas sugiriendo una falla en la regulación de las rutas metabólicas (Guerrero-Zárate et al. 2019), esto probablemente se deba a un daño hepático causado por una acumulación

excesiva de lípidos en los hepatocitos como fue evidenciado a través de análisis histológicos (datos no publicados).

Los resultados de la presente investigación sugieren una posible programación temprana para una mejora para la utilización de carbohidratos en la etapa adulta evidenciada por una disminución de la concentración de los niveles de glucosa en plasma en los peces alimentados con la D2 (22% CHO) en comparación a los peces alimentados con la D1 y D2 y sometidos a una prueba de tolerancia a la glucosa. Pero es necesario que los resultados aquí presentados sean confirmados con estudios que analicen la actividad de enzimas metabólicas o expresión genética, e incluso modificaciones a nivel epigenético.

Por otro lado, es sabido que en estos experimentos de programación nutricional, la dosis y el periodo durante el cual se aplica el estímulo son relevantes, además de ser específicos para cada especie (Kamalam et al. 2017). En la presente investigación se puede observar que el suministrar una dieta con niveles elevados de carbohidratos (28%) por un periodo prolongado de tiempo puede causar un efecto permanente, semejante al de resistencia a la insulina en el pejelagarto, demostrado por la hiperglicemia observada posterior a las 24 h de ayuno en los peces alimentados con la D3. Por lo que nosotros proponemos que existe un nivel de CHO y un tiempo de exposición umbral que no deben ser traspasados durante el periodo de programación a fin de no causar un daño permanente.

En el caso de la concentración triglicéridos, la diferencias en la concentración en plasma se debe a la dieta que recibieron durante la etapa de crianza, mientras que la prueba de tolerancia a la glucosa no mostro ningún efecto. Una investigación anterior en pejelagarto

pone en evidencia estas diferencias mientras los peces eran alimentados con diferentes proporciones de CHO/lípidos (L), donde la concentración de triglicéridos se incrementa mientras disminuye de proporción CHO/L. Los resultados de la presente investigación demuestran que este efecto es permanente a pesar de que los peces de los tres grupos reciban la misma dieta durante la etapa adulta. En el caso del colesterol, sus concentraciones no se vieron afectadas por la dieta suministrada durante la etapa de crianza ni por la prueba de tolerancia a la glucosa.

En conclusión, la concentración de carbohidratos y lípidos suministradas durante la etapa temprana de crianza puede modificar de forma permanente las concentraciones de glucosa y triglicéridos en plasma, así como la tolerancia a la glucosa de los pejelagartos adultos.

### **Agradecimientos**

R. Guerrero-Zárate agradece al Programa para el Desarrollo Profesional Docente (PRODEP) por el apoyo brindado a través de la beca para estudios de posgrado. Esta investigación fue financiada por el proyecto SEP-CONACYT Ciencia Básica “Estudio de la fisiología digestiva en larvas y juveniles de pejelagarto (*Atractosteus tropicus*) con base en técnicas histológicas, bioquímicas y moleculares” No. 282765.

### **Conflicto de interés y declaraciones éticas**

Los autores siguieron todas las pautas internacionales, nacionales o institucionales aplicables para el cuidado y uso de los animales.

## Referencias

- AOAC (2000) Official Methods of Analysis, 17th Edition. Assoc. Off. Anal. Chem.
- Enes P, Panserat S, Kaushik S, Oliva-Teles A (2006) Effect of normal and waxy maize starch on growth, food utilization and hepatic glucose metabolism in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. *Comp Biochem Physiol - A Mol Integr Physiol* 143:89–96. doi: 10.1016/j.cbpa.2005.10.027
- 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. doi: 10.1016/j.aquaculture.2007.11.009
- Fang L, Liang XF, Zhou Y, et al (2014) Programming effects of high-carbohydrate feeding of larvae on adult glucose metabolism in zebrafish, *Danio rerio*. *Br J Nutr* 111:808–818. doi: 10.1017/S0007114513003243
- Folch J, Lees M, Sloan Stanley G (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* 226:497–509. doi: 10.1016/j.ultrasmedbio.2011.03.005
- Frías-Quintana C, Álvarez-González C, Márquez-Couturier G (2010) Diseño de microdietas para el cultivo de pejelagarto *Atractosteus tropicus*, Gill 1863. *Univ y Cienc* 26:265–282
- Frías-Quintana C, Domínguez-Lorenzo J, Álvarez-González C, et al (2016) Using cornstarch in microparticulate diets for larvicultured tropical gar (*Atractosteus*

tropicus). *Fish Physiol Biochem* 42:517–528. doi: 10.1007/s10695-015-0156-4

Gong G, Xue M, Wang J, et al (2015) The regulation of gluconeogenesis in the Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) affected later in life by a short-term high-glucose programming during early life. *Aquaculture* 436:127–136. doi: 10.1016/j.aquaculture.2014.10.044

Guerrero-Zárate R, Álvarez-González C, Jesus-Contreras R, et al (2019) Evaluation of carbohydrate / lipid ratios on growth and metabolic response in tropical gar (*Atractosteus tropicus*) juvenile. *Aquac Res* 50:1812–1823. doi: 10.1111/are.14060

Guerrero-Zárate R, Alvarez-González C, Olvera-Novoa M, et al (2014) Partial characterization of digestive proteases in tropical gar *Atractosteus tropicus* juveniles. *Fish Physiol Biochem* 40:1021–1029. doi: 10.1007/s10695-013-9902-7

Hemre G-I, Mommsen TP, Kroghdahl A (2002) Carbohydrates in fish nutrition: effects on growth, glucose metabolism and hepatic enzymes. *Aquac Nutr* 8:175–194. doi: 10.1046/j.1365-2095.2002.00200.x

Kamalam B, Medale F, Panserat S (2017) Utilisation of dietary carbohydrates in farmed fishes: New insights on influencing factors, biological limitations and future strategies. *Aquaculture* 467:3–27. doi: 10.1016/j.aquaculture.2016.02.007

Kamalam B, Panserat S (2016) Carbohydrates in fish nutrition. doi: 10.13140/RG.2.1.4570.6645

Liang X, Wang J, Gong G, et al (2017) Gluconeogenesis during starvation and refeeding phase is affected by previous dietary carbohydrates levels and a glucose stimuli during

early life in Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*). *Anim Nutr* 3:284–294. doi:  
10.1016/j.aninu.2017.06.001

Lucas A (1998) Symposium : The Effects of Childhood Diet on Adult Health and Disease  
Programming by Early Nutrition : An Experimental Approach. *Am Soc Nutr Sci*  
128:401–406

Márquez-Couturier G, Vázquez-Navarrete C, Contreras-Sánchez W, Alvarez-González C  
(2015) Acuicultura tropical sustentable: Una estrategia para la producción y  
conservación del pejelagarto (*Atractosteus tropicus*) en Tabasco, México, 2<sup>a</sup>.  
Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Villahermosa, Tabasco

Panserat S, Marandel L, Seiliez I (2019) New Insights on Intermediary Metabolism for a  
Better Understanding of Nutrition in Teleosts. *Annu Rev Anim Biosci* 7:1–26

Panserat S, Médale C, Blin J, et al (2000a) Hepatic glucokinase is induced by dietary  
carbohydrates in rainbow trout, gilthead seabream, and common carp. *Am J Physiol*  
*Regul Integr Comp Physiol* 278:1164–1170

Panserat S, Médale F, Brèque J, et al (2000b) Lack of significant long-term effect of dietary  
carbohydrates on hepatic glucose-6-phosphatase expression in rainbow trout  
(*Oncorhynchus mykiss*)<sup>11</sup>The Genbank accession number for the rainbow trout  
G6Pase sequence is AF120150. *J Nutr Biochem* 11:22–29. doi: 10.1016/S0955-  
2863(99)00067-4

Polakof S, Mommsen TP, Soengas JL (2011) Glucosensing and glucose homeostasis: From  
fish to mammals. *Comp Biochem Physiol - B Biochem Mol Biol* 160:123–149. doi:

10.1016/j.cbpb.2011.07.006

Polakof S, Panserat S, Soengas JL, Moon TW (2012) Glucose metabolism in fish: A review. *J Comp Physiol B Biochem Syst Environ Physiol* 182:1015–1045. doi: 10.1007/s00360-012-0658-7

Polakof S, Skiba-Cassy S, Panserat S (2009) Glucose homeostasis is impaired by a paradoxical interaction between metformin and insulin in carnivorous rainbow trout. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol* 297:R1769–R1776. doi: 10.1152/ajpregu.00369.2009.

Thivend P, Mercier C, Guilbot A (1972) Determination of starch with glucoamylase. In: Whistler R, Bemiller J (eds) *Methods in Carbohydrate Chemistry*. Academic Press, New York, USA, pp 100–105

Wilson RP (1994) Utilization of dietary carbohydrate by fish. *Aquaculture* 124:67–80. doi: 10.1016/0044-8486(94)90363-8

## Leyenda de figuras

**Figura 1.** Esquema de alimentación aplicado a los organismos experimentales previo a ser sometidos a la prueba de tolerancia a la glucosa

**Figura 2.** Niveles de glucosa en plasma después de la administración de 1.2 g de dextrosa/kg de peso. Media  $\pm$  EE, n=9

**Figura 3.** Niveles de triglicéridos en plasma después de la administración de 1.2 g de dextrosa/kg de peso. Media  $\pm$  EE, n=9

**Figura 4.** Niveles de colesterol en plasma después de la administración de 1.2 g de dextrosa/kg de peso. Media  $\pm$  EE, n=9

## Tablas

Tabla 1. Composición química y análisis proximal de las dietas experimentales para pejelagarto

Ingredientes (g Kg <sup>-1</sup> )	D1 (100%L/ 0% CHO)	D2 (50%L/ 50% CHO)	D3(0% L/ 100 CHO)
Harina de sardina <sup>1</sup>	546	546	546
Aceite de sardina <sup>1</sup>	72	35	0
Hidrolizado de pescado <sup>1</sup>	100	100	100

Lecitina de soya <sup>2</sup>	36	18	0
Almidón de maíz pregelatinizado <sup>3</sup>	0	125	250
Grenetina <sup>4</sup>	20	20	20
Premezcla de vitaminas y minerales <sup>5</sup>	15	15	15
Vitamina C	0.8	0.8	0.8
Harina de sorgo 8-10%	210	140	68
<hr/>			
Materia seca	975	983	976
Proteína cruda	425	418	415
Lípidos	183	107	62.4
Carbohidratos	138	225	289
Cenizas	98	114	118
Proporción carbohidratos: lípidos	0.75	2.10	4.63
<hr/>			

