

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS**  
**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS**



**“ESTADO DE SALUD DE JUVENILES DE *Totoaba macdonaldi*  
ALIMENTADOS CON DIFERENTES NIVELES DE HARINA DE LARVA DE  
MOSCA SOLDADO NEGRO *Hermetia illucens*”.**

**T E S I S**

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

**MAESTRO EN CIENCIAS EN OCEANOGRAFÍA COSTERA**

**PRESENTA**

**REGINA ORTEGA FLORES**

**ENSENADA, BAJA CALIFORNIA, MÉXICO, ENERO DEL 2024.**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA.**  
**FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS.**  
**POSGRADO EN OCEANOGRAFIA COSTERA.**

“ESTADO DE SALUD DE JUVENILES DE *Totoaba macdonaldi*  
ALIMENTADOS CON DIFERENTES NIVELES DE HARINA DE LARVA  
DE MOSCA SOLDADO NEGRO *Hermetia illucens*”.

**T E S I S**

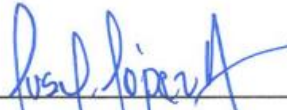
QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS  
PARA OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS EN OCEANOGRAFÍA COSTERA**

PRESENTA

**REGINA ORTEGA FLORES**

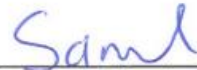
Aprobada por:



\_\_\_\_\_  
Dra. Lus Mercedes López Acuña  
Directora de Tesis



\_\_\_\_\_  
Dr. Mario Alberto Galaviz Espinoza  
Sinodal



\_\_\_\_\_  
Dr. Samuel Sánchez Serrano  
Sinodal



\_\_\_\_\_  
Dr. José Ángel Olivas Valdez  
Sinodal

Asunto: Voto aprobatorio sobre trabajo  
de tesis de grado de Maestría

**Dra. Ivone Giffard Mena**  
Coordinadora de Investigación y  
Posgrado, F.C.M.  
Presente

Estimada Dra. Giffard

Me dirijo a usted en mi calidad de **Directora de tesis** encargada de revisar la tesis de Maestría presentada por la estudiante **Regina Ortega Flores** como parte de los requisitos para obtener el grado de **Maestro en Ciencias en Oceanografía Costera**.

Tras llevar a cabo una revisión minuciosa y exhaustiva del trabajo mencionado, es mi deber informarle que he emitido mi **voto Aprobatorio** sobre la tesis titulada:

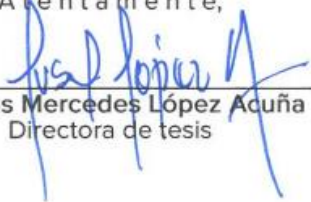
"Estado de salud de juveniles de *totoaba macdonaldi* alimentados con diferentes niveles de harina de larva de mosca soldado negro *hermetia illucens*"

He realizado esta revisión con el compromiso de asegurar que el trabajo cumple con los estándares de calidad y excelencia académica requeridos por nuestro programa de posgrado. Después de un análisis detenido, he llegado a la conclusión de que el trabajo de tesis satisface plenamente estos criterios y representa una contribución valiosa al campo de la Oceanografía Costera.

El trabajo exhibe una sólida base teórica, una metodología rigurosa y una presentación coherente de los hallazgos. Las referencias bibliográficas están actualizadas y pertinentes, y las figuras y tablas son claras y respaldan eficazmente los argumentos del texto. La sección de conclusiones proporciona un resumen sólido de los resultados y sus implicaciones, la referencias y citas están actualizadas y son pertinentes.

Ensenada, B. C., a 10 de enero de 2024

Atentamente,

  
\_\_\_\_\_  
**Dra. Lus Mercedes López Acuña**  
Directora de tesis

c.c.p. Expediente del alumno

Asunto: Voto aprobatorio sobre trabajo  
de tesis de grado de Maestría

**Dra. Ivone Giffard Mena**  
Coordinadora de Investigación y  
Posgrado, F.C.M.  
Presente

Estimada Dra. Giffard

Me dirijo a usted en mi calidad de **Sinodal** encargado de revisar la tesis de Maestría presentada por la estudiante **Regina Ortega Flores** como parte de los requisitos para obtener el grado de **Maestro en Ciencias en Oceanografía Costera**.

Tras llevar a cabo una revisión minuciosa y exhaustiva del trabajo mencionado, es mi deber informarle que he emitido mi **voto Aprobatorio** sobre la tesis titulada:

"Estado de salud de juveniles de *totoaba macdonaldi* alimentados con diferentes niveles de harina de larva de mosca soldado negro *hermetia illucens*"

He realizado esta revisión con el compromiso de asegurar que el trabajo cumple con los estándares de calidad y excelencia académica requeridos por nuestro programa de posgrado. Después de un análisis detenido, he llegado a la conclusión de que el trabajo de tesis satisface plenamente estos criterios y representa una contribución valiosa al campo de la Oceanografía Costera.

El trabajo exhibe una sólida base teórica, una metodología rigurosa y una presentación coherente de los hallazgos. Las referencias bibliográficas están actualizadas y pertinentes, y las figuras y tablas son claras y respaldan eficazmente los argumentos del texto. La sección de conclusiones proporciona un resumen sólido de los resultados y sus implicaciones, la referencias y citas están actualizadas y son pertinentes.

Ensenada, B. C., a 10 de enero de 2024

Atentamente,

---

Dr. Mario Alberto Galaviz Espinoza  
Sinodal

c.c.p. Expediente del alumno

Asunto: Voto aprobatorio sobre trabajo  
de tesis de grado de Maestría

Dra. Ivone Giffard Mena  
Coordinadora de Investigación y  
Posgrado, F.C.M.  
Presente

Estimada Dra. Giffard

Me dirijo a usted en mi calidad de **Sinodal** encargado de revisar la tesis de Maestría presentada por la estudiante **Regina Ortega Flores** como parte de los requisitos para obtener el grado de **Maestro en Ciencias en Oceanografía Costera**.

Tras llevar a cabo una revisión minuciosa y exhaustiva del trabajo mencionado, es mi deber informarle que he emitido mi **voto Aprobatorio** sobre la tesis titulada:

"Estado de salud de juveniles de *totoaba macdonaldi* alimentados con diferentes niveles de harina de larva de mosca soldado negro *hermetia illucens*"

He realizado esta revisión con el compromiso de asegurar que el trabajo cumple con los estándares de calidad y excelencia académica requeridos por nuestro programa de posgrado. Después de un análisis detenido, he llegado a la conclusión de que el trabajo de tesis satisface plenamente estos criterios y representa una contribución valiosa al campo de la Oceanografía Costera.

El trabajo exhibe una sólida base teórica, una metodología rigurosa y una presentación coherente de los hallazgos. Las referencias bibliográficas están actualizadas y pertinentes, y las figuras y tablas son claras y respaldan eficazmente los argumentos del texto. La sección de conclusiones proporciona un resumen sólido de los resultados y sus implicaciones, la referencias y citas están actualizadas y son pertinentes.

Ensenada, B. C., a 10 de enero de 2024

Atentamente,

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Samuel Sánchez Serrano  
Sinodal

c.c.p. Expediente del alumno

Asunto: Voto aprobatorio sobre trabajo  
de tesis de grado de Maestría

Dra. Ivone Giffard Mena  
Coordinadora de Investigación y  
Posgrado, F.C.M.  
Presente

Estimada Dra. Giffard

Me dirijo a usted en mi calidad de Sinodal encargado de revisar la tesis de Maestría presentada por la estudiante Regina Ortega Flores como parte de los requisitos para obtener el grado de Maestro en Ciencias en Oceanografía Costera.

Tras llevar a cabo una revisión minuciosa y exhaustiva del trabajo mencionado, es mi deber informarle que he emitido mi voto Aprobatorio sobre la tesis titulada:

"Estado de salud de juveniles de *totoaba macdonaldi* alimentados con diferentes niveles de harina de larva de mosca soldado negro *hermetia illucens*"

He realizado esta revisión con el compromiso de asegurar que el trabajo cumple con los estándares de calidad y excelencia académica requeridos por nuestro programa de posgrado. Después de un análisis detenido, he llegado a la conclusión de que el trabajo de tesis satisface plenamente estos criterios y representa una contribución valiosa al campo de la Oceanografía Costera.

El trabajo exhibe una sólida base teórica, una metodología rigurosa y una presentación coherente de los hallazgos. Las referencias bibliográficas están actualizadas y pertinentes, y las figuras y tablas son claras y respaldan eficazmente los argumentos del texto. La sección de conclusiones proporciona un resumen sólido de los resultados y sus implicaciones, la referencias y citas están actualizadas y son pertinentes.

Ensenada, B. C., a 10 de enero de 2024

Atentamente,



Dr. José Ángel Olivas Valdez  
Sinodal

c.c.p. Expediente del alumno

## **Estado de salud de juveniles de *Totoaba macdonaldi* alimentados con diferentes niveles de harina de larva de mosca soldado negro *Hermetia illucens*.**

### **Resumen**

La acuicultura se ha consolidado como una actividad de gran potencial. Debido a que la alimentación de peces cultivados, en su mayoría dependen de la pesca, su uso es cada vez menos sostenible por lo que se buscan fuentes de proteína alternas que contribuyan a su nutrición y buen estado de salud de los organismos. La harina de larva de mosca soldado negro (HLMSN) *Hermetia illucens* es un como excelente candidato para el reemplazo de la harina de pescado (HP) o bien como suplemento alimenticio ya que tiene un buen perfil nutricional, además ayuda a disminuir la inflamación intestinal de los peces, principal problema que se encuentra en los organismos carnívoros alimentados con fuentes vegetales, los cuales causan acortamiento y pérdida de las vellosidades intestinales, y por lo tanto, se presentan problemas digestivos y de absorción de nutrientes. Por todo lo anterior, el objetivo de la presente investigación fue evaluar el estado de salud de juveniles de *Totoaba macdonaldi* al sustituir parcialmente los niveles de HP por HLMSN. Se formularon 6 dietas isoprotéicas (52%) e isolipídicas (12%), con porcentaje de sustitución del (0,10,20,30,40 y 50%) de HP por HLMSN. Para el bioensayo se sembraron organismos de  $18.92 \pm 0.56$  g de peso inicial y fueron alimentados durante 60 días. Al final del experimento se demostró por medio de una Anova de una vía que los organismos alimentados con dietas con sustitución del 20 y 30% de HLMSN tuvieron un crecimiento significativamente mayor ( $P < 0.05$ ) en comparación de los peces alimentados con la dieta control, al mismo tiempo, mostraron mejor respuesta en los parámetros de crecimiento. Los análisis bromatológicos de los tejidos no se vieron afectados por la sustitución de la HLMSN. Se determinó que los ácidos grasos saturados (AGS) aumentan en el músculo e hígado de los peces conforme se incorpora la HLMSN, mientras los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAS) bajan sus niveles de concentración. Los resultados de los análisis de bioquímica sanguínea mostraron que los valores de colesterol disminuyen conforme se aumenta el % de la HLMSN en las dietas, mientras que los niveles de glucosa aumentan. Por otro lado, los resultados histológicos mostraron que los organismos alimentados con las dietas 20 y 30% de HLMSN no se vieron afectados en la integridad del intestino distal ni hepática, sin embargo, las estructuras intestinales de los peces si se ven afectadas al consumir dietas con sustituciones del 40 y 50% de HLMSN, indicando una enteritis intestinal, además de presentar esteatosis macrovesicular en el hígado de los organismos. En conclusión, se puede reemplazar hasta un 30% de HLMSN en las dietas para *Totoaba macdonaldi* mejorando el rendimiento en el crecimiento sin que afecte el estado de salud de los organismos. De otro modo cuando se sustituyen porcentajes mayores al 40% HLMSN en las dietas de totoaba, puede ser nocivo para su salud ya que se presenta enteritis en el intestino distal y esteatosis en el tejido hepático.

**Palabras clave:** *Hermetia illucens*, *Totoaba macdonaldi*, harina de larva de mosca, salud, histología intestinal, histología hepática, hematología.

# *Dedicatoria*

*Quiero dedicar mis estudios de maestría y este trabajo realizado con mucho esfuerzo, dedicación y amor a:*

*Mis padres Wilfredo Ortega y Lilia Flores, por el apoyo incondicional que me brindan, por la motivación y el cariño que siempre me han dado. Una vez más, gracias por creer en mí y verme crecer en esta bonita carrera que elegí. Los amo y saben que son el motor que me permite seguir avanzando. ¡Este logro es más suyo que mío!*

*A mi novio Marko Fontanott, por seguir conmigo en este camino, por siempre estar a mi lado apoyándome en todo momento, por darme toda su comprensión, paciencia y amor. Gracias por la motivación a nunca darme por vencida. ¡Qué suerte tenerte a mi lado, TE AMO BICHO!*

*A mí, por todo el esfuerzo realizado.*

## **Agradecimientos**

A la Universidad Autónoma de Baja California y la Facultad de Ciencias Marinas por aceptarme en el posgrado de Oceanografía Costera.

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCyT) por la beca otorgada para poder realizar mis estudios de maestría.

Quiero agradecer de manera muy especial a mi directora de tesis la Dra. Lus Mercedes López Acuña, quien me brindo parte de su conocimiento, su tiempo y su confianza, además de creer en mi para terminar mis estudios de posgrado. Muchas gracias por todo el apoyo doctora.

Al Dr. Mario A. Galaviz por haberme apoyado en las biometrías del experimento, además de toda su ayuda posible en el laboratorio de Nutrición Acuícola.

Al Dr. Samuel Sánchez y el Dr. José A. Olivas por brindarme su ayuda en el área de histología y análisis estadísticos.

A mi comité de tesis formado por: Dra. Lus M. López A., Dr. Mario A. Galaviz E., Dr. Samuel Sánchez S., y Dr. José A. Olivas V., quienes me ayudaron con sus recomendaciones, observaciones y correcciones, durante el bioensayo y la escritura de la presente tesis.

Al Dr. Fernando Barreto C., y al Dr. Omar E. Aguillón H., por su apoyo en los análisis de ácidos grasos, y resolver mis dudas en los análisis estadísticos.

Al Dr. Hervey Rodríguez González, por haberme aceptado en la estancia de investigación en el Laboratorio de Bromatología del Departamento de Acuicultura en el Centro de Investigación Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral

Regional (CIIDIR-IPN) Unidad Guasave, y además permitirme realizar análisis para la determinación del porcentaje de quitina en su laboratorio.

A mis amigos y compañeros de laboratorio Lic. Lizeth Vez, Lic. Oscar Alvarado, M.C. Ana Gastelum, por su apoyo en las biometrías, buenos deseos, motivaciones y consejos que me dieron durante estos dos años. Gracias por las aventuras y buena compañía, los quiero.

A la Lic. Samantha Victoria por su ayuda en el laboratorio de nutrición acuícola y su apoyo en las biometrías del bioensayo.

A mi servicio social Brandon Rangel y América Larios por su apoyo durante el bioensayo.

# CONTENIDO

Resumen .....	VI
Dedicatoria .....	VII
Agradecimientos .....	VIII
índice de figuras .....	XIV
índice de tablas .....	XVII

# INDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
1.1 La acuicultura a nivel mundial.....	1
1.2 Actualmente en la nutrición acuícola.....	2
1.3 Integración intestinal .....	3
1.4 Integración hepática .....	6
1.5 Solución a la problemática de la nutrición acuícola.....	8
<b>2. ANTECEDENTES .....</b>	<b>10</b>
2.1 <i>Totoaba macdonaldi</i> .....	10
2.2 <i>Hermetia illucens</i> .....	12
2.3 <i>Hermetia illucens</i> en la acuicultura.....	15
2.4 Otros beneficios de <i>Hermetia illucens</i> .....	17
<b>3. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>18</b>
<b>4. HIPÓTESIS.....</b>	<b>18</b>
<b>5. OBJETIVOS.....</b>	<b>19</b>

5.1 Objetivo general .....	19
5.2 Objetivos específicos .....	19
<b>6. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>20</b>
6.1 Obtención de organismos .....	20
6.2 Sistema de cultivo .....	20
6.3 Siembra de los organismos .....	20
6.4 Diseño experimental.....	21
6.5 Alimentación durante el período de aclimatación .....	21
6.6 Mantenimiento del sistema.....	21
6.7 Preparación de dietas experimentales .....	22
6.8 Analisis bromatologicos (químico-proximales) .....	22
6.8.1 Determinación de humedad y cenizas totales.....	24
6.8.2 Determinación de lípidos totales por el método de Folch (1957).....	24
6.8.3 Determinación proteínas totales por el metodo de microkjeldahl (Digestión) .....	25
6.8.4 Determinación de almidón total .....	27
6.8.4.1 Dispersion del almidón .....	27
6.8.4.2 Hidrólisis del almidón .....	27
6.8.4.3 Filtración de muestras .....	27
6.8.4.4 Cálculo para la determinación del almidón .....	28
6.8.5 Obtención de quitina .....	28
6.8.5.1 Desproteínización .....	29
6.8.5.2 Desmineralización .....	29
6.8.5.3 Purificación .....	29
6.8.5.4 Determinación del porcentaje de quitina .....	29
6.9 Determinación del perfil de aminoácidos de las dietas experimentales. ....	30

6.9.1 Desgrasado de muestras . . . . .	31
6.9.2 Lavado de muestras . . . . .	31
6.9.3 Hidrólisis . . . . .	32
6.10 Transmetilación de ácidos grasos . . . . .	34
6.11 Parámetros productivos . . . . .	36
6.12 Hematología y bioquímica sanguínea. . . . .	36
6.13 Histología. . . . .	37
6.13.1 Desparafinación de las muestras . . . . .	38
6.13. 2 Tinción Hematoxilina-Eosina . . . . .	38
6.14 Análisis estadísticos. . . . .	<b>39</b>
<b>7. RESULTADOS. . . . .</b>	<b>42</b>
7.1 Parámetros productivos . . . . .	42
7.2 Análisis bromatológicos de tejidos . . . . .	43
7.3 Contenido de ácidos grasos . . . . .	46
7.3.1 Dietas experimentales . . . . .	46
7.3.2 Músculo . . . . .	48
7.3.3 Hígado . . . . .	49
7.4 Parámetros hematológicos y bioquímica sanguínea . . . . .	53
7.5 Histología . . . . .	55
7.5.1 Intestinal . . . . .	55
7.5.2 Hepática . . . . .	63
<b>8. DISCUSIÓN . . . . .</b>	<b>69</b>
8.1 Parámetros productivos . . . . .	69
8.2 Análisis bromatológicos de tejidos . . . . .	73
8.3 Contenido de ácidos grasos . . . . .	74

8.3.1 Dietas experimentales.....	74
8.3.2 Músculo.....	76
8.3.3 Hígado.....	77
8.4 Parámetros hematológicos y bioquímica sanguínea.....	78
8.5 Histología.....	83
8.5.1 Intestinal.....	83
8.5.2 Hepática.....	88
<b>9. CONCLUSIONES.....</b>	<b>91</b>
<b>10. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>93</b>
<b>11. LITERATURA CITADA.....</b>	<b>94</b>

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Estado mundial de la pesca y la acuicultura .....	<b>2 –</b>
<b>Figura 2:</b> Estructura celular del intestino .....	<b>5 –</b>
<b>Figura 3:</b> Morfología del hígado y estructura celular .....	<b>7 –</b>
<b>Figura 4:</b> Esteatosis hepática A) Microvesicular y B) Macrovesicular .....	<b>8 –</b>
<b>Figura 5:</b> <i>Tototaba macdonaldi</i> .....	<b>11–</b>
<b>Figura 6:</b> <i>Hermetia illucens</i> (Mosca soldado Negro).....	<b>12 –</b>
<b>Figura 7:</b> Ciclo de vida de <i>Hermetia illucens</i> .....	<b>14 –</b>
<b>Figura 8:</b> Morfología de corte transversal del intestino medio de juveniles de <i>Totoaba macdonaldi</i> alimentados durante 60 días con dietas sustitución del 20% de harina de pescado por harina de larva de mosca soldado negro <i>Hermetia illucens</i> . <i>Objetivo 5x</i> . A. Serosa, B. Muscularis, C. Submucosa, D. Mucosa, E. Velloidades intestinales, F. Diámetro del intestino, G. Lumen o luz intestinal. ....	<b>40 –</b>
<b>Figura 9:</b> Morfología de corte transversal del intestino medio de juveniles de <i>Totoaba macdonaldi</i> alimentados durante 60 días con dietas sustitución del 30% de harina de pescado por harina de larva de mosca soldado negro <i>Hermetia illucens</i> . <i>Objetivo 40x</i> . A. Serosa, B. Muscularis, C. Submucosa, D. Mucosa, E. Velloidades intestinales, F. Lumen o luz intestinal, Flecha verde: Célula caliciforme, Flecha roja: Lamina propia, Flecha azul: Enterocito, Flecha negra; Mucus intestinal.....	<b>41 –</b>
<b>Figura 10:</b> Ganancia de peso de juveniles de <i>Totoaba macdonaldi</i> alimentados con diferentes niveles de harina de larva de mosca soldado negro <i>Hermetia illucens</i> , durante 60 días de experimentación. Superíndices distintos indican diferencias estadísticamente significativas ( $P<0.05$ ). Dieta control, M10. sustitución de HLMSN con 10%, M20. sustitución de HLMSN con 20%, M30. sustitución de HLMSN con 30%, M40. sustitución de HLMSN con 40%, M50. sustitución de HLMSN con 50% Los valores son expresados como promedio de tres réplicas por tratamiento $\pm$ desviación estándar. Análisis ANOVA de una vía; prueba posthoc Tuckey .....	<b>43 –</b>
<b>Figura 11:</b> Corte histológico transversal del intestino distal de juveniles de <i>Totoaba macdonaldi</i> alimentados durante 60 días con dietas con diferentes niveles de sustitución de harina de pescado por harina de larva de mosca soldado negro <i>Hermetia illucens</i> . A. Dieta control, B. sustitución de HLMSN con 10%, C: sustitución de HLMSN con 20%, D: sustitución de HLMSN con 30%, E: sustitución de HLMSN con 40%, F: sustitución de HLMSN con 50%. Tinción Hematoxilina-Eosina y azul alcian. <i>Objetivo 10x</i> , con escala de 350 $\mu$ m .....	<b>56 –</b>

**Figura 12:** Morfología de la serosa, muscularis, submucosa y mucosa del intestino distal de juveniles de *Totoaba macdonaldi* alimentados durante 60 días con dietas con diferentes niveles de sustitución de harina de pescado por harina de larva de mosca soldado negro *Hermetia illucens*. Fecha roja: alimento en el lumen intestinal del organismo. A. Dieta control, B. sustitución de HLMSN con 10%, C: sustitución de HLMSN con 20%, D: sustitución de HLMSN con 30%, E: sustitución de HLMSN con 40%, F: sustitución de HLMSN con 50% Tinción Hematoxilina-Eosina y azul alcian. Objetivo 40x, con escala de 200  $\mu\text{m}$  ..... **58 –**

**Figura 13:** Vellosidades del intestino medio de juveniles de *Totoaba macdonaldi* alimentados durante 60 días con dietas con diferentes niveles de sustitución de harina de pescado por harina de larva de mosca soldado negro *Hermetia illucens*. A. Dieta control, B. sustitución de HLMSN con 10%, C: sustitución de HLMSN con 20%, D: sustitución de HLMSN con 30%, E: sustitución de HLMSN con 40%, F: sustitución de HLMSN con 50% Tinción Hematoxilina-Eosina y azul alcian. Objetivo 40x, con escala de 50  $\mu\text{m}$  ..... **59 –**

**Figura 14:** Células caliciformes del tejido intestinal de juveniles de *Totoaba macdonaldi*, en las fotografías se observa el incremento de células conforme se añade la proteína de larva de mosca soldado negro *Hermetia illucens* en las dietas. Flecha roja: célula caliciforme, Flecha negra: Mucina en el lumen intestinal, Flecha verde: lamina propia, Flecha amarilla: célula caliciforme produciendo mucina. A. Dieta control, B. sustitución de HLMSN con 10%, C: sustitución de HLMSN con 20%, D: sustitución de HLMSN con 30%, E: sustitución de HLMSN con 40%, F: sustitución de HLMSN con 50%. Tinción Hematoxilina-Eosina y azul alcian. Objetivo 100x, con escala de 20  $\mu\text{m}$ . ..... **61 –**

**Figura 15:** Corte histológico sagital del parénquima hepático de juveniles de *Totoaba macdonaldi* alimentados durante 60 días con dietas con diferentes niveles de sustitución de harina de pescado por harina de larva de mosca soldado negro *Hermetia illucens*. A. Dieta control, B. sustitución de HLMSN con 10%, C: sustitución de HLMSN con 20%, D: sustitución de HLMSN con 30%, E: sustitución de HLMSN con 40%, F: sustitución de HLMSN con 50%. Tinción Hematoxilina-Eosina. Objetivo 10x, con escala de 200  $\mu\text{m}$  ..... **64-**

**Figura 16:** Corte histológico del parénquima hepático de juveniles de *Totoaba macdonaldi* alimentados durante 60 días con dietas con diferentes niveles de sustitución de harina de pescado por harina de larva de mosca soldado negro *Hermetia illucens*. \*Hepatocitos, Flecha roja: Núcleo, Flecha verde: Nucléolo, Flecha roja punteada: Núcleo desplazado a la periferia, Flecha negra: Vacuola A. Dieta control, B. sustitución de HLMSN con 10%, C: sustitución de HLMSN con 20%, D: sustitución de HLMSN con 30%, E: sustitución de HLMSN con 40%, F: sustitución de HLMSN con 50%. Tinción Hematoxilina-Eosina. Objetivo 40x, con escala de 50  $\mu\text{m}$  ..... **65 –**

**Figura 17:** Corte histológico hepático de juveniles de *Totoaba macdonaldi* alimentados durante 60 días con dietas con diferentes niveles de sustitución de harina de pescado por harina de larva de mosca soldado negro *Hermetia illucens*. A: Arteria, CB: conducto biliar, VP: Vena porta, VE: Vena, PH: Parénquima hepático, PP: Parénquima hepático, H: Hepatocitos, AP: Acinos pancreáticos, Flecha roja: Gránulos de zimógeno. A. Dieta control, B. sustitución de HLMSN con 10%, C: sustitución de HLMSN con 20%, D: sustitución de HLMSN con 30%, E: sustitución de HLMSN con 40%, F: sustitución de HLMSN con 50%. Tinción Hematoxilina-Eosina. Objetivo 40x, con escala de 50  $\mu$ m..... - **67** -

**Figura 18:** Corte histológico del parénquima pancreático de juveniles de *Totoaba macdonaldi* alimentados durante 60 días con dietas con diferentes niveles de sustitución de harina de pescado por harina de larva de mosca soldado negro *Hermetia illucens*. AP: Acino pancreático, flecha roja: Gránulos de zimógeno, fleja verde: núcleo basal del acino pancreático. A. Dieta control, B. sustitución de HLMSN con 10%, C: sustitución de HLMSN con 20%, D: sustitución de HLMSN con 30%, E: sustitución de HLMSN con 40%, F: sustitución de HLMSN con 50%. Tinción Hematoxilina-Eosina. Objetivo 100x, con escala de 20  $\mu$ m..... **68** -

## INDICE DE TABLAS

**Tabla 1.** Composición de ingredientes (gr 100g<sup>-1</sup>) de dieta control con harina de pescado (HP) y dietas experimentales con harina de larva de mosca soldado negro *Hermetia illucens*; y composición proximal, para *Totoaba macdonaldi*..... - **23** –

**Tabla 2.** Perfil de aminoácidos de dietas con diferentes niveles de sustitución de harina de pescado por harina de larva de mosca soldado negro *Hermetia illucens*, para juveniles de *Totoaba macdonaldi* (g AA 100 g<sup>-1</sup> de dieta, base seca) ..... - **33** –

**Tabla 3.** Perfil de ácidos grasos de la harina de larva de mosca soldado negro *Hermetia illucens* (mg AG\*g harina<sup>-1</sup>), antes de ser incorporada en las dietas para juveniles de *Totoaba macdonaldi* ..... - **35** –

**Tabla 4.** Parámetros de crecimiento de *Totoaba macdonaldi* alimentados con diferentes porcentajes de harina de lo larva de mosca soldado negro *Hermetia illucens*, durante 60 días ..... - **44** –

**Tabla 5.** Análisis bromatológicos de pez entero, músculo, vísceras e hígado de juveniles de *Totoaba macdonaldi* alimentados durante 60 días con dietas con diferentes niveles de sustitución de harina de pescado por harina de larva de mosca soldado negro *Hermetia illucens* ..... - **45** –

**Tabla 6.** Perfil de ácidos grasos de dietas con diferentes niveles de sustitución de harina de pescado por harina de larva de mosca soldado negro *Hermetia illucens*, para juveniles de *Totoaba macdonaldi* (mg AG\*g dieta<sup>-1</sup>) ..... - **47** –

**Tabla 7.** Perfil de ácidos grasos de músculo de juveniles de *Totoaba macdonaldi* alimentados con dietas con diferentes niveles de sustitución de harina de pescado por harina de larva de mosca soldado negro *Hermetia illucens* (mg AG\*g músculo<sup>-1</sup>) - **50** –

**Tabla 8.** Perfil de ácidos grasos ded hígado de juveniles de *Totoaba macdonaldi* alimentados con dietas con diferentes niveles de sustitución de harina de pescado por harina de larva de mosca soldado negro *Hermetia illucens* (mg AG\*g hígado<sup>-1</sup>) .. - **52** –

**Tabla 9.** Hematología y bioquímica sanguínea de juveniles de *Totoaba macdonaldi* alimentados con dietas con diferentes niveles de sustitución de harina de pescado por harina de larva de mosca soldado negro *Hermetia illucens* ..... - **54**–

**Tabla 10.** Análisis histológico de intestino distal de juveniles de *Totoaba macdonaldi* alimentados con dietas con diferentes niveles de sustitución de harina de pescado por harina de larva de mosca soldado negro *Hermetia illucens*, durante 60 días de experimento ..... - **55** –

**Tabla 11.** Conteo de células caliciformes del intestino distal de juveniles de *Totoaba macdonaldi* alimentados con dietas con diferentes niveles de sustitución de harina de pescado por harina de larva de mosca soldado negro *Hermetia illucens*, durante 60 días de experimento ..... - **62**–

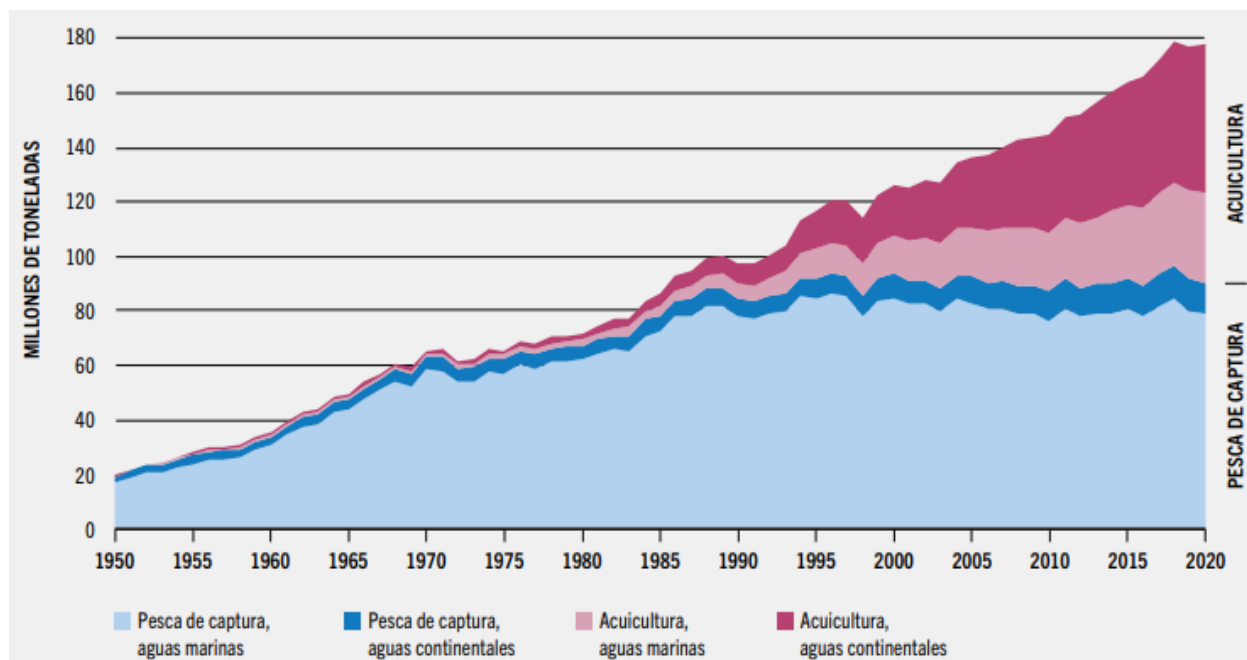
# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. La acuicultura a nivel mundial

La acuicultura es una actividad con gran potencial para nutrir a la creciente población mundial. La acuicultura se puede definir como una actividad en la que se emplean un conjunto de técnicas, conocimientos y habilidades para el desarrollo del cultivo de especies acuáticas como peces, crustáceos, moluscos y algas, que van desde la técnica de reproducción, siembra, alimentación y finalmente la cosecha, con el fin de tener un aumento de su biomasa en el menor tiempo posible y proveer alimento para la población humana (Vázquez et al., 2022; Rueda, 2011). En la acuicultura, influye la mano del hombre en el control de parámetros fisicoquímicos para una mejor calidad de agua, con el fin de que los organismos tengan un buen desarrollo y además de evitar la proliferación de agentes patógenos en el sistema (Rueda, 2011).

A nivel mundial la acuicultura es una de las actividades que ha ido creciendo constantemente en los últimos años, más que cualquier otro sector de producción de alimentos de origen animal; según la FAO a una tasa anual del 5.3% (Food Agriculture Organization, 2022), por lo que se ha consolidado como una de las actividades de gran potencial, con fuentes de proteína animal de excelente calidad.

La FAO estimó en el año 2020, que la acuicultura tuvo una producción total de organismos cultivados a nivel mundial de 88 millones de toneladas (Figura 1), acumulando un total de 179 millones de toneladas de organismos acuáticos (excepto algas), ligeramente menor al año 2018 por cuestiones de la pandemia mundial por SARS-CoV-2 (Covid-19), un virus letal que paró la economía en todo el mundo. Es importante mencionar que, del total de esta producción, el 89% de estos organismos fueron destinados para el consumo humano y un 11% para la producción de harinas y aceites de pescado (Food Agriculture Organization, 2022).



**Figura 1.** Estado Mundial de la Pesca y la Acuicultura

**Fuente:** Organización Mundial de las Naciones Unidas, la alimentación y la agricultura, 2022.

## 1.2. Actualmente en la nutrición acuícola

Debido a que la alimentación de peces cultivados, en su mayoría dependen de alimentos elaborados con harina de pescado de especies como la anchoveta, sardina y macarela por su alto contenido nutricional; se prevé que sigan aumentando los costos de estos ingredientes primarios a consecuencia de la reducción de pesca de estas y otras especies que son destinadas para la elaboración de alimentos acuícolas (Correa, 2020), por lo que se requieren de nuevos ingredientes proteicos, principalmente, que sustituyan parcial o totalmente a las harinas de pescado y hagan a la acuicultura una actividad sostenible.

La acuicultura ha traído consigo un gran reto en cuanto a la nutrición de peces, principalmente especies carnívoras. Los altos niveles de proteína requeridos en la dieta han sido cubiertos con harina y aceite de pescado durante muchos años hasta la actualidad, y no solo en especies acuícolas, sino también en animales terrestres (Hernández Cerón, 2020; Arcos-Méndez, 2015;) debido a su digestibilidad y alto contenido proteico (Abdel-Tawwab et al., 2020); Sin embargo, al paso de los años, éstas

fuentes proteicas han incrementado su costo de una manera exponencial, por lo que se buscan fuentes alternas que no contengan factores antinutricionales, las cuales se definen como sustancias que se interponen en la utilización de nutrientes (Hernández, 2014), afectando el crecimiento y la salud de los organismos.