Figuras

Figura 1

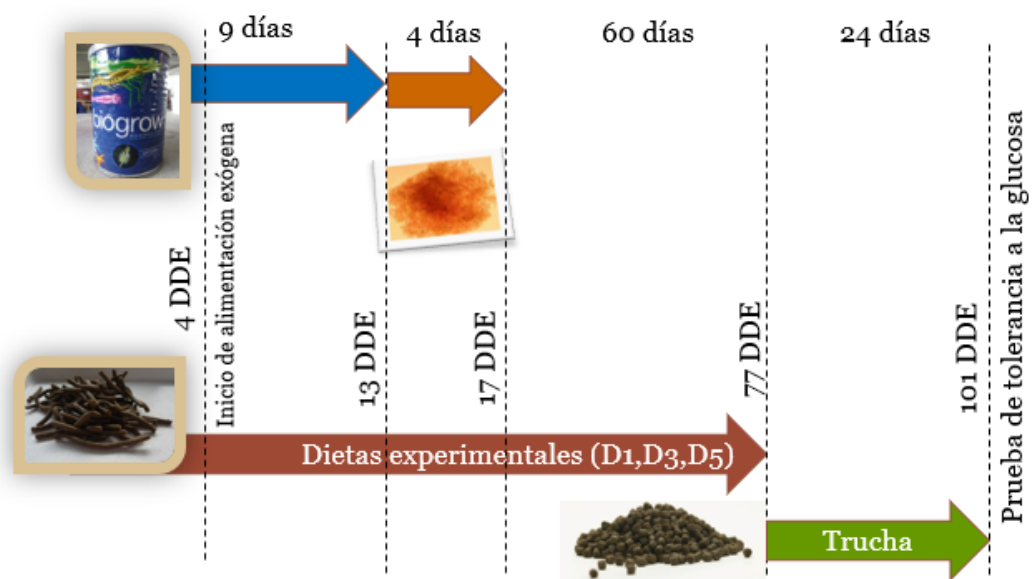


Figura 2

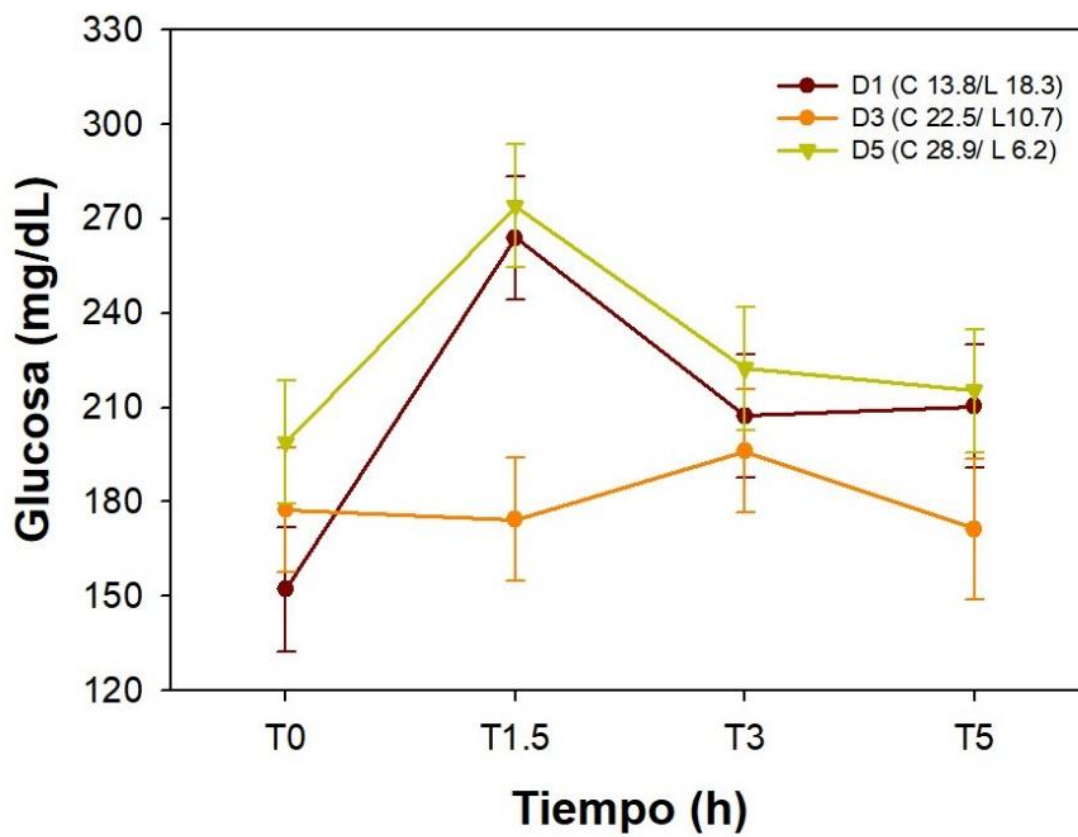


Figura 3

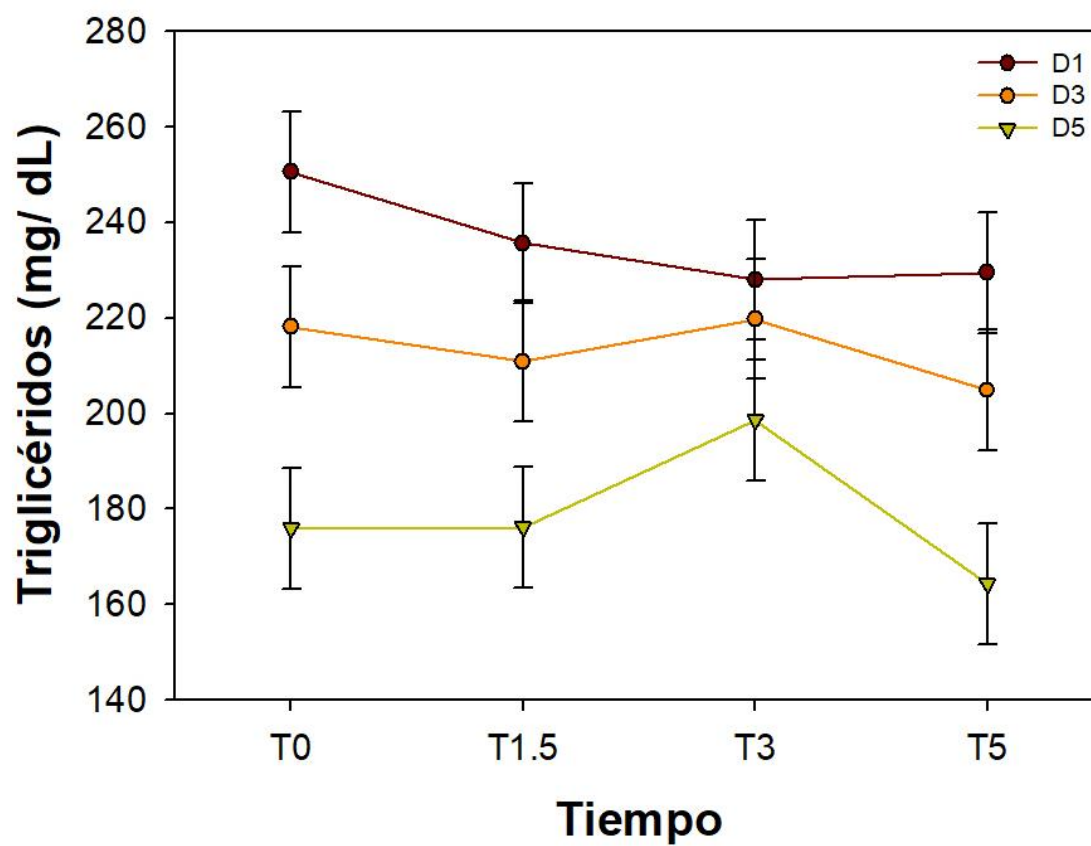
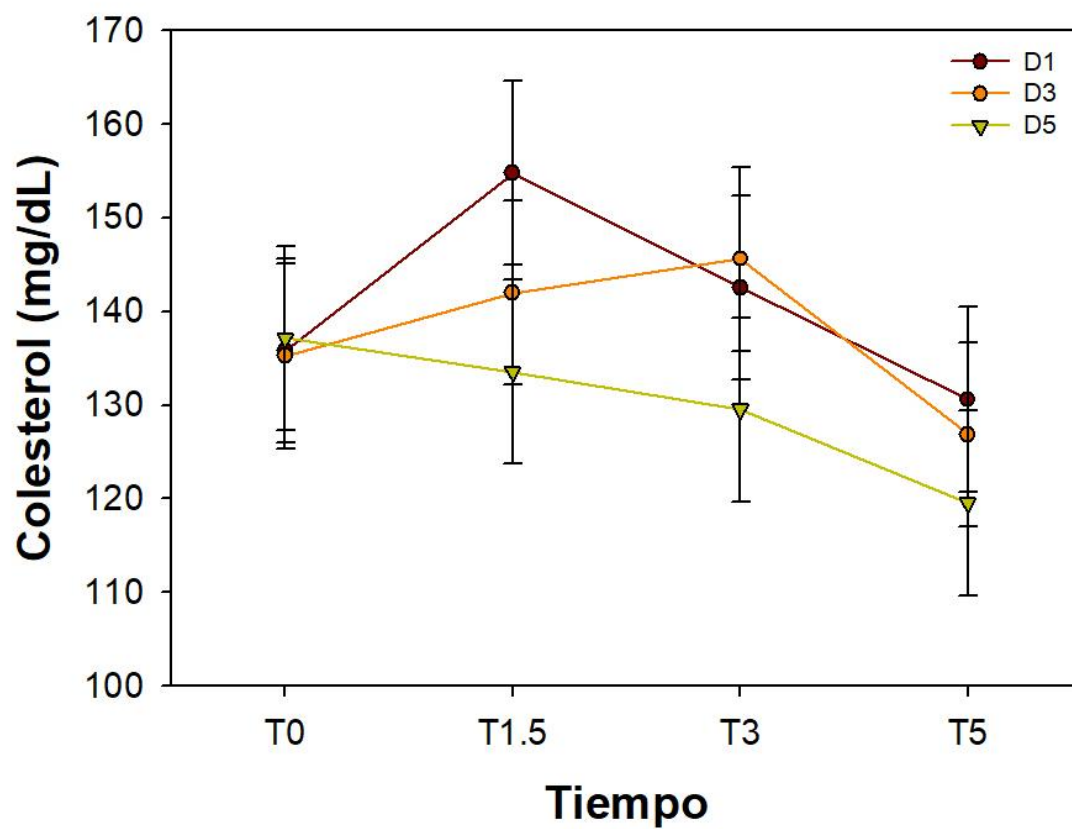


Figura 4



## 9. CONCLUSIONES GENERALES

En la presente investigación se evaluó por medio de indicadores de rendimiento productivo, análisis bioquímicos de plasma, actividad de enzimas digestivas y del metabolismo intermediario, expresión genética diferencial e histología el efecto de cinco dietas experimentales con diferente proporción carbohidratos (CHO) /lípidos (L) (D1: 0.75, D2: 1.27, D3: 2.10, D4: 2.54 y D5: 4.63) sobre el metabolismo intermediario del pejelagarto (*Atractosteus tropicus*). También se estudió si un estímulo nutricional prolongado durante la etapa de larvicultivo puede mejorar la utilización de carbohidratos en la etapa adulta de *A. tropicus*.

Los resultados muestran que a pesar de que el pejelagarto ha sido descrito como un pez carnívoro los parámetros de crecimiento, utilización de alimento, supervivencia y la actividad de enzimas digestivas no se ven significativamente afectados por la proporción CHO/L. No obstante, puede apreciarse una tendencia a una mejora en los parámetros productivos en los peces que fueron alimentados con la D3 (22.5% de carbohidratos/ 10.75 de lípidos).

La cantidad de lípidos en el hígado y en plasma, así como la concentración en de triglicéridos y colesterol en plasma fueron incrementadas al disminuir la proporción CHO/L, demostrando que los lípidos dietarios contribuyen más a la acumulación de lípidos en el cuerpo que los carbohidratos.

No obstante, en el caso del hígado estos resultados deben tomarse con reserva debido a que la expresión genética diferencial muestra que con la D5 (CHO/L de 4.63) se sobreexpresan

principalmente genes que codifican enzimas relacionadas con la biosíntesis de ácidos grasos saturados (ACACA), monoinsaturados (ACOD), de cadena larga (FAS) y muy larga (ELOV2 y ELOV4). Así mismo, la actividad de la enzima glucosa 6 fosfato deshidrogenasa hepática (G6PDH) se incrementa conforme se incrementa la proporción CHO/L. Esta enzima regula la ruta de las pentosas fosfato, la cual entre otras cosas genera poder reductor (NADPH) utilizado en la síntesis de lípidos, lo que corrobora la hipótesis de que el pejelagarto es eficiente en activar la ruta de lipogénesis a partir de carbohidratos. En el análisis histológico se observó que los hepatocitos presentan vacuolas, que se incrementan en tamaño al incrementar la CHO/L de tal forma que en la D5 la vacuolización causa hipertrofia de los hepatocitos, además de un arreglo anormal en las áreas cercanas a los vasos circulatorios e infiltraciones. Por otro lado, el análisis bromatológico del hígado mostro que el contenido de lípidos disminuye mientras el de glucógeno aumenta conforme se incrementa la inclusión de almidón en la dieta, lo que contradice la hipótesis de que la mayor vacuolización de los hepatocitos se debe a una excesiva acumulación de lípidos. Por lo que se requieren estudios que profundicen acerca del tipo de biomolécula de reserva que contienen los hepatocitos. Sin embargo, es claro que los peces alimentados con la CHO/L de 4.63 presentan indicios de daño hepático.

A través de la actividad de enzimas del metabolismo hepático se observa una adecuada regulación de las rutas de la glucólisis (HK, GK) y gluconeogénesis (PEPCK y FBPasa), al menos hasta la proporción CHO/L de 2.10. Mientras que en la proporción CHO/L de 4.63 la actividad de las enzimas metabólicas la actividad de estas mismas enzimas muestra un patrón opuesto indicando una falla en la regulación de las rutas metabólicas, probablemente

causada por el daño hepático descrito anteriormente. No obstante, la concentración de glucosa en plasma no se vio afectada por ninguna de las dietas 24 h horas después de haber sido alimentadas. Los resultados de actividad de enzimas metabólicas y de expresión genética sugieren que esto se debe a que la glucosa que entra en el torrente sanguíneo es canalizada hacia la glicólisis y síntesis de lípidos. Con base en los resultados descritos anteriormente se concluye que el pejelagarto es capaz de aceptar hasta un 22.5 % de carbohidratos en su dieta con una proporción CHO/L de 2.1.

Por otro lado, al suministrar dietas con carbohidratos durante la crianza larval los pejelagartos pueden mejorar de forma permanente la utilización de carbohidratos durante su etapa adulta, evidenciada por una disminución de la concentración de los niveles de glucosa en plasma en los peces alimentados con la D3 (22% CHO) en comparación a los peces alimentados con la D1 y D5 y sometidos a una prueba de tolerancia a la glucosa, esto sugiere una programación nutricional. Sin embargo, dietas muy grasas (18%) provocan una concentración elevada de triglicéridos en plasma que permanece hasta la etapa adulta, mientras una dieta alta en carbohidratos (29% CHO) por un periodo prolongado de tiempo puede causar un efecto permanente, semejante al de resistencia a la insulina en el pejelagarto, provocando una falla en la regulación del metabolismo de la glucosa que persiste hasta la etapa adulta. Lo que sugiere que existe un nivel de CHO y un tiempo de exposición umbral que no deben ser traspasados durante el periodo de programación a fin de no causar un daño permanente.

## 10. ANEXO 1

Received: 10 December 2018 | Revised: 11 March 2019 | Accepted: 21 March 2019  
 DOI: 10.1111/are.14060

## ORIGINAL ARTICLE



## Evaluation of carbohydrate/lipid ratios on growth and metabolic response in tropical gar (*Atractosteus tropicus*) juvenile

Rocío Guerrero-Zárate<sup>1,2</sup> | Carlos A. Álvarez-González<sup>1</sup> | Ronald Jesus-Contreras<sup>1</sup> | Emyr S. Peña-Marín<sup>1,3</sup> | Rafael Martínez-García<sup>1</sup> | Mario A. Galaviz<sup>2</sup> | Lus M. López<sup>2</sup> | Raul Llera-Herrera<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Acuicultura Tropical, División Académica de Ciencias Biológicas, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco (UJAT), Villahermosa, Mexico

<sup>2</sup>Facultad de Ciencias Marinas, Universidad Autónoma de Baja California (UABC), Ensenada, Mexico

<sup>3</sup>Cátedra Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Villahermosa, Mexico

<sup>4</sup>Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Mazatlán, Mexico

## Correspondence

Carlos A. Álvarez-González, Laboratorio de Acuicultura Tropical, División Académica de Ciencias Biológicas, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco (UJAT), Carretera Villahermosa-Cárdenas s/n, Km 0, C.P. 86059 Villahermosa, Tabasco, Mexico. Email: alvarez\_alfonzo@hotmail.com

## Funding Information

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Grant/Award Number: 282765

## Abstract

Five experimental diets with different carbohydrates/lipid ratio (CHO:L, 0.75, 1.28, 2.10, 2.52, 4.63) were formulated. Fish were randomly assigned by triplicate (10 fish per tank,  $0.50 \pm 0.01$  g). Growth was registered every 15 days until end of the experiment (45 days). Samples were taken for analysis of chemical carcass composition, blood chemistry, glycogen and lipid liver content, digestive and metabolic enzyme activities. Results showed that survival, growth performance parameters and plasma glucose were not affected by treatments ( $p > 0.05$ ). Lipids of carcass and liver, as well as triglycerides and plasma cholesterol increase significantly as CHO:L ratio decreased. While an inversely proportional tendency was observed for carcass protein and liver glycogen ( $p < 0.05$ ). Digestive enzymes did not show significant differences among treatments ( $p > 0.05$ ). Finally, Hexokinase (HK), glucokinase (GK), phosphoenol pyruvate carboxykinase (PEPCK) and fructose-1,6-biphosphate (FBPase) showed high regulation by carbohydrates up to the CHO:L ratio of 2.10 ( $p < 0.05$ ), while pyruvate kinase (PK) activity was not significantly affected by the CHO:L ratio. By the other side, glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) tends to significantly increase as the CHO:L ratio increases. We conclude that *A. tropicus* fry have a high capacity to utilize carbohydrates substituting lipids as energy source in balanced diets.

## KEYWORDS

ancient fish, carbohydrates, cornstarch, gluconeogenesis, glycolysis, lipids

## 1 | INTRODUCTION

A general trend in aquaculture industry is to optimize the use of nutrients in diets through other energy sources. Although it is a widely accepted fact that fish do not have a specific carbohydrate requirement, their use in elaboration of fish diets provides usable energy by optimizing the use of protein and dietary lipids, especially in herbivorous and omnivorous fish (Hemre, Mommsen, &

Krogdahl, 2002; Krogdahl, Hemre, & Mommsen, 2005; Stone, 2003). In this regard, lipids are a major source of energy for fish, and at the same time, providing them with the required fatty acids for proper growth and health conditions (Torfi Mozanzadeh, Yavari, Maramazi, Agh, & Gisbert, 2017). However, diets with high lipid levels may have adverse effect on immune response and disease resistance of fish (Dias et al., 2004). On the other hand, carbohydrates have advantage of being three to five times

cheaper ingredients than proteins and lipids, they reduce the amount of nitrogen from effluents of farms and they help in the pellet binding, stability and buoyancy (Krongdahl et al., 2005). However, the capacity of fish to use carbohydrates depends on several factors, which can be grouped into biological, nutritional and environmental (Kamalam, Medale, & Panserat, 2017). An excess of dietary carbohydrates can generate problems in fish health such as prolonged hyperglycaemia, decreased growth and in some cases increased glycosylated haemoglobin, retinopathy, hepatic steatosis and insulin resistance (Barma, Dey, Bazu, Roy, & Bhattacharya, 2006; Gleeson, Connaughton, & Arneson, 2007; Prisingkorn et al., 2017).

Most of the studies related to the use of carbohydrates and their effect on metabolism in fish have been made in teleosts. In this context, tropical gar (*Atractosteus tropicus*), is a freshwater fish species belonging to Lepisosteidae family, a clade classified as holoostei (infraclass) that diverged during the Mesozoic before the Teleosts Genome Duplication (TGD; Wiley & Schultze, 1984). The genome of spotted gar (*Lepisosteus oculatus*) was recently described and it was pointed out that gars could be used as an ancestral model of the function of genes and their implications in evolution, development and physiology of teleosts and tetrapods (Braasch et al., 2016).

Tropical gar has been described, morphologically and physiologically, as a carnivorous species in early stages (Frias-Quintana et al., 2015; Reséndez & Salvadores, 1983). Additionally, it was recently reported that larvae of *A. tropicus* are able to improve their growth by replacing cellulose with cornstarch in formulation of their diets (Frias-Quintana, Dominguez-Lorenzo, Álvarez-González, Tovar-Ramírez, & Martínez-García, 2016). Also, favourable results in growth and survival were observed when adding potato starch to replace part of dietary protein (Frias-Quintana et al., 2017). Considering the above mentioned, the effect of metabolism with the inclusion of dietary carbohydrates in lepisosteids is unknown. Thus, the objective of this study was to determinate the effect of different dietary carbohydrate to lipid ratios in diets for *A. tropicus* fry on growth performance, proximate composition, plasma biochemical parameters, digestive and hepatic enzyme activities.

## 2 | MATERIALS AND METHODS

### 2.1 | Fish culture

Tropical gar fry were obtained from the broodstock of the Laboratorio de Acuicultura Tropical, División Académica de Ciencias Biológicas, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Mexico. Once the larvae started free swimming, they were transferred to 70 L circular tanks. Fish were acclimated to a pelleted diet by a co-feeding regime with *Artemia* (nauplii and frozen adults) and a basal diet which was denoted as D1 (Table 1; Frias-Quintana, Álvarez-González, & Márquez-Couturier, 2010), until 17 days post-hatching (DPH; Márquez-Couturier et al., 2008), then they only fed with the basal

**TABLE 1** Chemical composition and proximal analysis of the experimental diets to tropical gar

Ingredients (g/kg)	Carbohydrate:lipid ratio diets				
	0.75	1.28	2.10	2.52	4.63
Sardine meal <sup>1</sup>	546	546	546	546	546
Fish protein hydrolyzate <sup>2</sup>	100	100	100	100	100
Sardine oil <sup>3</sup>	72	54	55	17.9	0
Soybean lecithin <sup>4</sup>	56	27	18	9	0
Pregelatinized cornstarch <sup>5</sup>	0	62.5	125	188	250
Granetin <sup>6</sup>	20	20	20	20	20
Vitamin and mineral premix <sup>7</sup>	15	15	15	15	15
Vitamin C <sup>8</sup>	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8
Sorghum meal 8%–10% <sup>9</sup>	210	175	140	104	68
Proximate composition (g/kg)					
Dry matter	975	974	985	950	976
Crude protein	425	420	418	418	415
Crude lipid	185	141	107	99.9	62.4
Carbohydrate	158	180	225	252	289
Ash	98	110	114	108	118
Carbohydrate:lipid ratio	0.75	1.28	2.10	2.52	4.63
Gross energy (MJ/kg) <sup>10</sup>	19.6	18.6	18.2	18.0	17.2

<sup>1</sup>Probielaz Marina y Agropecuarias, S.A. de C.V., Guadalajara, Jalisco, Mexico. <sup>2</sup>Pronat Ultra, Mérida, Yucatán, Mexico. <sup>3</sup>MSA Industrializadora de Maiz, S.A. de C.V., Guadalajara, Jalisco, Mexico. <sup>4</sup>DMS (Heerlen, Netherlands, active agent 85%). <sup>5</sup>GALMEX Comercializadora de Insumos Agrícolas, Villahermosa, Tabasco, Mexico. <sup>6</sup>D'garl Productos alimenticios y dietéticos Reimpago, Tlalpan, Edomex, Mexico.

<sup>7</sup>Consortio Súper Sociedad Anónima de Capital Variable. (for trout by courtesy), Guadalajara, Jalisco, Mexico. <sup>8</sup>Calculated using values of 29.6 KJ/g for protein, 39.56 KJ/g for lipid and 17.2 for carbohydrate (Gao et al., 2010).

diet (Carbohydrate:Lipid, CHO:L ratio of 0.75) until the beginning of the experiment (30 DPH).

### 2.2 | Experimental design and food preparation

For this study a simple factor was designing to evaluate the effect of dietary CHO:L ratio in *A. tropicus* fry. Control diet was formulated according to the protein, lipid and energy requirement (Márquez-Couturier et al., 2006), also we modified the diet considering the formulation proposed by Frias-Quintana et al. (2016) using fish meal as the main protein source with any addition of carbohydrates (Diet 1, 0.75 CHO:Lipid ratio). The other experimental diets were designed with gradual increments of 25% pregelatinized cornstarch, while the added lipids were reduced by 25% (Table 1). As a result, five isonitrogenous practical diets were prepared with different carbohydrate

to lipid ratios (0.75, 1.28, 2.10, 2.52, and 4.63 respectively), and the gradual reduction of the gross energy content (19.6, 18.6, 18.2, 18.0 and 17.2 MJ/kg respectively). Each diet was assigned to three tanks in a completely randomized design. Diets were formulated using Mixit-Win V.5 software (San Diego, CA). Fish meal and fish hydrolysate were used as the main protein sources, whereas fish oil and soybean lecithin were used as main lipid sources, and using pregelatinized cornstarch as main digestible carbohydrates source, according to results obtained by Frias-Quintana et al. (2016) (Table 1). All dry ingredients were finely ground, then the macronutrients were mixed for 15 min, to this mixture was added vitamins and minerals and mixed for 15 min more. The liquid ingredients were added slowly and mixed for another 15 min, finally distilled water was added and mixed for 15 min more. The diets were pelleted and then dried at 50°C for 10 hr, finally broken-up and sieved at 1mm. Subsequently, they were stored at -20°C. Fish were hand-fed to apparent satiation four times per day (8:00, 11:00, 14:00 and 17:00) for 45 days. Feed consumption was recorded for each experimental unit everyday.

### 2.3 | Experimental facility and growth performance

Growth trial was conducted in an indoor recirculating freshwater system supplied with mechanical and biological filters and aeration in the main reservoir, temperature was maintained at  $28.9 \pm 1.2^\circ\text{C}$  under natural photoperiod (12:12). During the feeding trial, water quality parameters were monitored daily, water pH was  $8.0 \pm 0.4$  (pH pen meter ST10, Ohaus, Parsippany, NJ), dissolved oxygen  $5.1 \pm 0.5$  mg/L (DO instrument, YSI 55-12FT, Yellow Springs, OH) nitrite and ammonium  $0.19 \pm 0.13$  mg/L (Ammonia Test Kit, Mars Fishcare, Chalfont, PA). At the beginning of trial, 150 fry were allocated to 15 circular tanks of 70-L of volume, each tank stocked with 10 fish, 30 fish per treatment (initial body weight average  $0.50 \pm 0.01$  g).