Se ha demostrado que las harinas vegetales como la harina de soja, tienen factores antinutricionales, las cuales afectan principalmente a especies carnívoras marinas ocasionando una inflamación en el estómago e intestino, desintegración de la membrana epitelial, cambios en la microbiota intestinal, supresión del sistema inmunitario y como resultado se producen organismos más propensos a 1) enfermedades infecciosas: que a pesar de que el uso de los antibióticos está dirigido para combatir infecciones bacterias, su uso incorrecto de manera profiláctica puede provocar resistencia bacteriana, es decir, que la bacteria sea capaz de sobrevivir y crecer en presencia de uno o más antibióticos (Álvarez et al., 2004), provocando implicaciones negativas para la salud animal y humana como consumidor final, y 2) enfermedades no infecciosas como la desnutrición) (Kumar et al., 2021).

Cuando a un organismo no se le administra en el alimento los requerimientos nutricionales adecuados, (Garza y Correa, 1992), se hacen presentes las enfermedades nutricionales como inflamación intestinal (enteritis), esteatosis hepática, etc., por lo que la mala absorción de nutrientes se hace presente, disminuyendo la tasa de crecimiento de los organismos (Li et al., 2019). Estas enfermedades son algunos de los problemas más comunes que se presentan con algunas fuentes proteicas alternas como la harina de soja (Li et al., 2019).

### **1.3. Integración intestinal**

El sistema digestivo de los peces es diferente dependiendo de la especie (carnívoros, omnívoros o herbívoros), hábitos alimenticios, etapa de crecimiento de los organismos, lapsos de tiempo en el que se alimentan, sin embargo, su funcionamiento es similar debido al conjunto de células que conforman a este órgano (Garnica, 2022; Fortoul, 2017).

Cuando las células se agrupan en un órgano para realizar una función en específico, reciben el nombre de tejidos. Las células que conforman el tejido pueden comunicarse entre sí, debido a que cuentan con uniones intracelulares (Fortoul, 2017).

Existen 4 tipos de tejidos básicos que podemos encontrar en diferentes órganos, pero a pesar de esto, dependiendo de las necesidades funcionales del órgano las células pueden modificar su estructura a lo cual llamamos como especialización de membrana (Fortoul, 2017).

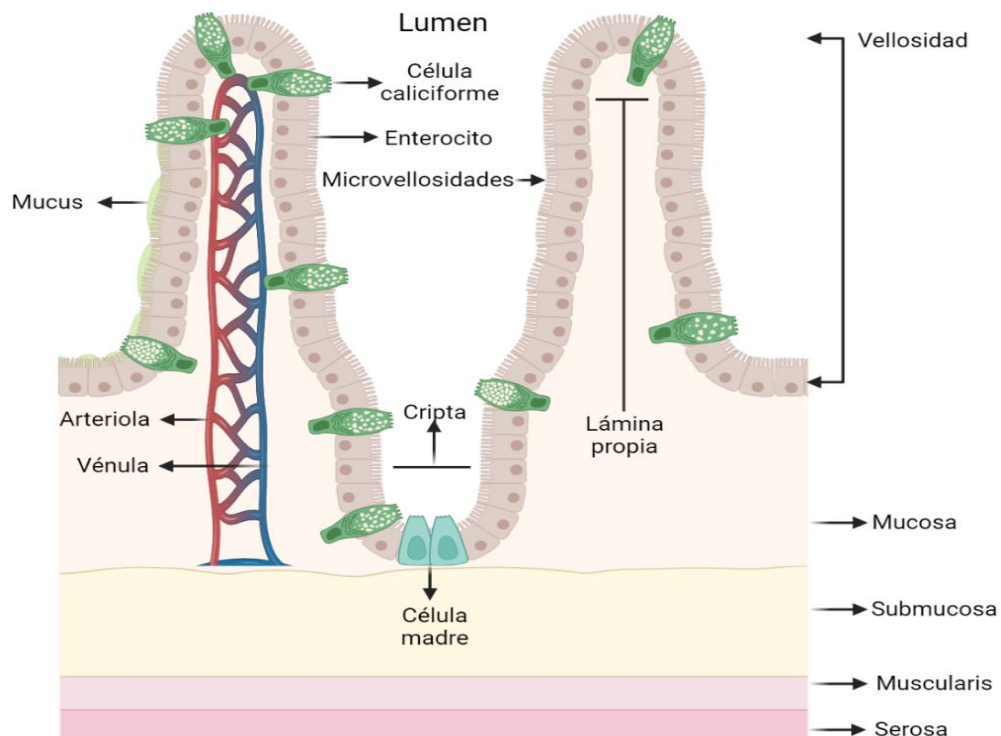
- Tejido epitelial: Este tejido se localiza en superficies y cavidades del cuerpo.
- Tejido conjuntivo: Funciona de apoyo en la estructura para los tres tejidos.
- Tejido muscular: Su principal función es darle movimiento al tejido, ya que está compuesto principalmente de células contráctiles.
- Tejido nervioso: Tiene la función de recibir y enviar información a través del órgano que lo conforma (Fortoul, 2017).

El intestino está formado por vellosidades intestinales (Figura 5), las cuales están formadas por un tejido epitelial, que, a su vez, está formado por células llamadas enterocitos (Garnica, 2022). Los enterocitos se distinguen por ser células altas y delgadas, con un núcleo elongado y con microvellosidades en su ápice, conocidos comúnmente como borde de cepillo (Garnica, 2022). La función principal de los enterocitos es absorber nutrientes del alimento consumido desde el lumen o luz intestinal hacia el interior del cuerpo del organismo (Megías et al., 2021; Mendoza, 2012). Gracias a que los enterocitos forman el tejido epitelial en forma de cadena, permite una excelente eficiencia en la absorción de nutrientes.

Entre los enterocitos, se pueden encontrar de manera dispersa células caliciformes, o bien, conocidas como células mucosas, estas células forman parte del tejido intestinal con el objetivo de proteger estas paredes intestinales con el mucus producido, neutralizando el pH de las enzimas digestivas, ya que en el intestino proximal se siguen llevando a cabo ciertos procesos digestivos como la producción de lipasas y acción de sales biliares para la emulsificación de grasas (Garnica, 2022).

Las células caliciformes se encuentran en los pliegues intestinales y otra de sus funciones, es que a partir de la secreción de la mucina son las encargadas de proteger al organismo de infecciones bacterianas principalmente (Roldan, 2020). La mucina son proteínas glicosiladas y pueden presentar diferente función dependiendo de su composición química: (1) las glicoproteínas neutras pueden participar en la digestión y absorción de nutrientes, (2) y las ácidas protegen el epitelio intestinal aumentando la producción del moco contra la acción de las bacterias oportunistas (Roldan, 2020).

En general, las vellosidades, la cadena de enterocitos, junto con células caliciformes, células madre las cuales se especializan en un determinado momento, y la lámina propia que está compuesta de tejido conectivo, forman la capa mucosa de la pared intestinal, posterior a esta capa podemos encontrar la capa submucosa, formada por tejido conectivo, después observamos la capa muscularis, compuesta de tejido muscular y por último la capa serosa, la cual está compuesta por tejido conectivo y donde se encuentra el sistema vascular (arterias y venas) (Garnica, 2022).



**Figura 2.** Estructura celular del intestino.  
Fuente: Generada en Biorender.com - modificación propia.

## 1.4 Integración hepática

El hígado y el páncreas (Figura 6) en algunos peces como *T. macdonaldi*, es un órgano en conjunto, el cual cumple con funciones hepáticas y pancreáticas a la vez; este órgano se conoce como hepatopáncreas.

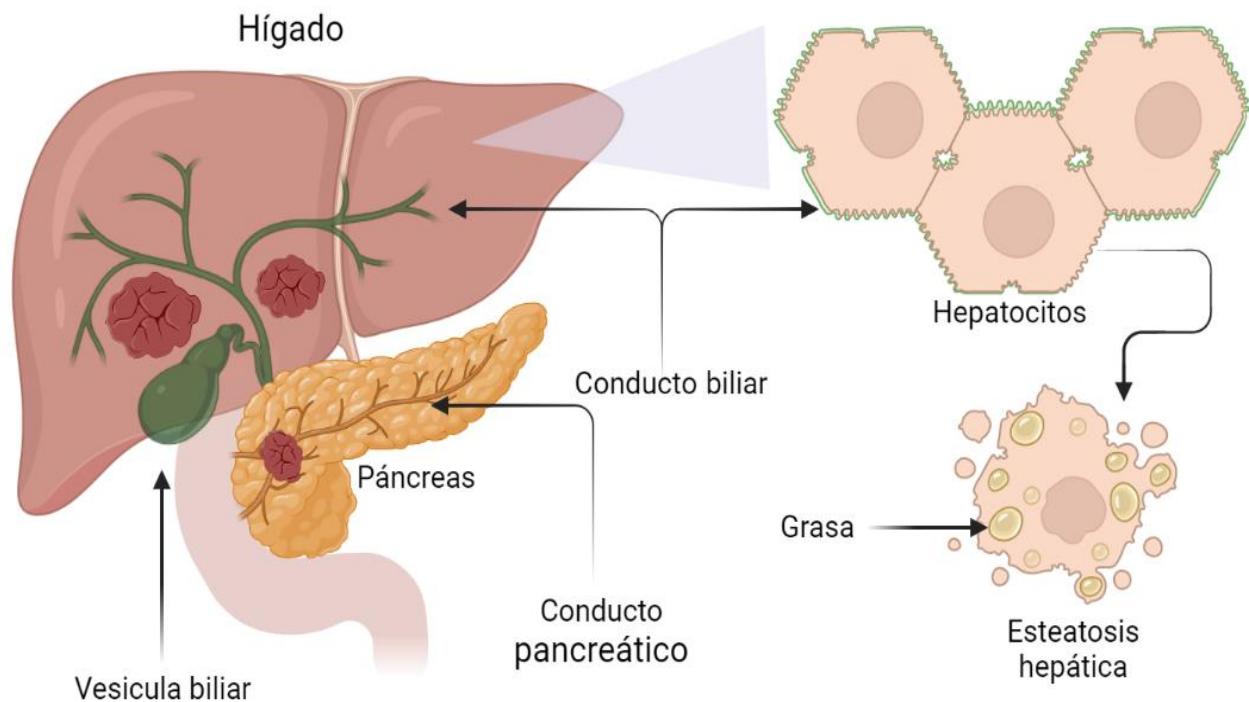
El hepatopáncreas está formado por células llamadas hepatocitos y éstos constituyen más del 80% de todo el órgano (Nejedli y Tlak, 2013). La función principal de los hepatocitos es metabolizar los nutrientes obtenidos de la digestión que se realiza en el estómago (Megías et al., 2022). Cada hepatocito cumple con funciones como: Almacenar glucógeno como fuente energética, desintoxica el sistema sanguíneo, gracias a la presencia de peroxisomas en su citoplasma, además, los hepatocitos pueden sintetizar proteínas importantes como la albumina, la cual es la encargada de regular la presión oncótica, es decir, mantiene una presión osmótica entre proteínas plasmáticas y el líquido intersticial (Rojas et al., 2017).

Así mismo, los hepatocitos sintetizan bilis, sustancia necesaria para la digestión de las grasas, la cual es depositada en la vesícula biliar a través de los canalículos biliares hacia el conducto biliar principal (Rojas et al., 2017).

El páncreas se constituye morfológicamente por una parte exocrina, la cual tiene la función de secretar sales biliares; y una parte endocrina, donde ocurren gran parte de procesos hormonales como secreción de insulina y glucagón (Nejedli y Tlak 2013).

La estructura del hígado es relativamente sencilla, debido a que se repite una misma estructura llamada lobulillo hepático, sin embargo, en la histología de peces hay menos posibilidades de encontrar estas estructuras, así como las triadas portales las cuales están formados por venas porta, arterias hepáticas y conductos biliares (Megías et al., 2022; López et al., 2020).

Una de las anomalías que presentan los hepatocitos es la esteatosis hepática, que se da cuando estas células contienen un exceso de triglicéridos en el citoplasma (Figura 7). La presencia de esteatosis está relacionada con el alto consumo de carbohidratos y grasas principalmente. (Rojas et al., 2017).

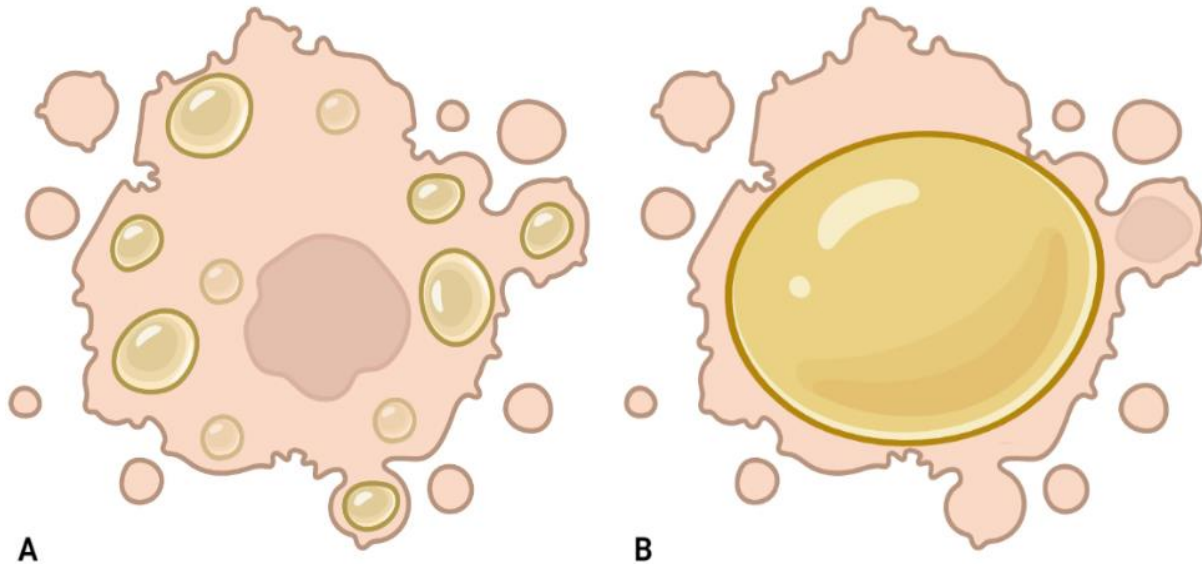


**Figura 3.** Morfología del hígado y estructura celular.

Fuente: Generada en Biorender.com - modificación propia

Esta alteración se puede observar de dos maneras: 1) Esteatosis microvesicular, donde se pueden observar múltiples gotas de grasa en el citoplasma del hepatocito sin desplazar el núcleo. 2) Esteatosis macrovesicular, cuando se observa una sola gota grande de grasa abarcando toda la superficie del hepatocito, incluso desplazando el núcleo del centro. Cabe mencionar que ambas anomalías pueden llevar a la muerte celular (Rojas et al., 2017).

Por todo lo anterior, es importante mantener el buen estado de salud de los organismos a través de la alimentación para obtener un crecimiento óptimo.



**Figura 4.** Esteatosis hepática A) Microvesicular y B) Macrovesicular

Fuente: Generada en Biorender.com - modificación propia.

### **1.5 Solución a la problemática de la nutrición acuícola.**

La principal prioridad de los productores acuícolas es incrementar la producción de sus cultivos para lograr una mayor rentabilidad, por lo que un alimento de calidad es de suma importancia, ya que de ahí se deriva un buen estado de salud en los organismos, sin llegar al requerimiento del uso de antibióticos, debido a un alimento deficiente de nutrientes (Roldan, 2020).

Algunos de los requisitos que se tienen que tomar en cuenta para que un nuevo ingrediente pueda ser utilizado en las dietas de organismos acuícolas, es primeramente recopilar toda la información necesaria sobre el organismo a cultivar, es decir, en qué condiciones fisicoquímicas habita la especie, fisiología del organismo, tipo de alimentación, niveles proteicos adecuados ya que estos son de suma importancia para el crecimiento y función del sistema inmune, niveles lipídicos adecuados de lo contrario podría haber un desequilibrio de lípidos y ácidos grasos en las células haciendo más permeable la membrana celular dejando entrar con facilidad a agentes patógenos (Chen et al., 2023), de esta manera se puede evitar un desbalance en sus funciones metabólicas, inmunológicas y además, evitar grandes pérdidas, hablando económicamente (Vásquez, 2001).

Otro de los requisitos que el ingrediente debe de presentar para ser candidato a ser utilizado en dietas para organismos acuáticos, es que este ingrediente contenga un buen perfil nutricional, es decir, buen perfil de aminoácidos, ácidos grasos, vitaminas y minerales disponibles para que los organismos puedan digerirlos, absorberlos y utilizarlos de manera eficiente (Hernández, 2014). La calidad nutrimental de los ingredientes es de suma importancia debido a que juega un papel importante en la salud de los peces, permitiendo que se lleven a cabo los procesos digestivos y las funciones metabólicas de los organismos (Li et al., 2019; Vásquez, 2001).

Estudios recientes se han enfocado en responder preguntas acerca de nuevos ingredientes alternos a las harinas y aceites de pescado, como las harinas de insectos, los cuales prometen ser potencialmente sostenibles (Maulu et al., 2022). Los insectos son un grupo muy diverso, siendo también un grupo cosmopolita, ya que los podemos encontrar en diferentes ambientes (Nogales et al., 2018). Los insectos han formado parte de la dieta natural de peces tanto carnívoros como omnívoros, ya que se han encontrado restos de insectos en los intestinos de peces disectados (Nogales et al., 2018).

Los insectos han ganado popularidad en los últimos años en la industria alimentaria por tener varios puntos a favor; su huella ambiental es muy reducida ya que su crianza se da de manera vertical, por lo que se requiere menos espacio, además, la utilización de agua en el proceso del cultivo es muy poca en comparación de la producción de carne de res, avícola y porcina. Otro de los puntos a favor, es que los insectos se alimentan de desechos orgánicos, por lo que contribuyen a la reducción de basura orgánica (Maulu et al., 2022; Nogales et al., 2018).

La harina de grillo *Gryllus assimilis*, tenebrio *Tenebrio molitor* y de mosca soldado negro *Hermetia illucens* BSF (por sus siglas en inglés), han sido excelentes candidatos como reemplazo de la harina de pescado (HP) para dietas comerciales de organismos acuícolas (Kumar et al., 2021), ya que dichos sustitutos contienen fuentes proteicas de alta calidad, como un perfil de aminoácidos esenciales muy similares a las que contiene la HP, además, contienen alto porcentaje de lípidos, ácidos grasos esenciales, vitaminas y minerales que pueden contribuir al buen estado de salud de los organismos cultivados (Correa, 2020; Li et al., 2020).

Sin embargo, las cantidades de estos nutrientes varía dependiendo de la especie, el sustrato con el que se alimenten, etapa larvaria en la que se cosechan, el proceso de secado para la obtención de harina, y además un dato importante, es que debido a que los insectos tienden a acumular una cantidad mayor de lípidos en su etapa larvaria, la harina cosechada en esta etapa contine alto porcentajes de lípidos, por lo que las industrias alimentarias realizan un proceso previo para desgrasar dicha harina, haciendo cambios considerables en el aumento de porcentaje de proteínas (Nogales et al., 2018).

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. *Totoaba macdonaldi*

*Totoaba macdonaldi* (Figura 2), es una especie endémica del Alto Golfo de California (Flanagan y Hendrickson, 1976), la cual es sobreexplotada por el alto valor comercial que tiene su vejiga natatoria en el mercado asiático, ya que se considera un alimento afrodisiaco con propiedades regenerativas y curativas, por esta razón en el año 1975 la totoaba entró en veda permanente, quedando prohibida su pesca de acuerdo con la norma NOM-059, según la Norma oficial mexicana de emergencia Nom- EM-169- (SEMARNAT, 2017; Flanagan y Hendrickson, 1976).

Totoaba es la especie más grande de la familia *Sciaenidae*, en su hábitat natural puede llegar a medir hasta 2 m de longitud y pesar 150 kg en su etapa adulta (True, 2012; Flanagan y Hendrickson, 1976). Haciendo una descripción de su morfología, totoaba es de cuerpo alargado, presenta boca grande desde juveniles, y ojos ligeramente pequeños; su coloración es platead con vientre blanco y manchas oscuras en todo su cuerpo.

Su temporada reproductiva va de invierno-primavera por lo que se pueden llegar a observar juveniles de totoaba en el área del Delta del Río Colorado, Sonora, México, a una temperatura de 24-32°C, alimentándose principalmente de larvas de peces y camarones en su etapa temprana, haciéndola una especie carnívora (True, 2012; Cisneros-Mata et al., 1995). Se ha comprobado que totoaba es una especie que no tolera altos porcentajes lípidos y de carbohidratos, ya que es una especie magra y estos

responden de manera negativa al crecimiento y eficiencia metabólica (González Acevedo, 2011; Rueda et al., 2011; López et al., 2006).

Durante los últimos años se ha trabajado arduamente en la investigación sobre el cultivo de *T. macdonaldi*, desarrollando su biotecnología de reproducción y engorda, por lo que se ha demostrado ser una especie con potencial para la acuicultura y maricultura, ya que tiene un crecimiento rápido durante los primeros meses de vida, además, es una especie que se adapta fácilmente a condiciones de cautiverio (Garnica, 2022; True, 2012).



**Figura 5.** *Totoaba macdonaldi*.  
**Fuente:** Creación propia.

Totoaba pertenece a la siguiente clasificación:

**Reino** – *Animalia*  
**Filo** – *Chordata*  
**Clase** – *Actinopterygii*  
**Orden** – *Perciforme*  
**Familia** – *Sciaenidae*  
**Género** – *Totoaba* (Villamar, 1980)  
**Especie** – *Totoaba macdonaldi*  
**Nombre común** – Totoaba

A pesar de estas expectativas, una de las limitantes para realizar el cultivo de esta especie, es que requiere un alto contenido proteico en su alimentación por ser una especie carnívora; por lo que alimentar a totoaba con harinas y aceites de pescado, no hacen sostenible a la acuicultura.

## 2.2. *Hermetia illucens*

Mosca soldado negro MSN (*H. illucens*) (Figura 3) pertenece a la familia *Stratiomyidae*, es un insecto de aproximadamente 25 mm y morfológicamente se describe con un cuerpo color negro ligeramente aplanado, tiene 6 patas situadas en el mesotórax, un par de ojos grandes y anténulas situadas en la cabeza, un par de alas situadas a la mitad de su cuerpo y comúnmente es confundido con avispa, pero a diferencia MSN carece de aguijón (Zumbado y Azofeifa, 2018). Estos organismos pueden lograr vivir en diversos hábitats, desde ambientes terrestres, costeros y dulceacuícolas (Zumbado y Azofeifa, 2018).

El ciclo de vida de *H. illucens* es considerablemente corto y consta de 5 estadios (Figura 4), una mosca adulta puede llegar a poner de 800 a 900 huevos, este estadio dura alrededor de 4 días aproximadamente, posteriormente el huevo eclosiona a una larva, la cual se alimenta de materia orgánica por un periodo de 13 a 18 días, después de este tiempo la larva pasa a ser una pre-pupa, la cual solo aumenta su tamaño pero de la misma manera se sigue alimentando, aprovechando los residuos orgánicos de la mejor manera para ser acumulados como reservas energética para su adultes (Oviedo et al., 2022; Zumbado y Azofeifa, 2018).



**Figura 6.** *Hermetia illucens* (Mosca Soldado Negro).

Fuente: Oviedo et al. (2022).

La mosca soldado negro pertenece a la siguiente clasificación:

**Reino** – *Animalia*  
**Filo** – *Arthropoda*  
**Clase** – *Insecta*  
**Orden** – *Diptera*  
**Familia** – *Stratiomyidae*  
**Género** – *Hermetia*  
**Especie** – *Hermetia illucens* (Linnaeus, 1758)  
**Nombre común** – Mosca soldado negro

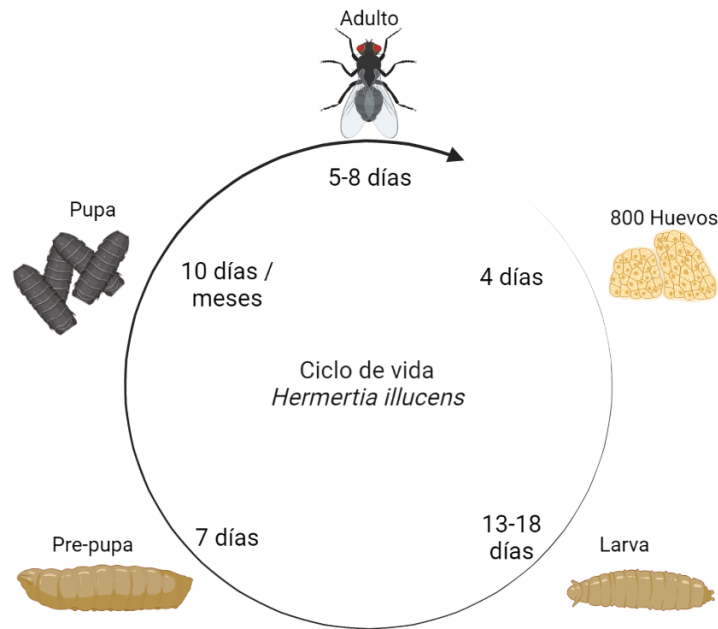
Después de los 7 días, pasa a un estadio de pupa donde su envoltura se queratiniza y se mantiene dura para evitar ser comido por depredadores, y si las condiciones ambientales lo permiten, 10 días después la pupa pasa a ser un adulto, donde su único objetivo será reproducirse, ya que su boca no tiene las herramientas necesarias para alimentarse de organismos más pequeños, sin embargo, no les impide tomar líquidos (Oviedo et al., 2022).

La MSN habita en un ambiente con un alto porcentaje de microorganismos patógenos, en su etapa larvaria se alimenta de materia orgánica, a pesar de estas condiciones, *H. illucens* no es un vector de enfermedades (Oviedo et al., 2022), incluso se ha reportado que contienen compuestos bioactivos que permite la inhibición de patógenos oportunistas, teniendo en su sistema inmune innato péptidos antimicrobianos (Zhang et al., 2022).

La MSN acumula de manera eficaz su alimento, transformándolo en grandes cantidades de proteína y lípidos; Actualmente es uno de los insectos más estudiados, ya que contiene alrededor de 40-65% de proteína en materia seca y 11-37% de lípidos crudos, ayudando a mejorar el crecimiento de los organismos cultivados y la función inmunológica de los organismos que tienen una dieta a base de este insecto (Zhang et al., 2022; Jiang et al., 2022; Mohan et al., 2022).

Se ha demostrado que la harina de larva de mosca soldado negro HLMSN tiene un perfil de aminoácidos muy similar a la HP, ya que se ha encontrado que contiene arginina, ácido aspártico, cisteína, ácido glutámico, histidina, isoleucina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina, metionina, leucina y lisina, estos tres últimos mencionados son unos de los aminoácidos esenciales para la nutrición de los organismos, pero que

desafortunadamente son aminoácidos muy limitantes en otras fuentes de harinas alternas como la soya (Villanueva et al., 2022; Mohan et al., 2022; Nogales et al., 2018;).



**Figura 7.** Ciclo de vida de *Hermetia illucens*.

Fuente: Generada en Biorender.com - modificación propia.

Mohan et al., (2022) menciona que la larva contiene mayores concentraciones de ácidos grasos saturados, los cuales pueden contener de 58-72% de ácidos grasos saturados totales, sobresaliendo en mayores proporciones el ácido láurico y el palmítico, y dependiendo del valor nutricional de la dieta en su etapa larvaria puede llegar a contener entre 19-40% de ácidos grasos poliinsaturados y monosaturados totales, encontrándolos en menores concentraciones (Kroeckel et al., 2012). Además, se reporta que la HLMSN contiene minerales como calcio, fósforo, magnesio, hierro, manganeso, zinc y cobre (Mohan et al., 2022; Sastre, 2020) los cuales son esenciales para llevar a cabo algunas rutas metabólicas.

A pesar de que la MSN tiene un perfil nutricional excelente para ser sustituido por HP como fuente proteica, se requiere de una investigación exhausta para observar los efectos que causa en la salud de los organismos al ser alimentados con esta fuente.

Actualmente *H. illucens* tiene un gran potencial para la producción de materia prima para la elaboración de alimento animal a gran escala (Correa, 2020), estos grandes volúmenes se deben a que pueden crecer, vivir y reproducirse en espacios reducidos en un tiempo relativamente corto como ya se describió anteriormente.

Algunos animales que ya han sido alimentados con dietas a base de MSN para su producción a nivel comercial son cerdos, pollos, conejos (Zumbado y Azofeifa, 2018), y recientemente se ha demostrado que es un buen candidato para el reemplazo de HP para dietas de peces como carpa común (Li et al., 2017), salmón atlántico (Belghit et al., 2019), bagre (Fawole et al., 2020), lobina europea (Tawwab et al., 2020), pez barramundi (Chakladre et al., 2021), trucha arcoíris (Hossain et al., 2021) y tilapia (Kishawy et al., 2022).

### **2.3. *Hermetia illucens* en la acuicultura**

Estudios probados sobre organismos marinos alimentados con MSN, han demostrado su buen funcionamiento en la digestibilidad, reducción de la inflamación intestinal, alta supervivencia durante el periodo de cultivo y aumento en la inmunidad innata de los peces juveniles (Kumar et al., 2021), el cual actúa como la primera línea de defensa ante la infección de agentes patógenos de manera rápida (Azmiria et al., 2022).

Recientemente, Heder y colaboradores en el 2021 evaluaron los efectos de la sustitución parcial de harina y aceite de pescado por harina y aceite de mosca soldado negro *H. illucens*, con el objetivo de observar los parámetros productivos de juveniles de barramundi *Lates calcarifer*, pez que se cultiva en gran parte de Australia y el océano Índico; Además, evaluaron el estado de la barrera intestinal, respuesta inmune y calidad de la carne del organismo, en su estudio formularon 4 dietas: 1) dieta control con harina de pescado 2) dieta con 30% harina de mosca, 3) dieta con 30% aceite de mosca y 4) dieta con reemplazo del 30% de harina de mosca y 30% de aceite de mosca. Al final del experimento no se encontraron diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) en los parámetros productivos de los peces control y experimentales. En cuanto al estado de la barrera intestinal, encontraron que los peces alimentados con la dieta 2 y 4 tuvieron un aumento en la producción de células caliciformes, tanto en el intestino como en la epidermis a

comparación de la dieta 1; así como también hubo un mejoramiento de la expresión de citocinas. También reportaron que el perfil de ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados del músculo de los peces alimentados con las 4 diferentes dietas, no se vieron afectados por la incorporación de harina de MSN en las dietas de los organismos, por lo que los autores reportan y sugieren un reemplazo parcial del 30% de harina y aceite de mosca soldado sin comprometer la salud del pez barramundi.

Por otro lado, Li y colaboradores en el 2020, en su investigación con salmón del Atlántico *Salmo salar*, determinaron el efecto de la salud intestinal de los organismos a través de la histología, análisis de metabolismo de lípidos y expresión génica. Los autores reportan que los juveniles de salmón del Atlántico presentaron esteatosis en el intestino distal y medio al ser alimentados con la dieta control y dietas experimentales con harina de mosca, sin embargo, se observó con menor intensidad en el intestino distal de los peces alimentados con harina de MSN. En cuanto a los genes expresados con relación a procesos inflamatorios no fueron estadísticamente significativos ( $P>0.05$ ), por lo que los autores concluyen que el remplazo de harina de mosca en el salmón del Atlántico no compromete la salud del intestino distal y medio.

Elia y colaboradores (2018), realizaron un estudio donde remplazaron parcialmente la harina de MSN por HP en dietas para trucha arcoíris *Oncorhynchus mykiss*, formulando dietas isoprotéicas e isolipídicas con un remplazo del 25 y 50% de harina de mosca, con el fin de evaluar los efectos sobre la salud intestinal de los peces, composición de la mucina y el estrés oxidativo. En sus resultados demostraron que la harina de MSN incorporada en las dietas, no causó alteración en la integración del intestino, por lo que no presentaron diferencias significativas ( $P>0.05$ ) en la salud de este, por otro lado, encontraron una mayor producción de células caliciformes con composición neutra en los organismos alimentados con harina de MSN, las cuales están relacionadas en la participación de la digestión y absorción de nutrientes (Roldan, 2020). Sin embargo, los valores de estrés oxidativo se vieron alterados en los organismos alimentados con MSN en comparación con la dieta control, por lo que los autores recomiendan una inclusión menor al 20% de harina de MSN a pesar de que la salud intestinal no tuvo efectos adversos.

En base a la información presentada, es de gran interés para el desarrollo de alimentos formulados para *T. macdonaldi* conocer los efectos relacionados a la salud intestinal de *T. macdonaldi* al ser alimentados con HLMSN *H. illucens*.

#### **2.4. Otros beneficios de *Hermetia illucens***

Si bien *H. illucens* ha sido utilizada como una alternativa proteica en la industria acuícola, en los últimos años se han hecho investigaciones por su actividad inmunomoduladora debido al contenido de quitina (Koutsos et al., 2022; Hurtado Lévano, 2010). Los inmunopotenciadores se definen como un agente, molécula, compuesto o sustancia que estimula la respuesta inmune innata de los organismos por medio de una interacción de estos componentes y las células de dicho sistema (Rondón-Barragán, 2004; Pérez et al., 2014), el uso de inmunopotenciadores en la dieta de peces ha sido hasta ahora la mejor opción para reducir el uso de antibióticos, ya que incrementan las funciones de las células defensoras (Rondón-Barragán, 2004; Roldan, 2020).

La mayoría de los inmunopotenciadores son compuestos que están presentes en la dieta como proteínas, lípidos, vitaminas y minerales (Rondón Barragán, 2004). Weththasinghe et al. (2021), también menciona y confirma que la MSN, contiene sustancias como la quitina y péptidos antimicrobianos (PAM) que funcionan como inmunopotenciadores y antioxidantes, que pueden ayudar a mejorar la salud de los peces alimentados con una dieta a base de harina de mosca soldado.

La quitina es un polisacárido compuesto de cadenas largas de glucosa que está presente en el exoesqueleto de la MSN (Gasco et al., 2018) y ha sido utilizada en la trucha arcoíris *Oncorhynchus mykiss* como inmunopotenciador para aumentar la eficiencia del sistema inmune ante infecciones de la cepa bacteriana *Aeromonas salmonicida* (Rondón Barragán, 2004).

### 3. JUSTIFICACIÓN

- Debido al interés que surge en encontrar fuentes proteicas que sean sustentables, el presente estudio propone utilizar la harina de mosca soldado negro, debido a que contiene altos niveles de proteínas que van del 40-65%, alta digestibilidad, posee aminoácidos y ácidos grasos esenciales, apto para ser un producto que cumple con los estándares de nutrición de alta calidad para la producción de juveniles de *Totoaba macdonaldi*, además, de ser un producto seguro para su salud, ya que la mosca no es un vector de enfermedades.
- *Totoaba macdonaldi* en etapas juveniles requiere del 40-50% de proteína cruda, por lo que *Hermetia illucens* puede ser una excelente fuente nutritiva, aportando estas cantidades proteicas.
- De acuerdo con estudios previos realizados en otras especies de peces carnívoros, se ha demostrado que *Hermetia illucens* beneficia su salud intestinal, mejorando la capacidad de absorción de nutrientes.

### 4. HIPÓTESIS

El uso de harina de larva de mosca soldado negro (HLMSN) *Hermetia illucens* en las dietas de juveniles de *Totoaba macdonaldi* tiene un efecto positivo en la salud de dichos organismos.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo general

Evaluar el estado de salud de juveniles de *Totoaba macdonaldi* a través de dietas con diferentes niveles de harina de larva de mosca soldado negro *Hermetia illucens*.