Length and body weight of all individuals was statistically analysed to ensure that there were no statistically significant differences. All fish from each experimental unit were counted to estimate survival and weighed and measured (total length) individually each two weeks during the experiment.

### 2.4 | Sample collection

At the end of growth trial, all fish from each experimental unit were weighed individually. To avoid that stress for manipulation of fish influenced the biochemical parameters of plasma, they were returned to their respective tanks and fed for an additional day. Afterward, fish were fasted for 24 hr, and they were anesthetized with clove oil (0.1 ml/L). Three fish from each tank were randomly selected. Blood sample was collected from the caudal vein using syringes contained EDTA (342 mmol/L) as anticoagulant and were immediately centrifuged at 10,000 g for 1 min; plasma samples were immediately analysed for biochemical parameters. Fish still anesthetized were sacrificed by decapitation by trained personnel (NOM-062-ZOO-1999, from Mexico) then were rapidly dissected on

ice to obtain liver and intestines samples for analysis of digestive and metabolic enzyme activities. Three other fish from each experimental unit were anesthetized, slaughter and dissected, in the same way as previously explained, for the calculation of viscerosomatic and hepatosomatic indexes, as well as for proximal analysis of carcasses and livers.

### 2.5 | Growth and food quality indexes

In order to evaluate fish performance, following parameters were calculated: Survival (S as percentage) =  $100 \times [\text{Final fish number} / \text{Initial fish number}]$ . Weight gain (WG as percentage) =  $100 \times [(\text{final mean body weight} - \text{initial mean body weight}) / \text{initial mean body weight}]$ . Specific growth rate (SGR as percentage of body weight gain per day) =  $100 \times (\text{Ln final mean body weight} - \text{Ln initial mean body weight}) / \text{days}$ . Feed conversion ratio (FCR) =  $(\text{individual dry feed intake}) / (\text{individual wet weight gain})$ . Condition factor (K as percentage) =  $100 \times [(\text{final mean body weight (g)} / \text{standard length (cm)}^3)]$ .

### 2.6 | Hepatosomatic and viscerosomatic indexes

Whole fish, viscera and livers from three fish of each experimental unit were weighed for calculation of viscerosomatic index (VSI) =  $100 \times [(\text{viscera weight}) / (\text{fish weight})]$  and hepatosomatic index (HSI) =  $100 \times [(\text{liver weight}) / (\text{fish weight})]$ . The dressed carcasses were frozen and lyophilized for proximal chemical analysis. Livers and intestines of each fish were separated and immediately frozen and kept at  $-80^\circ\text{C}$  until analyses for enzymatic activities, hepatic glycogen and lipid content.

### 2.7 | Proximate composition analysis of experimental diets

Proximate composition of experimental diets and carcass were determined according to Association of Official Analytical Chemist procedures (AOAC, 2000). Dry matter after drying samples at  $105^\circ\text{C}$  for 24 hr. Total ash content was determined by gravimetry after combustion at  $550^\circ\text{C}$  for 8 hr. Crude protein by Kjeldahl method using an automatic distillation system VAPODEST 10s, Gerhardt and automatic titration system TitroLine® 5000, SI Analytics. Lipids of diets, carcass and liver were determined by chloroform-methanol extracted as previously described by Folch, Lees, and Sloan Stanley (1957). Starch was determined in experimental diets by the glucosylase glucose oxidase method (Thivend, Mercier, & Guilbot, 1972).

### 2.8 | Plasma and liver assays

Plasma metabolites were analysed using commercial kits (Pointe Scientific, Canton, MI) adapted to a microplate (xMark™ Microplate Absorbance Spectrophotometer, Bio-Rad, Hercules, CA). Glucose in plasma was determined by glucose oxidase method, triglycerides

by enzymatic reaction using glycerol phosphate oxidase, cholesterol was determined using cholesterol esterase and cholesterol oxidase, and albumin by Bromocresol Green method.

Frozen liver samples were minced on a chilled petri dish into small pieces and divided into two different aliquots to assess enzyme activities and glycogen. Hepatic glycogen was evaluated using 50 mg of frozen liver tissue. Individual samples were homogenized by ultrasonic disruption with 7.5 vols of 600 mmol/L perchloric acid (chilled) and then neutralized using 1 M potassium bicarbonate. The homogenate was centrifuged at 1000 g for 10 min at  $-4^{\circ}\text{C}$ . Liver glycogen levels were measured using the Keppler and Decker (1974) method. Glucose obtained after glycogen breakdown was determined with a commercial kit (Pointe Scientific, Canton, MI). Hepatic fat content was determined by crude lipids determination (CL) where fat in the tissues were extracted after 12 hr of homogenization with dichloromethane-methanol (2:1 v/v) followed by separation and vacuum drying in 2 ml of chloroform, and quantified gravimetrically (Folch et al., 1957).

## 2.9 | Intestinal enzyme activities

Three intestines from each experimental unit were homogenized in a pool with ice-cold buffer cold buffer 50 mmol/L Tris-HCl, 25 mM  $\text{CaCl}_2$  (pH 7.5) using an Ultra-Turrax IKA T18 basic tissue homogenizer. The homogenate was centrifuged at 16,000 g for 15 min at  $-4^{\circ}\text{C}$ , resultant supernatant was separate and preserved in aliquots at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Alkaline proteases activity was determined according to Walter (1984) using Hammarsten-grade casein 0.5% in buffer (100 mmol/L Tris-HCl; 10 mmol/L  $\text{CaCl}_2$ , pH 9); one unit of activity was defined as 1  $\mu\text{g}$  of tyrosine released per minute at  $\text{Abs}_{280}$ . Lipase activity was measured as previously described by Versaw, Cuppett, Winters, and Williams (1989) but using *p*-naphthyl acetate 100 mmol/L as substrate; one unit of activity was defined as 1  $\mu\text{g}$  de naphthol released per minute at 540 nm.  $\alpha$ -amylase activity (EC 3.2.1.1) was determined by the method of Robyt and Whelan (1968) using soluble starch (2%) in a buffer (100 mmol/L citrate-phosphate; 50 mmol/L NaCl, pH 7.5), one unit of amylase was defined as the amount of enzyme to produce 1  $\mu\text{mol/L}$  of maltose per minute at 600 nm. All enzyme activities were expressed per mg of protein. Protein concentration was determined according to Bradford (1976) using a standard curve with bovine serum albumin (BSA). All assays were performed in triplicate.

## 2.10 | Hepatic enzyme activities

A frozen sample of liver (500 mg) was homogenized in a Potter-Elvehjem homogenizer with 9 vols of an ice-cold buffer 50 mmol/L Tris (pH 7.6), 5 mmol/L EDTA, 2 mmol/L 1,4 dithiothreitol (DTT), and a commercial protease inhibitor cocktail (AEBSF 2 mmol/L, aprotinin 0.3  $\mu\text{mol/L}$ , bestatin 116  $\mu\text{mol/L}$ , E-64 14  $\mu\text{mol/L}$ , leupeptin 1  $\mu\text{mol/L}$  and EDTA 1 mmol/L; Conde-Sieira, Soengas, & Valente, 2015). The homogenate was centrifuged at 900 g for 10 min, and resultant supernatant was separated and divided in two aliquots.

One aliquot was used for measurement of hexokinase (EC 2.7.1.1; HK), glucokinase (EC 2.7.1.2; GK), fructose-1, 6-bisphosphatase (EC 3.1.3.11; FBPase) and glucose-6-phosphate dehydrogenase (EC 1.1.1.49; G6PD) activities. The second aliquot was centrifuged at 10 000 g for 20 min, the resultant cytosolic fraction was used for measure pyruvate kinase activity (EC 2.7.1.40; PK; Kirchner, Kaushik, & Panzerat, 2003).

The HK and GK activities were measured using 50 mmol/L imidazole (pH 8), 7 mmol/L ATP, 5 mmol/L  $\text{MgCl}_2$ , 2 mmol/L NADP, 0.15 U/ml, G6PD, 0.1 U/ml 6-phosphogluconate dehydrogenase and 1 mmol/L of glucose (except the controls; Borrebaek & Waagbo, 1993; Sangiao-Alvarellos et al., 2003; Tranulis, Dregni, Christophersen, Krogdahl, & Borrebaek, 1996).

FBPase was assessed using 85 mmol/L imidazole (pH 7.7), 0.5 mmol/L NADP, 5 mmol/L  $\text{MgCl}_2$ , 2 U/ml G6PD, 2 U/ml phosphoglucoisomerase, and 1 mmol/L fructose-1, 6-bisphosphate (except the controls; Sangiao-Alvarellos et al., 2003).

G6PD activity was assayed using 78 mmol/L imidazole (pH 7.7), 5 mmol/L  $\text{MgCl}_2$ , 0.5 mmol/L NADP, 1 mmol/L glucose-6-phosphate (except the controls; Sangiao-Alvarellos et al., 2003).

In order to measure the phosphoenol pyruvate carboxykinase activity (EC 4.1.1.32; PEPCK) a piece of liver tissue (500 mg) was homogenized with 10 vols of ice-cold buffer (10 mmol/L 4-(2-hydroxyethyl) piperazine-1-ethanesulfonic acid, 250 mmol/L saccharose, 1 mmol/L DTT). The homogenate was centrifuged at 900 g for 10 min, the resultant supernatant was centrifuged at 10 000 g for 20 min. The cytosolic phase was recovered and frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$  until analysis of enzymatic activity (Kirchner et al., 2003).

The activity of PK was measured as previously described by Laiz-Carrión, Martín Del Río, Miguez, Mancera, and Soengas (2003) using in a final volume 50 mmol/L imidazole-HCl (pH 7.4), 5 mmol/L  $\text{MgCl}_2$ , 100 mmol/L KCl, 0.15 mmol/L NADH, 1 mmol/L ADP, 2 mmol/L PEP (except the controls) and 2 U of lactate dehydrogenase.

PEPCK activity was determined using 50 mmol/L Tris-HCl (7.5), 1 mol/L  $\text{MnCl}_2$ , 20 mmol/L  $\text{NaHCO}_3$ , 0.3 mmol/L NADH, 1.5 mmol/L PEP, 2 U malate dehydrogenase, and 0.2 mmol/L deoxyguanosine 5'-diphosphate (dGDP, omitted for controls; Petrescu et al., 1979; Polakof, Miguez, & Soengas, 2008).

All enzyme activities were determined using an xMark™ Microplate Absorbance Spectrophotometer (Bio-Rad, Hercules, CA). Reaction rates of enzymes were determined at  $37^{\circ}\text{C}$  by the increased or decreased in absorbance of NAD(P)H at 340 nm. All enzyme activities were expressed per mg of hepatic soluble protein. Protein concentration of each type of enzyme extract was determined using the Quick Start™ Bradford protein assay (Bio-Rad, Hercules, CA) and a standard curve with bovine serum albumin (BSA), according to Bradford (1976). All assays were performed in triplicate.

## 2.11 | Statistical analysis

Data were statistically analysed by one-way ANOVA, previously verified the assumptions of normality (Kolmogorov-Smirnov test)

and homoscedasticity (Levine test). Where significant differences were found applying a Tukey test. Analyses were performed with the statistical software Statistica TM v8.0 (Statsoft, Inc., Tulsa, OK) using a significance value of  $p < 0.05$ . The results were presented as mean  $\pm$  standard deviation, SD.

### 3 | RESULTS

#### 3.1 | Growth performance, feed utilization and survival

In the present study, growth performance (FBW, WG, SGR and K) and feed utilization (FI, FCR) did not show significant differences among diets. The survival of fish ranged from 80% to 96% without statistical differences between treatments ( $p > 0.05$ ; Table 2).

#### 3.2 | Hepatosomatic and viscerosomatic indexes

HSI was significantly influenced by the dietary CHO:L ratios, where the highest index was obtained in fish fed a CHO:L ratio of 2.10, which was not significantly different from those of 1.28 and 2.52 (Table 3), although higher than those fed with ratios of 0.75 and 4.63 ( $p < 0.05$ ). By the other side, VSI was not significantly different among treatments.

#### 3.3 | Dressed carcass and liver composition

Proximate composition of dressed carcass and liver of *A. tropicus* fry are shown in Table 4. Crude lipid content of carcass significantly decreased with dietary CHO:L ratios increasing from 2.10 to 4.63 ( $p < 0.05$ ), where the highest lipid content is observed in fish fed a CHO:L ratio of 4.63. No significant differences were observed in moisture, ash and protein content of carcass among dietary treatments.