### 5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar los parámetros productivos de juveniles de *Totoaba macdonaldi* y determinar la mejor concentración de reemplazo de harina de mosca soldado negro *Hermetia illucens* que no afecte el estado de salud los organismos.
- Comparar los parámetros hematológicos y bioquímica sanguínea de juveniles de *Totoaba macdonaldi* alimentados con una dieta control a base de harina de pescado y dietas experimentales a base de harina de mosca *Hermetia illucens*.
- Comparar la producción de células caliciformes del tejido intestinal de juveniles de *Totoaba macdonaldi* alimentados mediante las diferentes concentraciones proteicas de harina de mosca *Hermetia illucens* y dieta control.
- Observar estructuras de tejido intestinal y hepatopáncreas de juveniles de *Totoaba macdonaldi* y describir el efecto que causa en los organismos alimentados con una dieta a base de harina de mosca soldado negro *Hermetia illucens*.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Obtención de organismos

Este trabajo de investigación se realizó con organismos juveniles de *T. macdonaldi* donados por la Unidad de Biotecnología en Piscicultura (UBP) de la Facultad de Ciencias Marinas (FCM) de la Universidad Autónoma de Baja California (UABC):

Coordenadas:      Latitud (31° 51 '47")

                          Longitud (116° 39' 56")

### 6.2 Sistema de cultivo

Los organismos se sembraron en un sistema de cultivo 'Guelph' con un flujo cerrado con recolector de heces. El sistema contó con 24 unidades experimentales con una capacidad aproximada de 90 L cada una. Para mantener la calidad y recirculación del agua, el sistema contó con una bomba de ¾ HP, un calentador de agua para el control de la temperatura (Delta Star Heat Pump) Modelo DSPH-8 con ¾ Hp y 1,495 watts, un filtro mecánico de polipropileno con bolsa filtrante de 10 µm, un biofiltro de cuentas plásticas (PolyGeysers®), un fraccionador de espuma (Protein Skimmer) para evitar la acumulación excesiva de compuestos nitrogenados, un tanque de compensación con capacidad de 0.390 m<sup>3</sup>, un blower para mantener la concentración de oxígeno disuelto, un filtro de 1 µm con luz ultravioleta, y un reservorio de agua con capacidad de 800 L.

### 6.3 Siembra de los organismos

Se realizó la siembra de organismos en 18 unidades experimentales, donde la selección fue completamente aleatoria. Se colocaron 15 organismos por tanque y se colocaron en tres rondas: 1 de 10 organismos, 1 de 3 organismos y 1 de 2 organismos. El experimento se inició con organismos de peso promedio de 18.92 ± 0.56 g y una talla promedio de 12.60 ± 0.58 cm. Se realizó un análisis estadístico al inicio del experimento para verificar que todos los tanques experimentales contaran con un peso promedio inicial de los organismos, para lo cual se realizó el análisis ANOVA del cual no se obtuvieron diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) entre los tratamientos.

#### **6.4 Diseño experimental**

Las 6 dietas elaboradas se distribuyeron por triplicado completamente al azar en los tanques del sistema. Los juveniles de totoaba fueron alimentados a saciedad dos veces al día. Una primera alimentación se llevó a cabo a las 9:00 h y la segunda a las 17:00 h durante 60 días. Se mantuvo un fotoperiodo de 12 h luz y 12 h oscuridad.

#### **6.5 Alimentación durante el periodo de aclimatación**

El periodo de aclimatación fue de 5 días, donde se alimentaron a los juveniles de totoaba con alimento comercial EWOS® empleado en la UBP. Las raciones de alimentación fueron a saciedad dos veces al día, una primera alimentación se llevó a cabo a las 9:00 y la segunda 17:00 h. Durante el periodo de aclimatación se realizaron las dietas experimentales.

#### **6.6 Mantenimiento del sistema**

Después de la alimentación, se llevaba a cabo una limpieza de las unidades experimentales haciendo uso de un sifón para recolectar las heces y el alimento no consumido. Para evitar un aumento de compuestos nitrogenados, diariamente se drenaban tuberías de salida del sistema, se realizaban cambios de los filtros de bolsa de 10 µm del filtro mecánico, se realizaba retrolavado del biofiltro por inyección de aire y se median parámetros (amonio, nitrito y nitrato) con un kit comercial API®. El agua perdida por la limpieza se recuperaba inmediatamente a través de una válvula check colocada en el tanque de compensación la cual entraba al calentador de agua para evitar un cambio brusco de temperatura. La concentración de oxígeno disuelto en el sistema se mantuvo a 6 mg/L y la temperatura fue mantenida a 24°C durante la aclimatación y el experimento.

## **6.7 Preparación de dietas experimentales**

Para el experimento se formularon 6 dietas isoprotéicas e isolipídicas para contener 52% de proteína cruda y 12% de lípidos crudos: se formuló una dieta control a base de harina de pescado y cinco dietas experimentales donde se sustituyó un 10, 20, 30, 40 y 50% de HP por HLMSN *H. illucens* de la empresa Enviroflight®, nombradas DC, M10, M20, M30, M40, M50, respectivamente. Una vez obtenidas las seis dietas, se verificó el contenido proximal formulado, por lo que se realizó un análisis proximal (Tabla 1), así como análisis de aminoácidos y ácidos grasos (Tabla 2-3). La elaboración de las dietas fue llevada a cabo en el laboratorio de Nutrición Acuícola de la FCM en la UABC. Cada uno de los ingredientes de la Tabla 1 se integraron en una mezcladora (modelo K45SS, KitchenAid®) con capacidad de 1 kg de 275 watts, en el siguiente orden; Harinas (proteínas, carbohidratos, vitaminas y minerales), aceites y aglutinantes. Las harinas fueron mezcladas por 5 minutos, posteriormente se diluyó la vitamina liposoluble (E) con los aceites para después ser vertidos en las harinas y ser mezclados durante 5 minutos. Para cubrir los requerimientos nutricionales de aminoácidos esenciales de totoaba, se agregó taurina, lisina y metionina. La grenetina y el almidón se hidrataron previamente, una vez disueltos se colocaron con los demás ingredientes y se mezclaron por 3 minutos, agregando agua para obtener una masa consistente. Una vez obteniendo la consistencia deseada, la masa se colocó en un moledor de carne con un disco de orificios de 5 mm para moldear y cortar el alimento y formar los pellets, los cuales se colocaron en charolas de aluminio para su secado en una estufa a 60°C durante 12 h. Una vez secos los pellets se dejaron enfriar y se almacenaron en bolsas ziploc, para posteriormente ser guardadas en refrigeración a 4°C hasta su uso.

## **6.8 Análisis bromatológicos (químico-proximales)**

Para determinar el porcentaje de proteínas, lípidos, cenizas y humedad de la harina de mosca soldado negro y los tejidos (músculo, vísceras, hígado y pez entero) se realizaron análisis químico proximal (Tabla 1). Previo al análisis de composición proximal, cada uno de los tejidos fueron puestas en navecillas y posteriormente fueron colocados en una estufa a 60°C durante 8 a 12 h, para la obtención de muestras seca.

**Tabla 1.** Composición de ingredientes (gr 100g<sup>-1</sup>) de dieta control con harina de pescado (HP) y dietas experimentales con harina de larva de mosca soldado negro *Hermetia illucens*; y composición proximal, para *Totoaba macdonaldi*.

<b>INGREDIENTES</b>	<b>DC</b>	<b>M10</b>	<b>M20</b>	<b>M30</b>	<b>M40</b>	<b>M50</b>
Harina de pescado	65.70	58.60	52.55	45.98	39.41	32.55
Harina de mosca soldado	0.00	8.65	17.13	25.69	34.56	42.82
Quitina	8.10	6.50	4.90	3.30	1.60	0.00
Grenetina	0.60	1.20	1.50	2.20	2.70	3.69
Almidón	5.90	5.90	5.90	5.90	5.90	5.85
Celulosa	4.80	4.06	3.03	1.84	0.74	0.00
Harina trigo	5.50	5.50	5.50	5.50	5.50	5.46
Harina maíz	5.60	5.60	5.60	5.60	5.60	5.58
Aceite de pescado	0.00	0.00	0.50	1.50	2.20	2.30
Aceite de soya	2.00	2.20	1.60	0.70	0.00	0.00
Mezcla vit-min*	0.35	0.35	0.35	0.35	0.35	0.35
Vitamina C	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
Vitamina E	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
Taurina	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40
Lisina	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30
Metionina	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30
Asc. mono-P (35%) **	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04
<b>TOTAL</b>	<b>100.0</b>	<b>100.00</b>	<b>100.0</b>	<b>100.0</b>	<b>100.0</b>	<b>100.0</b>
<b>COMPOSICIÓN PROXIMAL</b>						
<b>Proteína cruda (%)</b>	52.02	52.30	52.15	52.02	52.08	52.19
<b>Lípidos crudos (%)</b>	11.87	12.14	12.07	12.00	12.15	12.47
<b>Cenizas (%)</b>	13.25	13.74	13.54	13.53	12.86	12.05
<b>Humedad (%)</b>	4.80	4.46	4.37	4.05	3.63	4.18
<b>Almidón (%)</b>	8.2	9.2	9.8	10.2	10.4	10.4
<b>Quitina (%)</b>	6.87	5.70	4.25	3.93	2.92	2.13
<b>ELN</b>	2.99	2.46	3.82	4.27	5.96	6.58

\*: Mezcla de vitaminas y minerales, \*\*: Ascorbato 2-fostato al 35%, **ELN**: Extracto libre de nitrógeno. **DC**: Dieta control, **M10**: sustitución de HLMSN con 10%, **M20**: sustitución de HLMSN con 20%, **M30**: sustitución de HLMSN con 30%, **M40**: sustitución de HLMSN con 40%, **M50**: sustitución de HLMSN con 50%.

### 6.8.1 Determinación de humedad y cenizas totales

Para obtener la humedad total de las muestras se etiquetaron y se pesaron crisoles en una balanza analítica, posteriormente se pesaron 0.25 g de muestra seca; En todo momento se requirió del uso de pinzas de disección para manipular los crisoles. Los crisoles se colocaron en una estufa y se dejaron a 105°C durante 6 h, al finalizar este tiempo se colocaron los crisoles en un desecador; una vez a temperatura ambiente se pesaron los crisoles en una balanza analítica y se anotaron los pesos obtenidos.

$$\% \text{Humedad} = 100 - \left( \frac{MS}{PMI} \right) * 100$$

Donde:

- **MS**= Muestra seca
- **PF**= Peso final (después de las 6 h)
- **PMI**= Peso de muestra inicial

Con las muestras previas utilizadas en humedad, se colocaron los crisoles en la mufla a 150 °C y se subió la temperatura gradualmente cada 15 minutos hasta llegar a los 550 °C. Una vez llegando a la temperatura se dejaron las muestras en la mufla por 5 h para obtener el porcentaje de cenizas totales.

$$\% \text{Cenizas} = \left( \frac{PFC - PC}{MS} \right) * 100$$

Donde:

- **PFC**=Peso final crisol
- **PC**=Peso crisol
- **MS**=Muestra seca

### 6.8.2 Determinación de lípidos totales por el método de Folch (1957).

Se pesó 0.1 g de muestra seca en un tubo de ensayo previamente etiquetado, (cada muestra se realizó por triplicado). Como estándar se pesó 0.025 g de tripalmitin,

posteriormente se adicionó a cada tubo 200  $\mu$ m de agua destilada con una micropipeta y se dio vortex por 1 minuto. Después se adicionaron 6 ml de diclorometano-metanol, se dio vortex por 30 segundos y se dejó reposar durante 12 h para que se realizara la separación de fases y extracción de lípidos de las muestras. 12 h después, se etiquetó la misma cantidad de tubos de ensayo. Se prepararon jeringas de 12 ml con filtro de plástico y papel Whattman #4 para filtrar las muestras a los nuevos tubos de ensayo. Una vez filtradas las muestras se agregaron 1.5 ml de KCl al 1.76%, y se dejó reposar por 12 h. Después de este tiempo, con una pipeta Pasteur se descartó la fase acuosa y de sólidos. Por otro lado, se pesaron viales de 4 ml y se anotó el peso obtenido de la balanza analítica, después se tomaron 2 ml de la muestra con una pipeta aforada y se colocaron en su respectivo vial, los cuales se dejaron evaporar a 60°C en un termoblock. Una vez evaporada la muestra, se retiraron y se colocaron en el desecador con unas pinzas de esterilización, se dejaron las muestras por 30 min a temperatura ambiente y se anotaron los pesos obtenidos de la balanza analítica.

$$\% \text{Lípidos} = \left( \frac{(P_{VF} - P_V)}{P_M} \right) * 100 \text{ *ml evaporados}$$

Donde:

- **PVI**= Peso vial inicial
- **PVF**= Peso vial final
- **PM**= Peso de muestra

### **6.8.3 Determinación de proteínas totales por el método de microKjeldahl (Digestión)**

En un papel libre de nitrógeno se pesó en una balanza analítica 1.5 g de sulfato de potasio, 0.05 g de sulfato cúprico, 0.05 g de muestra (polvo) y en el caso de la muestra estándar de proteína se pesó 0.025 g de grenetina, todo se colocó en un matraz microKjeldahl de 30 ml, se adicionó 3 ml de ácido sulfúrico (todas las muestras se prepararon por duplicado). Los matraces se colocarán en el digestor y se aumentó la temperatura gradualmente cada 20 minutos, el equipo se apagó hasta disolver todos los componentes añadidos. Las muestras se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se

aforaron a 25 ml con agua destilada y se guardaron en frascos de polietileno. Para el proceso de destilación primeramente en un vaso de precipitado de 100 ml se colocaron 15 ml de ácido bórico al 3%, se agregaron 5 gotas de indicador Shiro Tashiro y posteriormente se colocó el vaso de precipitado para obtener la muestra, para ello, se tomaron 5 ml de la muestra aforada, 10 ml de hidróxido de sodio preparado al 40% y se vertió en la copa del destilador. Se encendió el equipo y se destilaron 40 ml por muestra. Para la titulación se utilizó una bureta con soporte universal y se agregó HCl al 0.05N Sobre una plancha de agitación constante se colocó el vaso de precipitado con los 40 ml de muestra destilada, y por medio de goteo lento se anotó el volumen gastado de ácido al instante del cambio de color verde a violeta.

$$\% \text{Nitrógeno} = (((\text{HCLgm} - \text{HCLbl}) * \text{HCLN} * 0.014) / \text{PM}) * 100$$

Donde:

- **HCLgm**= Ácido clorhídrico gastado en muestra
- **HCLbl**= Ácido clorhídrico blanco
- **HCLN**= Normalidad del ácido
- **PM**= Peso de muestra en gramos

Posteriormente, se aplicó la siguiente fórmula para obtener el porcentaje de proteínas total.

$$\% \text{ Proteína} = \% \text{ Nitrógeno} * 5 \text{ ml} * 6.25 \text{ (ó 4.67)}$$

Donde:

% Nitrógeno: Resultado de porcentaje de nitrógeno

5 ml: 5 ml muestra destilada

6.25: Valor Kp en proteína animal

4.67: Valor Kp en proteína de insectos (Jannsen et al., 2017).

#### **6.8.4 Determinación de almidón total**

Para la preparación de las muestras, se pesaron y etiquetaron matraces de 100 ml. Después se pesaron 0.5 gr de muestra (dieta) en una balanza analítica, 0.5 gr de blanco y 0.25 gr de estándar en el cual se utilizó almidón de maíz.

##### **6.8.4.1 Dispersión del almidón**

A cada uno de los matraces con muestra previamente pesada, se añadió 25 ml de agua destilada fría y se agito suavemente. Posteriormente los matraces se colocaron en ebullición durante 3 minutos, e inmediatamente se taparon los matraces con un vaso de precipitado y se colocó en una incubadora a 60°C. Una vez alcanzada la temperatura los matraces se transfirieron rápidamente a una autoclave a 121°C por 1.5 h. Pasando el tiempo programado, los matraces de colocaron rápidamente a baño maría a 60°C, con el fin de evitar la cristalización de la solución. Cabe destacar que en todo el procedimiento la temperatura de la solución no fue menor a 60°C.

##### **6.8.4.2 Hidrólisis del almidón**

Cuando los matraces estaban en el baño maría, se les añadió 2.5 ml de solución tapón acético, y posteriormente se le añadió agua destilada a temperatura ambiente, hasta que el contenido del matraz alcanzara 50 gr, para ajustar su peso, el matraz se retiró del baño maría, rápidamente se ajustó su peso en una balanza analítica y se regresó de inmediato a baño maría. Una vez teniendo el peso deseado, se inició la agitación del baño maría y se esperó a que las muestras alcanzarán los 60°C. Posteriormente se añadieron 2 ml de solución glucamilasa, nuevamente se taparon los matraces con un vaso de precipitado y se continuo con la agitación a baño maría durante 2 h.

##### **6.8.4.3 Filtración de muestras**

Para filtrar la solución de cada uno de los matraces, se colocaron sobre un embudo con papel filtro (Whatman #4) y un matraz de aforación, después con agua

destilada se aforo la muestra a 100 ml (Solo se aforo una vez que las muestras estuvieran a temperatura ambiente).

#### **6.8.4.4 Cálculos para la determinación del almidón**

Finalmente, el contenido de almidón se cuantifico utilizando un lector de microplaca siguiendo las indicaciones del Kit comercial de glucosa oxidada Pointe Scientific, INC.

$$\% \text{ Almidón} = 0.9 \times ((m/10^5) \times (250/V_0) \times (V_1/1) \times (100/E) \times (100/100-H))$$

Donde:

0.9= Factor de conversión de glucosa en almidón

m= Glucosa leída en curva patrón ( $\mu\text{m}$ )

$V_0$ = Volumen de la alícuota del hidrolizado (ml)

$V_1$ = Volumen del hidrolizado diluido (ml)

E= Peso de la muestra (gr)

H= Contenido en agua

#### **6.8.5 Obtención de quitina**

La quitina se obtuvo a través del exoesqueleto de camarón las cuales primeramente fueron lavadas con agua corriente, y en seguida se colocaron en agua hirviendo para su cocción. Posteriormente fueron colocadas en charolas de aluminio y se metieron en una estufa a 60°C por 8 h, después fueron depositadas en una licuadora (modelo Explorian E320, Vitamix®) de 1640 watts y se trituraron hasta obtener harina de exoesqueleto de camarón. Una vez obtenido el polvo se realizaron 3 lavados para la extracción de quitina siguiendo la metodología de (Escobar *et al.*, 2013).

#### **6.8.5.1 Desproteínización**

Las proteínas existentes en nuestra harina de exoesqueleto de camarón se eliminaron a través de una solución de hidróxido de sodio (grado analítico) a una concentración de 3.5%. La harina se colocó en una relación 1:10 líquido, posteriormente se mantuvo en una plancha de agitación a 95°C por 2 h bajo una campana de flujo laminar. Una vez terminado el tiempo la harina fue filtrada con una maya, se lavó con agua dulce y se exprimió para retirar el excedente de la solución, se colocó en una cama de aluminio y se dejó secar en una estufa a 60°C por 6 h.

#### **6.8.5.2 Desmineralización**

Una vez seca, se removieron los carbohidratos de calcio del exoesqueleto a través de una solución de ácido clorhídrico a una concentración de 2N. La harina se colocó en una relación 1:5 líquido, posteriormente se mantuvo en la plancha de agitación sin temperatura por 1 hora bajo una campana de flujo laminar. Una vez terminado el tiempo la harina fue filtrada con una maya, se lavó con agua dulce y se exprimió para retirar el excedente de la solución, se colocó en una cama de aluminio y se dejó secar en una estufa a 60°C por 6 h.

#### **6.8.5.3 Purificación**

Finalmente, para la obtención de quitina, se realizó un tercer lavado a partir de una solución de hidróxido de sodio (grado analítico) a una concentración de 3%. La harina se colocó en una relación 1:10 líquido, posteriormente se mantuvo en una plancha de agitación a 100°C por 1 hora bajo una campana de flujo laminar. Una vez terminado el tiempo la harina fue filtrada con una maya, se lavó con agua dulce y se exprimió para retirar el excedente de la solución, se colocó en una cama de aluminio y se dejó secar en una estufa a 60°C por 6 h.

#### **6.8.5.4 Determinación del porcentaje de quitina**

Para la determinación de la quitina en las dietas, se pesaron 8 gr de muestra sobre papel filtro en una balanza analítica, posteriormente se colocaron en dedales de

extracción y fueron colocados en un extractor Soxhlet. Siguiendo con el protocolo, se colocaron 175 ml de éter de petróleo en el matraz bola y se colocó a una temperatura de 90°C y se dejó por 2 h. Una vez teniendo las muestras desgrasadas, se utilizó el método de Black y Schwartz, 1950 modificado para obtener el porcentaje de quitina en las dietas. En una balanza analítica se pesaron 2 gramos de muestra previamente desgrasada, se colocaron en un vaso de precipitado de 600 ml, posteriormente se agregaron 100 ml de HCL al 3% y se colocaron en un extractor de fibra cruda por 1 hora. Después de este tiempo, la muestra se colocó en un embudo de crisol sobre un papel filtro y a través de una bomba de vacío se filtró la muestra, posteriormente se hicieron lavados con agua destilada hirviendo hasta que la muestra ya no fuera acida. Las mismas muestras se volvieron a colocar en los vasos de precipitado de 600 ml, se agregaron 100 ml de NaOH al 5% y se colocaron sobre el extractor de fibra cruda por 1 hora. Durante este periodo de tiempo se agregaron 3 gotas de etanoato de etilo para estabilizar la molécula de la quitina y evitar que la muestra se proyectara. Posterior al tiempo, la muestra se colocó nuevamente en un embudo de crisol sobre un papel filtro (previamente pesado en una balanza analítica) y a través de una bomba de vacío se filtró la muestra, después se hicieron lavados con agua destilada hirviendo hasta eliminar el NaOH, y por último se dieron dos enjuagues con 15 ml de acetona cada uno. Una vez filtrada la muestra, el papel filtro junto con la muestra se pesaron en una balanza analítica, se pusieron en un crisol previamente pesado y etiquetado y se colocaron en una estufa a 110°C por 30 min. Finalmente, una vez seca la muestra, los crisoles se volvieron a pesar en una balanza analítica y posteriormente fueron colocados en una mufla para incinerar la muestra a 550°C por 30 minutos, subiendo gradualmente la temperatura cada 15 minutos para evitar una proyección en las muestras.

### **6.9 Determinación del perfil de aminoácidos de dietas experimentales**

Para la determinación del perfil de aminoácidos de las dietas experimentales se llevó a cabo la siguiente metodología.

### 6.9.1 Desgrasado de muestras

Se pesaron 0.150 gr se muestra seca en viales de 10 ml, posteriormente se añadió 3 ml de solución metanol/diclorometano en una relación (2:1). Después se agitaron las muestras con ayuda de un vortex por 30 segundos y se dejaron reposar las muestras durante 24 h a 4°C.

### 6.9.2 Lavado de muestras

- Las muestras se dejaron a temperatura ambiente.
- Una vez a temperatura ambiente, las muestras se colocaron en la centrifuga a 3000 rpm por 3 minutos a 4°C.
- Se retiró el sobrenadante con una jeringa de vidrio de 1 ml.
- Se les agregaron 2 ml solución dicloro metano/metanol a una relación (1:1).
- Las muestras se colocaron en la centrifuga a 3000 rpm por 3 minutos a 4°C.
- Se retiró el sobrenadante con jeringa de vidrio de 1 ml.
- Se volvieron a agregar 2 ml solución metano/metanol relación (1:1).
- Las muestras por tercera vez se colocaron en la centrifuga a 3000 rpm por 3 minutos a 4°C.
- Una vez más se retiró el sobrenadante de la jeringa de vidrio de 1 ml.
- Por cuarta y última vez se agregaron 2 ml solución metano/metanol relación (1:1).
- Las muestras se colocaron en la centrifuga a 3000 rpm por 3 minutos a 4°C.
- Se retiró el sobrenadante
- Finalmente se dejaron las muestras evaporando a 60°C en una estufa toda la noche.

### 6.9.3 Hidrólisis

Una vez seca la muestra, se pesaron 0.05 g de muestra y se agregaron 3 ml de ácido clorhídrico al 6N con 0.1% de fenol. Posteriormente se agregó corriente de nitrógeno para dispersar el oxígeno existente en la muestra, y se colocó en una estufa a 113°C por 18 h. Posterior al tiempo, la muestra se colocó en un matraz de aforación de 25 ml utilizando agua desionizada, y se mezcló para su integración. Después, en un vaso de precipitado y con una jeringa se tomó 1.5 ml de muestra, se colocó un filtro y se vertió en viales ámbar de 1.5 ml. Finalmente se guardaron los viales en refrigeración a 4°C hasta su procesamiento en HPLC. La derivatización se realizó directamente en el HPLC Agilent (Mod. 1200 infinity series). De manera general, se tomaron 2.5 µl del buffer de fosfatos (Part Num. 5061-3339), seguido de 0.5 µl de muestra con relación 1:1:1 de OPA: Fmoc (Ortoftaldehido: Fluorenylmethyloxycarbonyl), posteriormente fueron inyectadas en secuencia continua en el HPLC. Para la separación de los AAS se utilizó una columna C18 de fase reversa Zorbax eclipse AAA (4.5 X 150 mm 3.5µm, P.N. 963400-902), donde se empleó un volumen de inyección de 5 µL. Para la corrida, se utilizó un gradiente de buffer de fosfato de sodio al 40mM (Sigma aldrich, cat num. 71500-250g) y una mezcla de acetonitrilo al 45% Metanol 45% y agua grado HPLC 10%, a un flujo de 1mL/min. El sistema se acopló a un detector de fluorescencia (1260 FLD series, Agilent technologies, USA) y un detector de DAD (1260 DAD-UV, Agilent technologies, USA), mismos que fueron configurados en dos longitudes de onda, 340/450 nm y 266/305 nm excitación/emisión y para el DAD, 380nm (OPA) y 262nm (Fmoc). La curva de calibración se realizó utilizando una solución de AAS estándares (P.N. 061-3330) con concentraciones de 50 a 350 pmol. Como último paso, estimó el área bajo la curva con el programa "OpenLAB" (Agilent Technologies 2000 copyright), obteniendo así el porcentaje de aminoácidos, respecto al contenido de proteína en las muestras (Tabla 2).

**Tabla 2.** Perfil de aminoácidos de dietas con diferentes niveles de sustitución de harina de pescado por harina de larva de mosca soldado negro *Hermetia illucens*, para juveniles de *Totoaba macdonaldi* (g AA 100 g<sup>-1</sup> de dieta, base seca).

<b>AMINOÁCIDOS</b>	<b>DC</b>	<b>M10</b>	<b>M20</b>	<b>M30</b>	<b>M40</b>	<b>M50</b>
<b>Aminoácidos esenciales</b>						
Histidina	1.2±0.0	1.3±0.0	1.3±0.0	1.2±0.0	1.3±0.0	1.3±0.1
Arginina	3.3±0.0	3.3±0.0	3.3±0.0	3.3±0.0	3.7±0.3	3.3±0.0
Treonina	2.5±0.0	2.5±0.0	2.4±0.0	2.4±0.0	2.5±0.0	2.3±0.0
Valina	3.1±0.2	3.4±0.1	3.5±0.1	3.5±0.0	3.5±0.0	3.6±0.1
Metionina	0.4±0.1	0.2±0.0	0.2 ±0.0	0.4±0.0	0.2±0.2	0.3±0.1
Lisina	4.7±0.0	4.5±0.1	4.5±0.1	4.5±0.1	4.2±0.1	3.9±0.1
Isoleucina	2.4±0.0	2.4±0.0	2.4±0.0	2.3±0.0	2.3±0.0	2.3±0.0
Leucina	4.4±0.0	4.4±0.0	4.3±0.0	4.2±0.0	4.1±0.1	4.0±0.1
Fenilalanina	2.5±0.0	2.5±0.0	2.5±0.0	2.4±0.0	2.4±0.0	2.4±0.0
<b>Subtotal</b>	<b>24.5±0.2</b>	<b>24.4±0.2</b>	<b>24.3±0.3</b>	<b>24.1±0.0</b>	<b>24.0±0.3</b>	<b>23.4±0.1</b>
<b>Aminoácidos no esenciales</b>						
A. Aspar*	5.1±0.0	5.1±0.1	5.1±0.1	5.0±0.0	4.7±0.0	4.9±0.2
Serina	2.5±0.0	2.5±0.0	2.5±0.0	2.5±0.0	2.6±0.0	2.6±0.0
A. Glutam*	8.6±0.1	8.6±0.1	8.4±0.3	8.3±0.0	7.9±0.1	8.2±0.3
Glicina	3.4±0.0	3.4±0.1	3.5±0.0	3.8±0.0	3.9±0.1	3.9±0.1
Alanina	3.90.1	3.9±0.2	3.9±0.0	3.9±0.1	4.0±0.0	4.0±0.1
Tirosina	2.1±0.0	2.2±0.0	2.3±0.0	2.4±0.0	2.5±0.0	2.6±0.1
<b>Subtotal</b>	<b>25.7±0.2</b>	<b>25.8±0.1</b>	<b>25.8±0.2</b>	<b>25.9±0.1</b>	<b>25.4±0.2</b>	<b>26.1±0.5</b>
<b>Otros</b>						
Taurina	0.8±0.1	1.0±0.0	0.9±0.0	0.9±0.0	1.0±0.0	1.0±0.0
<b>Total</b>	<b>51.1± 0.1</b>	<b>51.2± 0.2</b>	<b>51.0± 0.0</b>	<b>51.0± 0.1</b>	<b>50.5± 0.1</b>	<b>50.4± 0.4</b>

**DC:** Dieta control, **M10:** sustitución de HLMSN con 10%, **M20:** sustitución de HLMSN con 20%, **M30:** sustitución de HLMSN con 30%, **M40:** sustitución de HLMSN con 40%, **M50:** sustitución de HLMSN con 50%. \***A. Glutam:** Ácido glutámico, \***A. Aspar:** Ácido aspártico. Los valores son expresados como promedio de dos réplicas ± desviación estándar.

## 6.10 Transmetilación de ácidos grasos

Para realizar la transmetilación y obtener el perfil de ácidos grasos (AGS) de la HLMSN, las dietas experimentales e hígados de los organismos, se preparó una solución extractora con relación (10:1:1), donde se mezcló en una botella de cristal de 100 ml, 40 ml de metanol, 4 ml de diclorometano y 4 ml de ácido clorhídrico. En un vial de 10 ml se pesaron 0.1 g de muestra seca en una balanza analítica, posteriormente se adicionaron 3 ml de solución extractora preparada previamente y 50  $\mu$ l de estándar BHT. Las muestras se colocaron en corriente de nitrógeno por 30 segundos, se cerraron los viales y se colocaron en una estufa a 85°C por 2 h. Una vez el tiempo terminado, las muestras se dejaron enfriar (30 min) y se adiciono con una pipeta 1.5 ml de hexano, 1.5 ml de agua destilada y 0.33 ml de diclorometano. Posteriormente se centrifugaron las muestras a 3500 rpm por 10 minutos a 4°C. Finalmente se recuperó por muestra 1.5 ml de la fase superior con una jeringa de cristal y se colocó en viales ámbar, se cerraron y se almacenaron en refrigeración a 4°C hasta su uso en un cromatógrafo. Para el análisis de las muestras en cromatografía de gases se sustituyeron las tapas por unas que permitieron la inyección de las muestras al cromatógrafo. Para comenzar con el ciclo de determinación de los AGS, el cromatógrafo inicio con una temperatura de 120°C, y hasta llegar a los 240°C para concluir el ciclo. Se utilizo nitrógeno como gas acelerador de los ácidos grasos, y como reactivo blanco se utilizó hexano. En una computadora conectada con el equipo Agilent Technologies 78820<sup>a</sup> GC system, se ingresó al software para depurar los perfiles obtenidos de cada una de las harinas, dietas muestreadas y músculos de los peces alimentados con diferentes dietas. Este software mostró los tiempos de retención de cada uno de los ácidos grasos identificados de cada muestra a través de un proceso de combustión de estos AGS. Una vez que las lecturas fueron arrojadas por el programa, se procedió a eliminar el área de la gráfica correspondiente al hexano, posteriormente se ajustaron los demás tiempos de retención de los ácidos grasos y cuando estos fueron <0.300% se eliminaron. Los tiempos de retención obtenidos de cada muestra se colocaron en una base de datos en Excel para poder identificar los ácidos grasos correspondientes. En la Tabla 5 se resume el contenido de lípidos total (mg AG\*g harina<sup>-1</sup>) obtenido en la harina de mosca soldado negro antes de ser incorporado a las dietas experimentales.

**Tabla 3.** Perfil de ácidos grasos de la harina de larva de mosca soldado negro *Hermetia illucens* (mg AG\*g harina<sup>-1</sup>), antes de ser incorporada en las dietas para juveniles de *Totoaba macdonaldi*.

<b>A. GRASOS</b>	<b>HMSN</b>
C12:0	0.7 ± 0.2
C13:0	29.2 ± 3.2
C14:0	8.9 ± 0.1
C16:0	17.6 ± 0.9
C18:0	4.5 ± 0.4
<b>ΣSFA</b>	<b>60.8 ± 2.3</b>
C16:1N7	1.6 ± 0.3
C18:1N9T	13.8 ± 0.9
<b>ΣMUFA</b>	<b>15.4 ± 1.1</b>
C18:2N6C	16.7 ± 1.2
C18:3N3	1.1 ± 0.2
C18:3N4	1.0 ± 0.1
<b>ΣPUFAS</b>	<b>18.8 ± 1.5</b>
NID	4.9 ± 0.3
<b>Σ TOTAL</b>	<b>100.0</b>

**NID:** No identificado, **C12:0:** Ácido Láurico, **C13:0:** Ácido Tridecílico, **C14:0:** Ácido Mirístico, **C16:0:** Ácido Palmítico, **C18:0:** Ácido Esteárico, **ΣSFA:** Sumatoria de ácidos grados saturados, **C16:1n7:** Ácido Palmitoleico, **C18:1N9T:** Ácido eláidico, **ΣMUFA:** Sumatoria de ácidos grasos monoinsaturados, **C18:2N6C:** Ácido linoleico, **C18:3N3:** Ácido linolénico, **C18:3n4:** Acido octadecatrienoico **ΣPUFAS:** Sumatoria de ácidos grasos poliinsaturados. **AGS:** Ácidos grasos, **HLMSN:** Harina de larva de mosca soldado negro (*Hermetia illucens*). Los valores son expresados como promedio de dos réplicas ± desviación.

### 6.11 Parámetros productivos

En la biometría final los peces se colectaron con redes y fueron colocados en una cubeta de 12 L con 10 ml aceite de clavo, con el fin de evitar estrés en los organismos y facilitar su manejo. Una vez que los peces perdieron el equilibrio fueron pesados (g) en una balanza y medidos (longitud cm) para conocer el crecimiento de los organismos alimentados con diferentes porcentajes proteicos de las dietas experimentales, y la eficiencia proteica del alimento a través de los siguientes cálculos.