The amount of lipids in the liver was significantly higher in fish fed with CHO:L ratios of 0.75, without showing differences with the fish that received the CHO:L ratio of 1.28; and tended to decrease according to CHO:L ratio increase ( $p < 0.05$ ). On the contrary, hepatic glycogen showed an opposite trend, so that fish fed a CHO:L ratio of 0.75 had a liver glycogen concentration significantly lower than those of the other groups ( $p < 0.05$ ).

#### 3.4 | Plasma biochemical composition

Cholesterol and triglycerides were markedly affected by CHO:L ratios (Table 5). Lowest cholesterol and triglycerides concentrations were observed in fish fed a CHO:L ratio of 4.63, and they were significantly different from those fed CHO:L ratios of 0.75, 1.28 and 2.10 ( $p < 0.05$ ). Albumin and glucose did not show any significant difference among dietary treatments ( $p > 0.05$ ).

**TABLE 2** Growth performance parameters of tropical gar fed experimental diets

	Carbohydrate:lipid ratio diets				
	0.75	1.28	2.10	2.52	4.63
S	86.7 $\pm$ 18.8	93.5 $\pm$ 9.4	80.0 $\pm$ 8.2	90.0 $\pm$ 14.1	96.7 $\pm$ 4.7
IBW	0.50	0.51	0.51	0.50	0.50
FBW	12.54 $\pm$ 1.24	14.25 $\pm$ 1.51	17.12 $\pm$ 1.45	18.82 $\pm$ 2.84	14.68 $\pm$ 0.77
WG	2,587.5 $\pm$ 245.2	2,657.1 $\pm$ 406.8	5,129.7 $\pm$ 948.1	2,677.8 $\pm$ 560.6	2,814.2 $\pm$ 125.2
SGR	7.15 $\pm$ 0.22	7.41 $\pm$ 0.25	7.81 $\pm$ 0.19	7.56 $\pm$ 0.44	7.49 $\pm$ 0.09
FCR	1.06 $\pm$ 0.46	0.97 $\pm$ 0.19	1.00 $\pm$ 0.10	1.12 $\pm$ 0.61	1.10 $\pm$ 0.25
FI	0.29 $\pm$ 0.15	0.29 $\pm$ 0.04	0.57 $\pm$ 0.04	0.51 $\pm$ 0.12	0.54 $\pm$ 0.05
K	1.56 $\pm$ 0.16	1.07 $\pm$ 0.15	1.06 $\pm$ 0.11	1.27 $\pm$ 0.52	1.55 $\pm$ 0.20

Note. Values are presented as mean  $\pm$  SD,  $n = 5$ .

Abbreviations: FBW, Final mean body weight; FCR, feed conversion ratio; FI, feed intake (g/day); IBW, Initial mean body weight; K, condition factor; S, survival; SGR, specific growth rate; WG, Weight gain.

**TABLE 3** Viscerosomatic and hepatosomatic indexes in tropical gar fed experimental diets

	Carbohydrate:lipid ratio diets				
	0.75	1.28	2.10	2.52	4.63
VSI	8.76 $\pm$ 1.18	8.84 $\pm$ 0.87	8.88 $\pm$ 0.77	8.97 $\pm$ 1.61	9.6 $\pm$ 1.16
HSI	5.19 $\pm$ 0.51 <sup>bc</sup>	5.72 $\pm$ 0.55 <sup>ab</sup>	4.06 $\pm$ 0.42 <sup>d</sup>	5.67 $\pm$ 0.48 <sup>bc</sup>	5.11 $\pm$ 0.57 <sup>c</sup>

Note. Values are presented as mean  $\pm$  SD,  $n = 5$ . Means with different superscripts in the same row are significantly different ( $p < 0.05$ ).

Abbreviation: HSI, Hepatosomatic Index; VSI, Viscerosomatic Index.

### 3.5 | Intestinal enzyme activities

Proteases, lipases and  $\alpha$ -amylase activities did not show differences among treatments ( $p > 0.05$ ). However,  $\alpha$ -amylase and lipase activities showed a tendency to increase as the CHO:L ratio increased (Table 6).

### 3.6 | Hepatic enzyme activities

Except for PK, hepatic enzyme activities were markedly affected by experimental diets (Table 7). GK and HK activities increased as dietary CHO:L ratios increased from 0.75 to 2.10 but decreased significantly ( $p < 0.05$ ) with the further increasing CHO:L ratios (2.52 and 4.63); whereas the opposite was true for PEPCCK. FBPase showed the same pattern of PEPCCK but the lowest enzymatic activity was observed in fish fed a CHO:L ratio of 2.53. Hepatic PK enzyme showed little difference among all the treatments ( $p > 0.05$ ). On the other hand, G6PD activity increased significantly as dietary CHO:L ratios increased ( $p < 0.05$ ).

## 4 | DISCUSSION

*A. tropicus* has been described as carnivore species (Frias-Quintana et al., 2015; Reséndez & Salvadores, 1983); however, our results in terms of growth performance parameters indicated that the replacement of

lipids by dietary carbohydrates in diets did not significantly affect fish performance. Even though, it is possible to observe a slight tendency to WG and SGR increase as CHO:L ratio increases from 0.75 to 2.10 and then decrease towards higher levels of carbohydrate inclusion.

In this regard, it is known that a high energy intake in the diet decreases the feed intake, which has negative effects on growth due to the reduction in the consumption of nutrients, such as proteins (Borba, Fracalossi, & Pezzato, 2006). In the present investigation, gross energy was greater as the CHO:L ratio decreased. Although our results did not show significant differences with respect to food consumption, it was possible to observe a trend towards a decrease in food consumption in the diets with the highest energy content (CHO:L ratios of 0.75 and 1.28), while in the CHO:L ratio of 2.10 the feed intake increased, which coincides with the trend observed in the WG.

On the other hand, it must be taken into account that of the gross energy contributed by the food only a part is absorbed by the organism (digestible energy) and a part of the assimilated energy (metabolizable energy) is lost in several biological processes such as digestion and excretion (Kaushik & Seifriz, 2010). Our results indicate that the diet 3 (22.5% of carbohydrates and 10.7% of lipids content) had the right balance in terms of energy input for growth and less loss due to the use of nutrients, which agrees with the results of Frias-Quintana et al. (2017), Frias-Quintana et al. (2016) about the use of starch as a non-protein energy resource to improve growth in

**TABLE 4** Dressed carcass and liver proximate composition in tropical gar fed experimental diets

	Carbohydrate:lipid ratio diets				
	0.75	1.28	2.10	2.52	4.63
Dressed carcass (g/kg of wet weight basis)					
Moisture	709.0 $\pm$ 20.5	722.4 $\pm$ 24.5	705.4 $\pm$ 9.5	726.4 $\pm$ 51.5	755.7 $\pm$ 14.8
Crude protein	191.5 $\pm$ 10.7	186.9 $\pm$ 8.6	205.0 $\pm$ 4.1	197.5 $\pm$ 17.7	197.2 $\pm$ 7.7
Crude lipids	45.7 $\pm$ 4.5 <sup>a</sup>	39.5 $\pm$ 6.5 <sup>a</sup>	40.9 $\pm$ 2.1 <sup>a</sup>	28.5 $\pm$ 2.6 <sup>b</sup>	25.1 $\pm$ 2.5 <sup>b</sup>
Ash	51.2 $\pm$ 2.1	51.2 $\pm$ 4.5	27.5 $\pm$ 1.8	54.8 $\pm$ 0.7	51.8 $\pm$ 3.4
Liver					
Lipids (g/kg)	126.1 $\pm$ 7.9 <sup>a</sup>	155.1 $\pm$ 7.2 <sup>a</sup>	114.5 $\pm$ 16.5 <sup>ab</sup>	86.0 $\pm$ 6.4 <sup>ab</sup>	81.59 $\pm$ 12.4 <sup>a</sup>
Glycogen ( $\mu$ mol/g)	26.16 $\pm$ 5.1 <sup>a</sup>	51.62 $\pm$ 4.1 <sup>ab</sup>	55.25 $\pm$ 5.6 <sup>a</sup>	55.25 $\pm$ 8.0 <sup>a</sup>	56.78 $\pm$ 5.2 <sup>a</sup>

Note. Values are presented as mean  $\pm$  SD,  $n = 5$ . Means with different superscripts in the same row are significantly different ( $p < 0.05$ ).

**TABLE 5** Plasma biochemical parameters of tropical gar fed experimental diets after 24 hr fasting

Parameter	Carbohydrate:lipid ratio diets				
	0.75	1.28	2.10	2.52	4.63
Glucose (mg/dL)	115.25 $\pm$ 26.48	114.56 $\pm$ 8.10	107.98 $\pm$ 12.26	127.48 $\pm$ 26.26	125.18 $\pm$ 18.05
Triglycerides (mg/dL)	275.96 $\pm$ 45.48 <sup>a</sup>	277.69 $\pm$ 42.82 <sup>a</sup>	277.56 $\pm$ 55.32 <sup>a</sup>	227.51 $\pm$ 56.64 <sup>ab</sup>	189.5 $\pm$ 54.90 <sup>a</sup>
Cholesterol (mg/dL)	157.54 $\pm$ 25.22 <sup>ab</sup>	141.72 $\pm$ 20.89 <sup>a</sup>	157.42 $\pm$ 15.47 <sup>ab</sup>	121.41 $\pm$ 22.28 <sup>ab</sup>	116.28 $\pm$ 9.54 <sup>a</sup>
Albumin (g/dL)	7.64 $\pm$ 5.18	7.84 $\pm$ 2.15	7.98 $\pm$ 2.14	5.85 $\pm$ 2.51	5.14 $\pm$ 0.88

Note. Values are presented as mean  $\pm$  SD,  $n = 9$  fish by treatment. Means with different superscripts in the same row are significantly different ( $p < 0.05$ ).

*A. tropicus*, however, more studies are required that deepen the use of these nutrients and energy metabolism in the tropical gar.

Similarly, it is likely that the decrease in growth observed in the CHO:L ratios of 2.52 and 4.63, it is due to the decrease in the supply of essential fatty acids that the increase of carbohydrates in the diet. In this regard, it is widely known that lipids, in addition to providing energy, also provide fatty acids that play important roles in physiological processes such as growth, food efficiency, immune response and health conditions, especially during the larval stage (Tocher, 2003; Tocher, Bendiksen, Campbell, & Bell, 2008).

In the present study, survival was not affected by the experimental diets, this varied from 80% to 96%, which agreed with previous studies in tropical gar such as Friso-Quintana et al. (2016) who reported survival of 97.8% and decreased cannibalism when using diets contained 15% of corn starch instead of cellulose. Likewise, Huerta-Ortiz et al. (2009) who reported a survival between 56% and 86% in a study about the substitution of fish oil by vegetable oil. On the other hand, the lipid content of carcass significantly decreased with the increase of dietary CHO:L ratios from 2.10 to 4.63, this indicates that lipids for *A. tropicus* play a major role in the deposition of lipids in the whole body in comparison with carbohydrates, which is consistent with reported in other fish species such as Senegalese sole (*Solea senegalensis*; Dias et al., 2004), grass carp (*Ctenopharyngodon idella*; Gao et al., 2010), *R. quelen* (Moro, Camilo, Moraes, & Fracalossi, 2010), yellow croaker (*Larimichthys crocea*; Zhou, Wang, Xie, Deng, & Zhou, 2016) and

Brazilian sardine (*Sardinella brasiliensis*; Sterzelecki et al., 2017). Moreover, in *A. tropicus* there was also no significant variation in carcass protein content; however, studies in red drum (*Sciaenops ocellatus*; Ellis & Reigh, 1991), Asian seabass (*Lateolabrax japonicus*; Catacutan & Coloso, 1997), *M. amblycephala* (Li, Wang, Liu, Jiang, & Zhu, 2013) and golden pompano (*Trachinotus ovatus*; Zhou et al., 2015) reported an increase in protein content as the CHO:L ratio increased, which was only attributed to the inverse relationship between lipid and protein content of tissues that is often observed when this data are expressed as a percentage of dry weight (Ellis & Reigh, 1991).

In our study, HSI of the fish fed with CHO:L ratio of 2.10 was significantly higher than fish that received the diets with CHO:L ratios of 0.75 and 4.63. Concerning this, liver proximal composition showed a significantly lower deposition of hepatic glycogen in fish that received the cornstarch free diet (diet 0.75) with respect to the fish feed diets contained higher CHO:L ratio (2.10, 2.52 and 4.53). Contrary, the level of liver fat decreases as CHO:L ratio increase. Then, the highest HSI observed in the fish that were fed with CHO:L ratio diet of 2.10 shows the effect of both energy reserves accumulation (fat and glycogen) in the liver. Considering the above mentioned, HSI tends to decrease towards the CHO:L ratio of 0.75 because of the lower content of glycogen, while it also decreases towards the CHO:L ratio of 4.63 due to the lower accumulation of lipids. This indicates that *A. tropicus* fry can better use lipids than dietary carbohydrates for lipid accumulation.