- **Ganancia de peso (GP)** = (Peso final - Peso inicial)
- **Porcentaje de la ganancia de peso (%GP)** =  $[(\text{Peso corporal final (g)} - \text{peso corporal inicial (g)}) / \text{peso corporal inicial (g)}] \times 100$
- **Tasa de crecimiento específico** =  $[(\ln \text{Peso corporal final (g)} - \ln \text{Peso corporal inicial (g)}) / \text{número de días de alimentación}] \times 100$
- **Ingesta de alimento** = Alimento total administrado (g) / número de peces
- **Relación de conversión alimenticia** = alimento consumido / ganancia de peso
- **Relación de eficiencia proteica** = [ Ganancia de peso neto (g) / Alimentación con proteínas (g)]
- **Índice hepatosomático** =  $100 \times \text{Peso húmedo hígado (g)} / \text{peso corporal entero (g)}$

### 6.12 Hematología y química sanguínea

Para los análisis hematológicos los organismos fueron sometidos a 12 h de ayuno. Por medio de punción cardiaca se extrajeron muestras de sangre de peces obtenidos al azar (8 réplicas por tanque). La sangre se obtuvo a través de jeringas de 1 ml con 0.1 ml de solución anticoagulante al 10% (EDTA) para la determinación inmediata de eritrocitos (ER), hematocrito (HT) y hemoglobina (HB). El porcentaje de hematocrito (HT%) se calculó por el método de micro-hematocrito a través de centrifugación de la sangre a 10,000 rpm por 10 minutos y el lector para tubos capilares de hematocrito Spiracrit Lancer. El resto de las muestras se centrifugaron a 12,000 rpm por 5 min a 4°C,

se colectó el plasma en tubos eppendorf y se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  en un crió-congelador hasta su uso. Con el plasma almacenado se determinó la concentración de proteína total (PT), glucosa (Glu), albúmina (Alb) y colesterol (Col), por medio de kits comerciales (*Pointe Scientific, INC*), a través de un lector de microplaca, con el programa SKANIT SOFTWARE 3.2 Research Edition for Multiskan GO. (Thermo Scientific).

### **6.13 Histología**

Para muestras histológicas se disectaron los organismos y se les extrajo el intestino distal, y dos lóbulos del hígado (tres peces por tanque). Los tejidos fueron depositados en un histocaset previamente etiquetados y fueron colocados en un recipiente con 300 ml de solución fijadora (solución Davidson) por dos días. Una vez concluyendo este periodo, los tejidos se cambiaron a 300 ml de alcohol absoluto y se almacenaron a temperatura ambiente hasta su uso. A partir de muestras almacenadas de tejido intestinal y hepático de juveniles de *T. macdonaldi* se deshidrataron en diferentes concentraciones de Etanol con ayuda de un histoquinete (Tissue-tek II, modelo 4640B). Posteriormente, las muestras se embebieron en parafina (Paraplast X-TRA) y se cortaron láminas de muestra en un micrótopo (Leica RM2125 RTS) a un grosor de  $5\ \mu\text{m}$ . Los cortes se colocaron en baño maría con grenetina (grado analítico) para extender el tejido y evitar una montura errónea. Posteriormente los cortes fueron montados en portaobjetos (Gold Seal®), escurriendo el excedente de agua. Después las laminillas fueron colocadas en una rejilla en una estufa a  $80^{\circ}\text{C}$  durante toda la noche para realizar la desparafinación de las muestras. Previamente a la tinción de las muestras se preparó la solución Azul alcian; En una balanza analítica se pesó 1g de reactivo azul alcian (CI 74240), y se añadió 3 ml de ácido acético, posteriormente se aforó la muestra a 100 ml con agua destilada y se agitó para su integración. Posteriormente se tiñeron las muestras con la técnica Hematoxilina-Eosina y Azul Alcian (intestinos) modificado por Sánchez (2019), de la siguiente manera:

### **6.13.1 Desparafinación de las muestras**

- Las laminillas de tejido intestinal y hepático se realizaron por triplicado por cada tratamiento, y se colocaron por 8 min en xileno I
- Se colocaron 8 min en xileno II
- Después, las laminillas pasaron por 5 min en etanol 100%
- Posterior a este tiempo fueron colocadas por 5 min en etanol 96%
- Inmediatamente se colocaron por 2 min en etanol 90%
- Después las laminillas se colocaron por 2 min en etanol 80%
- Después pasaron por 2 min a etanol 70%
- Posterior al tiempo, los tejidos se colocaron por 5 min en agua destilada
- Tomando solo los tejidos intestinales se colocaron por 10 min en Azul Alcian para la tinción de células caliciformes.

### **6.13.2 Tinción Hematoxilina-Eosina**

Una vez terminado este tiempo se volvieron a integrar los tejidos (intestinal y hepático) para continuar con el protocolo de tinción Hematoxilina-Eosina.

- Las laminillas se colocaron por 12 min en hematoxilina
- Posteriormente se realizaron 2 inmersiones de los tejidos en agua corriente
- Inmediatamente se realizó 1 inmersión rápida en alcohol ácido
- Después se pusieron por 2 min en agua corriente
- Después por 2 min se colocaron en carbonato de litio
- Posteriormente durante 1 min, las laminillas fueron puestas en agua corriente.
- Concluyendo este tiempo, fueron colocadas por 1 min en alcohol 70%
- Después se realizaron 5 inmersiones de las muestras en Eosina
- Posteriormente se colocaron en alcohol 70% por 30 s
- Se colocaron en alcohol 80% por 2 min
- Después en alcohol 90% por 2 min
- Posterior en alcohol 96% por 5 min
- Se colocaron en alcohol I 100% por 5 min
- Después pasaron a alcohol II 100% por 5 min
- Se colocaron en xileno I por 3 min

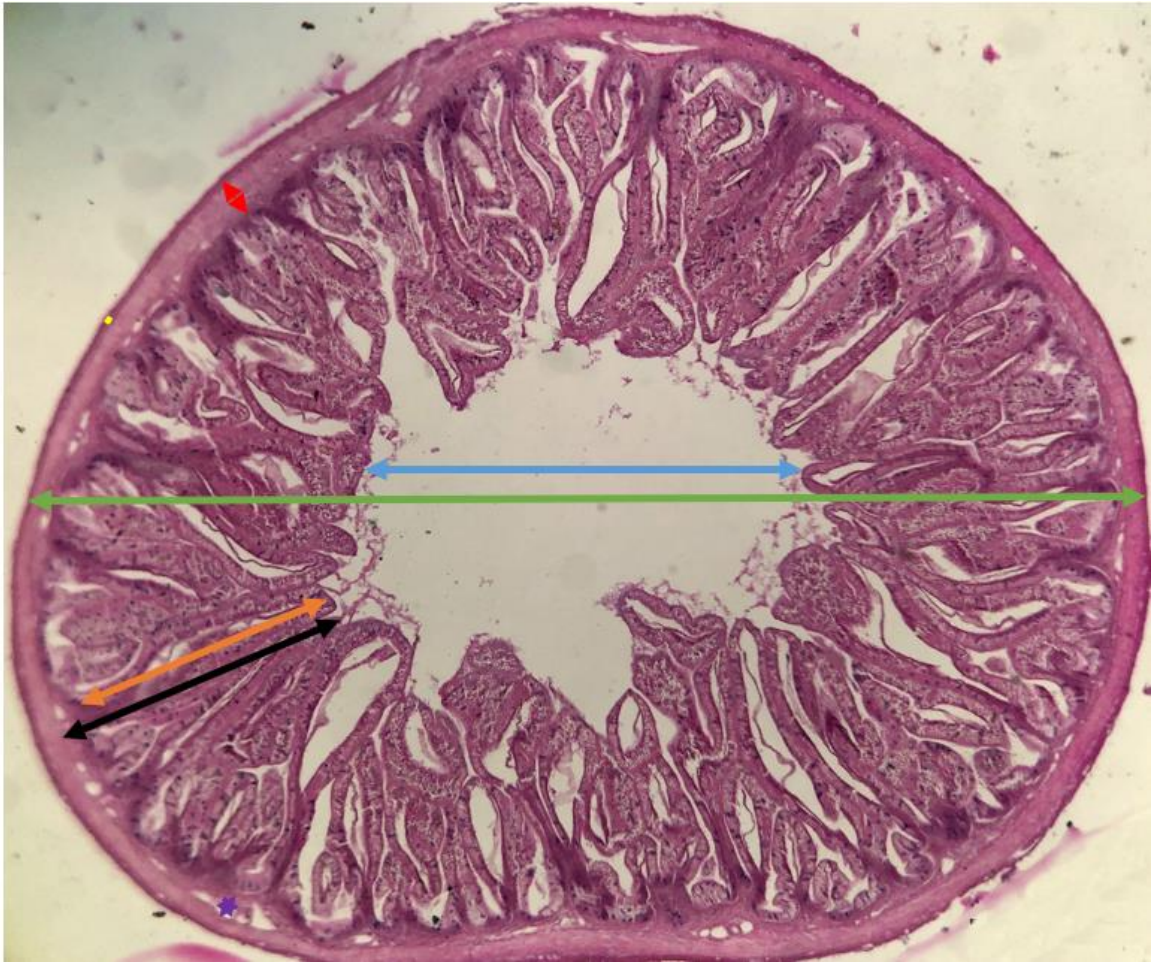
- Y finalmente las muestras se colocaron en xileno II por 11 min. (Las laminillas se mantuvieron en xileno II hasta su fijación en resina).

Concluyendo el periodo de tiempo las muestras se retiraron de la rejilla y se colocó una gota de resina, y sobre la laminilla se colocó un cubreobjetos, se dejaron secar a temperatura ambiente y se guardaron hasta su uso. Por último, los cortes de las muestras de los tejidos de *T. macdonaldi* (intestino distal e hígado) se observaron en un microscopio Axioscope a una magnificación de 5x, 10x, 40x, 100x y fueron fotografiadas con celular (iPhone modelo 8s) y un adaptador para cámara (Labcam) para su descripción. Las fotografías histológicas de intestino fueron analizadas a detalle con el programa Imagej, donde se midieron las células caliciformes, vellosidades intestinales, longitud de la serosa, muscularis, submucosa, mucosa, altura de enterocitos, longitud de la lámina propia y diámetro del intestino, en las Figuras 8 y 9 se delimitan las zonas medidas en los cortes.

#### **6.14 Análisis estadístico**

La evaluación de la normalidad de los datos se determinó con la prueba de Kolmogorov-Smirnov y para la evaluación de la homocedasticidad de los datos, se aplicó la prueba de Levene. El efecto que se presentó a partir de las dietas administradas en los juveniles de *T. macdonaldi* (ganancia de peso, crecimiento específico, ingesta de alimento, factor de conversión alimenticia, eficiencia proteica, IHS, IVS, análisis sanguíneos, composición proximal y conteo total de celular caliciformes) se evaluó con una prueba de ANOVA de una vía con un nivel de significancia de  $P < 0.05$ .

Cuando se determinaron diferencias significativas se llevó a cabo una prueba a *posteriori* Tukey para observar las diferencias entre tratamiento. Para poder realizar un análisis estadístico en las mediciones del intestino distal de los juveniles de *T. macdonaldi*, se realizó una transformación de los datos a raíz cuadrada para la evaluación de la prueba ANOVA de una vía con un nivel de significancia de  $P < 0.05$ , y cuando se determinaron diferencias significativas se llevó a cabo una prueba a *posteriori* Tukey. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software STATISTICA release 7 © Statsoft, Inc 2004.



**Figura 8.** Corte sagital transversal del intestino medio de juveniles de *Totoaba macdonaldi* alimentados durante 60 días con dietas sustitución del 20% de harina de pescado por harina de larva de mosca soldado negro *Hermetia illucens*. Objetivo 5x. **Punto amarillo:** Serosa, **Flecha roja:** Muscularis, **Punto morado:** Submucosa, **Flecha negra:** Mucosa, **Flecha anaranjada:** Velloidades intestinales, **Flecha verde:** Diámetro del intestino, **Flecha azul:** Lumen o luz intestinal.



**Figura 9.** Morfología de corte transversal del intestino medio de juveniles de *Totoaba macdonaldi* alimentados durante 60 días con dietas sustitución del 30% de harina de pescado por harina de larva de mosca soldado negro *Hermetia illucens*. Objetivo 40x. **A.** Serosa, **B.** Muscularis, **C.** Submucosa, **D.** Mucosa, **E.** Vellosidades intestinales, **F.** Lumen o luz intestinal, Flecha verde: Célula caliciforme, Flecha roja: Lamina propia, Flecha azul: Enterocito, Flecha negra; Mucus intestinal.

## 6 RESULTADOS

### 7.1 Parámetros productivos

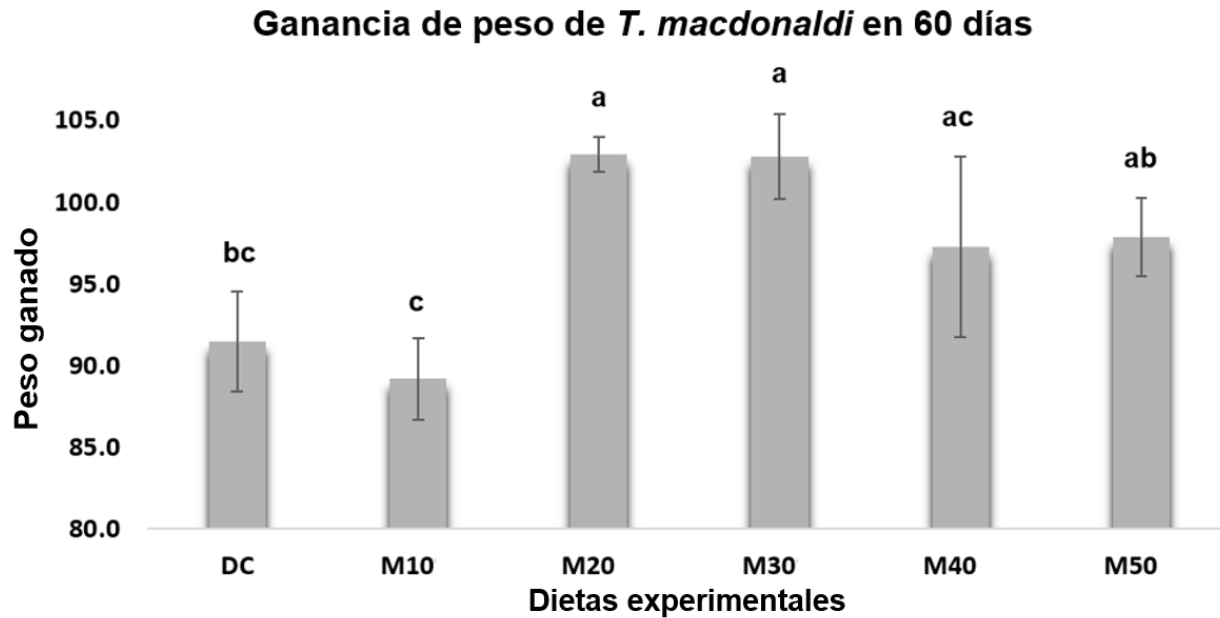
Los efectos de *T. macdonaldi* sobre la respuesta biológica al ser alimentados con HLMSN se presentan en la Tabla 4.

Al finalizar los 60 días de experimento, se obtuvieron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) en el parámetro de peso final (P. Final) en los organismos alimentados con un porcentaje de inclusión de HLMSN del 20 y 30% ( $121.87 \pm 1.01$  g y  $121.63 \pm 2.54$  g) respectivamente, teniendo un peso mayor respecto a los organismos alimentados con la dieta control a base de harina de pescado con un peso final de  $110.45 \pm 3.15$  g. En el parámetro de ganancia de peso (PG) se obtuvieron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ), donde las dietas con un porcentaje de inclusión de HLMSN del 20, 30, 40 y 50% fueron muy similares en comparación de la dieta control y la dieta con 10% de HLMSN (Figura 10), sin embargo, los organismos alimentados con 20 y 30% de HLMSN tuvieron mayor ganancia de peso ( $102.93 \pm 1.05$  g y  $102.78 \pm 2.59$  g), que los organismos alimentados con la dieta control y 10% con reemplazo parcial de HLMSN ( $91.49 \pm 3.6$  g y  $89.19 \pm 2.49$  g, respectivamente).

Otro de los parámetros donde se obtuvieron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) fue en la tasa de crecimiento específico, donde los organismos alimentados con el 20 y 30 % de HLMSN tuvieron un aumento de peso corporal/día de ( $3.15 \pm 0.02$  y  $3.16 \pm 0.03$  g) respectivamente, siendo mayor que el aumento de peso corporal que registraron los peces alimentados con la dieta control  $2.99 \pm 0.04$  g.

Por otro lado, el factor de conversión alimenticia, relación de eficiencia proteica, los índices hepatosomáticos, viscerosomáticos e ingesta de alimento no se encontraron diferencias significativas ( $P > 0.05$ ), sin embargo, los organismos alimentados con dieta control y M20 tuvieron una ingesta de alimento muy similar ( $84.39 \pm 5.93$  y  $84.67 \pm 2.44$  g/pez) respectivamente.

Es importante mencionar que la disminución del porcentaje de sobrevivencia de los organismos alimentados con las dietas M10, M20 y M30 no se le atribuye a la dieta.



**Figura 10.** Ganancia de peso de juveniles de *Totoaba macdonaldi* alimentados con diferentes niveles de harina de larva de mosca soldado negro *Hermetia illucens*, en 60 días de experimentación. superíndices distintos indican diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0.05$ ). **DC:** Dieta control, **M10:** sustitución de HLMSN con 10%, **M20:** sustitución de HLMSN con 20%, **M30:** sustitución de HLMSN con 30%, **M40:** sustitución de HLMSN con 40%, **M50:** sustitución de HLMSN con 50%. Los valores son expresados como promedio de tres réplicas por tratamiento  $\pm$  desviación estándar. Análisis ANOVA de una vía; prueba posthoc Tukey.

## 7.2 Análisis bromatológicos de tejidos

En cuanto a los análisis bromatológicos de pez entero (proteína, lípidos, cenizas y humedad), se ve una mayor tendencia en la depositación de lípidos en los organismos alimentados con las dietas M10, M20 y M30 de HLMSN a comparación de los peces alimentados con de la dieta control, sin embargo, no se obtuvieron diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) (Tabla 5) en respuesta a la incorporación de los diferentes niveles de HLMSN y HP en las dietas para juveniles de *T. macdonaldi*.

Del mismo modo, no se encontraron diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) en los análisis de proteína, lípidos, humedad y cenizas en los tejidos de músculo y vísceras.

**Tabla 4.** Parámetros de crecimiento de *Totoaba macdonaldi* alimentados con diferentes porcentajes de harina de la larva de mosca soldado negro *Hermetia illucens*, durante 60 días.

	<b>DC</b>	<b>M10</b>	<b>M20</b>	<b>M30</b>	<b>M40</b>	<b>M50</b>
<b>P. Inicial</b>	18.49 ± 0.10	18.94 ± 0.09	18.95 ± 0.07	18.85 ± 0.11	18.95 ± 0.03	18.87 ± 0.08
<b>P. Final</b>	110.45 ± 3.15 <sup>b</sup>	108.13 ± 2.40 <sup>b</sup>	121.87 ± 1.01 <sup>a</sup>	121.63 ± 2.54 <sup>a</sup>	116.23 ± 5.54 <sup>ab</sup>	116.74 ± 2.31 <sup>ab</sup>
<b>PG</b>	91.49 ± 3.6 <sup>bc</sup>	89.19 ± 2.49 <sup>c</sup>	102.93 ± 1.05 <sup>a</sup>	102.78 ± 2.59 <sup>a</sup>	97.28 ± 5.53 <sup>ac</sup>	99.65 ± 2.38 <sup>ab</sup>
<b>%PG</b>	482.51	470.89	543.28	545.11	513.41	528.07
<b>TCE</b>	2.99 ± 0.04 <sup>bc</sup>	2.95 ± 0.05 <sup>c</sup>	3.15 ± 0.02 <sup>a</sup>	3.16 ± 0.03 <sup>a</sup>	3.07 ± 0.08 <sup>ac</sup>	3.11 ± 0.04 <sup>ab</sup>
<b>IA</b>	84.39 ± 5.93	81.00 ± 8.28	84.67 ± 2.44	81.59 ± 3.66	79.98 ± 7.33	78.90 ± 3.02
<b>FCA</b>	1.31 ± 0.06	1.33 ± 0.15	1.44 ± 0.05	1.49 ± 0.03	1.45 ± 0.07	1.50 ± 0.06
<b>REP</b>	2.17 ± 0.07	2.20 ± 0.20	2.43 ± 0.07	2.52 ± 0.04	2.43 ± 0.09	2.53 ± 0.09
<b>%S</b>	100.00	91.11	97.78	95.56	100.00	100.00
<b>IHS</b>	2.18 ± 0.13	2.06 ± 0.27	2.26 ± 0.22	2.15 ± 0.18	1.96 ± 0.01	2.18 ± 0.13
<b>IVS</b>	5.05 ± 0.62	5.69 ± 0.87	6.22 ± 1.17	5.79 ± 0.47	5.96 ± 0.90	6.32 ± 0.65

Peso inicial g (**P. Inicial**), Peso final g (**P. Final**), peso ganado g (**PG**), porcentaje de peso ganado (**%PG**), tasa de crecimiento específico % pez-1 día-1 (**TCE**), ingesta de alimento g/pez (**IA**), factor de conversión alimenticia g pez -1 día-1 (**FCA**), relación de eficiencia proteica (**REP**), porcentaje de sobrevivencia (**%S**), índice hepatosomático (**IHS**), índice viscerosomático (**IVS**). **DC**: Dieta control, **M10**: sustitución de HLMSN con 10%, **M20**: sustitución de HLMSN con 20%, **M30**: sustitución de HLMSN con 30%, **M40**: sustitución de HLMSN con 40%, **M50**: sustitución de HLMSN con 50%. Los valores son expresados como promedio de tres réplicas ± desviación estándar. Las letras distintas en los superíndices en la misma línea indican diferencias estadísticamente significativas (P<0.05) entre tratamientos. Análisis ANOVA de una vía; prueba posthoc Tuckey.

**Tabla 5.** Análisis bromatológicos de pez entero, músculo, vísceras e hígado de juveniles de *Totoaba macdonaldi* dietas con diferentes niveles de sustitución de harina de pescado por HLMSN *Hermetia illucens*.

PEZ ENTERO						
%	DC	M10	M20	M30	M40	M50
<b>Humedad</b>	2.75±0.8	2.15±0.2	2.21±0.9	2.8±0.1	2.05±0.8	2.40±0.6
<b>Cenizas</b>	14.26±0.5	13.72±0.2	13.72±0.1	12.94±0.3	13.98±0.4	13.41±0.8
<b>Lípidos</b>	15.87±0.2	17.15±1.5	16.98±0.7	16.27±1.9	15.03±1.5	15.37±1.7
<b>Proteínas</b>	66.92±0.6	66.21±0.1	66.47±1.1	66.95±1.7	67.47±0.9	67.25±0.8
MÚSCULO						
<b>Humedad</b>	3.48±.08	3.23±0.2	3.79±0.2	3.44±0.5	3.05±0.5	3.08±0.8
<b>Cenizas</b>	5.93±0.1	5.83±0.2	5.81±0.1	5.87±0.1	5.96±0.1	5.67±0.4
<b>Lípidos</b>	5.78±.06	5.73±0.1	5.84±0.1	5.83±.05	5.80±.07	5.80±1.0
<b>Proteínas</b>	84.08±0.9	82.88±1.2	84.13±1.4	84.91±1.0	83.63±2.1	83.31±0.7
VÍSCERAS						
<b>Humedad</b>	3.19±0.6	3.58±0.4	3.42±0.6	4.35±0.9	5.18±1.5	4.44±0.3
<b>Cenizas</b>	5.80±0.1	5.82±0.0	5.93±0.4	5.51±0.5	6.05±0.5	6.02±0.2
<b>Lípidos</b>	19.92±0.7	18.75±0.8	17.95±1.7	18.31±1.2	17.68±1.6	18.43±1.3
<b>Proteína</b>	66.54±1.1	69.02±2.2	67.91±2.3	67.64±1.6	68.06±2.0	68.82±1.2
HÍGADO						
<b>Humedad</b>	5.69±0.5 <sup>b</sup>	5.41±0.7 <sup>b</sup>	3.9±0.3 <sup>a</sup>	4.64±0.1 <sup>ba</sup>	5.05±0.4 <sup>ba</sup>	5.41±0.5 <sup>b</sup>
<b>Cenizas</b>	2.79±0.3	2.68±0.1	2.76±0.1	2.69±0.2	2.76±0.1	2.16±0.3
<b>Lípidos</b>	39.96±2.3 <sup>a</sup>	42.17±4.8 <sup>ab</sup>	46.79±3.3 <sup>ab</sup>	46.71±3.9 <sup>ab</sup>	47.27±2.8 <sup>ab</sup>	49.14±1.7 <sup>b</sup>
<b>Proteínas</b>	28.78±0.5	28.95±0.9	28.24±1.9	28.51±1.0	27.23±1.8	27.40±2.5

**DC:** Dieta control, **M10:** sustitución de HLMSN con 10%, **M20:** sustitución de HLMSN con 20%, **M30:** sustitución de HLMSN con 30%, **M40:** sustitución de HLMSN con 40%, **M50:** sustitución de HLMSN con 50%. Los valores representan las medias ± desviación estándar. Los valores son expresados como promedio de tres réplicas ± desviación estándar. Las letras distintas en los superíndices en la misma línea indican diferencias estadísticamente significativos (P<0.05) entre tratamientos. Análisis ANOVA de una vía; prueba posthoc Tuckey.

Los hígados no presentaron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) de la humedad del tejido entre tratamientos, siendo los organismos alimentados con la dieta M20 con el hígado con menor porcentaje de humedad ( $3.9 \pm 0.3$ ) en comparación con resto de los tratamientos.

Con respecto a la concentración de lípidos en los hígados de los juveniles de totoaba, hubo diferencias significativas entre tratamiento ( $P < 0.05$ ) donde los organismos alimentados con la dieta control presentaron una concentración menor de lípidos ( $39.96 \pm 2.3$ ), a medida que se incrementó la proteína de MSN en las dietas experimentales hubo una tendencia a mayor depositación de estos en el hígado de los organismos, de modo que los organismos alimentados con la dieta M50 fueron los tejidos con mayor porcentaje de lípidos ( $49.14 \pm 1.7$ ). En cuanto al porcentaje de cenizas y humedad de hígado no se obtuvieron diferencias significativas ( $P > 0.05$ ).

### **7.3 Contenido de ácidos grasos**

#### **7.3.1 Dietas experimentales**

En el análisis del perfil de ácidos grasos de las dietas experimentales se muestran en la Tabla 6, donde se observa que el ácido láurico (C12:0) solo se identificó en las dietas con HLMSN como fuente proteica, incrementando su concentración conforme se aumentó el porcentaje de inclusión de HLMSN en las dietas para juveniles de *T. macdonaldi*, siendo la dieta con sustituto parcial del 50% con más concentración de este ácido graso con  $7.50 \text{ mg AG}^* \text{ g dieta}^{-1}$ . Otro de los ácidos grasos que tuvieron una tendencia de menor a mayor concentración conforme se sustituía parcialmente la HLMSN fue el ácido mirístico (C14:0), donde los resultados muestran que la DC obtuvo una concentración de  $1.28 \text{ mg AG}^* \text{ g dieta}^{-1}$ , en cambio la dieta M50 obtuvo una concentración de  $5.80 \text{ mg AG}^* \text{ g dieta}^{-1}$ .

En general, el total de ácidos grasos saturados ( $\Sigma\text{AGS}$ ) en las dietas experimentales, tuvieron una tendencia a mayor concentración conforme se sustituía parcialmente la HLMSN, donde los rangos fluctuaron entre  $13.16 \text{ mg AG}^* \text{ g dieta}^{-1}$  en la dieta control y  $30.28 \text{ mg AG}^* \text{ g dieta}^{-1}$  en la dieta M50.

En cuanto al total de ácidos grasos monoinsaturados ( $\Sigma$ MUFAS) las dietas experimentales M10, y M20 mantuvieron sus concentraciones de manera similar (5.27 y 5.54 mg AG\* g dieta<sup>-1</sup>) respectivamente, a comparación de las dietas M30, M40 y M50 donde los valores de ácidos grasos monoinsaturados aumentaron (6.07, 6.18, 6.53 mg AG\* g dieta<sup>-1</sup>, sin embargo, el total de los ácidos monoinsaturados de las dietas experimentales fueron mayores que el  $\Sigma$ MUFAS de la dieta control (4.18 mg AG\* g dieta<sup>-1</sup>).

**Tabla 6.** Perfil de ácidos grasos de dietas con diferentes niveles de sustitución de harina de pescado por harina de larva de mosca soldado negro *Hermetia illucens*, para juveniles de *Totoaba macdonaldi* (mg AG\*g dieta<sup>-1</sup>).

<b>AGs</b>	<b>DC</b>	<b>M10</b>	<b>M20</b>	<b>M30</b>	<b>M40</b>	<b>M50</b>
C12:0	NID	0.63	2.09	4.08	5.94	7.50
C13:0	3.02	3.46	3.68	3.93	3.92	3.95
C14:0	1.28	2.39	3.02	4.49	5.59	5.80
C16:0	6.19	7.05	7.18	8.02	8.40	8.54
C18:0	0.95	1.08	1.08	1.09	1.08	1.09
C21:0	3.14	2.97	2.98	3.42	3.44	3.51
<b><math>\Sigma</math>SFA</b>	<b>13.16</b>	<b>17.57</b>	<b>20.04</b>	<b>25.04</b>	<b>28.37</b>	<b>30.28</b>
C16:1N7	0.68	0.63	0.76	1.11	1.29	1.20
C18:1N9T	3.50	4.65	4.78	4.96	4.88	5.33
<b><math>\Sigma</math>MUFAS</b>	<b>4.18</b>	<b>5.27</b>	<b>5.54</b>	<b>6.07</b>	<b>6.18</b>	<b>6.53</b>
C18:2N6	8.59	7.69	7.13	6.51	5.51	5.04
C18:3N3	0.31	0.24	0.18	0.07	NID	NID
C22:6N3	10.81	10.04	9.44	9.57	8.64	6.70
<b><math>\Sigma</math>PUFAS</b>	<b>19.71</b>	<b>17.97</b>	<b>16.75</b>	<b>16.15</b>	<b>14.14</b>	<b>13.04</b>

**NID:** No identificado, **C12:0:** Ácido Láurico, **C13:0:** Ácido Tridecílico, **C14:0:** Ácido Mirístico, **C16:0:** Ácido Palmítico, **C18:0:** Ácido Esteárico, **C21:0:** Ácido Heneicosanóico,  **$\Sigma$ AGS:** sumatoria de ácidos grasos saturados, **C16:1N7:** Ácido Palmitoleico, **C18:1N9:** Ácido Eláidico,  **$\Sigma$ MUFAS:** Sumatoria de ácidos grasos monoinsaturados, **C18:2N6:** Ácido linoleico, **C18:3N3:** Ácido linolénico, **C22:6N3:**Ácido docosahexaenoico (DHA),  **$\Sigma$ PUFAS:** Sumatoria de ácidos grasos poliinsaturados, **DC:** Dieta control, **M10:** sustitución de HLMSN con 10%, **M20:** sustitución de HLMSN con 20%, **M30:** sustitución de HLMSN con 30%, **M40:** sustitución de HLMSN con 40%, **M50:** sustitución de HLMSN con 50%.

En lo que respecta a los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAS), el ácido linolénico (C18:3N3) no se identificó en las dietas M40 y M50; por el contrario, este ácido graso se identificó en las dietas DC, M10, M20, M30, sin embargo, se identificó en concentraciones muy bajas (0.31, 0.24, 0.18 y 0.07 mg AG\* g dieta<sup>-1</sup>, respectivamente).

El DHA (C22:6N3) tuvo una mayor concentración en la dieta control (10.81 mg AG\* g dieta<sup>-1</sup>), y conforme se añadió la proteína de harina de mosca soldado en las dietas, la concentración disminuyó (6.70 mg AG\* g dieta<sup>-1</sup>) en la dieta M50.

En resumen, el total de ΣPUFAS fue mayor la concentración en las dietas DC y M10 (19.71 y 17.97 70 mg AG\* g dieta<sup>-1</sup>), a comparación de la dieta M40 y M50 (14.14 y 113.04 mg AG\* g dieta<sup>-1</sup>, respectivamente), disminuyendo su concentración.

### **7.3.2 Músculo**

Los resultados del análisis del perfil de ácidos grasos de músculo de los juveniles de totoaba alimentados con diferentes niveles de HLMSN se muestran en resumen en la Tabla 7, en la cual indica que la ΣAGS presentaron una variación en las concentraciones entre músculos de organismos alimentados con DC y dieta M50 (10.53 y 12.34 mg AG\* g musculo<sup>-1</sup>), observando que las concentraciones de los ácidos grasos saturados aumentan conforme se integra la HLMSN en la dieta de los organismos. El ácido palmítico (C16:0) se encontró con una disminución en la concentración de este ácido graso en el tejido conforme se sustituía la HLMSN, encontrándose con mayor cantidad en los tejidos de los juveniles alimentados con la dieta control con 5.99 mg AG\*g musculo<sup>-1</sup>, y en menor cantidad en el musculo de los organismos alimentados con M50 con 4.07 mg AG\*g musculo<sup>-1</sup>.

De forma contraria el ácido mirístico, esteárico y heneicosanóico aumentaron sus concentraciones en el músculo de los organismos, es decir, los músculos de los organismos alimentados con dieta control fueron los de menor concentración y los músculos de los organismos alimentados con las dietas M50 fueron los de mayor concentración de estos ácidos grasos.

En cuanto al  $\Sigma$ MUFAS, los valores se mantuvieron de manera muy similar entre grupos, los cuales los rangos oscilaron entre 4.84 y 3.56 mg AG\*g músculo<sup>-1</sup>, siendo los músculos de los organismos alimentados con la dieta M50 los de menor concentración. Por último, en los organismos alimentados con la dieta M20 y M30 de HLMSN mantuvieron los niveles de DHA (C22:6N3), donde los valores fluctuaron entre 7.68 y 7.36 mg AG\*g músculo<sup>-1</sup>; cabe señalar que los tejidos de músculo de los organismos alimentados con la dieta control fueron los valores más altos de DHA con 10.00 mg AG\*g músculo<sup>-1</sup>.

El  $\Sigma$ PUFAS se concentraron en mayor cantidad en los organismos alimentados con la DC y M10 (15.21 y 13.65 mg AG\*g músculo<sup>-1</sup>), mientras que los valores más bajos se mostraron en los tejidos de los organismos que se alimentaron con una sustitución parcial de HLMSN del 20 y 50% (10.00 y 9.57 mg AG\*g músculo<sup>-1</sup>) respectivamente.

### **7.3.3 Hígado**

El resumen del perfil de ácidos grasos se muestra en la Tabla 8. En cuanto al perfil de AGS en el hígado de los peces, se pudo observar que el ácido láurico (C12:0) no se identificó en la dieta control ni en la dieta M10, y las concentraciones de este mismo ácido fue en aumento conforme se adicionó mayormente porcentaje de la HLMSN. Esta misma tendencia se vio reflejada en los demás AGS a excepción del ácido graso tridecílico (C13:0) el cual se observó un rango similar en todos los tratamientos experimentales (4.95-5.54 mg AG\*g hígado<sup>-1</sup>).

En general, el  $\Sigma$ AGS se obtuvo en menor concentración en la dieta control (79.47 mg AG\*g hígado<sup>-1</sup>), y a partir de este grupo experimental los hígados de los peces acumularon mayores concentraciones de AGS debido al reemplazo parcial de la harina de pescado por la HLMSN, obteniendo en el grupo M50 una concentración de (153.84 mg AG\*g hígado<sup>-1</sup>).

**Tabla 7.** Perfil de ácidos grasos de músculo de juveniles de *Totoaba macdonaldi* alimentados con dietas con diferentes niveles de sustitución de harina de pescado por harina de larva de mosca soldado negro *Hermetia illucens* (mg AG\*g músculo<sup>-1</sup>).

<b>AGs</b>	<b>DC</b>	<b>M10</b>	<b>M20</b>	<b>M30</b>	<b>M40</b>	<b>M50</b>
C13:0	2.42	2.44	2.46	2.53	2.86	3.19
C14:0	0.25	0.28	0.36	0.88	0.92	1.07
C16:0	5.99	5.72	5.44	5.55	5.02	5.07
C18:0	0.55	0.58	0.72	0.85	0.98	1.08
C21:0	1.33	1.50	1.58	1.69	1.80	1.94
<b>ΣSFA</b>	<b>10.53</b>	<b>10.52</b>	<b>10.56</b>	<b>11.50</b>	<b>11.59</b>	<b>12.34</b>
C16:1N7	0.44	0.36	0.31	0.29	0.30	0.30
C18:1N9	4.39	4.21	4.15	4.08	3.63	3.26
<b>ΣMUFAS</b>	<b>4.84</b>	<b>4.48</b>	<b>4.47</b>	<b>4.38</b>	<b>3.94</b>	<b>3.56</b>
C18:2N6	5.21	5.15	4.95	4.27	3.29	3.20
C22:6N3	10.00	8.50	7.68	7.36	6.71	6.38
<b>ΣPUFAS</b>	<b>15.21</b>	<b>13.65</b>	<b>12.63</b>	<b>11.63</b>	<b>10.00</b>	<b>9.57</b>

**C13:0:** Ácido Tridecílico, **C14:0:** Ácido Mirístico, **C16:0:** Ácido Palmítico, **C18:0:** Ácido Estearico, **C21:0:** Ácido Heneicosanóico, **ΣAGS:** sumatoria de ácidos grasos saturados, **C16:1N7:** Ácido Palmitoleico, **C18:1N9:** Ácido Eláidico, **ΣMUFAS:** Sumatoria de ácidos grasos monoinsaturados, **C18:2N6:** Ácido linoleico, **C18:3N3:** Ácido linolénico, **C22:6N3:**Ácido docosahexaenoico (DHA), **ΣPUFAS:** Sumatoria de ácidos grasos poliinsaturados, **DC:** Dieta control, **M10:** sustituto de HLMSN con 10%, **M20:** sustituto de HLMSN con 20%, **M30:** sustituto de HLMSN con 30%, **M40:** sustituto de HLMSN con 40%, **M50:** sustituto de HLMSN con 50%.

En cuanto a los MUFAS, se observó un aumento en la concentración del ácido mistoleico (C14:1) al incorporar una mayor concentración de HLMSN en las dietas de totoaba. El ácido Palmitoleico (C16:1N7) disminuyó su concentración gradualmente por lo que los hígados de los peces alimentados con la dieta M50 fueron los que tuvieron una menor concentración (3.32 mg AG\*g hígado<sup>-1</sup>) con respecto a la dieta control, igualmente se observó la misma tendencia en los MUFAS (C18:1N7, C24:1N9).

De manera contraria a la ΣAGS, en la ΣMUFAS se observó en menor concentración en los hígados de los organismos alimentados con la dieta M50 con una concentración de (46.22 mg AG\*g hígado<sup>-1</sup>), mientras que las mayores concentraciones

de MUFAS en los hígados de los organismos alimentados con la dieta control y dieta M10 (63.96 y 57.97 mg AG\*g hígado<sup>-1</sup>, respectivamente).

Finalmente, en lo que respecta a los PUFAS, se observó una mayor concentración de ácido linoleico en los hígados de los organismos alimentados con la dieta control (42.92 mg AG\*g hígado<sup>-1</sup>), observando una disminución en concentración de este ácido graso en los hígados de los organismos alimentados con la M50 (29.52 mg AG\*g hígado<sup>-1</sup>). Por otro lado, el ácido estearidónico (C18:4N3) no se identificó en los hígados de los organismos alimentados con las dietas control M10 y M20, y de manera contraria el ácido eicosatrienoico (C20:3N3) no se identificó en los hígados de los organismos alimentados con la dieta M20, M30, M40 y M50.

En cuanto al ácido araquidónico (C20:4N6) se pudo observar una mayor concentración en los hígados del grupo alimentado con la dieta M50 (1.80 mg AG\*g hígado<sup>-1</sup>), pero la concentración más baja fue en los hígados del grupo alimentado con la dieta control con una concentración de (0.23 mg AG\*g hígado<sup>-1</sup>). La concentración del EPA en los hígados de los peces alimentados con las dietas M10, M20 y M30 fueron similares (8.06, 8.26 y 8.08 mg AG\*g hígado<sup>-1</sup>) respectivamente, pero fueron menores respecto a los hígados de totoaba alimentados con la dieta control (10.82 mg AG\*g hígado<sup>-1</sup>), y los hígados con menor concentración de este ácido graso fueron los del tratamiento M50 (7.44 mg AG\*g hígado<sup>-1</sup>). Otro de los ácidos grasos de mayor importancia fue el DHA, el cual se observó que las concentraciones disminuyeron conforme se reemplazó la harina de pescado por harina de larva de mosca soldado en las dietas de totoaba, obteniendo una mayor concentración en el grupo de la dieta control (55.86 mg AG\*g hígado<sup>-1</sup>) y una menor en el grupo experimental M50 (30.98 mg AG\*g hígado<sup>-1</sup>). En general la concentración de ΣPUFAS se vio afectada por la sustitución parcial de harina de pescado por HLMSN, observando una mayor concentración de PUFAS en los hígados de totoaba alimentados con la dieta control (114.35 mg AG\*g hígado<sup>-1</sup>), y una concentración menor de PUFAS en los hígados de los peces del grupo M50 (71.81 mg AG\*g hígado<sup>-1</sup>).

**Tabla 8.** Perfil de ácidos grasos del hígado de juveniles de *Totoaba macdonaldi* alimentados con dietas con diferentes niveles de sustitución de harina de pescado por harina de larva de mosca soldado negro *Hermetia illucens* (mg AG\*g hígado<sup>-1</sup>).

<b>AGs</b>	<b>DC</b>	<b>M10</b>	<b>M20</b>	<b>M30</b>	<b>M40</b>	<b>M50</b>
C12:0	NID	NID	0.98	1.59	4.27	5.41
C13:0	5.05	5.09	4.95	5.13	5.47	5.54
C14:0	9.54	11.66	14.14	14.01	23.80	28.64
C16:0	49.40	48.71	54.58	58.42	69.68	70.29
C18:0	15.48	15.61	20.45	32.98	39.55	39.00
C24:0	NID	NID	NID	2.14	4.63	4.95
<b>ΣSFA</b>	<b>79.47</b>	<b>81.07</b>	<b>95.09</b>	<b>114.28</b>	<b>147.41</b>	<b>153.84</b>
C14:1	0.41	0.42	0.43	0.45	0.43	0.50
C16:1N7	13.31	11.15	9.75	7.68	5.07	3.32
C18:1N7	2.51	1.91	1.90	1.79	1.67	1.64
C18:1N9	42.72	40.30	38.65	39.59	35.77	34.38
C20:1N9	3.83	3.27	3.86	4.25	4.73	5.74
C24:1N9	1.18	0.93	0.84	0.81	0.75	0.64
<b>ΣMUFA</b>	<b>63.96</b>	<b>57.97</b>	<b>55.42</b>	<b>54.56</b>	<b>48.43</b>	<b>46.22</b>
C18:2N6	42.92	40.07	38.61	33.72	30.76	29.52
C18:4N3	NID	NID	NID	0.75	1.0	1.02
C18:3N3	3.28	3.26	3.13	2.18	1.38	0.92
C20:2	0.87	0.71	0.73	0.63	0.30	0.13
C20:3N3	0.38	0.18	NID	NID	NID	NID
C20:4N6	0.23	0.38	0.61	0.70	1.38	1.80
C20:5N3	10.82	8.06	8.26	8.08	7.91	7.44
C22:6N3	55.86	39.19	37.32	32.97	33.29	30.98
<b>ΣPUFAS</b>	<b>114.35</b>	<b>91.85</b>	<b>88.63</b>	<b>79.03</b>	<b>76.02</b>	<b>71.81</b>

**NID:** No identificado, **C12:0** Ácido Láurico, **C13:0** Ácido Tridecílico, **C14:0** Ácido Mirístico, **C16:0** Ácido Palmítico, **C18:0** Ácido Esteárico, **C24:0** Ácido Lignocérico, **ΣAGS:** sumatoria de ácidos grasos saturados, **C14:1** Ácido Mistoleico, **C16:1N7** Ácido palmitoleico, **C18:1N7** Ácido cis-Vaccenico, **C18:1N9** Ácido Oleico, **C20:1N9** Ácido Eicosenoico, **C24:1N9** Ácido Nervónico, **ΣMUFA:** Sumatoria de ácidos grasos monoinsaturados, **C18:2N6C** Ácido linoleico, **C18:4N3** Ácido Estearidonico, **C18:3N3** Ácido linolénico, **C20:2** Ácido eicosadienoico, **C20:3N3** Ácido Eicosatrienoico, **C20:4N6** Ácido Araquidónico, **C20:5N3** Ácido Timnodónico (EPA), **C22:6N3** Ácido Cervónico (DHA), **ΣPUFAS:** Sumatoria de ácidos grasos poliinsaturados, **DC:** Dieta control, **M10:** sustitución de HLMSN con 10%, **M20:** sustitución de HLMSN con 20%, **M30:** sustitución de HLMSN con 30%, **M40:** sustitución de HLMSN con 40%, **M50:** sustitución de HLMSN con 50%.

#### **7.4 Parámetros hematológicos y bioquímica sanguínea**

Al finalizar el bioensayo se obtuvieron los resultados hematológicos de los juveniles de totoaba la cual se resume en la Tabla 9, donde se muestra que la inclusión de HLMSN en las dietas de los organismos alimentados durante 60 días, no afectó los valores hematológicos ( $P>0.05$ ) es decir, el porcentaje de hematocrito ni en los valores de hemoglobina. Sin embargo, a pesar de no ver diferencias significativas se puede observar que los organismos alimentados con dieta control y M10 tuvieron un porcentaje de hematocrito más bajo (22.0%) a comparación de las demás dietas experimentales, siendo los organismos alimentados con la dieta M50 con mayor porcentaje ( $25.6 \pm 2.9\%$ ). Así mismo, se pudo observar que el aumento de HLMSN en las dietas, no mostró cambios significativos ( $P>0.05$ ) en la proteína total y albumina en el plasma de los juveniles de totoaba.

Por otro lado, obtuvimos diferencias significativas ( $P<0.05$ ) en los valores de glucosa en el plasma de los organismos de los diferentes tratamientos, se pudo observar que los organismos alimentados con la dieta control tuvieron los valores más bajos de glucosa ( $39.7 \pm 0.6 \text{ mg dL}^{-1}$ ) en plasma, y a medida que se incorporó el ingrediente proteico de HLMSN en las dietas de los organismos, los niveles de glucosa en plasma aumentaron, por lo que los organismos alimentados con la dieta M50 obtuvieron los valores más altos de glucosa ( $57.2 \pm 0.5 \text{ mg dL}^{-1}$ ) en plasma, a pesar de no ver una tendencia marcada, estadísticamente hablamos que los tratamientos M10, M20, M30 y M40 son iguales.

También se obtuvieron diferencias significativas ( $P<0.05$ ) en la concentración plasmática de colesterol de los organismos de los diferentes tratamientos experimentales. Las concentraciones más altas fueron encontradas en los peces alimentados con la dieta control y M20 ( $163.5 \pm 1.1$  y  $164.9 \pm 2.1 \text{ mg dL}^{-1}$ ) respectivamente, sin embargo, los valores fueron estadísticamente iguales a la de los organismos alimentados con las dietas M10 y M30, pero los niveles de colesterol en plasma de los juveniles de totoaba disminuyeron significativamente ( $P<0.05$ ) cuando se reemplazó la HLMSN en porcentajes de 40 y 50% en la dieta de los organismos ( $135.9 \pm 1.8$  y  $142.3 \pm 5.9 \text{ mg dL}^{-1}$ , respectivamente).

**Tabla 9.** Hematología y bioquímica sanguínea de juveniles de *Totoaba macdonaldi* alimentados con dietas con diferentes niveles de sustitución de harina de pescado por harina de larva de mosca soldado negro *Hermetia illucens*

	<b>DC</b>	<b>M10</b>	<b>M20</b>	<b>M30</b>	<b>M40</b>	<b>M50</b>
<b>%HT</b>	22.0 ± 3.7	22.0 ± 2.2	22.7 ± 2.5	23.9 ± 0.4	25.8 ± 0.6	25.6 ± 2.9
<b>HM</b>	6.1 ± 0.7	5.6 ± 1.1	5.2 ± 0.4	6.0 ± 1.0	5.2 ± 0.3	6.0 ± .06
<b>PROT</b>	3.2 ± 0.5	3.7 ± 1.0	3.5 ± 1.0	3.8 ± 0.2	3.5 ± 0.1	3.8 ± 0.3
<b>ALB</b>	0.6 ± .07	0.8 ± 0.1	0.7 ± .09	0.6 ± .07	0.5 ± .04	0.6 ± .01
<b>GLU</b>	39.7 ± 0.6 <sup>a</sup>	53.1 ± 2.5 <sup>b</sup>	53.4 ± 9.5 <sup>b</sup>	46.4 ± 1.6 <sup>b</sup>	51.2 ± 1.7 <sup>b</sup>	57.2 ± 0.5 <sup>c</sup>
<b>COL</b>	163.5 ± 1.1 <sup>b</sup>	162.4 ± 1.6 <sup>b</sup>	164.9 ± 2.1 <sup>b</sup>	161.6 ± 0.5 <sup>b</sup>	135.9 ± 1.8 <sup>a</sup>	142.3 ± 5.9 <sup>a</sup>

Porcentaje de hematocrito (**%HT**), Hemoglobina (**HM**) (g dL<sup>-1</sup>) Proteínas totales (**PROT**) (g dL<sup>-1</sup>), Albumina (**ALB**) (g dL<sup>-1</sup>), Glucosa (**GLU**) (mg dL<sup>-1</sup>), Colesterol (**COL**) (mg dL<sup>-1</sup>). \*Análisis ANOVA de una vía. **DC**: Dieta control, **M10**: sustitución de HLMSN con 10%, **M20**: sustitución de HLMSN con 20%, **M30**: sustitución de HLMSN con 30%, **M40**: sustitución de HLMSN con 40%, **M50**: sustitución de HLMSN con 50%. Los valores son expresados como promedio de tres réplicas ± desviación estándar. Las letras distintas en los superíndices en la misma línea indican diferencias estadísticamente significativos (P<0.05) entre tratamientos. Análisis ANOVA de una vía; prueba posthoc Tuckey.

## 7.5 Histología

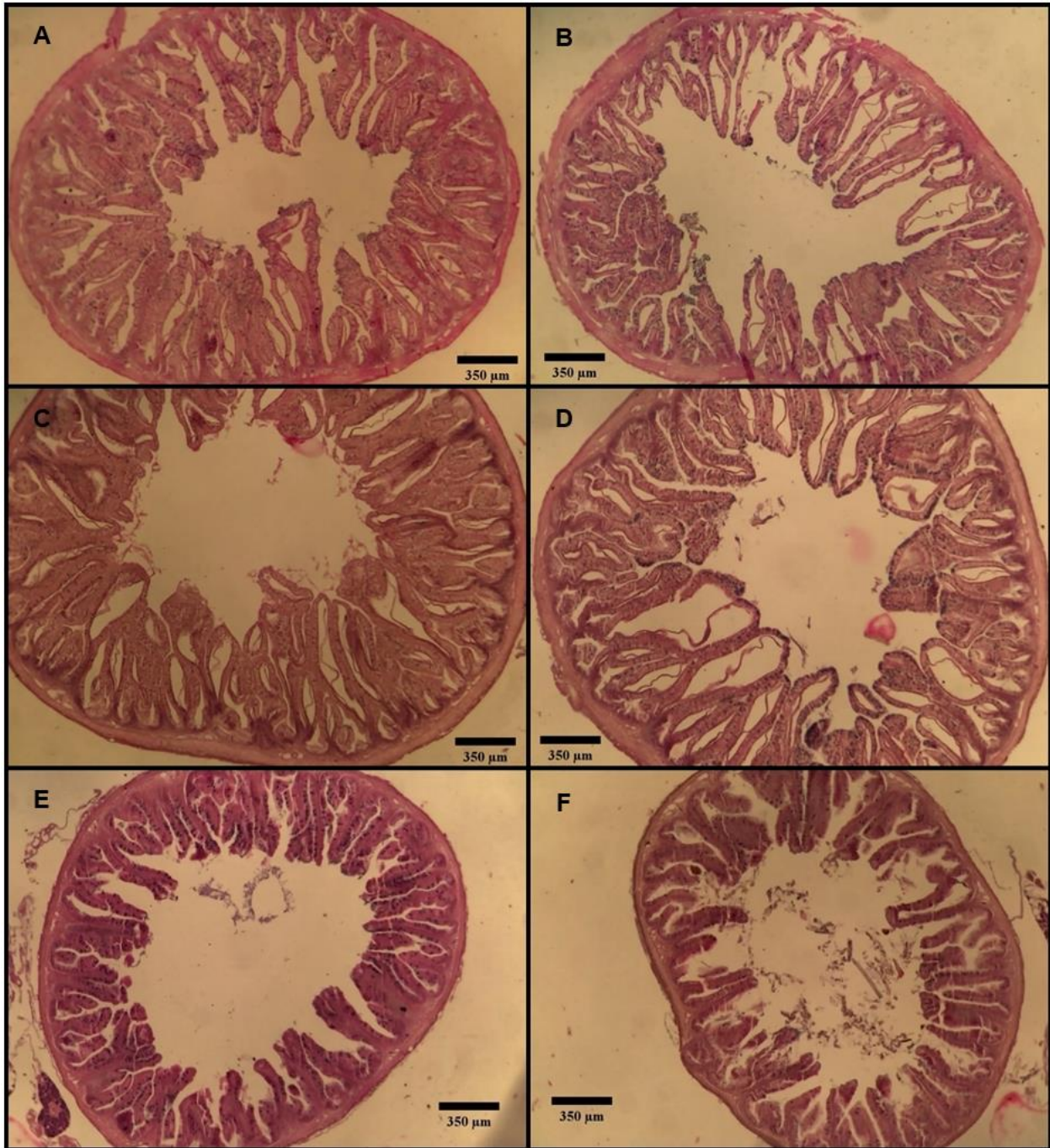
### 7.5.1 intestinal

Los resultados de las medidas morfológicas del intestino distal de los organismos alimentados con dieta control y dietas con diferentes niveles de HLMSN, durante 60 días de experimento se resumen en la Tabla 10, en donde cada una de las mediciones realizadas fueron significativas ( $P < 0.05$ ).

**Tabla 10.** Análisis histológico de intestino distal de juveniles de *Totoaba macdonaldi* alimentados con dietas con diferentes niveles de sustitución de harina de pescado por harina de larva de mosca soldado negro *Hermetia illucens*, durante 60 días de experimento.

	DC	M10	M20	M30	M40	M50
<b>Anch-Ser</b>	15.17±1.6 <sup>a</sup>	21.71±2.9 <sup>cd</sup>	19.09±1.3 <sup>b</sup>	19.99±1.9 <sup>bc</sup>	32.36±2.8 <sup>de</sup>	25.96±1.6 <sup>e</sup>
<b>Anch-Mus</b>	36.24±3.0 <sup>a</sup>	37.70±3.9 <sup>a</sup>	49.19±4.2 <sup>b</sup>	49.82±4.2 <sup>b</sup>	37.34±6.4 <sup>a</sup>	39.57±4.0 <sup>a</sup>
<b>AnchSubM</b>	43.17±6.4 <sup>a</sup>	32.33±4.7 <sup>b</sup>	42.80±3.7 <sup>a</sup>	44.11±2.7 <sup>a</sup>	42.30±7.0 <sup>a</sup>	40.85±4.1 <sup>a</sup>
<b>Anch-Muc</b>	717.9±77.0 <sup>b</sup>	731.8±64.7 <sup>b</sup>	853.3±64.2 <sup>a</sup>	879.5±78.1 <sup>a</sup>	567.2±41.7 <sup>c</sup>	614.3±73.4 <sup>c</sup>
<b>Long-Vell</b>	618.7±113.8 <sup>b</sup>	735.6±59.6 <sup>a</sup>	840.8±78.0 <sup>a</sup>	844.6±94.0 <sup>a</sup>	492.8±44.3 <sup>c</sup>	485.8±44.7 <sup>c</sup>
<b>Alt-Ent</b>	42.11±3.7 <sup>ab</sup>	38.37±1.6 <sup>bc</sup>	37.05±3.3 <sup>c</sup>	43.05±2.3 <sup>a</sup>	42.10±2.8 <sup>ab</sup>	46.0±3.0 <sup>a</sup>
<b>Alt-Ccal</b>	14.05±1.6 <sup>ab</sup>	14.71±0.9 <sup>ab</sup>	13.48±1.7 <sup>b</sup>	14.94±0.9 <sup>a</sup>	14.74±1.0 <sup>ab</sup>	14.89±1.4 <sup>a</sup>
<b>AnchLamP</b>	10.60±0.6 <sup>ab</sup>	9.47±1.6 <sup>b</sup>	10.47±0.8 <sup>ab</sup>	11.70±1.6 <sup>a</sup>	11.97±1.3 <sup>a</sup>	11.0±1.0 <sup>ab</sup>

Anchura de la serosa  $\mu\text{m}$  (**Anch-Ser**), Anchura de la muscularis  $\mu\text{m}$  (**Anch-Mus**), Anchura de la submucosa  $\mu\text{m}$  (**Anch-SubM**), Anchura de la mucosa  $\mu\text{m}$  (**Anch-Muc**), Longitud de vellosidades  $\mu\text{m}$  (**Long-Vell**), Altura de enterocitos  $\mu\text{m}$  (**Alt-Ent**), Altura de Células caliciformes  $\mu\text{m}$  (**Alt-Ccal**), Ancho de lámina propia  $\mu\text{m}$  (**Anch-LamP** **DC**: Dieta control, **M10**: sustitución de HLMSN con 10%, **M20**: sustitución de HLMSN con 20%, **M30**: sustitución de HLMSN con 30%, **M40**: sustitución de HLMSN con 40%, **M50**: sustitución de HLMSN con 50%. Los valores son expresados como promedio de tres réplicas  $\pm$  desviación estándar. Las letras distintas en los superíndices en la misma línea indican diferencias estadísticamente significativos ( $P < 0.05$ ) entre tratamientos. Análisis ANOVA de una vía.



**Figura 11.** Corte histológico transversal del intestino distal de juveniles de *Totoaba macdonaldi* alimentados durante 60 días con dietas con diferentes niveles de sustitución de harina de pescado por harina de larva de mosca soldado negro *Hermetia illucens*. **A.** Dieta control, **B.** sustitución de HLMSN con 10%, **C:** sustitución de HLMSN con 20%, **D:** sustitución de HLMSN con 30%, **E:** sustitución de HLMSN con 40%, **F:** sustitución de HLMSN con 50%. Tinción Hematoxilina-Eosina y azul alcian. Objetivo 5x, con escala de 350 µm.

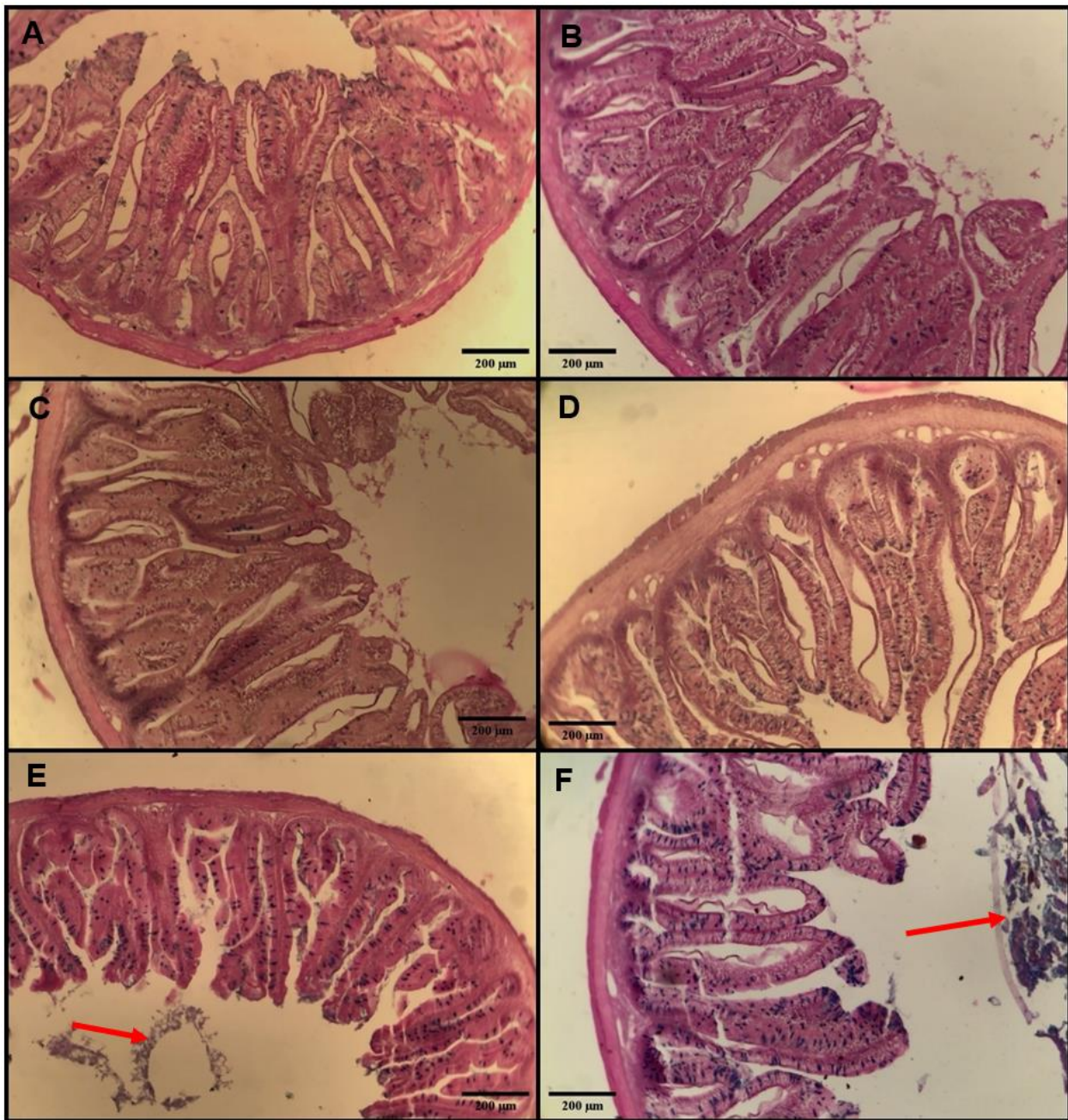
Se encontraron diferencias significativas en los resultados de la anchura del tejido de la serosa, donde los organismos alimentados con dieta control obtuvieron una anchura menor ( $15.17 \pm 1.6 \mu\text{m}$ ) en comparación con los organismos alimentados con las diferentes dietas experimentales, siendo los organismos alimentados con la dieta M40 y M50 con mayor anchura de este tejido ( $32.36 \pm 2.8$  y  $25.96 \pm 1.60 \mu\text{m}$ , respectivamente).

En cuanto a la anchura del tejido de la muscularis intestinal de totoaba, se observó que los organismos alimentados con la dieta control, M10, M40 y M50 fueron estadísticamente iguales, sin embargo, de forma contraria se obtuvo que en la muscularis del intestino de los organismos alimentados con las dietas M20 y M30 marcaron una diferencia significativa y fueron los intestinos de los organismos con mayor anchura en la muscularis ( $49.19 \pm 4.2$  y  $49.82 \pm 4.2 \mu\text{m}$ , respectivamente).

Otros de los cambios morfológicos encontrados (Figura 11-12) fueron las vellosidades intestinales, es decir, proyecciones largas que se encuentran alrededor del tubo intestinal, que son de mayor importancia para la absorción de nutrientes. Los organismos alimentados con las dietas M10, M20 y M30 fueron estadísticamente iguales ( $735.68 \pm 59.6$ ,  $840.81 \pm 78.0$  y  $844.64 \pm 94.0 \mu\text{m}$ ) respectivamente, siendo mayores a comparación de la longitud de las vellosidades obtenidas de los organismos alimentados con las dietas M40 y M50 ( $492.88 \pm 44.3$  y  $485.87 \pm 44.7 \mu\text{m}$ ), respectivamente.

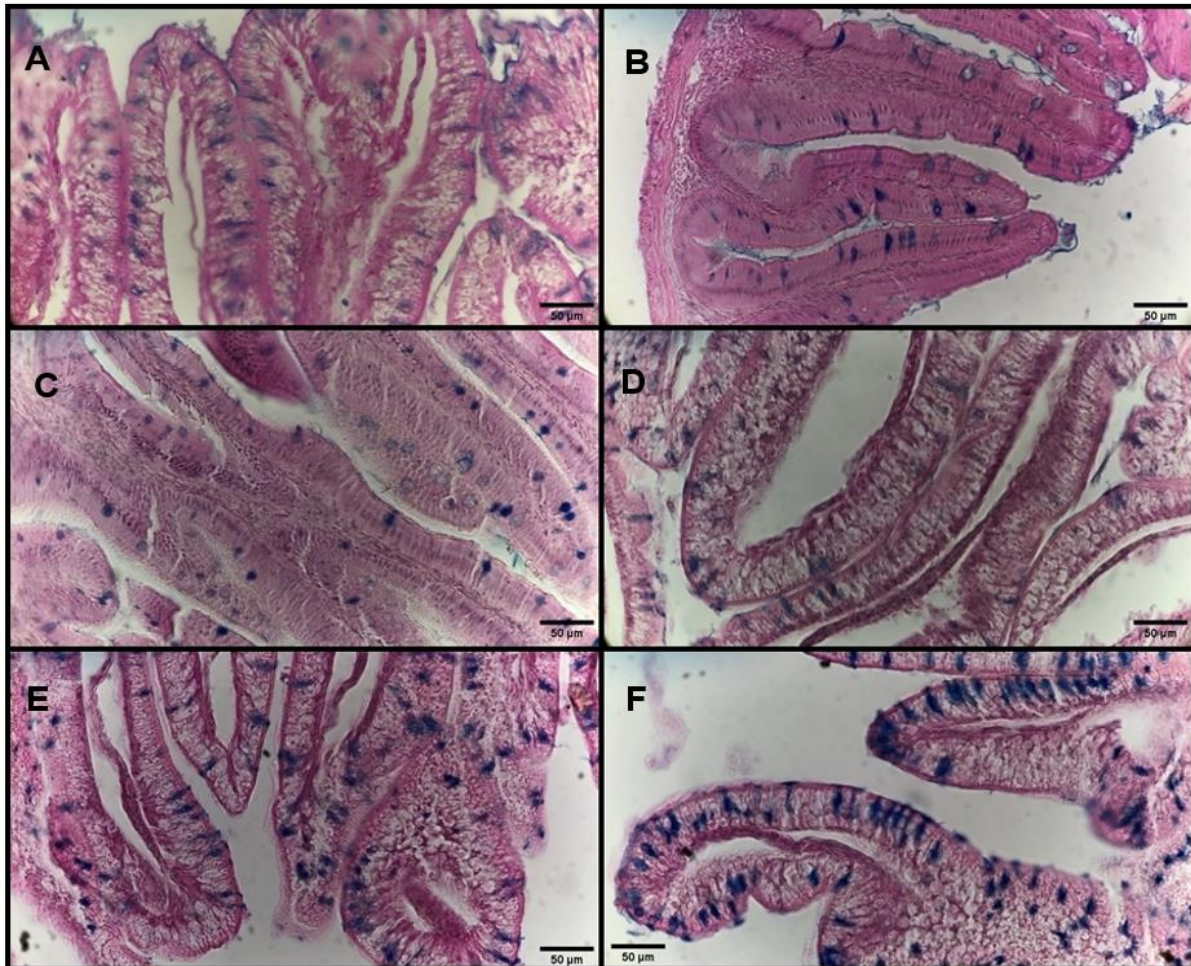
Entre las afectaciones encontradas debido al acortamiento de las vellosidades intestinales de los organismos alimentados con los tratamientos M40 y M50, es que se pudo observar en el lumen de estos intestinos, se encontraban restos de alimento ingerido y no absorbido por el organismo (Figura 12E-F), por lo que es importante mencionar que todos los organismos tuvieron 12 h de ayuno antes de la biometría final.

Por otro lado, en el tamaño de los enterocitos de los organismos alimentados con la dieta M30, M40 y M50 fueron las células con mayor longitud y muy similares entre ellas, a comparación del tamaño de células que se registraron en los organismos alimentados con las dietas M10 y M20.



**Figura 12.** Morfología de la serosa, muscularis, submucosa y mucosa del intestino distal de juveniles de *Totoaba macdonaldi* alimentados durante 60 días con dietas con diferentes niveles de sustitución de harina de pescado por harina de larva de mosca soldado negro *Hermetia illucens*. Flecha roja: alimento en el lumen intestinal del organismo. **A.** Dieta control, **B.** sustitución de HLMSN con 10%, **C:** sustitución de HLMSN con 20%, **D:** sustitución de HLMSN con 30%, **E:** sustitución de HLMSN con 40%, **F:** sustitución de HLMSN con 50%. Tinción Hematoxilina-Eosina y azul alcian. Objetivo 10x, con escala de 200 µm.

Se identificaron cambios en la estructura de las células caliciformes, ya que dichas células de los organismos alimentados con dieta M30 fueron estadísticamente mayores en cuanto a longitud ( $14.94 \pm 0.9 \mu\text{m}$ ) a diferencia de la longitud de las células caliciformes de los organismos alimentados con la dieta M20 ( $13.48 \pm 1.7 \mu\text{m}$ ). Otro de los cambios encontrados en estos mismos organismos fue que las células caliciformes se observaron de forma más redonda (Figura 13C) en comparación con las demás células de los diferentes tratamientos.



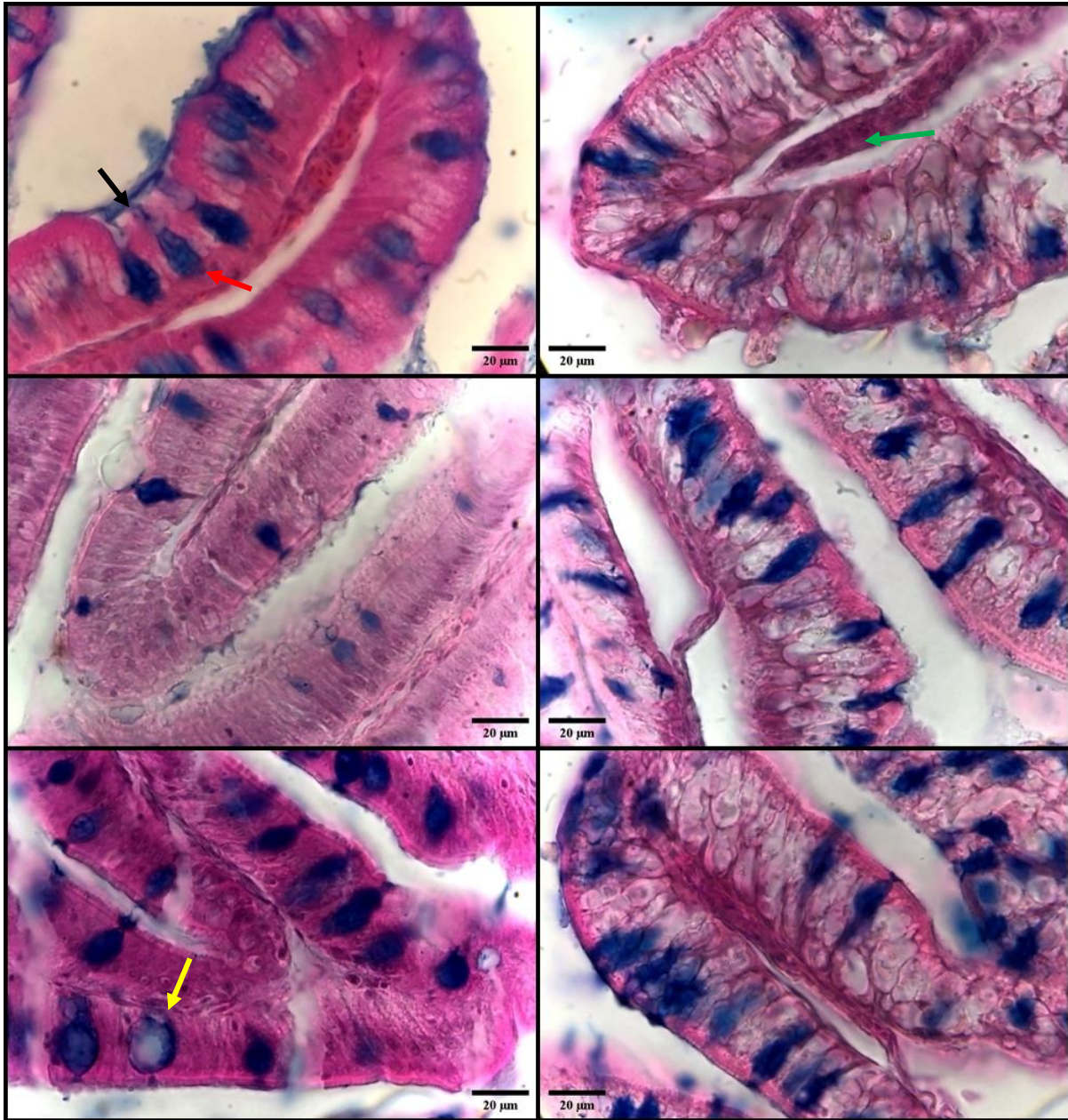
**Figura 13.** Vellosidades del intestino distal de juveniles de *Totoaba macdonaldi* alimentados durante 60 días con dietas con diferentes niveles de sustitución de harina de pescado por harina de larva de mosca soldado negro *Hermetia illucens*. **A.** Dieta control, **B.** sustitución de HLMSN con 10%, **C:** sustitución de HLMSN con 20%, **D:** sustitución de HLMSN con 30%, **E:** sustitución de HLMSN con 40%, **F:** sustitución de HLMSN con 50%. Tinción Hematoxilina-Eosina y azul alcian. Objetivo 40x, con escala de 50  $\mu\text{m}$ .