**TABLE 6** Intestinal enzyme activities of tropical gar fed experimental diets after 24 hr fasting

Activity (U mg/protein)	Carbohydrate:lipid ratio diets				
	0.75	1.28	2.10	2.52	4.63
Proteases	79.9 ± 14.4	75.8 ± 1.7	77.7 ± 12.5	77.6 ± 18.6	85.8 ± 4.5
Lipases	517.6 ± 50.6	508.7 ± 80.8	580.9 ± 55	601.2 ± 114.9	612.8 ± 48.5
Amylases	21.4 ± 11.5	24.5 ± 8.9	55.0 ± 15.6	42.9 ± 11.0	51.9 ± 10.4

Note. Values are presented as mean ± SD, n = 5.

**TABLE 7** Hepatic enzyme activities of tropical gar fed experimental diets after 24 hr fasting

Activity (U mg/protein)	Carbohydrate:lipid ratio diets				
	0.75	1.28	2.10	2.52	4.63
<b>Glycolytic enzymes</b>					
HK	0.81 ± 0.04 <sup>a</sup>	1.15 ± 0.54 <sup>b</sup>	1.97 ± 0.20 <sup>c</sup>	1.05 ± 0.06 <sup>b</sup>	1.82 ± 0.17 <sup>d</sup>
GK	0.15 ± 0.05 <sup>d</sup>	0.39 ± 0.27 <sup>ab</sup>	1.1 ± 0.05 <sup>b</sup>	0.69 ± 0.05 <sup>ab</sup>	0.19 ± 0.04 <sup>cd</sup>
PK	104.9 ± 19.6	99.4 ± 14.0	86.1 ± 9.7	89.9 ± 24.5	88.9 ± 5.6
<b>Gluconeogenic enzymes</b>					
PEPCK	5.2 ± 0.15 <sup>d</sup>	5.5 ± 0.65 <sup>d</sup>	1.5 ± 0.42 <sup>b</sup>	2.5 ± 0.71 <sup>ab</sup>	2.8 ± 0.42 <sup>ab</sup>
FBPase	61.4 ± 1.7 <sup>d</sup>	56.1 ± 2.7 <sup>ab</sup>	55 ± 2.8 <sup>ab</sup>	47.7 ± 6.9 <sup>b</sup>	57.1 ± 5.7 <sup>ab</sup>
<b>Lipogenic enzyme</b>					
G6PD	7.5 ± 0.05 <sup>b</sup>	8.5 ± 1.7 <sup>b</sup>	12.1 ± 0.8 <sup>d</sup>	9.7 ± 2.1 <sup>ab</sup>	12.5 ± 1.0 <sup>d</sup>

Note. Values are presented as mean ± SD, n = 5. Means with different superscripts in the same row are significantly different ( $p < 0.05$ ). Abbreviations: FBPase, fructose-1,6-bisphosphatase; G6PD, glucose-6-phosphate dehydrogenase; GK, glucokinase; HK, Hexokinase; PEPCK, phosphoenolpyruvate carboxykinase; PK, pyruvate kinase.

Regarding blood chemistry analysis, plasma glucose levels after 24 hr of fasting did not show significant differences among treatments, which agree with Zhou et al. (2016) where the absorption of glucose released by digestion is very efficient and allows the increase of blood glucose in most of fish. However, the intensity of blood glucose peak and its duration are species-specific and condition the tolerance of each species to carbohydrates (Moon, 2001). Many fish species (mainly carnivores) tend to exhibit a persistent postprandial hyperglycaemia after a meal high in carbohydrates (Hemre et al., 2002). Nevertheless, the glucose tolerance test in *A. tropicus* showed that after an intraperitoneal injection of 1.2 g/kg dextrose, the basal glucose level is recovered in less than 10 hr (unpublished data). This is in agreement with our results, which suggest that *A. tropicus* fry have a capacity to metabolize glucose faster than other carnivorous fish species such as *S. brasiliensis* (Sterzelecki et al., 2017).

According to our results, plasma triglyceride and cholesterol levels were significantly increased as CHO:L ratio decreased, this coincides with that reported for yellowfin seabream (*Sparus latus*; Hu et al., 2007), *C. idella* (Gao et al., 2010), *L. crocea* (Zhou et al., 2016) and *O. niloticus* (Xie et al., 2017). Plasma profiles reflect the general metabolism and physiological status of tissues, especially the liver, therefore, the increase in plasma triglycerides and cholesterol is attributed to active lipid transport in response to a high level of dietary fat (Xie et al., 2017).

Another important aspect has been detected in digestive enzyme activities; for instance, proteases, lipases and amylases are secreted in digestive system, usually in response to dietary protein, lipid and carbohydrate content (Buddington & Kroghdahl, 2004). In this context,  $\alpha$ -amylase activity generally correlates positively with dietary carbohydrate level (Polakof, Panzerat, Soengas, & Moon, 2012); however, this ability to secrete more  $\alpha$ -amylase for dietary polysaccharides hydrolysis seems to be more efficient in herbivorous and omnivorous species, while in carnivorous species such as rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) this digestive enzyme is not efficiently expressed, which provokes adverse effects when high levels of carbohydrates are incorporated into the diet (Kroghdahl et al., 2005). In the case of lipase activity regarding to the inclusion of carbohydrates, the response is variable, since species such as *C. idella* and *L. crocea* showed a decrease in lipase activity as CHO:L ratio increases (Gao et al., 2010; Zhou et al., 2016) while in *S. brasiliensis* the activity tends to increase in accordance to CHO:L ratio (Sterzelecki et al., 2017).

Previous studies on *A. tropicus* larvae described a significant increase in  $\alpha$ -amylase activity as dietary carbohydrates increase (Frias-Quintana et al., 2017, 2016). In our research, the same trend was observed, although there are no significant differences between treatments. We consider that  $\alpha$ -amylase activity increases in fish fed with CHO:L ratios from 0.75 to 2.52 in response to the increase of cornstarch in their diet. Then, the activity decreases in the CHO:L ratio of 4.63 because the excess of carbohydrates in diet (28.94%), coupled with the pelleting process produced harder pellets that resisted longer the digestive disintegration by the gastrointestinal tract transit (personal observation). In agreement with our results,

Sørensen (2012) indicates that there is a moderate but positive correlation between amount of purified wheat starch inclusion and the durability and hardness of the pellet. This author also describes that higher water stability of pellets results in longer gastric retention time and prolonged evacuation time of chyme through the gastrointestinal tract. Furthermore, pellets that were too hard caused digestive disturbances in the fish.

Our study showed an increase in lipase activity as the CHO:L ratio increases, this deal with results obtained by Frias-Quintana et al. (2017, 2016) despite the fact that in these authors used iso-lipidic diets. Therefore, the increase in lipase activity is due to the reduction in lipids in diets, in addition to the hardness of the pellet, particularly in the D5 (4.63 CHO:L ratio). However, further studies are needed to evaluate the effect of ingredients composition and processing conditions on physical characteristics of diets and how this affects the digestibility and availability of nutrients.

Considering the above-mentioned, liver plays an important role in the regulation of intermediary metabolism in response to nutritional status. Under aerobic conditions, glucose is catabolized by means of glycolysis, Krebs cycle and respiratory chain to produce ATP or via the pentose phosphate pathway to generate nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP). The excess can be stored as glycogen (glycogenesis) or lipids (lipogenesis). While, under fasting conditions, the lack of glucose is satisfied by means de novo synthesis from pyruvate, lactate, glycerol and some amino acids (gluconeogenesis) or by means of the degradation of glycogen into glucose (glycogenolysis; Polakof et al., 2012; Rui, 2014).

For this reason, an adequate regulation of these pathways is necessary to maintain glucose homeostasis. These mechanisms are regulated in herbivorous such as common carp (*Cyprinus carpio*; Shimeno, Kheyyali, & Shikata, 1995) or omnivores such as *O. niloticus* (Chen et al., 2017). However, in carnivorous fish such as gilthead seabream (*Sparus aurata*; Enes, Panzerat, Kaushik, & Oliva-Teles, 2011), perch (*Perca fluviatilis*; Borrebaek & Christophersen, 2000), *O. mykiss* (Kirchner, Panzerat, Lim, Kaushik, & Ferraris, 2008; Panzerat, Capilla, et al., 2001; Panzerat, Plagnes Juan, Breque, & Kaushik, 2001), European seabass (*Dicentrarchus labrax*; Enes, Panzerat, Kaushik, & Oliva-Teles, 2006; Enes et al., 2011) and *L. crocea* (P. Zhou et al., 2016), have been shown a low inhibition of hepatic gluconeogenesis related to the inclusion of carbohydrates in their diet, both at molecular level and enzymatic activity (Enes, Panzerat, Kaushik, & Oliva-Teles, 2009). Furthermore, in rainbow trout (*O. mykiss*) it has been shown that the activity of key enzymes in gluconeogenesis (PEPCK, FBPase and G6Pase) are regulated by amino acids (Kirchner et al., 2003) and could be modify by starvation (Kirchner et al., 2008). The absence of gluconeogenesis inhibition induced by carbohydrates is a hypothesis for postprandial hyperglycaemia and the poor use of carbohydrates in carnivorous fish. On the contrary, our results showed that *A. tropicus* fry, increases glycolytic enzyme activity for HK and GK as a response of the inclusion of carbohydrates ranged 13.8 to 22.5% (CHO:L ratios of 0.75 to 2.10) while gluconeogenic enzymes (PEPCK and FBPase) showed the opposite tendency. This confirms an efficient

regulation of metabolic pathways, glycolysis and gluconeogenesis, by dietary carbohydrates for this species. For example, a carbohydrate level above 25% (CHO:L ratio of 2.52) causes a greater activity of gluconeogenic enzymes and decrease in the activity of glycolytic enzymes. This effect is also observed in plasma glucose concentration, since it tends to rise in the fish fed the diets with CHO:L ratio of 2.52 and 4.63, although not significantly with respect to the other experimental groups. It is likely that this failure in the regulation of metabolic pathways in the fish that received diets with highest carbohydrate content out because a possible liver malformation due to an excessive accumulation of glycogen, as has been described for *O. mykiss* (Hemre et al., 2002) although further studies are required to clarify this issue.

Additionally, PK is another key glycolytic enzyme, although it has been accepted that this enzyme has a nutritional regulation, although in some fish species its regulation by carbohydrates is still controversial (Enes et al., 2009; Kamalam et al., 2017). In our investigation with *A. tropicus* fry, no effect of dietary carbohydrate intake on liver PK activity was observed, this is in accordance with previous studies carried out in *O. mykiss* (Fideu, Soler, & Ruiz-Amil, 1983; Hilton & Atkinson, 1982; Skiba-Cassy et al., 2013; Suarez, Sanz, Bazoco, & Garcia-Gallego, 2002), *S. senegalensis* (Conde-Sieira et al., 2015; Dias et al., 2004) and *S. aurata* (Enes, Panzerat, Kaushik, & Oliva-Teles, 2008). However, an effect has been observed in PK activity dependent on the type of carbohydrate supplied. In European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) was observed a higher induction of liver PK by glucose than by starch, whereas in gibel carp (*Carassius auratus*) and Chinese longsnout catfish (*Leiocassis longirostris*) PK was significantly higher in fish fed diets containing sucrose than glucose, dextrin or starch. In *C. carpio* the protein substitution by 30% of starch, glucose or fructose had no effect on hepatic PK activity, but 30% of galactose depressed PK activity. On the other hand, the starvation in species such as *O. mykiss* and *S. aurata* cause a significant decrease in PK activity (Enes et al., 2009).

Meanwhile, lipogenesis is not directly linked to carbohydrate metabolism; this pathway plays an important role in homeostasis because it converts excess glucose into fatty acids. In this sense, glucose entering exogenously can activate lipogenesis by generating carbon backbones or reduced form of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH), the key-reducing co-factor generated by the oxidative branch of the pentose phosphate pathway. The enzymes responsible for catalysing the reactions to generate NADPH are G6PD and 6-phosphogluconate dehydrogenase (Ruí, 2014). However, studies in fish using radiolabeled glucose indicate that carbohydrates appear to stimulate lipid biosynthesis by increasing the availability of cytosolic reducing equivalents, like NADPH, rather than contributing with carbon backbones (Hemre et al., 2002).

Investigations conducted in *O. mykiss* reported that the administration of metformin is associated with an improvement of postprandial hyperglycaemia, due to the induction of lipogenesis in the liver (Panzerat et al., 2009). This generated the hypothesis that in carnivorous fish the low hepatic lipogenesis can explain, at least in part, the poor glucose homeostasis (Polakof et al., 2012).

Furthermore, studies with primary trout hepatocytes revealed that amino acids regulate hepatic fatty acid biosynthetic gene expression more efficiently than carbohydrates (Dai et al., 2016; Dai, Panzerat, Plagnes-Juan, Seilliez, & Skiba-Cassy, 2015). In our study with *A. tropicus* fry an increase in G6PD activity was observed as the CHO:L ratio increased, which agrees with results obtained in *S. senegalensis* (Dias et al., 2004), suggesting the activation de novo lipogenesis pathway. This, together with the reduction of gluconeogenesis, previously mentioned, may have contributed to the similar concentrations of plasma glucose regardless of treatment applied.

In conclusion, even though tropical gar has been described as a carnivorous fish, our results regarding growth parameters, feed utilization and survival were not affected by varying dietary CHO:L ratios (0.75–4.63) when these were tested for 45 days. Likewise, protease, lipase and amylase activities were not affected by diets. However, lipase showed an increase in its activity when the CHO:L ratio was increased, which was attributed to reduction of lipids in diets in addition to the hardness of pellet. Lipid content of carcass and liver, as well as, plasma triglyceride and cholesterol levels were significantly increased as CHO:L ratio decreased, demonstrating that dietary lipids contribute to the accumulation of fat in body and liver while carbohydrates have little contribution in this process. On the other hand, plasma glucose level after 24 hr fasting was not affected by dietary CHO:L ratios. However, glycolytic enzyme activities HK and GK were increased in response to dietary CHO:L ratios from 0.75 to 2.10, while gluconeogenic enzymes PEPCK and FBPase showed the opposite tendency. These results show that *A. tropicus* fry have the capacity to adequately metabolize glucose up to a carbohydrate inclusion of 22.5% (CHO:L ratio of 2.10).

#### ACKNOWLEDGEMENTS

R. Guerrero-Zárate thanks the Programa para el Desarrollo Profesional Docente (PRODEP) for providing the graduate scholarship. This research was supported by the project SEP-CONACYT Ciencia Básica "Estudio de la fisiología digestiva en larvas y juveniles de pejelagarto (*Atractosteus tropicus*) con base en técnicas histológicas, bioquímicas y moleculares" No. 282765.

#### CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no conflict of interest.

#### ETHICAL STATEMENT

All applicable international, national and/or institutional guidelines for the care and use of animals were followed by the authors.

#### ORCID

Rocio Guerrero-Zárate  <http://orcid.org/0000-0002-0346-0841>

Carlos A. Álvarez-González  <https://orcid.org/0000-0001-9240-0041>

Emyr S. Peña-Marín  <https://orcid.org/0000-0002-4736-9089>  
 Rafael Martínez-García  <https://orcid.org/0000-0003-2560-1518>  
 Mario A. Galaviz  <https://orcid.org/0000-0002-6274-3024>  
 Luz M. López  <https://orcid.org/0000-0003-2371-7218>  
 Raúl Utero-Herrera  <https://orcid.org/0000-0001-9873-9732>

## REFERENCES

- AOAC. (2000). Official methods of analysis, 17th edition. Association of Official Analytical Chemists.
- Barma, R., Dey, D., Bazu, D., Roy, S. S., & Bhattacharya, S. (2006). Nutritionally induced insulin resistance in an Indian perch: A possible model for type 2 diabetes. *Current Science*, 90(2), 188–194. Retrieved from <https://www.jstor.org/stable/24088980>
- Borba, M. R., Fracalossi, D. M., & Pezato, L. E. (2006). Dietary energy requirement of piracanjuba fingerlings, *Brycon orbignyanus*, and relative utilization of dietary carbohydrate and lipid. *Aquaculture Nutrition*, 12(5), 185–191. <https://doi.org/10.1111/j.1565-2095.2006.00401.x>
- Borrebaek, B., & Christophersen, B. (2000). Hepatic glucose phosphorylating activities in perch (*Perca fluviatilis*) after different dietary treatments. *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, 129(5), 587–595. [https://doi.org/10.1016/S0965-0491\(99\)00185-6](https://doi.org/10.1016/S0965-0491(99)00185-6)
- Borrebaek, B., Waagbø, R., Christophersen, B., Tranulz, M. A., & Hemre, G.-I. (1995). Adaptable hexokinase with low affinity for glucose in the liver of Atlantic salmon (*Salmo Salar*). *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, 104(4), 855–856. [https://doi.org/10.1016/0965-0491\(95\)00058-7](https://doi.org/10.1016/0965-0491(95)00058-7)
- Brazach, L., Gehrke, A. R., Smith, J. J., Kawasaki, K., Manoussaki, T., Pasquari, J., ... Postlethwait, J. H. (2016). The spotted gar genome illuminates vertebrate evolution and facilitates human-teleost comparisons. *Nature Genetics*, 48(4), 427–457. <https://doi.org/10.1038/ng.3526>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-5](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-5)
- Buddington, R. K., & Kroghdal, A. (2004). Hormonal regulation of the fish gastrointestinal tract. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*, 139(5), 261–271. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2004.09.007>
- Catacutan, M. R., & Coloso, R. M. (1997). Growth of juvenile Asian seabass, *Lateolabrax niloticus*, fed varying carbohydrate and lipid levels. *Aquaculture*, 149(1–2), 137–144. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(96\)01482-9](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(96)01482-9)
- Chen, Y. J., Zhang, T. Y., Chen, H. Y., Lin, S. M., Luo, L., & Wang, D. S. (2017). An evaluation of hepatic glucose metabolism at the transcription level for the omnivorous GIFT tilapia, *Oreochromis niloticus* during postprandial nutritional status transition from anabolism to catabolism. *Aquaculture*, 475, 575–582. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.05.009>
- Conde-Griela, M., Soengas, J. L., & Valente, L. M. P. (2015). Potential capacity of Senegalese sole (*Solea senegalensis*) to use carbohydrates: Metabolic responses to hypo- and hyper-glycaemia. *Aquaculture*, 458, 59–67. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.12.042>
- Dal, W., Panzerat, S., Kaushik, S., Terrier, F., Plaigues-Juan, E., Salles, I., & Skiba-Caszy, S. (2016). Hepatic fatty acid biosynthesis is more responsive to protein than carbohydrate in rainbow trout during acute stimulations. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 310(1), R74–R86. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00281.2015>
- Dal, W., Panzerat, S., Plaigues-Juan, E., Salles, I., & Skiba-Caszy, S. (2015). Amino acids attenuate insulin action on gluconeogenesis and promote fatty acid biosynthesis via mTORC1 signaling pathway in trout hepatocytes. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 56(5), 1084–1100. <https://doi.org/10.1159/000450281>
- Diaz, J., Rueda-Jasso, R., Panzerat, S., De Conceição, L. E. C., Gomez, E. F., & Diniz, M. T. (2004). Effect of dietary carbohydrate-to-lipid ratios on growth, lipid deposition and metabolic hepatic enzymes in juvenile Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup). *Aquaculture Research*, 35(12), 1122–1130. <https://doi.org/10.1111/j.1565-2109.2004.01155.x>
- Eitz, S. C., & Reigh, R. C. (1991). Effects of dietary lipid and carbohydrate levels on growth and body composition of juvenile red drum, *Sciaenops ocellatus*. *Aquaculture*, 97(4), 585–594. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(91\)90550-A](https://doi.org/10.1016/0044-8486(91)90550-A)
- Enez, R., Panzerat, S., Kaushik, S., & Oliva-Telaz, A. (2006). 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 - A Molecular and Integrative Physiology*, 143(1), 89–96. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2005.10.027>
- Enez, R., Panzerat, S., Kaushik, S., & Oliva-Telaz, A. (2008). Growth performance and metabolic utilization of diets with native and waxy maize starch by gilthead sea bream (*Sparus aurata*) juveniles. *Aquaculture*, 274(1), 101–108. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.11.009>
- Enez, R., Panzerat, S., Kaushik, S., & Oliva-Telaz, A. (2009). Nutritional regulation of hepatic glucose metabolism in fish. *Fish Physiology and Biochemistry*, 35(5), 519–559. <https://doi.org/10.1007/s10695-008-9259-5>
- Enez, R., Panzerat, S., Kaushik, S., & Oliva-Telaz, A. (2011). Dietary carbohydrate utilization by European Sea Bass (*Dicentrarchus labrax* L.) and gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) juveniles. Review in Fisheries Science, 19(5), 201–215. <https://doi.org/10.1080/10641262.2011.579565>
- Fideu, M. D., Soler, G., & Ruiz-Aml, M. (1985). Nutritional regulation of glycolysis in rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 74(4), 795–799. [https://doi.org/10.1016/0965-0491\(85\)90148-7](https://doi.org/10.1016/0965-0491(85)90148-7)
- Folch, J., Lees, M., & Sloane Stanley, G. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry*, 226, 497–509. <https://doi.org/10.1016/j.ultra.2011.05.005>
- Frias-Quintana, C., Álvarez-González, C., & Márquez-Couturier, G. (2010). Diseño de microdieta para el cultivo de pejelagarto *Atractosteus tropicus*, Gill 1865. *Universidad Y Ciencia*, 26(2), 265–282. Retrieved from <http://www.zcilo.org.mx/pdf/uc/v26n2/v26n2a6.pdf>
- Frias-Quintana, C., Álvarez-González, C., Tovar-Ramírez, D., Martínez-García, R., Camarillo-Coop, S., Peña, E., & Galaviz, M. (2017). Use of potato starch in diets of tropical gar (*Atractosteus tropicus*, Gill 1865) larvae. *Fishes*, 2(1), 5. <https://doi.org/10.3390/fishes2010005>
- Frias-Quintana, C., Domínguez-Lorenzo, J., Álvarez-González, C., Tovar-Ramírez, D., & Martínez-García, R. (2016). Using cornstarch in microparticulate diets for larviculture of tropical gar (*Atractosteus tropicus*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 42(2), 517–528. <https://doi.org/10.1007/s10695-015-0156-4>
- Frias-Quintana, C. A., Márquez-Couturier, G., Álvarez-González, C. A., Tovar-Ramírez, D., Nolasco-Soria, H., Galaviz-Espinosa, M. A., ... Gilbert, E. (2015). Development of digestive tract and enzyme activities during the early ontogeny of the tropical gar *Atractosteus tropicus*. *Fish Physiology and Biochemistry*, 41(5), 1075–1091. <https://doi.org/10.1007/s10695-015-0070-9>
- Gao, W., Liu, Y.-J., Tian, L.-X., Mai, K.-S., Liang, G.-Y., Yang, H.-J., ... Luo, W.-J. (2010). Effect of dietary carbohydrate-to-lipid ratios on growth