El ancho de la lámina propia de las diferentes dietas experimentales fueron diferentes estadísticamente, donde los organismos alimentados con la dieta M30 y M40 tuvieron mayor engrosamiento de la lámina ( $11.70 \pm 1.6$  y  $11.97 \pm 1.3 \mu\text{m}$ , respectivamente), mientras que la dieta M10 y fue la de menor engrosamiento de la lámina propia ( $9.47 \pm 1.6 \mu\text{m}$ ).

Es importante mencionar que en todos los tratamientos experimentales se observaron anomalías en la morfología del intestino distal de las totoabas.

En los organismos alimentados con la dieta control, M10, M20 y M30 (Figura 11, 13), se pudo observar que tuvieron una desintegración en la arquitectura de las vellosidades intestinales principalmente, pero fue menos evidente en los organismos alimentados con la dieta M20.

Los cambios morfológicos observados en el intestino distal de los peces alimentados con las dietas M40 y M50, fue un acortamiento de las vellosidades intestinales muy evidente, desprendimiento del epitelio de la lámina propia, inflamación de las vellosidades, y se comenzó a notar inflamación de la lámina propia (Figura 13) todas estas características descritas por primera vez como enteritis por (Baeverfjord y Krogdahl, 1996).



**Figura 14.** Células caliciformes del tejido intestinal de juveniles de *Totoaba macdonaldi*, en las fotografías se observa el incremento de células conforme se añade la proteína de larva de mosca soldado negro *Hermetia illucens* en las dietas. Flecha roja: célula caliciforme, Flecha negra: Mucina en el lumen intestinal, Flecha verde: lamina propia, Flecha amarilla: célula caliciforme produciendo mucina. **A.** Dieta control, **B.** sustitución de HLMSN con 10%, **C:** sustitución de HLMSN con 20%, **D:** sustitución de HLMSN con 30%, **E:** sustitución de HLMSN con 40%, **F:** sustitución de HLMSN con 50%. Tinción Hematoxilina-Eosina y azul alcian. Objetivo100x, con escala de 20 µm.

Además, se encontraron diferencias en el número de células caliciformes (Figura 14) de las vellosidades intestinales (Tabla 11 se resume el conteo total), donde en un área marcado de 700 mm<sup>2</sup> en todos tratamientos experimentales, se observó una tendencia de menor a mayor en el número de células caliciformes conforme se incorporó la HLMSN, cabe destacar que las células de los organismos alimentados con dieta M10 tuvieron un número mayor de células caliciformes, a comparación de los organismos alimentados con la dieta M20.

A pesar de observar dicha tendencia, solo se encontraron diferencias significativas en los intestinos de los peces alimentados con los tratamientos M40 y M50, mientras que la dieta control, M10, M20 y M30 fueron significativamente igual.

**Tabla 11.** Conteo de células caliciformes del intestino distal de juveniles de *Totoaba macdonaldi* alimentados con dietas con diferentes niveles de sustitución de harina de pescado por harina de larva de mosca soldado negro *Hermetia illucens*, durante 60 días de experimento.

Tratamientos	# Ccal	Área mm <sup>2</sup>
<b>DC</b>	171 ± 4 <sup>a</sup>	700.26 ± .09
<b>M10</b>	189 ± 10 <sup>a</sup>	700.22 ± .17
<b>M20</b>	182 ± 13 <sup>a</sup>	700.23 ± .16
<b>M30</b>	196 ± 17 <sup>a</sup>	700.28 ± .18
<b>M40</b>	315 ± 12 <sup>b</sup>	700.25 ± .35
<b>M50</b>	327 ± 27 <sup>b</sup>	700.27 ± .24

**#Ccal:** Número de células caliciformes, área mm<sup>2</sup>: área delimitada en los tratamientos experimentales para el conteo celular. **DC:** Dieta control, **M10:** sustitución de HLMSN con 10%, **M20:** sustitución de HLMSN con 20%, **M30:** sustitución de HLMSN con 30%, **M40:** sustitución de HLMSN con 40%, **M50:** sustitución de HLMSN con 50%. Los valores son expresados como promedio de tres réplicas ± desviación estándar. Las letras distintas en los superíndices en la misma línea indican diferencias estadísticamente significativos (P<0.05) entre tratamientos. Análisis ANOVA de una vía; prueba posthoc Tukey.

### 7.5.2 Hepática

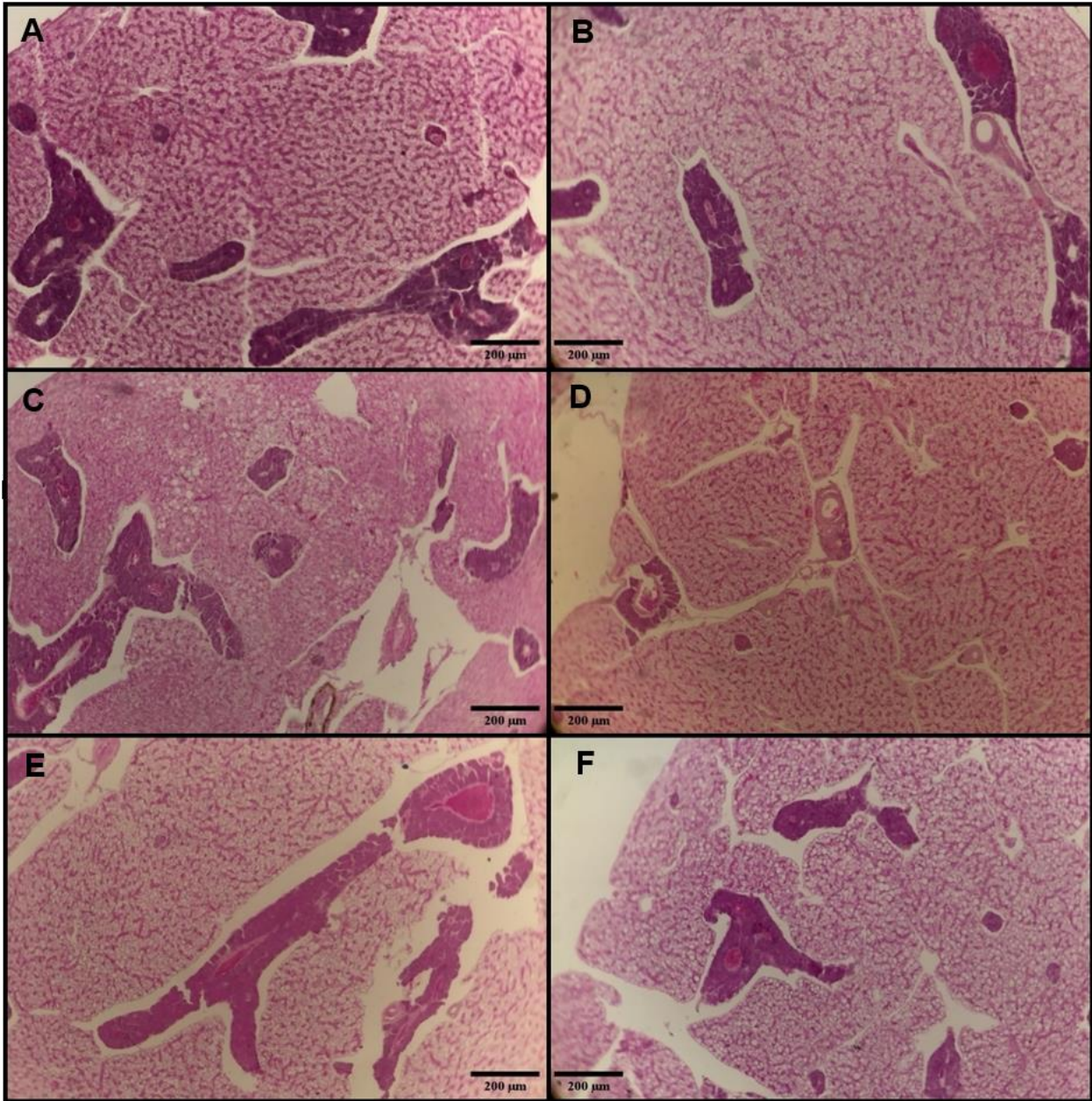
A nivel histológico hepático, a primera vista pudimos encontrar el hígado asociado al páncreas (Figura 15), se observó un tejido más íntegro en los organismos alimentados con dieta control y la dieta con un sustituto del 10% de HLMSN a comparación de los hígados de los peces alimentados con la dieta M40 y M50 como se puede apreciar en la (Figura 15-E, F).

Se pudo observar que, en el parénquima hepático de los organismos de este experimento, mostraron diferentes cambios a nivel tisular (Figura 16) según el tipo de dieta que se les proporcionó durante los 60 días de experimentación.

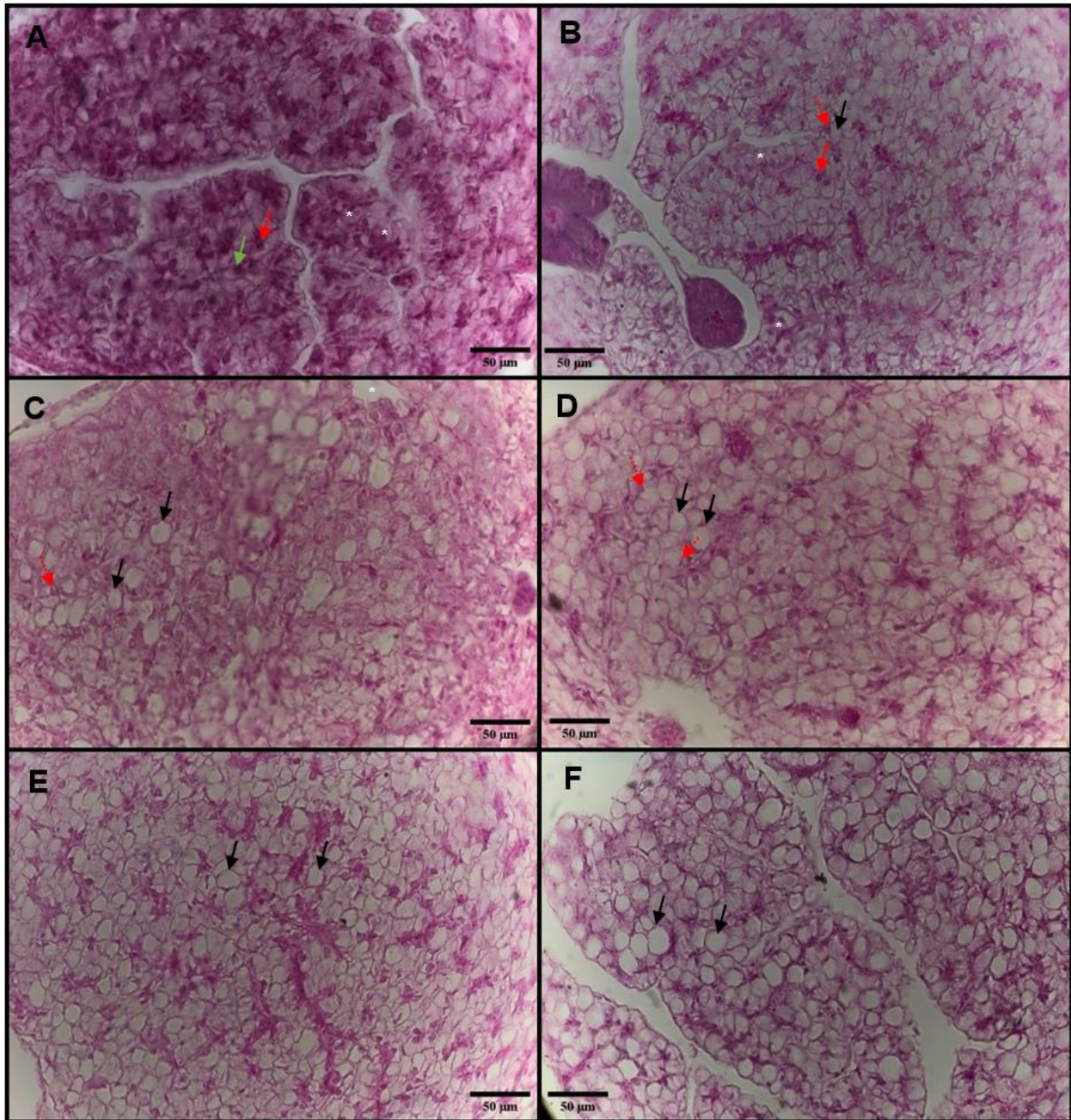
En los hepatocitos de los peces alimentados con la dieta control (Figura 16-A) no se observaron cambios estructurales, es decir, se encontraron hepatocitos con estructura poliédrica con un tamaño normal y color uniforme de su citoplasma (eosinofílico), baja acumulación de grasa en los hepatocitos, debido a que se observaron con claridad los núcleos al centro de las células hepáticas y nucléolos bien definidos.

Por otro lado, en los organismos alimentados con una dieta de 10% de sustitución de HP por HLMSN (Figura 16-B), se empezó a observar ligeros cambios estructurales en los hepatocitos, donde se identificaron vacuolas en el citoplasma de las células, la cual desplazó ligeramente los núcleos hacia la periferia, sin embargo, estas vacuolas no provocaron cambios mayores en los hepatocitos, ya que eran de tamaño pequeñas; asimismo también fueron visibles hepatocitos con apariencia normal en el tejido.

En los juveniles de *T. macdonaldi* alimentados con las dietas M20 y M30 se encontraron solo en algunas zonas, es decir, no en todo el tejido hepático, células con apariencia de esteatosis macrovesicular como se observa en la figura 16C-D, estas vacuolas por lo general se mostraron de tamaño mediano a comparación de las vacuolas identificadas en los hepatocitos de los organismos alimentados con la dieta M10, que como ya se mencionó, se observaron con una vacuola de tamaño pequeño. En los niveles de 20 y 30% de sustitución de HP por HLMSN, algunos hepatocitos perdieron su estructura poliédrica, por lo que se observaron de forma más redonda a consecuencia de las inclusiones lipídicas.



**Figura 15.** Corte histológico sagital del parénquima hepático de juveniles de *Totoaba macdonaldi* alimentados durante 60 días con dietas con diferentes niveles de sustitución de harina de pescado por harina de larva de mosca soldado negro *Hermetia illucens*. **A.** Dieta control, **B.** sustitución de HLMSN con 10%, **C:** sustitución de HLMSN con 20%, **D:** sustitución de HLMSN con 30%, **E:** sustitución de HLMSN con 40%, **F:** sustitución de HLMSN con 50%. Tinción Hematoxilina-Eosina. Objetivo 5x, con escala de 200 µm.



**Figura 16.** Corte histológico del parénquima hepático de juveniles de *Totoaba macdonaldi* alimentados durante 60 días con dietas con diferentes niveles de sustitución de harina de pescado por harina de larva de mosca soldado negro *Hermetia illucens*. \*Hepatocitos, Flecha roja: Núcleo, Flecha verde: Nucléolo, Flecha roja punteada: Núcleo desplazado a la periferia, Flecha negra: Vacuola **A.** Dieta control, **B.** sustitución de HLMSN con 10%, **C:** sustitución de HLMSN con 20%, **D:** sustitución de HLMSN con 30%, **E:** sustitución de HLMSN con 40%, **F:** sustitución de HLMSN con 50%. Tinción Hematoxilina-Eosina. Objetivo 10x, con escala de 50 µm.

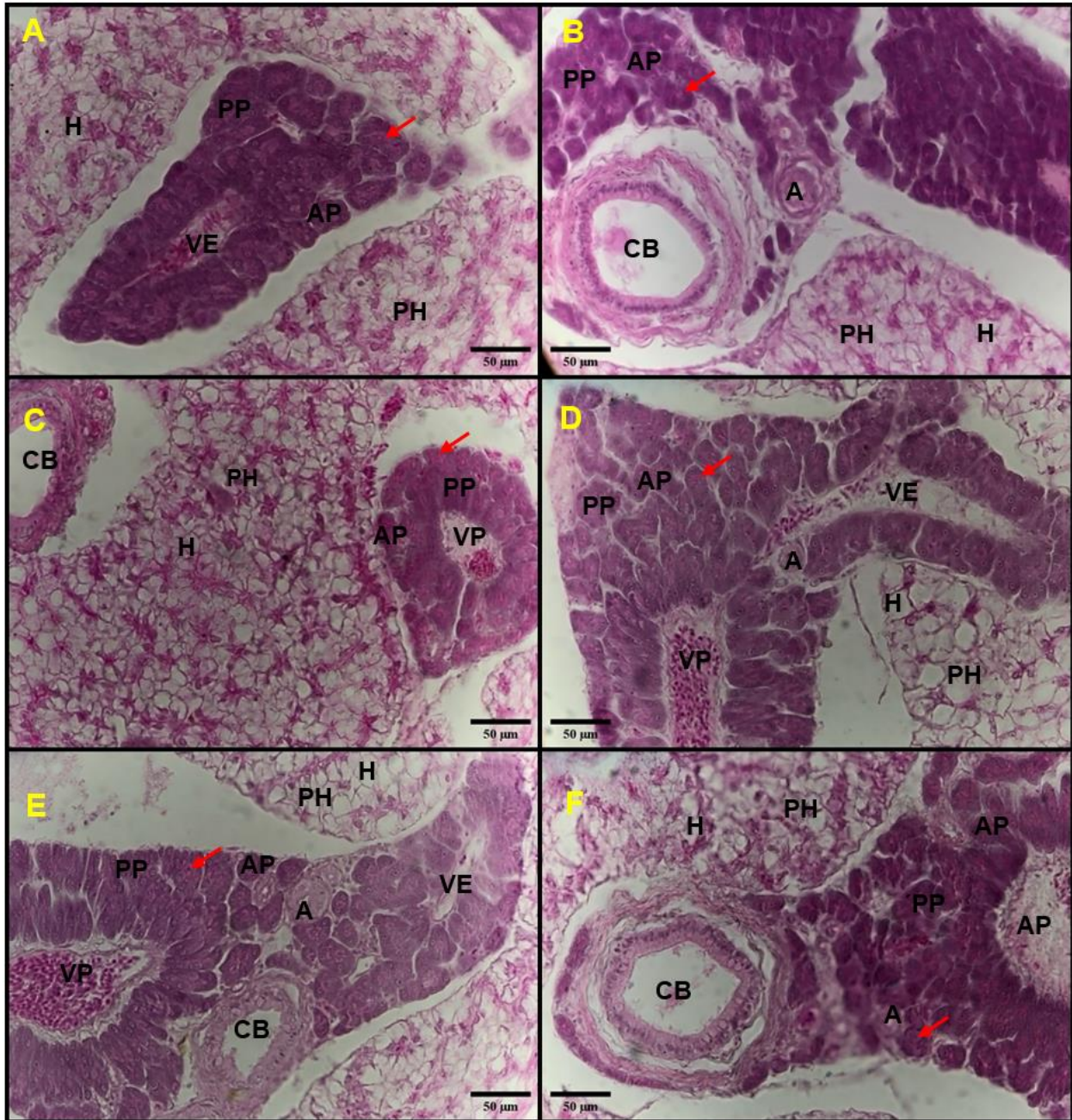
Finalmente, en los organismos alimentados con las dietas M40 y M50 se observó una coloración uniforme del corte, mostraron en la mayoría de todo el tejido hepático vacuolas que abarcaban la mayoría del área citoplasmática, por lo que desplazaba totalmente el núcleo hacia la periferia de la célula, siendo que fuera casi no visible; en general se pudieron observar vacuolas más grandes en los hepatocitos de los peces de este grupo a comparación de los organismos alimentados con las demás dietas experimentales. En este sentido, se determinó que se trata de una histopatología de esteatosis macrovesicular en los juveniles de totoaba alimentados con estos niveles de inclusión de HLMSN en su dieta (Figura 16E-F).

En cuanto a los cambios de la organización de las estructuras del parénquima pancreático de los juveniles de *T. macdonaldi* a causa de las diferentes dietas proporcionadas con distintos porcentajes de HLMSN, se resumen en las figuras 17-18.

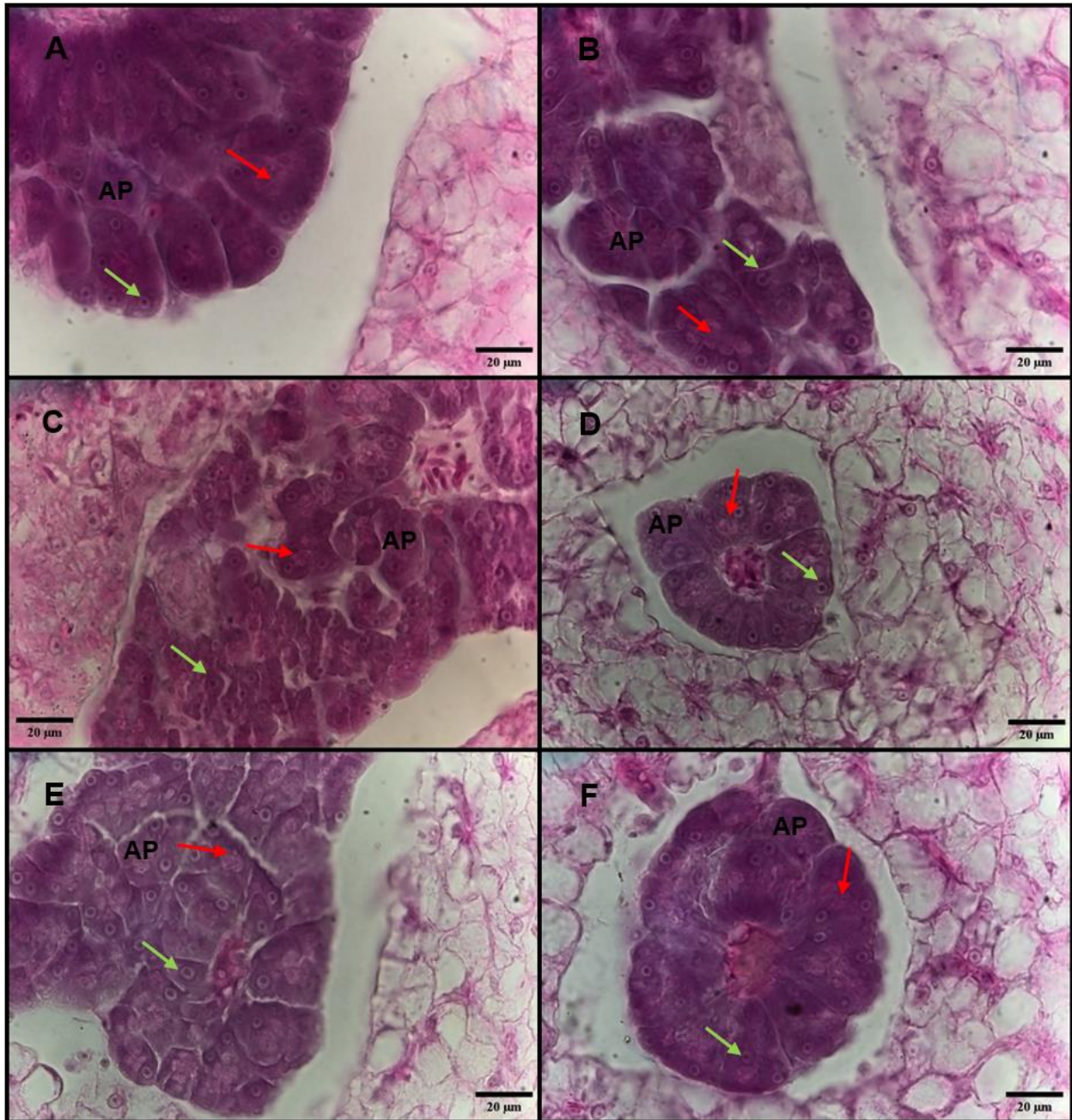
En general en el parénquima pancreático de los organismos (Figura 17), se pudieron observar venas portales, arterias, conductos biliares con diferentes tamaños, acinos pancreáticos y gránulos de zimógenos.

En la figura 18, se pueden observar a detalle el páncreas exocrino y acinos pancreáticos con estructura normal en todos los tratamientos experimentales, además no se encontraron infiltraciones por vacuolización, por lo que fueron muy visibles los núcleos de los acinos pancreáticos y gránulos de zimógenos, los cuales son importantes precursores de enzimas, ya que llevan a cabo la digestión de los alimentos.

A pesar de observar una esteatosis macrovesicular en el hígado de los organismos alimentados con una dieta del 40 y 50% de sustituto de HLMSN, no se observaron anomalías en el parénquima pancreático de estos organismos, ni se observó una desintegración del tejido hepático en los tratamientos experimentales.



**Figura 17.** Corte histológico hepático de juveniles de *Totoaba macdonaldi* alimentados durante 60 días con dietas con diferentes niveles de sustitución de harina de pescado por harina de larva de mosca soldado negro *Hermetia illucens*. **A:** Arteria, **CB:** conducto biliar, **VP:** Vena porta, **VE:** Vena, **PH:** Parénquima hepático, **PP:** Parénquima hepático, **H:** Hepatocitos, **AP:** Acinos pancreáticos, Flecha roja: Gránulos de zimógeno. **A.** Dieta control, **B.** sustitución de HLMSN con 10%, **C:** sustitución de HLMSN con 20%, **D:** sustitución de HLMSN con 30%, **E:** sustitución de HLMSN con 40%, **F:** sustitución de HLMSN con 50%. Tinción Hematoxilina-Eosina. Objetivo 40x, con escala de 50 µm.



**Figura 18.** Corte histológico del parénquima pancreático de juveniles de *Totoaba macdonaldi* alimentados durante 60 días con dietas con diferentes niveles de sustitución de harina de pescado por harina de larva de mosca soldado negro *Hermetia illucens*. AP: Acino pancreático, flecha roja: Gránulos de zimógeno, flecha verde: núcleo basal del acino pancreático. **A.** Dieta control, **B.** sustitución de HLMSN con 10%, **C:** sustitución de HLMSN con 20%, **D:** sustitución de HLMSN con 30%, **E:** sustitución de HLMSN con 40%, **F:** sustitución de HLMSN con 50%. Tinción Hematoxilina-Eosina. Objetivo 100x, con escala de 20 µm.

## 8 DISCUSIÓN

### 8.1 Parámetros productivos

La presente investigación se realizó para evaluar principalmente el estado de salud de juveniles de *T. macdonaldi*, a partir de la implementación de HLMSN (*H. illucens*) en la dieta de los peces en diferentes porcentajes de inclusión de dicho ingrediente proteico.

Los parámetros indicadores de crecimiento como la ingesta de alimento (IA), factor de conversión alimenticia (FCA), relación de eficiencia proteica (REP) y los índices hepatosomáticos (IHS) y viscerosomáticos (IVS) no presentaron diferencias significativas entre tratamientos ( $P>0.05$ ), por lo que nuestros resultados nos indican que los juveniles de totoaba respondieron de una manera favorable a las dietas formuladas a base de harina de insecto, con inclusiones del 10, 20, 30, 40 y 50% de HLMSN, por lo que no hubo un efecto negativo con relación a la palatabilidad de las dietas, mismos datos se relacionan con lo publicado por Villanueva et al. (2022), quienes informaron que la incorporación del 25 y 40% de la harina de MSN en las dietas de totoaba, no afectaban los índices somáticos del organismo, por otro lado Carvajal (2022) menciona que *T. macdonaldi* tuvo una ingesta de alimento similar a la dieta control a base de harina de pescado y dietas con sustitución parcial de HMSN del 25 y 50%, del mismo modo que se reporta en este estudio con porcentajes de inclusión proteica similares.

A pesar de que falta mucha investigación sobre la sustitución parcial de la harina de pescado por *H. illucens* en dietas para juveniles de *T. macdonaldi*, así como también evaluar sus efectos sobre el crecimiento y estado de salud de esta especie, se han realizado numerosas investigaciones en otros organismos como la carpa común (*Cyprinus carpio*), que en el 2017 Li y colaboradores realizaron un estudio con esta especie, e informaron que no hubo diferencia significativa ( $P>0.05$ ) entre tratamientos sobre el rendimiento en el crecimiento (GP, SGR, IA, FCA, REP) ni en los índices biológicos de los organismos (IVS, IHS).

También se han realizado investigaciones en distintas especies de peces carnívoros como la lobina japonesa *Lateolabrax japonicus* (Wang et al., 2019), bagre africano *Clarias gariepinus* (Fawole et al., 2020), trucha arcoíris *Oncorhynchus mykiss*

(Dumas et al., 2018), mero *Epinephelus coioides* (Jiang et al., 2022), lobina europea *Dicentrarchus labrax* (Tawwab et al., 2020), salmón atlántico *Salmo salar* (Belghit et al., 2019), esturión siberiano *Acipenser baerii* (Caimi et al., 2020), el pez barramundi *Lates calcarifer* (Chaklader et al., 2021), trucha marrón *Salmo trutta* (Mikolajczak et al., 2022), la dorada *Sparus aurata* (Carvalho et al., 2023) entre otros, donde reportan que al utilizar *H. illucens* como ingrediente proteico en las dietas de estas diferentes especies, no encontraron diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) en los parámetros de rendimiento del crecimiento, utilización de alimento e índices somáticos (FCA, IA, REP, IVS) en comparación con su dieta control, datos que concuerdan con el presente trabajo.

A pesar de que se trata de diferentes especies, todos estos experimentos se relacionan entre sí, al no causar un efecto negativo de estos parámetros productivos en los organismos, tanto como para especies carnívoras, omnívoras y herbívoras como: la tilapia roja (*Oreochromis sp*), tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) (Kishawy et al., 2022) y carpa (*Ctenopharyngodon idellus*) (Lu et al., 2020) según lo reportado hasta la fecha en que se reporta esta investigación, ya que la HLMSN tiene gran potencial como sustituto proteico debido a que tiene un perfil nutricional muy similar al de la harina de pescado.

Resultados de nuestra investigación muestran que la inclusión de HLMSN en las dietas para juveniles de *T. macdonaldi*, no afectó de manera negativa la sobrevivencia de esta especie, cabe mencionar que el deceso de los organismos alimentados con las dietas M10, M20 y M30 no se le atribuye al alimento formulado, ya que los organismos no rechazaron el alimento administrado durante la prueba experimental, es decir, todo el alimento administrado fue consumido en los horarios establecidos. Mismas condiciones sucedieron en el desarrollo experimental de Biasato et al. (2022), donde juveniles de trucha arcoíris *O. mikyss* recibieron una dieta con un reemplazo parcial y total de HP por harina de insecto *H. illucens* del 25, 50 y 100%, por 133 días, sin embargo, la tasa de sobrevivencia fue del 95-97% sin que esta fuera influenciada por el alimento consumido.

Varios estudios confirman que la HLMSN en dietas para diferentes especies de peces marinos carnívoros, como tal es el caso de *T. macdonaldi*, no afecta la supervivencia de la especie.

Carvajal (2020) formuló 4 dietas experimentales a base de harina de insectos, sustituyendo parcialmente la HP por un 25 y 50% de harina de grillo *Archeta domesticus* y 25 y 50% de harina de MSN *H. illucens*, para alimento de juveniles de *T. macdonaldi*, donde destacan que estos ingredientes proteicos no fueron un problema para la aceptación del alimento por lo que no afectó de manera negativa la sobrevivencia de los peces, obteniendo un 100% de animales vivos al final del experimento. Otras investigaciones coinciden con datos reportados por otros autores (Siddaiah et al., 2023; Jiang et al., 2022; Hyeon Cho et al., 2022; Fawole et al., 2020; Wang et al., 2019; Dumas, 2018; Magalhaes et al., 2017; Gasco et al., 2016).

Totoaba mostró una ganancia de peso relevante entre tratamientos, debido a que el grupo experimental alimentado con las dietas M20 y M30 fueron los organismos con mayor ganancia de peso en comparación con los de la dieta control, sin embargo, los organismos alimentados con mayor inclusión como las dietas M40 y M50 tuvieron una reducción del PG, es decir, la ganancia de peso de estos organismos disminuyó al aumentar el ingrediente proteico a partir del 40% de sustitución de HLMSN, debido a una menor ingesta de alimento y al ligero aumento del FCA a pesar de no ser resultados significativos ( $P < 0.05$ ) en este parámetro, sin embargo, estos organismos no resultaron con menor peso en comparación con los grupos de peces alimentados con la dieta control. Resultados muy similares se reportan para la lobina europea *Dicentrarchus labrax*, experimento realizado por Magalhaes et al. (2017), donde los organismos presentaron una menor ganancia de peso al incorporar un 45% de HLMSN en su dieta, sin embargo, cabe destacar que con una incorporación del 15 y 30% de HLMSN en las dietas de lobina lograron una ganancia de peso mayor con respecto a su dieta control.

De igual manera, en el experimento de Zhoulin-Yu y colaboradores (2023), los juveniles de pámpano dorado *Trachinotus ovatus* al ser alimentados con una sustitución parcial del 25% de harina de MSN, el crecimiento de los organismos fue significativamente ( $P < 0.05$ ) mayor a los organismos alimentados con dieta control, no obstante, observaron que el rendimiento en el crecimiento e ingesta de alimento se redujo en los organismos alimentados con una dieta con reemplazo del 50% de harina de MSN, mismos resultados fueron obtenidos en nuestro experimento con *T. macdonaldi* a pesar de no presentar diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) en la ingesta de alimento se

logró observar una tendencia de menor consumo de alimento en el grupo de organismos alimentados con mayor concentración de HLMSN (M50). Estos resultados pudieran deberse a que las dietas ricas en fibras (que en este caso la dieta M50 tuvo un mayor porcentaje de quitina en la dieta), requieren más tiempo de digestión, por lo que la sensación de saciedad podría ocurrir más rápido (Escudero y Álvarez 2006). La fibra se suele usar en las dietas de personas obesas, debido a que la saciedad de los alimentos llega pronto, evitando ingerir otras grasas y azúcares, llegando a ser beneficio debido a la reducción de glucosa y colesterol plasmático (Vilaplana, 2001).

Otro de los resultados que se pudieron comparar fue en la especie del robalo juvenil *Psetta maxima* (Kroeckel et al., 2012), donde a partir de una sustitución parcial de más del 33% de harina de MSN en la dieta, se redujo el peso final de los peces, así como también tuvieron una menor ingesta de alimento y un aumento en el parámetro de factor de conversión alimenticia, esto debido a que estos mismos investigadores informan que la presencia de la quitina en las dietas dificulta la absorción de nutrientes en el tracto intestinal de los organismos, así mismo, determinaron que en sus dietas experimentales contenían entre 1.6 - 7.3% de quitina según la incorporación de HMS en las dietas de robalo, rangos muy similares que se obtuvieron al determinar el porcentaje de quinta en las dietas de este estudio, los cuales oscilaban entre 2.1 - 6.8%.

Estudios informan que incluso con niveles de menores a 1% de quitina en las dietas de ciertos organismos podrían disminuir el consumo del alimento y por ende tener una reducción de peso ganado, esto debido a que estos organismos no contienen enzimas digestivas como las quitinasas las cuales son capaces de hidrolizar este polisacárido (Kroeckel et al., 2012). En el 2021, Mroue identificó por primera vez 7 especies de animales marinos que forman parte de la dieta diaria de totoabas silvestres, entre ellas tres tipos de krill *Euphasiidae sp*, *Tessarabrachion oculatum*, *Thysanoessa sp*, y dos tipos de copépodos: *Calanidae sp* y *Calanoida sp.*; estos organismos contienen un exoesqueleto articulado que los recubre, el cual se compone de quitina. A pesar de que hasta el momento no se tiene registro de que *T. macdonaldi* tenga enzimas digestivas de quitina, es un hecho que esta fibra forma parte de manera natural en la dieta diaria, lo que podría explicar de cierta manera que los juveniles de totoaba de nuestro experimento, no presentaron una diferencia significativa ( $P>0.05$ ) en la ingesta

de alimento, aunque el porcentaje de quitina varió en las diferentes dietas experimentales.

Los resultados de nuestro experimento nos indican que se puede incluir hasta un 50% de HLMSN en las dietas de *T. macdonaldi* sin mostrar efecto negativo sobre la supervivencia de los peces, sin embargo, se recomienda hasta 20% de sustitución de HLMSN en las dietas de totoaba como mejor resultado en cuanto a la ganancia de peso de organismos juveniles alimentados durante 60 días.

## **8.2 Análisis bromatológicos de tejidos**

En cuanto a los resultados de los análisis bromatológicos (contenido de proteínas, lípidos, cenizas y humedad) de los tejidos de totoaba, indicaron que no hubo una diferencia significativa ( $P>0.05$ ) en muestras de pez entero, músculo y vísceras, esto debido quizá a que se diseñaron dietas isoprotéicas e isolipídicas.

También se pudo observar que se puede reemplazar hasta un 50% de HLMSN sin que este afecte el contenido proteico, lipídico, así como la humedad y la ceniza de los tejidos mencionados, datos que coinciden con los resultados de Carvajal (2022), al estudiar una inclusión del 50% de harina de MSN en las dietas de *T. macdonaldi*, donde no hubo diferencias significativas ( $P>0.05$ ) en la composición muscular de los organismos entre los diferentes tratamientos experimentales, indicando que este nivel máximo de inclusión de harina de insecto en su investigación no se vio afectado en los análisis bromatológicos de los peces.

Del mismo modo, Wang y colaboradores (2019), indicaron que en la lobina japonesa *Lateolabrax japonicus* también pudo ser incluido un porcentaje del 60% de harina de MSN en la dieta de estos organismos, sin que se viera afectada su composición corporal total.

En la presente investigación, obtuvimos una diferencia significativa en el porcentaje de lípidos y humedad total en las diferentes muestras de hígado, cabe destacar que conforme se incluyó un porcentaje mayor de proteína de mosca a las dietas de totoaba, se incrementó el porcentaje lipídico en este tejido aunque las dietas fueron isolipídicas,

sin embargo, a pesar de encontrar una mayor depositación de lípidos en los hígados de los organismos alimentados con la dieta M50, no se vio afectado el índice hepatosomático de los peces entre los diferentes tratamientos, estos resultados fueron muy similares a lo descrito por Estévez y colaboradores (2022), los cuales formularon 5 dietas experimentales: dieta comercial, dieta a base de insectos, dieta a base de microalgas, dieta a base de conservas de atún, y una dieta mixta la cual incluía 10% de harina de microalgas, 15% de harina de insectos y 2% de conservas de atún para juveniles de corvina *Argyrosomus regius*, reportando que al realizar la composición proximal del hígado, el grupo de peces alimentados con la dieta a base de insectos fueron los tejidos con mayor depositación de lípidos.

### **8.3 Contenido de ácidos grasos**

Actualmente la acuicultura busca fuentes alternas que sustituyan con éxito parcial o totalmente no solo las harinas, sino también los aceites de pescado, esto debido a que ya no se considera rentable la utilización de estas fuentes lipídicas, además de tener graves consecuencias en el ambiente marino. Se sabe que las fuentes a base de pescado tienen un excelente perfil de AGS esenciales, los cuales favorecen la salud, y crecimiento de los organismos. Al sustituir un ingrediente nuevo no solo se busca un perfil de AGS que promuevan el crecimiento de los organismos, sino también que el filete tenga buena calidad nutrimental y por ende pueda competir en el mercado.

#### **8.3.1 Dietas experimentales**

Generalmente, se sabe que las harinas de insectos son ricos en AGS, y sus niveles dependen de la especie, etapa de vida y alimento dado durante su cultivo. En la etapa adulta de *H. illucens*, es decir, en el estado de madurez, este insecto no se alimenta, ya que en su estado larval consume toda la materia orgánica necesaria para poder sobrevivir en las siguientes etapas: pre-pupa, pupa y adulto, y de esta manera poder completar su ciclo de vida, acumulando de una manera eficiente los lípidos en su cuerpo, los cuales utilizará como fuente energética (Tomberlin et al., 2005).

En este sentido, se pudo observar que conforme se incluyó la HLMSN en las dietas de los peces, condujo a ciertos cambios en la composición del perfil de ácidos grasos, por ejemplo, el ácido láurico el cual representa el 21% del total de ácidos grasos de los insectos según lo reporta Onincx et al. (2015), y que, por esta misma razón, este ácido graso no se identificó en la dieta control, la cual fue formulada a base de harina de pescado. Se pudo observar una tendencia del ácido láurico en las dietas experimentales, es decir se tuvo una concentración de menor a mayor en el contenido de ácido láurico y ácido mirístico entre tratamientos, siendo la dieta M50 con mayor proporción de estos ácidos grasos, mismos resultados que reporta Tawwab et al. (2020).

Los AGS encontrados en el perfil de las dietas experimentales tuvieron una tendencia de menor a mayor concentración, por lo que se obtuvo un aumento de AGS totales conforme se incluyó un mayor porcentaje de la HLMSN en las dietas, mismos resultados que concuerdan con lo ocurrido en el experimento de Belghit et al. (2019), donde las dietas aumentaron la concentración de AGS conforme se incluyó la HLMSN, sin embargo, a diferencia de nuestro experimento, estos investigadores incluyeron un 100% de la fuente proteica en juveniles de salmón atlántico, obteniendo como resultados una concentración  $\sum$ AGS de 19 mg AG\* g de dieta, valor que está por debajo de lo obtenido en nuestro estudio de 30.28 mg AG\*g de dieta de 50% de sustitución parcial de harina de MSN, sin embargo, esto fue debido a que ellos utilizaron harina MSN parcialmente desgrasada.

Como se había mencionado, los insectos suelen ser ricos en AGS, sin embargo, sus concentraciones de MUFAS y PUFAS son muy bajas (López-Hernández, 2014), esto se pudo confirmar con los resultados de la cromatografía de gases de las diferentes dietas que se realizaron para nuestro experimento.

Es bien conocido que la composición de grasa y AGS del alimento, se refleja en la composición de ácidos grasos del músculo de los organismos (López et al., 2006). Debido a esto, en nuestra formulación dietética se incorporó más aceite de pescado (rico en DHA) conforme se disminuyó la fuente proteica de HP, esto con el fin de poder balancear esta fuente lipídica, ya que la incorporación de aceites en las dietas de los

organismos es vital para mejorar la absorción de las vitaminas liposolubles (Aprianto et al., 2023), también mejora la palatabilidad del alimento (López et al., 2006).

El DHA es un componente importante en los lípidos musculares ya que permite el incremento del peso de los organismos, además de ser un ácido graso con funciones vitales tanto para los peces cultivados, como para el ser humano como consumidor final (Cuervo-Moreno, 2014). A pesar del aumento del aceite de pescado en las dietas experimentales, se obtuvieron concentraciones menores conforme se incorporó la HLMSN, teniendo una concentración mínima de 6.70 mg DHA\*g de dieta de 50% de sustitución de harina de mosca, por lo que se esperaba que estas concentraciones aumentaran conforme se incluía el aceite de pescado en las dietas experimentales. Comparando estos resultados con (Carvajal, 2022), obtuvo una concentración mínima de 9.7 mg DHA\* g de dieta con una sustitución del 50% de harina de mosca soldado para juveniles de *T. macdonaldi*, sin embargo (Carpio, 2013) menciona que el mínimo requerimiento de DHA en dietas para juveniles de totoaba es de 4.58 mg DHA\*g de dieta para un crecimiento óptimo de la especie, por lo que las concentraciones mínimas encontradas de DHA en la dieta M50 es superior a la concentración mínima.

Por otro lado, los MUFAS totales en las dietas experimentales fueron ligeramente en aumento, comportamiento muy similar en el experimento de Caimi et al. (2020).

### **8.3.2 Músculo**

El ácido láurico en el musculo de totoaba no se identificó en el perfil de ácidos grasos, esto pudiera deberse a las bajas concentraciones de este ácido en el músculo. Li et al. (2016) reportaron en sus resultados que en el musculo de los juveniles de carpa *C. carpio* alimentados con HLMSN, tuvieron niveles muy bajos de ácido láurico y esto se pudo deber a que el organismo utilizó este ácido de manera fácil y rápidamente en la oxidación y la producción de energía, lo cual pudo haber pasado en el presente estudio debido a que no se identificó este ácido en el perfil de ácidos grasos del músculo de las totoabas. El ácido láurico en un AGS de cadena media que puede metabolizarse rápidamente, sin que este llegue a acumularse en el tejido adiposo, además, se encuentra directamente relacionado con que los organismos encuentran una pronta saciedad en dietas que

contengan mayores concentraciones de este ácido graso, por lo que reducen su ingesta de alimento (Dayrit, 2014; Anedda et al., 2023;).

En el trabajo de Carvajal, (2020) mencionan que el grupo de juveniles de totoaba alimentados con las dietas que contenían mayor concentración de ácido láurico y que este caso fueron alimentados con 50% de sustitución de HP por harina de grillo, redujeron su ingesta de alimento, sin embargo, en nuestro estudio no se obtuvo una diferencia significativa ( $P>0.05$ ) en la ingesta de alimento en los diferentes grupos experimentales, ni siquiera con la dieta con sustitución del 50% de HP por HLMSN, mismos resultados que concuerdan con Guerreiro et al. (2020), donde indican que juveniles de corvina (*Argyrosomus regius*) tampoco se vieron afectados en la ingesta de alimento con las concentraciones mayores de ácido láurico conforme se integraba la harina de MSN a las dietas de los organismos; pero cabe mencionar que en nuestro experimento a pesar de no ver diferencias significativas ( $P>0.05$ ) en la ingesta de alimento si se puede observar una tendencia a menor ingesta de alimento en los organismos alimentados con dieta M40 y M50.

La inclusión de HLMSN en las dietas, no modificó mayormente el contenido de MUFAS, sin embargo si se pudo observar una ligera disminución del total de los PUFAS, mismo resultados que concuerdan con Moutinho et al. (2021), donde se sustituyó harina de pre-pupa de mosca soldado en dietas para juveniles de lobina europea (*D. labrax*), en donde el perfil de AGS de las dietas, no se reflejó en el músculo de los organismos, como frecuentemente sucede, esto se debe a que los peces grasos o “azul” como comúnmente se conocen, tienden a ser más influenciados por la modificación de grasas en comparación con los peces magros o “blancos” Moutinho et al. (2021), es decir aquellos organismos que tienen bajo porcentaje de grasa en el musculo como *T. macdonaldi*.

### 8.3.3 Hígado

En general, el contenido  $\Sigma$ AGS en los hígados de los organismos alimentados con las diferentes dietas experimentales, se observó un aumento mayor en la concentración de estos AGS en los hígados de los organismos alimentados con las dietas M40 y M50 a comparación de la dieta control, principalmente de los AGS C12:0, C14:0 y C18:0.

Los resultados de la cromatografía de gases para determinar el contenido total de ácidos grasos del hígado de truchas que realizó Bruni et al. (2020), determinó que los ácidos grasos C12:0 y C14:0 aumentaron significativamente ( $P<0.05$ ) en las dietas donde se sustituyó el 25 y 50% de harina de pescado por harina de MSN en dietas para la trucha arcoíris (*O. mykiss*) y determinaron que este aumento de AGS se debió a que los peces acumularon estos ácidos en lugar de oxidarlos, como pudo haber pasado en nuestro trabajo. Por otra parte, en los resultados de Estévez et al. (2022) también encontraron un aumento de AGS en los hígados juveniles de corvina (*Angyrosomus regius*) al ser alimentarlos con una dieta a base de insecto, determinando que ese aumento originara cambios histomorfológicos en el hígado de los juveniles de corvina, sin embargo, no llegó a mostrar efectos significativos ( $P>0.05$ ) en el índice hepatosomático, ni muerte de los organismos, mismos resultados que concuerdan con nuestro trabajo.

#### **8.4 Parámetros hematológicos y bioquímica sanguínea**

Los ingredientes incluidos en las dietas de los organismos pueden ser los indicadores de que el desarrollo productivo y salud de los peces son influenciados por dicho ingrediente, ya que puede verse reflejado en cambios fisiológicos y así como también generar, en algunos casos patologías; esto se puede determinar a través del estudio de la hematología y bioquímica sanguínea, ya que esta herramienta ha sido de mayor importancia durante los últimos años en la acuicultura para evaluar el estado de salud de los animales cultivados.

Hasta la fecha en que se redacta esta investigación, no se encontraron estudios hematológicos, ni bioquímica sanguínea de juveniles de *T. macdonaldi* que fueran alimentados con sustituciones parciales de HLMSN, y que indiquen de alguna manera su influencia en los valores hematológicos ante este sustituto proteico en las dietas de totoaba, por lo que este estudio corresponde a los primeros estudios hematológicos y de química sanguínea de dicha especie, los cuales podrán contribuir a investigaciones futuras. A pesar de no haber resultados previos hematológicos de totoaba que nos indique el estado de salud al ser alimentados con HLMSN, se han realizado diversas

investigaciones con diferentes organismos que son un referente en la acuicultura, hoy en día.

Tawwab et al. (2020), realizaron un estudio con juveniles de lobina europea, tras alimentarlos durante ocho semanas con sustituciones parciales de HP por HLMSN (25, 35 y 50%), realizaron evaluaciones hematológicas donde determinaron que los valores de hematocrito y hemoglobina de los juveniles no fueron influenciados significativamente ( $P>0.05$ ) por la inclusión de HLMSN. De igual manera en el estudio de Muñoz-Játiva (2022), no se encontraron resultados significativos ( $P>0.05$ ) en los valores del porcentaje de hematocrito en alevines de trucha arcoíris alimentadas con 0, 15 y 20% de harina HMSN. Mismos resultados se obtuvieron en la presente investigación donde el reemplazo de HLMSN en las dietas de *T. macdonaldi* no afectó los parámetros sanguíneos, por lo que no compromete el transporte de oxígeno hacia los órganos vitales del pez.

Debemos tomar en cuenta en que los cambios de los componentes sanguíneos dependerán de la especie, edad, variables fisicoquímicas, estado reproductivo y como ya se mencionó la alimentación.

Espinosa Acevedo (2014) menciona que los valores más altos de hematocrito y hemoglobina están directamente relacionados con un buen estado de salud de los organismos. Campbell (2015) menciona que los peces con un hematocrito mayor a 45% se debe a un aumento anormal de los glóbulos rojos, esta condición en mejor conocida como policitemia y se debe a una deshidratación o bien que la medula los produce en exceso, de manera contraria, peces con un porcentaje menor al 20% de hematocrito puede estar relacionado a un estado de anemia por lo que podría debilitar las funciones del sistema inmunológico. Con este contexto, en el presente trabajo, los valores de hematocrito de los organismos alimentados tanto con la dieta control como las dietas experimentales a base de HLMSN, estuvieron dentro de los rangos normales antes descritos (22 a 25%), por lo que podemos decir que las dietas no afectaron los valores hematológicos de los juveniles de *T. macdonaldi*, sin embargo, a pesar de no encontrar diferencias significativas ( $P>0.05$ ) en el porcentaje de hematocrito de los diferentes grupos experimentales, si se puede observar una tendencia a mayor porcentaje de

hematocrito en los organismos alimentados con la dieta M50 y esto pudiera estar relacionado a que la HLMSN contienen péptidos tales son como el ácido láurico y la quitina, los cuales mejoran la respuesta inmune de los organismos que la consumen.

Por otro lado, Lu et al. (2020) reportaron que, en los juveniles de carpa herbívora, no se presentaron diferencias significativas ( $P>0.05$ ) en los valores de albumina y proteína total, al sustituir los porcentajes de HP por HLMSN (25, 50, 75 %) en las dietas de los organismos. De igual manera en el estudio de Dumas et al. (2018) y Kishawy et al. (2022), reportaron que la albumina y la proteína total del plasma de los juveniles de trucha arcoíris y tilapia del Nilo (respectivamente), no fueron significativamente diferentes ( $P>0.05$ ) respecto al plasma de los organismos alimentados con la dieta control, por lo que no se observaron valores anormales en los tratamientos con respecto a los organismos alimentados con la dieta control, mismos resultados se pudieron obtener en el presente estudio al no obtener una diferencia significativa ( $P>0.05$ ) en los valores de albumina y proteína total en plasma de los juveniles de totoaba.

Los aumentos de los niveles de proteína total y albumina, son signos positivos en el estado de salud e inmunológicos de los organismos (Kumar et al., 2007), en los análisis del perfil de proteínas séricas de nuestro experimento no se encontraron diferencias significativas ( $P>0.05$ ), sin embargo, los organismos alimentados con dieta control presentaron los niveles de proteína total sérica más bajos en comparación con las demás dietas experimentales ( $3.2 \pm 0.5 \text{ g dL}^{-1}$ ), mientras que los organismos alimentados con HLMSN tuvieron los niveles de proteína total en un rango de  $3.5 - 3.8 \text{ g dL}^{-1}$ , esto pudiera ser debido a que se sabe que la HLMSN contiene compuestos bioactivos como péptidos antimicrobianos, ácido láurico y la quitina que funcionan como inmunopotenciadores (Mohan et al., 2023; Weththasingue et al., 2021), lo que podría haber sucedido en nuestros organismos como un posible efecto inmunoestimulante por parte de la HLMSN incluido en las dietas, aunque los efectos reales tendrían que comprobarse con otros análisis sanguíneos.

Los análisis de colesterol plasmático, así como triglicéridos totales, se realizan para evaluar el metabolismo de los lípidos de los organismos et al. (El-katcha et al., 2021).

Anurak et al. (2022) reporta que la inclusión de harina de MSN en las dietas de peces Golfish *Carassius auratus*, disminuyen linealmente los niveles séricos de colesterol total en los organismos al aumentar los niveles de inclusión proteica en la dieta con niveles de 43 g kg<sup>-1</sup>, 84 g kg<sup>-1</sup>, 145 g kg<sup>-1</sup>, y 210 g kg<sup>-1</sup> de HMSN para reemplazar la HP. De igual manera Wang et al. (2019) obtuvieron resultados similares con juveniles de lobina japonesa *Lateolabrax japonicus*, estos resultados son comparables con lo obtenido en nuestro estudio, ya que al incluir 86 g kg<sup>-1</sup>, 171 g kg<sup>-1</sup>, 256 g kg<sup>-1</sup>, 345 g kg<sup>-1</sup> y 428 g kg<sup>-1</sup> de HLMSN en las dietas de totoaba, los niveles séricos de colesterol total también disminuyeron cuando aumentaron los porcentajes de HLMSN, indicando que la HLMSN puede reducir la colesterolemia en los juveniles de totoaba, esto podría deberse a dos razones: la primera podría deberse a que la HLMSN contiene menos colesterol que la harina de pescado (Wang et al., 2019), y la segunda razón podría ser que la quitina funciona como una fibra dietética la cual actualmente se considera parte de una dieta saludable, debido a que reduce el colesterol plasmático, resultados reportados por Anurak et al. (2022), Magalhaes et al. (2017) y Escudero y González (2006).

Cuando un organismo ingiere alimento, la vesicular biliar libera sales biliares, la cual, a una cierta concentración forma moléculas llamadas micelas, estas son indispensables para el transporte de colesterol hasta las microvellosidades (borde de cepillo) de los enterocitos de los organismos, donde a través de difusión pasiva el colesterol atraviesa la membrana del enterocito hasta su citoplasma, posteriormente es incorporado al sistema linfático y finalmente a la sangre del organismo (Boix y Picó, 2005). La quitina es responsable de inhibir esta absorción de colesterol debido a que puede alterar la formación de micelas al unirse a ellas y aumentando la excreción de sales biliares, disminuyendo de esta manera los niveles de colesterol en sangre (Magalhaes et al., 2017).

En cuanto a la glucosa plasmática de los juveniles de totoaba se observó un aumento de los niveles cuando se incluyeron los porcentajes de HLMSN en la dieta de los organismos, observando que los organismos alimentados con dieta control tuvieron los valores más bajos de glucosa plasmática (39.7 ± 0.6 mg dL<sup>-1</sup>), mientras que las totoabas alimentadas con 50% de HLMSN en las dietas tuvieron los valores más alto de glucosa (57.2 ± 0.5 mg dL<sup>-1</sup>), estos resultados concuerdan con lo reportado por Guerreiro et al.

(2020) con juveniles de corvina (*Argyrosomus regius*) donde encontraron una tendencia de aumento lineal en los niveles de glucosa, alimentando a los organismos con porcentajes del 10, 20 y 30% de harina de *H. illucens*.

Chávez y Ubidia (2015) mencionan que los niveles de glucosa plasmática en trucha arcoíris es proporcional a los carbohidratos incluidos en la dieta; en nuestra investigación al realizar la composición proximal de las dietas obtuvimos que los valores de ELN fueron aumentando linealmente, siendo la dieta M50 con mayor contenido de ELN. (Tabla 3), mientras que por otra parte los niveles de glucosa plasmática de los peces alimentados con las dietas M10, M20, M30 y M40 fueron estadísticamente mayores al de los peces alimentados con la dieta control, pero, además, los valores de glucosa plasmática de los organismos alimentados con la dieta M50 fueron mayormente diferentes a la de los demás tratamientos experimentales incluida la dieta control, de esta manera corroborando la información de estos autores mencionados.

Por otra parte (Kamanlam y Panserat 2023) mencionan que los niveles de glucosa plasmática están directamente relacionados con la depositación de glucógeno en el tejido hepático, por lo que una dieta con niveles altos de carbohidratos podría afectar el funcionamiento hepático, ya que los carbohidratos se acumulan de forma excesiva en el hepatopáncreas de los peces, resultados que observamos en el presente experimento, ya que al tener un incremento de carbohidratos en las dietas de totoaba, se pudo observar, por medio de histología hepática, esteatosis macrovesicular en las totoabas alimentadas con las dietas M40 y M50, recordando que los valores de almidón en estas dietas fueron más altos que el resto, así mismo, la glucosa plasmática de estos organismo fue más alta.

Para los peces carnívoros marinos, los carbohidratos no son esenciales en comparación con las especies herbívoras, sin embargo, son componentes importantes en la dieta ya que favorecen el aprovechamiento de proteínas y lípidos (Guerrero Zarate, 2019). A pesar de esto, se ha demostrado que el aprovechamiento de los carbohidratos varía entre especie, así como la complejidad de la molécula (carbohidratos) en la dieta (Cho et al., 2022; Mikolajczak et al., 2022; Dumas et al., 2018; Ibarz et al., 2013), que en este caso la quitina es un carbohidrato poco digerible en algunas especies de peces;

mostrando que las especies carnívoras tienen una menor tolerancia a la glucosa, por lo que presentan hiperglicemia ya que requieren más tiempo para recuperar sus niveles de glucosa normal, y en muchos de los casos puede haber un crecimiento reducido en los organismos (Guerrero Zarate, 2019); con este contexto podemos comparar que los juveniles de totoaba alimentados con la dieta M50 tuvieron un incremento de la glucosa normal y una reducción en su crecimiento (Tabla 6).

## **8.5 Histología**

Particularmente, la histología en este trabajo se realizó para evaluar los posibles cambios morfológicos del intestino y hepatopáncreas de los juveniles de *T. macdonaldi* al sustituir parcialmente la HLMSNN (*H. illucens*) en las dietas de los peces, ya que hasta el momento en que se redacta esta tesis, no se encontró ninguna investigación que describa los efectos que causa dicha harina a nivel histológico (intestinal y hepático) en esta especie.

Tanto el intestino como el hepatopáncreas son órganos diana que nos permite ver las diferentes alteraciones a nivel celular al ser expuestas a diferentes estímulos ya sean físicos, biológicos, químicos, genéticos o nutricionales (Trejo, 2020), además las células que conforman este tejido se reajustan estructuralmente para poder potencializar su funcionalidad al encontrarse con estos diferentes estímulos estresores para el organismo.

### **8.5.1 Intestinal**

En este estudio se tomó el intestino distal como referente a cambios morfológicos a partir de la sustitución parcial de HLMSN, debido a que en el intestino distal es el lugar donde principalmente se lleva a cabo la digestión y absorción de los alimentos, además, es el sitio donde se llevan a cabo las funciones normales de la mucina que se secreta en el intestino a través de las células caliciformes (Luo et al., 2014).

En general en este estudio se encontraron diferencias estructurales estadísticamente significativas en cada uno de los componentes medidos del intestino distal.

Se pudo observar que con una sustitución parcial del 20 y 30% de harina de pescado por HLMSN en las dietas, no se tuvo un impacto negativo en el intestino distal de totoaba, es decir, las vellosidades intestinales fueron más largas que las demás dietas experimentales (incluso que la dieta control), no se vio una inflamación de la lámina propia, ni vellosidades, además que no se observaron infiltraciones de células inmunes en el intestino de los peces alimentados con las dietas mencionadas anteriormente.

Es importante mencionar que las vellosidades intestinales cumplen la función importante de absorber los nutrientes del alimento hacia la sangre a través de los enterocitos (Deng et al., 2010), la longitud y el ancho de las vellosidades pueden indicar el estado de salud de los organismos, ya que la buena formación o integridad del intestino es fundamental para el buen funcionamiento fisiológico, de lo contrario si se administra una dieta desequilibrada nutricionalmente puede provocar degeneración de estos tejidos.

Los resultados de esta investigación fueron muy similares a lo observado en el estudio de Elia et al., (2018), donde al sustituir porcentajes del 25% de HP por harina de *H. illucens*, en dietas para trucha arcoíris (*O. mykiss*), las vellosidades intestinales no se vieron afectadas, por lo que no se determinó una enteritis en la especie, así como tampoco se vieron afectados significativamente ( $P>0.05$ ) otras características morfológicas del intestino como tamaño de enterocitos, espesor de la pared intestinal, inflamación de las vellosidades y lamina propia, por lo que los autores sugieren que la trucha arcoíris no tiene una influencia negativa sobre la capacidad digestiva de esta fuente proteica a base de insectos.

También Huang et al. (2022), determinó que al incluir hasta un 30% de HMSN, no se observaron diferencias significativas ( $P>0.05$ ) en la morfología del intestino distal del mero negro *Epinephelus fuscoguttatus*. Por otra parte, Zhao et al., (2023), informaron que no encontraron cambios significativos ( $P>0.05$ ) en la histología intestinal de juveniles de Robalo (*Scophthalmus maximus L.*) al ser alimentados con 14% de sustitución de HP por harina entera y desgrasada de larva de mosca soldado negro, con respecto a la dieta

control a base de HP; resultados muy similares a los encontrados en el presente estudio, donde todas las mediciones realizadas en el intestino distal de totoaba (a excepción de la longitud de la submucosa) fueron muy similares entre los organismos alimentados con un 10% de sustitución de HLMSN y dieta control.

Por lo contrario, en nuestra investigación, los organismos alimentados con los tratamientos M40 y M50 obtuvieron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) en el acortamiento de las vellosidades intestinales. De manera similar se encontró un estudio Lu et al. (2020) en el que informaron que con un remplazo del 50% de HP por harina desgrasada de larva de mosca soldado en dietas para la Capra herbívora (*Ctenopharyngodon idellus*), el intestino de dicha especie presentó una disminución del espesor de la pared intestinal, además de que las distancias de los pliegues de las vellosidades fueron más largas entre sí a comparación de la dieta control.

Otros autores también han confirmado que con una inclusión mayor al 75% de harina de MSN en la dieta de los peces, afecta negativamente la morfología de las vellosidades intestinales, por lo que la capacidad de asimilación de nutrientes del alimento es mucho menor, además el tamaño de enterocitos se ve reducido, se muestran inflamaciones en las vellosidades y lamina propia, el espesor de la pared intestinal se ve reducido, hay infiltraciones leucocitarias, y en ocasiones se observa una desintegración estructural de la arquitectura de las vellosidades intestinales, en peces como la carpa común *Cyprinus carpio* (Senlin et al., 2017), la trucha arcoíris *O. mykiss* (Elia et al., 2018), y la dorada *Sparus aurata* (Gai et al., 2023); todos estos signos señalan de una enteritis intestinal severa, resultados que concuerdan con lo observado en el intestino distal de totoaba alimentados con las dietas M40 y M50 de este experimento.

Sin embargo, en estudios como el de Wang et al. (2019) de manera contraria a lo descrito anteriormente, lograron una sustitución del 64% de harina desgrasada de larvas de mosca soldado negro, sin que este afectara la estructura del intestino en juveniles de lobina japonesa *Lateolabrax japonicus*, es decir, no se vio afectada la altura de las vellosidades intestinales, el ancho, ni el número de células caliciformes por vellosidad.

El uso de las harinas a base de insectos en la industria acuícola está meramente dividido por varios investigadores; Se sabe que todas las harinas a base de insectos

contienen un cierto porcentaje de quitina, debido a que este polisacárido forma de manera natural la cutícula del organismo, así como también está presente en el exoesqueleto de camarones, cangrejos, langostas, langostinos y percebes (Rimoldi et al., 2023).

Varios estudios informan que un incremento alto de harina de insecto en la dieta de los peces, puede llegar a tener efectos negativos en su salud, como enteritis intestinal, donde ya se mencionó que los signos principales de esta enfermedad se presentan con una inflamación del tracto digestivo y acortamiento de las vellosidades intestinales principalmente (Zarantoniello et al., 2020; Gasco, 2018), además, disminuye la digestibilidad de las dietas por lo que se presenta una baja asimilación de los nutrientes contenidos en el alimento (Gasco, 2018), y por consiguiente el organismo le es imposible desarrollarse; Esto principalmente debe a que ciertos peces no cuentan con enzimas digestivas como las quitinasas para poder digerir y absorber la quitina.

Por otro lado, se ha demostrado que la quitina tiene efectos positivos al ser añadidos en la dieta de los organismos acuícolas, ya sea en forma de harina (a base de insectos) o bien como aditivos (aislada a partir del exoesqueleto de crustáceos), debido a que funcionan como inmunoestimulantes, además de tener beneficios en la microbiota (Antonopoulou et al., 2019), ya que al actuar como un prebiótico, estimula el crecimiento de bacterias benéficas, entre ellas degradantes de quitina (Rimoldi et al., 2023) por lo que hay organismos que elevan sus tasas de crecimiento y no se ve afectada la morfología intestinal de especies como la trucha arco iris *O. mykiss*, la tilapia del Nilo (*O. niloticus*), el jurel cola amarilla (*Seriola quinqueradiata*), el salmón Atlántico (*Salmo salar*) entre otros (Rimoldi et al., 2023; Agbohessou et al., 2022; Li et al., 2020).

En este sentido, se sugiere que los juveniles de *T. macdonaldi*, pueden tolerar inclusiones de hasta el 30% de HLMSN en la dieta sin que la quitina tenga efectos negativos en el intestino distal, y corroborando lo mencionado anteriormente por los autores (Zarantoniello et al., 2020; Gasco, 2018), al incluir altos porcentajes de harina de mosca soldado en las dietas, y que en este estudio fueron 40 y 50% de HLMSN en las dietas, se presentan daños en el intestino distal de los peces, impidiendo una correcta absorción de los nutrientes como podemos observar en la Figura 12 de este trabajo.

El aumento del número de células caliciformes fue otro de los cambios significativos ( $P < 0.05$ ) en el presente estudio; Se pudo observar que, con inclusiones de 0, 10, 20, y 30% de HLMSN en las dietas, no se presentaron cambios significativos en la densidad de células caliciformes en el intestino distal de totoaba, sin embargo, se pudo ver un incremento de estas células con una sustitución de 40 y 50% de HLMSN. Resultados muy similares se encontraron en el estudio de Kari et al. (2023) y Urán et al., (2018) donde la densidad de células caliciformes en las vellosidades fue en aumento conforme sustituyeron los niveles de la HP por harina de MSN en dietas para el pez beta (*Betta splendens*) y harina de soja en la carpa común (*Cyprinus carpio* L.) respectivamente, por lo que los autores mencionan que este aumento en la densidad de células se trata de signos de una respuesta inflamatoria similar a la causada por la harina de soja descrita en el Salmon atlántico (*Salmo salar*) como una enteritis sub-aguda no infecciosa de la mucosa epitelial distal (Agboola et al., 2022; Uran et al., 2018; Baeverfjord y Krogdahl, 1996).

De manera contraria en juveniles de lobina japonesa (*Lateolabrax japonicus*) no se vio afectado el número de células caliciformes mediante incorporaban harina de insecto *H. illucens* como fuente proteica en porcentajes de 16, 32, 48 y 64% (Wang, 2019).

Las células caliciformes o de goblet, se encuentran dispersas entre los tejidos del intestino y el aparato respiratorio; En el intestino, una de las principales funciones de las células caliciformes, es proteger la superficie epitelial del intestino a través de la mucina excretada por estas células, el cual es un componente transparente y viscoso que forma una capa de moco, y es la encargada de proteger a los enterocitos contra daños físicos y químicos (Kim y Khan, 2013). La capa de mucina creada por estas células también tiene la capacidad de prevenir infiltraciones de antígenos o microorganismos patógenos, ya que contiene anticuerpos como la inmunoglobulina A (IgA) que permite combatir contra estos agentes (Kim y Khan, 2013).

Por otro lado, los organismos tienden a reaccionar inmunológicamente cuando se administra alguna proteína o algún componente de la dieta que para él se considera extraña (antígeno alimentario) por lo que además de proporcionar una barrera física

contra enfermedades, la mucina de las células caliciformes también proporciona señales antiinflamatorias como defensa ante estos antígenos, que llegan a células dendríticas para regular la salud intestinal (Vázquez y Verga, 2012).

Zarantoniello et al. (2020), interpreta el aumento de mucina en el intestino del pez cebra (*Danio rerio*) como una lubricación necesaria para un adecuado transporte de las dietas administradas con inclusiones de 50, 75 y 100% de harina de pre-pupa de MSN y esto gracias al papel inmunoestimulador que juega la quitina en el sistema inmunológicos de los peces.

En este sentido con lo antes descrito, posiblemente en este estudio el aumento del número de células caliciformes se puede interpretar como una respuesta a la alteración de la estructura de las vellosidades intestinales, así como una respuesta defensiva al epitelio y modulador de la inflamación intestinal al incorporar sustituciones parciales del 40 y 50% de HLMSN en la dieta de totoaba.