- performance, body composition, nutrient utilization and hepatic enzymes activities of herbivorous grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Aquaculture Nutrition*, 16(5), 517–555. <https://doi.org/10.1111/1565-2095.2009.00668.x>
- Gleason, M., Connaughton, V., & Arneson, L. S. (2007). Induction of hyperglycaemia in zebrafish (*Danio rerio*) leads to morphological changes in the retina. *Acta Diabetologica*, 44(5), 157–165. <https://doi.org/10.1007/s00592-007-0257-5>
- Hemre, G.-I., Mommson, T. P., & Kroghdahl, A. (2002). Carbohydrates in fish nutrition: Effects on growth, glucose metabolism and hepatic enzymes. *Aquaculture Nutrition*, 8(5), 175–194. <https://doi.org/10.1046/j.1565-2095.2002.00200.x>
- Hilton, J. W., & Atkinson, J. L. (1981). Response of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) to increased levels of available carbohydrate in practical trout diets. *British Journal of Nutrition*, 47(03), 597–607. <https://doi.org/10.1079/BJN19820071>
- Hu, Y.-H., Liu, Y.-J., Tian, L.-X., Yang, H.-J., Liang, G.-Y., & Gao, W. (2007). Optimal dietary carbohydrate to lipid ratio for juvenile yellowfin seabream (*Sparus latus*). *Aquaculture Nutrition*, 13(4), 291–297. <https://doi.org/10.1111/j.1565-2095.2007.00476.x>
- Huertas-Ortiz, M., Alvarez-González, C., Márquez-Couturier, G., Contreras-Sánchez, W., Civera-Caracado, R., & Goytortúa-Boraz, E. (2009). Sustitución total de aceite de pescado con aceite vegetal en larvas de pejelagarto *Atractosteus tropicus*. *Kuukitab'*, 13(28), 51–58. <https://doi.org/10.19156/kuukitab.a15n28.448>
- Kamalan, B. S., Medala, P. F., & Panzerat, S. (2017). Utilization of dietary carbohydrates in farmed fishes: New insights on influencing factors, biological limitations and future strategies. *Aquaculture*, 467, 5–27. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.02.007>
- Kauchik, S. J., & Selles, I. (2010). Protein and amino acid nutrition and metabolism in fish: Current knowledge and future needs. *Aquaculture Research*, 41, 521–552. <https://doi.org/10.1111/j.1565-2095.2009.02174.x>
- Kappler, D., & Decker, K. (1974). Glycogen determination with amyloglucosidase. *Methods of Enzymatic Analysis*, 5, 1127–1151.
- Kirchner, S., Kauchik, S., & Panzerat, S. (2005). Effect of partial substitution of dietary protein by a single gluconeogenic dispensable amino acid on hepatic glucose metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 134(2), 557–547. [https://doi.org/10.1016/S1096-4959\(05\)00267-2](https://doi.org/10.1016/S1096-4959(05)00267-2)
- Kirchner, S., Panzerat, S., Lim, P., Kauchik, S., & Ferraris, R. (2008). The role of hepatic, renal and intestinal gluconeogenic enzymes in glucose homeostasis of juvenile rainbow trout. *Journal of Comparative Physiology*, 178(5), 429–448. <https://doi.org/10.1007/s00560-007-0255-7>
- Kroghdahl, A., Hemre, G. I., & Mommson, T. P. (2005). Carbohydrates in fish nutrition: Digestion and absorption in postlarval stages. *Aquaculture Nutrition*, 11(2), 105–112. <https://doi.org/10.1111/j.1565-2095.2004.00527.x>
- Lal-Carrión, R., Martín Del Río, M., Mijanguez, J., Mancera, J., & Soengas, J. (2005). Influence of cortisol on osmoregulation and energy metabolism in gilthead seabream *Sparus aurata*. *Journal of Experimental Zoology Part A: Comparative Experimental Biology*, 295A(2), 105–118. <https://doi.org/10.1002/jexa.10256>
- Li, X., Wang, Y., Liu, W., Jiang, G., & Zhu, J. (2015). Effects of dietary carbohydrate/lipid ratios on growth performance, body composition and glucose metabolism of fingerling blunt snout bream *Megalobrama amblycephala*. *Aquaculture Nutrition*, 19(5), 701–708. <https://doi.org/10.1111/anu.12017>
- Márquez-Couturier, G., Alvarez-González, C. A., Contreras-Sánchez, W., Hernández-Vidal, U., Hernández-Franyutti, A., Mendoza-Alfaro, R., ... y Goytortúa Boraz, E. (2006). Avances en la alimentación y nutrición del pejelagarto *Atractosteus tropicus*. In L. Cruz Suárez, D. Ricque-Marie, M. Tapia Salazar, M. Nieto López, D. Villarreal Cabazos, A. Puello, & A. García Ortega (Eds.), *Avances en Nutrición Acuicola* VIII. VIII Simposio Internacional de Nutrición Acuicola (pp. 446–522). Monterrey, México: Universidad Autónoma de Nuevo León. Retrieved from [www.nutricionacuicola.uanl.mx/numeros/8/28ANarez.pdf](http://www.nutricionacuicola.uanl.mx/numeros/8/28ANarez.pdf)
- Moon, T. W. (2001). Glucose intolerance in teleost fish: Fact or fiction? *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 129(2–5), 245–249. [https://doi.org/10.1016/S1096-4959\(01\)00516-5](https://doi.org/10.1016/S1096-4959(01)00516-5)
- Moro, G., Camilo, R., Moraes, G., & Fracalossi, D. (2010). Dietary non-protein energy sources: Growth, digestive enzyme activities and nutrient utilization by the catfish jundiá, *Rhamdia Quelen*. *Aquaculture Research*, 41(5), 394–400. <https://doi.org/10.1111/j.1565-2095.2009.02352.x>
- Panzerat, S., Capilla, E., Gutiérrez, J., Frappart, P. O., Vachot, C., Plagnes-Juan, E., ... Kauchik, S. (2001). Glucokinase is highly induced and glucose-6-phosphatase poorly repressed in liver of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by a single meal with glucose. *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, 128(2), 275–285. [https://doi.org/10.1016/S1096-4959\(00\)00522-5](https://doi.org/10.1016/S1096-4959(00)00522-5)
- Panzerat, S., Plagnes Juan, E., Braque, J., & Kauchik, S. (2001). Hepatic phosphoenolpyruvate carboxylase gene expression is not repressed by dietary carbohydrates in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Experimental Biology*, 204(2), 559–565. Retrieved from <http://jeb.biologists.org/content/204/2/559>
- Panzerat, S., Skiba-Caszy, S., Selles, I., Lencard, M., Plagnes-Juan, E., Vachot, C., ... Moon, T. W. (2009). Metformin improves postprandial glucose homeostasis in rainbow trout fed dietary carbohydrates: A link with the induction of hepatic lipogenic capacities? *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 297(5), R707–R715. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00120.2009>
- Petrescu, I., Bojan, O., Seled, M., Bărbu, O., Schmidt, F., & Kühnle, H. F. (1979). Determination of phosphoenolpyruvate carboxylase activity with deoxyguanosine 5'-diphosphate as nucleotide substrate. *Analytical Biochemistry*, 90(2), 279–281. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(79\)90583-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(79)90583-7)
- Polakof, S., Mijanguez, J. M., & Soengas, J. L. (2008). Dietary carbohydrates induce changes in gluconeogenic capacity and food intake of rainbow trout. *American Journal of Physiology, Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 295(2), R478–R489. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00176.2008>
- Polakof, S., Panzerat, S., Soengas, J. L., & Moon, T. W. (2012). Glucose metabolism in fish: A review. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*, 182(8), 1015–1045. <https://doi.org/10.1007/s00560-011-0658-7>
- Pribitkin, W., Prathomya, R., Jakovlje, I., Liu, H., Zhao, Y.-H., & Wang, W.-M. (2017). Transcriptomics, metabolomics and histology indicate that high-carbohydrate diet negatively affects the liver health of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*). *BMC Genomics*, 18(1), 856. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-4246-9>
- Rezández, A., & Salvador, M. (1985). Contribución al conocimiento de la biología del pejelagarto *Leptosteus tropicus* (Gill) y la tangüaca *Petenia splendida* (Günther) del estado de Tabasco. *Siatica*, 8(4), 415–426.
- Robyt, J. P., & Whelan, W. J. (1968). The  $\beta$ -amylase. In J. Radley (Ed.), *Starch and its derivatives* (pp. 477–497). London: Chapman and Hall.
- Rui, L. (2014). Energy metabolism in the liver. *Comprehensive Physiology*, 4(1), 177–197. <https://doi.org/10.1002/cphy.c150024>
- Sañudo-Avarelos, S., Lal-Carrión, R., Guzmán, J. M., Del Río, M. R. M., Mijanguez, J. M., Mancera, J. M., & Soengas, J. L. (2005). Acclimation of *S. aurata* to various salinities alters energy metabolism of osmoregulatory and nonosmoregulatory organs. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative & Comparative Physiology*, 289(4), R897–R907. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00161.2005>

- Shimeno, S., Khayat, D., & Shikata, T. (1995). Metabolic response to dietary carbohydrate to protein ratios in carp. *Fisheries Science*, 61(2), 277–281. <https://doi.org/10.2351/fishsci.61.277>
- Silba-Cazzy, S., Pancerat, S., Larquier, M., Diaz, K., Surjet, A., Flaques-Juan, E., ... Sallés, I. (2015). Apparent low ability of liver and muscle to adapt to variation of dietary carbohydrate:Protein ratio in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *British Journal of Nutrition*, 109(8), 1559–1572. <https://doi.org/10.1017/S0007114512006532>
- Sorensen, M. (2012). A review of the effects of ingredient composition and processing conditions on the physical qualities of extruded high-energy fish feed as measured by prevailing methods. *Aquaculture Nutrition*, 18(5), 295–248. <https://doi.org/10.1111/j.1565-2095.2011.00924.x>
- Starzalecki, F. C., Sugai, J. K., Baloi, M., Pazzini, G., de Carvalho, C. V. A., Fracalossi, D. M., & Cerqueira, V. R. (2017). Effect of dietary carbohydrate to lipid ratios on growth, digestive enzyme and blood metabolites of juvenile Brazilian zardines, *Sardinella brasiliensis* (Steindachner, 1879). *Aquaculture Research*, 48(9), 5111–5121. <https://doi.org/10.1111/ara.12550>
- Stone, D. A. J. (2005). Dietary carbohydrate utilization by fish. *Reviews in Fisheries Science*, 11(4), 567–569. <https://doi.org/10.1080/10641260590160884>
- Suarez, M. D., Sans, A., Bazoco, J., & Garcia-Galego, M. (2002). Metabolic effects of changes in the dietary protein: Carbohydrate ratio in eel (*Anguilla anguilla*) and trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture International*, 10(2), 145–156. <https://doi.org/10.1025/A-1021571104859>
- Thivend, P., Mercier, C., & Guilbot, A. (1972). Determination of starch with glucoamylase. In R. Whistler, & J. BeMiller (Eds.), *Methods in carbohydrate chemistry* (pp. 100–105). New York, USA: Academic Press.
- Tocher, D. R. (2005). Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish. *Reviews in Fisheries Science*, 11(2), 107–164. <https://doi.org/10.1080/715610925>
- Tocher, D. R., Bendiksen, E. Å., Campbell, R. J., & Bell, J. G. (2008). The role of phospholipids in nutrition and metabolism of teleost fish. *Aquaculture*, 280(1–4), 21–54. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.04.054>
- Torfi Mozandadeh, M., Yavari, V., Marambaei, J. G., Ajgh, N., & Gilbert, E. (2017). Optimal dietary carbohydrate-to-lipid ratios for silvery-black porgy (*Sparidentex hazeti*) juveniles. *Aquaculture Nutrition*, 23(5), 470–485. <https://doi.org/10.1111/anu.12415>
- Tranull, M. A., Drengl, O., Christopherzen, S., Kroghschi, A., & Borebaek, B. (1996). A glucokinase-like enzyme in the liver of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, 114(1), 55–59. [https://doi.org/10.1016/0955-0491\(95\)02119-1](https://doi.org/10.1016/0955-0491(95)02119-1)
- Verzaw, W. K., Cuppatt, S., Winters, D., & Williams, L. (1989). An improved calorimetric assay for bacterial lipase in nonfat dry milk. *Journal of Food Science*, 54(6), 251–254. <https://doi.org/10.1111/j.1565-2021.1989.tb05159.x>
- Walter, H. (1984). Proteinases: Methods with hemoglobin, casein and azocoll as substrates. In H. J. Bergmeyer (Ed.), *Methods of enzymatic analysis* (Vol. 5, pp. 270–277). Weinheim, Germany: Verlag Chemie.
- Wiley, E. O., & Schultze, H.-P. (1984). Family leptocarbalea (garr) as living fossils. In N. Eldredge, & E. M. Stanley (Eds.), *Living fossils. Casebooks in earth sciences* (pp. 160–165). New York, NY: Springer. [https://doi.org/10.1007/978-1-4615-8271-5\\_17](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-8271-5_17)
- Xie, D., Yang, L., Yu, R., Chen, F., Lu, R., Qin, C., & Niu, G. (2017). Effects of dietary carbohydrate and lipid levels on growth and hepatic lipid deposition of juvenile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture*, 476, 696–705. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.07.015>
- Zhou, C., Ge, X., Niu, J., Lin, H., Huang, Z., & Tan, X. (2015). Effect of dietary carbohydrate levels on growth performance, body composition, intestinal and hepatic enzyme activities, and growth hormone gene expression of juvenile golden pompano, *Trachinotus ovatus*. *Aquaculture*, 457, 590–597. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.12.016>
- Zhou, R., Wang, M., Xie, F., Deng, D., & Zhou, Q. (2016). Effects of dietary carbohydrate to lipid ratios on growth performance, digestive enzyme and hepatic carbohydrate metabolic enzyme activities of large yellow croaker (*Larimichthys crocea*). *Aquaculture*, 451, 45–51. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.10.010>

How to cite this article: Guerrero-Zárate R, Álvarez-González CA, Jesús-Contreras R, et al. Evaluation of carbohydrate/lipid ratios on growth and metabolic response in tropical gar (*Atractosteus tropicus*) juvenile. *Aquac Res*. 2019;00:1–12. <https://doi.org/10.1111/ara.14060>