### **8.5.2 Hepática**

Generalmente, se menciona que el hepatopáncreas es muy sensible ante los alimentos consumidos, por lo que la salud de los organismos varía dependiendo de la calidad del alimento (Wang et al., 2019).

En cuanto la histología hepatopancreática de totoaba, se observó que los hepatopáncreas de los organismos alimentados con las dietas DC, M10, M20 y M30 de sustitución de HLMSN, no presentaron alteraciones en la morfología de este órgano, a excepción del tratamiento M30 en donde solo en algunas zonas se comenzó a visualizar hepatocitos con inclusiones de pequeñas vacuolas lipídicas. Anedda et al. (2023), también determinaron que con sustituciones del 10% de HP por harina de MSN en la dieta de la dorada (*Sparus aurata*), no causa alteraciones o daños en la morfología de las células hepáticas del organismo.

Otros trabajos muy similares al nuestro, fue el de Bruni et al. (2020) en el cual no se encontraron diferencias en los hígados de las trucha arcoíris (*O. mykiss*) alimentados con inclusiones del 25% de HMSN en el alimento y la dieta control a base de harina de

pescado. De igual manera en el trabajo de Zarantoniello et al. (2020) indicaron que con inclusiones menores al 25% de harina de pre-pupa de *H. illucens*, el hígado de los juveniles del pez cebra (*Danio rerio*) no presentó esteatosis en los hepatocitos.

Sin embargo, caso contrario ocurrió en juveniles de curvina (*Argyrosomus regius*) ya que los organismos presentaron vacuolización hepática debido a la presencia de lípidos en los hepatocitos cuando fue alimentada con una sustitución de 15% de HP por harina de grillo (*Acheta domestitcus*) (Estévez et al., 2022).

Por otro lado, en nuestro estudio se observó una esteatosis macrovesicular muy notoria en los organismos alimentados con las dietas M40 y M50 de sustitución de HLMSN, sin embargo, a pesar de estos cambios en la estructura de los hepatocitos, no se notó ninguna otra alteración en el parénquima hepático ni pancreático, como necrosis, inflamaciones o infiltración de células inmunes en las totoabas alimentadas con las dietas experimentales.

Nuestros resultados fueron consistentes con los resultados que se presentaron en la investigación de Bruni et al. (2020), donde los autores mencionan que al sustituir 50% de HP por harina de MSN en dietas para trucha arcoíris (*O. mykiss*), el parénquima hepático de los organismos mostró una acumulación de lípidos en los hepatocitos, la cual determinaron como esteatosis macrovesicular. En el estudio de Bisiato et al. (2022) encontraron resultados similares al estudio anterior con la misma especie, encontrando inflamación, vacuolización lipídica, infiltraciones linfocitarias alrededor de los conductos biliares, degeneración del tejido hepático en los organismos alimentados con una dieta con inclusiones del 50 y 100% de HMSN, sin embargo, estos cambios también se encontraron en los organismos alimentados con la dita control, concluyendo que estos cambios histopatológicos no fueron influenciados por la utilización de la harina de MSN.

En las dietas experimentales del presente trabajo, pudimos observar los niveles de PUFAS  $\omega$ -3 fueron en disminución, de acuerdo con el aumento del porcentaje de inclusión de HLMSN en dietas para totoaba, de esta manera relacionando los resultados obtenidos debido a que se sabe una dieta balanceada en ácidos grasos poliinsaturados previene el daño hepático; observando esteatosis macrovesicular en el hígado de los organismos alimentados con las dietas M40 y M50, las cuales tuvieron niveles más bajos

de PUFAS  $\omega$ -3. Sin embargo, a pesar de observar esteatosis en los hepatocitos del hígado de estos dos grupos experimentales, no se obtuvieron diferencias significativas ( $P>0.05$ ) en el índice hepatosomático.

## 9. CONCLUSIONES

El peso ganado en los juveniles de *T. macdonaldi* al final del bioensayo no se vio afectado por la inclusión de HLMSN en las dietas, ya que a pesar de observar una reducción de peso en los organismos alimentados con porcentajes del 40 y 50% de HLMSN, estos pesos no fueron menores al de los peces alimentados con la dieta control.

El grupo de peces alimentados con las dietas M20 y M30 mostraron una mejor tasa de crecimiento específico (TCE) en comparación con el grupo de peces alimentados con la dieta control a base de HP.

Los diferentes porcentajes de inclusión de HLMSN en las dietas de *T. macdonaldi* no afectaron los parámetros productivos (IA, FCA, IHS, IVS) ni la supervivencia de los organismos.

Los diferentes porcentajes de inclusión de HLMSN en las dietas de *T. macdonaldi* no afectaron la composición proximal (humedad, cenizas, lípidos y proteínas) de pez entero, músculo y vísceras.

La inclusión del 50% de HLMSN en la dieta de los juveniles de *T. macdonaldi*, modificó el perfil de lípidos en el hígado, en comparación con el grupo de organismos alimentados con la dieta control, por lo que se sugiere que esto pudo haber ocurrido por el aumento de los carbohidratos en la dieta, así como el tipo de ácidos grasos de la HLMSN.

Los AGS aumentaron en el músculo e hígado de los organismos conforme se incluyó la HLMSN en las dietas, mientras los MUFAS y PUFAS bajaron sus niveles de concentración en los tejidos.

La inclusión de los diferentes porcentajes de HLMSN en la dieta de los juveniles de *T. macdonaldi*, no afectó significativamente ( $P > 0.05$ ) los valores de %HT, HM, PROT y ALB. Sin embargo, conforme se incluyó la HLMSN en las dietas de totoaba, los niveles de colesterol plasmático disminuyeron, debido a que la HLMSN puede reducir la colesterolemia en los organismos, alterando la formación de micelas. Por otro lado, se observó un aumento en los valores de glucosa plasmática, significativamente ( $P < 0.05$ )

mayor en el grupo de peces alimentados con la dieta M50, determinando que pudo deberse al aumento de carbohidratos en la dieta, además, que de acuerdo con los antecedentes los peces carnívoros tienen una menor tolerancia a la glucosa, promoviendo en ellos el aumento de los niveles de glucosa plasmática.

De acuerdo con el análisis histológico intestinal se determinó que una inclusión del 20 y 30% de HLMSN en la dieta de *T. macdonaldi*, no compromete la salud intestinal del organismo, mientras que sustituciones del 40 y 50% de HLMSN genera enteritis en los peces.

Las inclusiones del 40 y 50% de HLMSN en las dietas de totoaba, generó un mayor número de células caliciformes en el tejido intestinal, la cual se puede interpretar como una respuesta a la alteración de las estructuras de las vellosidades intestinales, así como una respuesta defensiva al epitelio y modulador de la inflamación intestinal ante la enteritis generada en este grupo de peces.

En el análisis histológico hepático se concluye que con inclusiones del 40 y 50% de HLMSN en las dietas de totoaba, se presenta esteatosis macrovesicular en el parénquima hepático, mientras que las inclusiones del 10, 20 y 30% de HLMSN no compromete la salud hepatopancreática del organismo.

Finalmente, se concluye que se puede sustituir hasta un porcentaje de 30% de harina de larva de mosca soldado negro *H. illucens* en la dieta de los juveniles de *T. macdonaldi*, ya que no compromete la salud ni los parámetros de crecimiento de los organismos, sin embargo, se recomienda una inclusión del 20% de HLMSN para mejores resultados.

## 10. RECOMENDACIONES

- Realizar análisis de digestibilidad de las dietas formuladas, debido a que no solo debemos tomar en cuenta el porcentaje proteico de las fuentes alternativas para el reemplazo de la HP, ya que estas también deben ser digeribles para que los nutrientes puedan ser asimilados y aprovechados por los organismos.
- Formular dietas balanceadas en el contenido de quitina, para confirmar si la quitina tiene un efecto ya sea negativo o positivo en los juveniles de *T. macdonaldi*.
- Realizar análisis de células rojas como globulinas, volumen corpuscular medio, concentración media de hemoglobina, concentración media de hemoglobina corpuscular y parámetros relacionados con el sistema inmunológico como lisozimas, inmunoglobulinas, células blancas (porcentaje de linfocitos, monocitos, neutrófilos) ya que nos indican un mejor estado de salud de los peces, así como las respuestas inmunes de los organismos ante la inclusión de harina de larva de mosca soldado en la dieta de los juveniles de *T. macdonaldi*.
- Realizar análisis de actividad enzimática AST y ALT en sangre, ya que son indicadores principales de la función hepática, complementando de esta manera los análisis de histología hepática.

## 11. LITERATURA CITADA

- Abdel-Tawwab, M., Khalil, R. H., Metwally, A. A., Shakweer, M. S., Khallaf, M. A., y Abdel-Latif, H. M. R., (2020). Effects of black soldier fly (*Hermetia illucens* L.) larvae meal on growth performance, organs-somatic indices, body composition, and hemato-biochemical variables of European sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *Aquaculture*, 522: 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735136>.
- Agbohessou Pamphile S., Mandiki Syaghalirwa N.M., Mbondo Biyong Serge R., Cornet Valérie, Nguyen Thi Mai, Lambert Jérôme, Jauniaux Thierry, Laléyé Philippe A., Kestemont Patrick. (2022). Intestinal histopathology and immune responses following *Escherichia coli* lipopolysaccharide challenge in Nile tilapia fed enriched black soldier fly (BSF) meal supplemented with chitinase. *Fish y shellfish immunology*, 128: 626. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2022.08.050>
- Agboola Jeleel O., Chikwati Elvis M., Hansen Jong O., Kortner Trond M., Mydland Liv T., Krogdahl Ashild., Djordjevic Brankica, Schrama Johan W., Overland Margareth., (2022). A meta- análisis to determine factors associated with the severity of enteritis in Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed soybean meal-based diets. *Aquaculture*, 555: 2,4,6. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738214>
- Álvarez J., Álvarez A., Obregón J., Agurto C., (2004). Resistencia antimicrobiana en bacterias aisladas de tilapias, agua y sedimento en Venezuela. En Maracaibo, Venezuela. De revista científica RC, laboratorio de microbiología de peces y crustáceos, 14:7-13. <https://www.redalyc.org/pdf/959/95914602.pdf>
- Anedda Roberto, Melis Riccardo, Palomba Antonio, Vitangeli Ilaria, Biossa Grazia, Braca Angela, Antonni Micaela, Moroni Federico, Romoldi Simona, Terona Genciana, Pagnozzi Daniela., (2023). Balanced Replacement of fish meal with *Hermetia illucens* meal allows efficient hepatic nutrient metabolism and increases fillet lipid quality in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquacultura*, 576: 1-2. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2023.739862>
- Antonopoulou Efthmia, Nikouli Eleni, Piccolo Giovanni, Gasco Laura, Gai Francesco, Chatzifotis Stavros, Mente Eleni, Ar Kormas Konstantinos. (2019). Reshaping gut

bacterial communities after dietary *Tenebrio Molitor* larvae meal supplementation in three fish species. *Aquaculture*, 503: 639,631,632.

Anurak Khieokhajokhet, Phusanisa Uanlam, Khanitta Ruttarattanamongkol, Niram Aeksiri, Pattaraporn Tatsapong, Gen Kaneko, (2022). Replacement of fish meal by black soldier fly larvae meal in diet for goldfish *Carassius auratus*: Growth performance, hematology, histology, total carotenoids, and coloration. *Aquaculture*, 561:2, 4, 7 y 8. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738618>

Aprianto Muhammad Anang, Muhlisin, Kurniawati Asih, Hanim Chusnul, Ariyadi Bambang, Anas Muhsin Al., (2023). Effect supplementation of black soldier fly larvae oil (*Hermetia illucens*) Calcium salt on performance, blood biochemical profile, carcass characteristic, meat quality, and gene expression in fat metabolism broilers. *Poultry Science*, 102(10):1-2. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2023.102984>

Arcos Méndez A., (2015). Condiciones de demanda de harina y aceite de pescado para piensos acuícolas en México. En Mazatlán-Sinaloa, México. En Centro de Investigación de Alimentación y Desarrollo, A.C. *CIAD*: 21-25. <https://ciad.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1006/108/1/Arcos%20Mendez%20Andres.pdf>

Azmiera, N., Krasilnikova, A., Sahudin, S., Al-Talib, H., y Heo, C. C., (2022). Antimicrobial peptides isolated from insects and their potential applications. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 25(2):1-7. <https://doi.org/10.1016/j.aspen.2022.101892>.

Baeverfjord, G. and Krogdahl, A. (1996) Development and Regression of Soybean Meal Induced Enteritis in Atlantic Salmon, *Salmo salar* L., Distal Intestine: A Comparison with the Intestines of Fasted Fish. *Journal of Fish Diseases*, 19: 375-387. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2761.1996.tb00376.x>

- Belghit Ikram Nina, Petter Gjesdal Lilanda, Biancarosa Irene, Menchetti Elisa, Li Yanxian, Waagbo Runa, Krogdahl Ashild, Bloquear Erik-Jan., (2019) Black soldier fly larvae meal can replace fish meal in diets of sea-water phase Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 503: 614., <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.12.032>
- Biasato I., Chemello G., Bellezza Oddo S., Ferrocino I., Corvaglia M.R., Caimi C., Resconi A., Paul A., Spankeren Van M., Capucchio M.T., Colombino E., Cocolin L., Gai F., Schiavone A., Gasco L., (2022). *Hermetia illucens* meal inclusion in low fishmeal diets for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Effects on the growth performance, nutrient digestibility coefficients, selected gut health traits, and health status indices. *Animal Feed Science and Technology*, 290: 7. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2022.115341>
- Black M.M., and Schwartz H.M., (1950). The estimation of chitin and chitin nitrogen in crawfish waste and derived products. *Analyst*, 75: 185-189.
- Bruni Leonardo, Randazzo Basilio, Cardinaletti Gloriana, Zarantonello Matteo, Mina Fabio, Secci Giulia, Tulli Francesca, Olivetto Ike, Parasi Giuliana., (2020). Dietary inclusion of full-fat *Hermetia illucens* prepupae meal in practical diets for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Lipid metabolism and fillet quality investigations. *Aquaculture*, 529: 8. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735678>
- Boix E., Picó A.M., (2005). Inhibidores de la absorción del colesterol. *Endocrinología y Nutrición*, 52(6): 98-99.
- Caimi Christian, Renna Manuela, Lussiana Carola, Bonaldo Alessio, Giraglio Marta, Meneguz Marco, Dabbou Silhem, Schiavone Achille, Gai Francesco, Elia Antonia Concetta, Prearo Marino, Gasco Laura., (2020). First insights on black soldier fly (*Hermetia illucens* L.) larvae meal dietary administration in Siberian sturgeon (*Acipenser baerii* Brandt) juveniles. *Aquaculture*, 512: 5. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734539>

- Campbell, T.W. 2015. 1. Peripheral Blood of Mammals. Exotic Animal Hematology and Cytology, *Wiley Blackwell*, 4ta Ed.: (Pg3-36).
- Carpio Ramirez, Alma Edith., (2013). Efecto de la sustitución de harina de pescado por harina de subproducto de ave en el perfil de ácidos grasos y crecimiento en juveniles de *Totoaba macdonaldi*. Universidad Autónoma de Baja California. Tesis. (Pg. 29) <https://repositorioinstitucional.uabc.mx/server/api/core/bitstreams/8aafd682-8b33-4ace-ac4d-fa12035cc6d6/content>
- Carvajal Soriano Karen E., (2022). Efecto de la sustitución de harina de pescado por harina de insecto (*Hermetia illucens* y *Acheta domesticus*) en el desempeño biológico, digestibilidad, actividad enzimática y perfil de ácidos grasos de juveniles de *Totoaba macdonaldi*. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California. (pg. 29). <http://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1007/3670>
- Carvalho Marta, Torrecillas Silvia, Montero Daniel, Sanmartín Antonio, Fontanillas Ramon, Farías Ana, Moutou Katerina, Hernández Velásquez Jorge, Izquierdo Marisol. (2023). Insect and single-cell protein meals as replacer of fish meal in low fish meal and fish oil diets for gilthead sea bream (*Sparus aurata*) juveniles. *Aquaculture*, 566: 6. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.739215>.
- Chakladre Md Reaz, Howieson Janet, Fotedar Ravi., (2021). Growth, Hepatic health, mucosal barrier status and immunity of juvenile barramundi, *Lates calcarifer* fed poultry by-product meal supplemented with full-fat or defatted *Hermetia illucens* larval meal. *Aquaculture*, 543: 5. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737026>
- Chavez Alcivar Becxi E., Ubidia Lugo David J., (2015). Elaboración y valuación de la harina de grillo *Acheta domesticus* como sustituto de harina de pescado en dos líneas de trucha arcoíris *Oncorhynchus mykiss* durante la etapa de alevinaje. Universidad de las fuerzas armadas. (Pg.31). [https://www.academia.edu/14137536/ELABORACION\\_Y\\_EVALUACION\\_DE\\_LA\\_HARINA\\_DE\\_GRILLO\\_Acheta\\_domesticus\\_COMO\\_SUSTITUTO\\_DE\\_HARINA\\_DE\\_PESCADO\\_EN\\_DOS\\_LINEAS\\_DE\\_TRUCHA\\_ARCOIRIS\\_Oncorhynchus\\_mykiss\\_DURANTE\\_LA\\_ETAPA\\_DE\\_ALEVINAJE](https://www.academia.edu/14137536/ELABORACION_Y_EVALUACION_DE_LA_HARINA_DE_GRILLO_Acheta_domesticus_COMO_SUSTITUTO_DE_HARINA_DE_PESCADO_EN_DOS_LINEAS_DE_TRUCHA_ARCOIRIS_Oncorhynchus_mykiss_DURANTE_LA_ETAPA_DE_ALEVINAJE)

- Chen Yubing, Lawson Rebecca, Shandilya Umesh, Chiasson Marcia A., Karrow Niel A., Huyben David, (2023). Dietary protein, lipid and insect meal on growth, plasma biochemistry and hepatic immune expresión of lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*). *Fish and Shellfish immunology reports*, 15: 1-2. <https://doi.org/10.1016/j.fsirep.2023.100111>
- Cho Jeong-Hyeon, Bae Jinho, Hwang In joon., (2022). Effects of black soldier fly (*Hermetia illucens*) pre-pupae meal on the growth, stress, and immune responses of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) reared at different stocking densities. *Aquaculture reports*, 25: 5. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2022.101202>
- Cisneros-Mata, M.A., Montemayor-Lopez, G. and Roman-Rodriguez, M.J., (1995) Life history and conservation of *Totoaba macdonaldi*. *Conservation Biology*, 9: 806-814.
- Correa Ignacio L., (2020). Efecto de la harina de larvas de mosca soldado negro parcial *Hermetia illucens*: Reemplazo de HP en dietas practicas sobre el crecimiento, enzima digestiva, y expresión genética relacionada para la anguila de los arrozales *Monoplerus albus*. (pg. 1-3). <https://es.scribd.com/document/473012860/Efecto-de-la-harina-de-larvas-de-mosca-soldado-negro-parcial>.
- Cuervo Moreno Leonardo Irad, (2014). Perfil de ácidos grasos en algunas especies dulceacuícolas de interés comercial en Colombia, estado del conocimiento y perspectivas. Universidad de La Salle, Retrieved from, <https://ciencia.lasalle.edu.co/zootecnia/207>
- Cummins, V. C., Rawles, S. D., Thompson, K. R., Velasquez, A., Kobayashi, Y., Hager, J., y Webster, C. D., (2017). Evaluation of black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae meal as partial or total replacement of marine fish meal in practical diets for Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture*, 473: 337–344. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.02.022>.
- Dayrit Fabian M., (2014). The properties of Lauric Acid and their significance in coconut oil. *American Oil Chemists Society*, 92(1): 2-3

- Deng J., Mai K., Qinghui Ai., Wenbing Z., Beiping T., Wei X., Zhiguo L., (2010). Alternative protein sources in diets for Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* (Temminck and Schlegel): II. Effects on nutrient digestibility and digestive enzyme activity. *Aquaculture Research*, 41(6); 861. [10.1111/j.1365-2109.2009.02363](https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02363).
- Di Minno Matteo Nicola Dario, Russolillo Anna, Lupoli Roberta, Pasquale Ambrosino, Di Minno Alessandro, Tarantino Giovanni., (2012). Omega-3 fatty acids for the treatment of non-alcoholic fatty liver disease. *World Journal of Gastroenterology*, 18: 41. [https://doi.org/ 10.3748/wjg.v18.i41.5839](https://doi.org/10.3748/wjg.v18.i41.5839)
- Dumas André, Raggi Thiago, Barkhouse Justin, Lewis Elizabeth, Weltzien Erika., (2018). The oil fraction and partially defatted meal of black soldier fly larvae (*Hermetia illucens*) affect differently growth performance, feed efficiency, nutrient deposition, blood glucose and lipid digestibility of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 492: 28. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.03.038>
- Elia Antonia C., Capucchio Teresa M., Caldaroni B., Magara G., Martin Dorr Ambrosius J., Biasato I., Biasibetti E., Righetti M., Pastorino P., Prearo M., Gia F., Schiavone A., Gasco L., (2018): Influence of *Hermetia illucens* meal dietary inclusion on the histological traits, gut mucin composition and the oxidative stress biomarkers in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 496; 50-57. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.07.009>
- El-Katcha Mohamed I., Soltan Mosaad A., Shewita Ramadan, Abdo Safaa E., Sanad Amr S., Tufarelli Vincenzo., Alagawany Mohmoud, El-Naggar Karima., (2021). Dietary Fiber and Lysolecithin Supplementation in Growing Ducks: Effect on Performance, Immune Response, Intestinal Morphology and Lipid Metabolism-Regulating Genes. *Animals*, 11(10): 2873. <https://doi.org/10.3390/ani11102873>
- Escobar Sierra D. M., Ossa Orozco C. P., Quintana M.A., Ospina W. A., (2013). Optimización de un protocolo de extracción de quitina y quitosano desde caparazones de crustáceos. *Universidad Tecnológica de Pereira*, 18(1):261-262. ISSN 0122-1701

- Escudero Álvarez E. y González Sánchez P., (2006). La fibra dietética. nutrición Hospitalaria. (Supl.2):62,67,68. ISSN 0212-1611
- Espinosa Acevedo Heraclio Manuel, (2014). Efecto del contenido de proteína de soya en la dieta sobre la hematología y química sanguínea en los juveniles de totoaba (*Totoaba macdonaldi*). Universidad Autónoma de Baja California: (Pg.30-34). <https://repositorioinstitucional.uabc.mx/server/api/core/bitstreams/cf33f38a-fcd7-4b9b-83da-759ff4e3efae/content>
- Esteban MA, Cuesta A, Ortuño J, Meseguer J., (2001). Immunomodulatory effects of dietary intake of chitin on gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) innate immune system. *Fish Shellfish Immunol: National Library of Medicine*, 11(4): 311. Doi: 10.1006/fsim.2000.0315.
- Estévez A., Blanco B., Fernández L., Ferreira M., Soula M., (2022). Effects of alternative and sustainable ingredients, meal insect microalgae and protein and lipid from tuna cooking water, in meagre (*Argyrosomus regius*) growth, food conversion and muscle and liver composition. *Aquaculture*, 548(1): 4-7. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737549>
- Fawole Femi J., Adeoye Ayodeji A., Tihamiyu Lateef O., Ajala Khadijah I., Obadara Saudat O., Ganiyu Ibrahim O., (2020). Substituting fishmeal with *Hermetia illucens* in the diets of African catfish (*Clarias gariepinus*): Effects on growth, nutrient utilization, haemato-physiological response, and oxidative stress biomarker. *Aquaculture*, 518: 3. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734849>
- Flanagan, C.A, Hendrickson, J.R., (1976) Observations on the commercial fishery and reproductive biology of the totoaba *Cynoscion macdonaldi*, in the northern Gulf of California. *Fishery Bulletin*,74: 531.
- Food Agriculture Organization FAO., (2020). El Estado Mundial De La Pesca Y La Acuicultura. La sostenibilidad requerida. Roma, (pg. 2-4). <https://doi.org/10.4060/ca9229es>
- Folch, J., Lees, M., Sloane-Stanley, G.H.S. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem*, 226: 497– 509.

Fortoul van der Goes T., I., (2017)., Histología y biología celular; Epitelios. *McGraw Hill*. 3era Ed. ISBN: 978-607-15-1408-0

Gai Francesco, Cusimano Giovanni Marco, Maricchiolo Giulia, Caccamo Letteria, Caimi Christian, Macchi Elisabetta, Meola Martina, Perdichizzi Anna, Tartarisco Gennaro, Gasco Laura. (2021)., Defatted Black Soldier Fly Meal in Diet for Grow-Out Gilthead Seabream (*Sparus aurata L. 1758*): Effects on Growth Performance, Gill Cortisol Level, Digestive Enzyme Activities, and Intestinal Histological Structure. *Aquaculture Research*, 2023: 7-10. <https://doi.org/10.1155/2023/3465335>

Garnica Gómez Lorena A., (2022). Efecto de las macroalgas como ingrediente funcional en el desempeño biológico, capacidad digestiva y respuesta inmune de la totoaba, *Totoaba macdonaldi*. CICESE: Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California (pg. 22). [https://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1007/3672/1/tesis\\_Lorena%20Andrea%20Garnica%20Gómez\\_16%20feb%202022.pdf](https://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1007/3672/1/tesis_Lorena%20Andrea%20Garnica%20Gómez_16%20feb%202022.pdf)

Garza Fernandez Ma. Hilda y Correa Lettien Ma. Teresa. (1992). Enfermedades nutricionales. Universidad Autónoma de Nuevo León. (pg.118-120).

Gasco Laura, Henry Morgane, Piccolo Giovanni, Marono Stefania, Gai Francesco, Renna Manuela, Lussiana Carola, Antonopoulou Efthimia, Mola Paula, Chatzifotis Stavros., (2016). *Tenebrio molitor* meal in diets for European seabass (*Dicentrarchus labrax L.*) Juveniles: Growth performance, whole body composition and in vivo apparent digestibility.,220; 39-41. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2016.07.003>

Gasco, L., Finke, M., y van Huis, A., (2018). Can diets containing insects promote animal health. *Journal of Insects as Food and Feed*. Wageningen Academic Publishers, 4(1):1–4. <https://doi.org/10.3920/JIFF2018.x001>

González Acevedo D., (2011). Respuesta en crecimiento de juveniles de Totoaba macdonaldi alimentados con dietas con diferentes niveles de almidón y lípidos, y adicionadas con un probiótico. Universidad Autónoma de Baja California, México. (pg.5-8).

Guerreiro Inés, Castro Carolina, Antunes Beatriz, Coutinho Filipe, Rangel Fábio, Couto Ana, Serra Cláudia R., Peres Helena, Pousao- Ferreira Pedro, Matos Elisabete, Gasco Laura, Gai Francesco, Corraze Genevieve, Olivia-Teles Aires, Enes Paula., (2020). Catching black soldier fly for meagre: Growth, whole-body fatty acid profile and metabolic responses. *Acuaqultura*, 516:4-5. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734613>

Guerrero Zárata Rocio., (2019). Estudio del metabolismo de la glucosa bajo diferentes condiciones glicémicas en el pejelagarto (*Atractosteus tropicus*). Universidad Autónoma de Baja California: Facultad de Ciencias Marinas. (Pg. 1,3,5,6) <https://repositorioinstitucional.uabc.mx/server/api/core/bitstreams/21d144e3-a7cd-446e-bfba-68ad9edfad38/content>

Heder A., Siddik M. A., Howieson J., Fotedar R., (2021). Black Soldier Fly, *Hermetia illucens* as an alternative to fishmeal protein and fish oil: Impacto on growth, immune response, mucosal barrier status, and flesh quality of juvenile Barramundi, *Lates calcarifer* (Bloch, 1790). *Biology*, 10(6): 505. <https://doi.org/10.3390/biology10060505>

Hernández Cerón Abel de Jesús, (2020). Efecto de la inclusión de harina de pescado en la alimentación de ovinos de pelo en finalización, sobre las características de la canal y calidad de la carne. Universidad Autónoma de Nayarit. (Pg.19) [http://dspace.uan.mx:8080/jspui/bitstream/123456789/2305/1/EFECTO%20DE%20LA%20INCLUSI%C3%93N%20DE%20HARINA%20DE%20PESCADO%20ARTES%20ANAL%20EN%20LA\\_compressed.pdf](http://dspace.uan.mx:8080/jspui/bitstream/123456789/2305/1/EFECTO%20DE%20LA%20INCLUSI%C3%93N%20DE%20HARINA%20DE%20PESCADO%20ARTES%20ANAL%20EN%20LA_compressed.pdf)

Hernández Flores G., (2014). Efectos de la sustitución total de harina de pescado con harina de soya (*Glycine maxima*) y polvo de Spirulina en juveniles de especies acuícolas de importancia comercial. Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM. (pg. 4-5) <http://132.248.9.195/ptd2014/enero/0707929/0707929.pdf>

Huang Bocheng, Zhang Shuang, Dong Xiaohui, Chi Shuyan, Yang Qikui, Liu Hongyu, Tan Beiping, Xie Shiwei. (2022). Effects of fishmeal replacement by black soldier fly on growth performance, digestive enzyme activity, intestine morphology, intestinal flora and immune response of Pearl geantin grouper (*Epinephelus fuscoguttatus*,

*Epinephelus lanceolatus*). *Fish y shellfish immunology*, 120: 497.  
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2021.12.027>

Hurtado Lévano Pablo C., (2010). Evaluación de los efectos de la quitina en la respuesta inmune humoral y celular innata de especímenes juveniles *Oncorhynchus mykiss* desafiados con la cepa estándar *Flavobacterium psychrophilum* NMCD 1947T. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. (Pg. 1-3).  
[https://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12672/2948/Hurtado\\_lp.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12672/2948/Hurtado_lp.pdf?sequence=1&isAllowed=y)

Hyeon Cho- Jeong, Bae Jinho, Hwang In Joon., (2022). Effects of black soldier fly (*Hermetia illucens*) pre-pupae meal on the growth, stress, and immune responses of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) reared at different stocking densities. *Aquaculture Reports*, 25: 5. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2022.101202>

Ibarz Antoni, Blasco Josefina y Fernandez Jaume., (2013). Piscicultura marina en Latinoamérica, bases científicas y técnicas para su desarrollo: Bases metabólicas de la nutrición. Requerimientos energéticos: proteínas glúcidos, vitaminas y minerales. Ed. Universidad de Barcelona. (pg.60-61) ISBN 978-84-475-3719-8

Janssen Renske H., Vincken Jean-Paul, Broek AM van den Lambertus, Fogliano Vincenzo, Lakemond Catriona MM., (2017). Nitrogen- to- protein conversión factors fot three edible insects: *Tenebrio molitor*, *Alphitobius diaperinus*, and *Hermetia illucens*. *Agricultural and food chemistry*, 65: 2277.  
<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b00471>

Jiang Biao, Sun Yanxin, Li Wei, Liu Chun, Wen Caiyi, Li Anxing, Huang Yanhua, Su Youlu., (2022). Effects of dietary black soldier fly (*Hermetia illucens*, *Linnaeus*) on the disease resistance of juvenile grouper (*Epinephelus coioides*). *Fish y Shellfish Immunology*, 123: 138. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2022.02.046>

Kamalam Biju S., Panserat S., (2023). Carbohidratos en la nutrición de peces. *Fish Farming Technology: Internacional AquaFeed*. <https://aquafeed.co/magazine/>

Kari Zulhisyam Abdul, Téllez-Isaías Guillermo, Abdul Hamid Noor Khalidah, Rusli Nor Dini, Mat Khairiyah, Mohamad Sukri Suniza Anis, Kabir Muhammad Anamul, Ishak

- Ahmad Razali, Dom Nazri Che, Abdel-Wahab A. Abdel-Warith, Younis Elsayed M., Khoo Martina Irwan Khoo, Abdullah Faizuan, Shahjahan Md., Rohani Md Fazle, Davies Simon J., Wei Lee Seong., (2023). Effect of Fish Meal Substitution with Black Soldier Fly (*Hermetia illucens*) on Growth Performance, Feed Stability, Blood Biochemistry, and Liver and Gut Morphology of Siamese Fighting Fish (*Betta splendens*)", *Aquaculture Nutrition*, 2023. <https://doi.org/10.1155/2023/6676953>
- Kim Janice j., Khan Waliul L., (2013). Globet cells and mucins: Role in innate defense in enteric infections. *Pathogens*, 2: 55-70. <https://doi.org/10.3390/pathogens2010055>
- Kishawy Asmaa TY., Mohammed Hain A., Zoglool Asmaa W., Attia Mai S., Hassan Fardos A.M., Roushdy Elshimaa M., Ismail Tamer Ahmed, Ibrahim Doaa., (2022). Partial defatted black soldier larvae meal as a promising strategy to replace fish meal protein in diet for nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): Performance, expresión of protein and fat transporters, and cytokines related genes and economic efficiency. *Aquaculture*, 555: 5. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.73819>
- Koutsos E., Modica B., Freel T., (2022). Immunomodulatory potential of black soldier fly larvae: Applications beyond nutrition in animal feeding programs. *Translational Animal Science., Oxford Academic*, 6:1-9. <https://doi.org/10.1093/tas/txac084>
- Kroeckel s., Harjes A.G.E., Roth I., Katz H., Wuertz S., Susenbeth A., Schulz C., (2012). When a turbot catches a fly: Evaluation of a pre-pupae mea lof the black soldier fly (*Hermetia illucens*) as fish meall substitute – Growth performance and titin degradation in juvenile turbot (*Psetta máxima*). *Aquaculture*, 364-365: 338-349. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.08.041>
- Kumar, V., Fawole, F. J., Romano, N., Hossain, M. S., Labh, S. N., Overturf, K., y Small, B. C., (2021). Insect (black soldier fly, *Hermetia illucens*) meal supplementation prevents the soybean meal-induced intestinal enteritis in rainbow trout and health benefits of using insect oil. *Fish and Shellfish Immunology*, 109: 116–124. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.12.008>

- Kumar V., Sahu N.P., Pal A.K., Kumar Shivendra., (2007). Immunomodulation of *Labeo rohita* juveniles due to dietary gelatinized and non-gelatinized starch. *Fish & Shellfish Immunology*, 23: 342. doi:10.1016/j.fsi.2006.11.008
- Kuo I-Pei, Liu Ching-Shuo, Yang Shuenn-Der, Liang Shih-Hsiang, Hu Yeh-Fang, Nan Fan-Hua., (2022). Effects of Replacing Fishmeal with Defatted Black Soldier Fly (*Hermetia illucens* Linnaeus) Larvae Meal in Japanese Eel (*Anguilla japonica*) Diet on Growth Performance, Fillet Texture, Serum Biochemical Parameters, and Intestinal Histomorphology. *Aquaculture Nutrition*, 2022. <https://doi.org/10.1155/2022/1866142>
- Lee, D. H., Chu, K. B., Kang, H. J., Lee, S. H., y Quan, F. S., (2020). Peptides in the hemolymph of *Hermetia illucens* larvae completely inhibit the growth of *Klebsiella pneumonia* in vitro and in vivo. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 23(1): 36–43. <https://doi.org/10.1016/j.aspen.2019.10.004>
- Li G., Kortner T. M., Chikwati E., M., Munang'andy H.M., Lock E.J., Krogdahl A., (2019). Gut health and vaccination response in presmolt Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae meal. *Fish y Sheallfish Immunology*, 86: 1106-1113. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.12.057>
- Li Senlin., Hong Ji, Binxin Zhang, Jishu Zhou, Haibo Yu., (2017) Defatted black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae meal in diets for juvenile Jian Carp (*Cyprinus carpio* var. Jian): Growth performance, antioxidant enzyme activities, digestive enzyme activities, intestine and hepatopáncreas histological structure. *Aquaculture*, 477: 62-70. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.04.015>
- Li Senlin, Hong Ji, Binxin Zhang, Jingjing Tian, Jishu Zhou, Haibo Yu., (2016). Influence oh black soldier fly (*Hermetia illucens*) Larvae oil on growth performance, body composition, tissue fatty acid composition and lipid deposition in juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian). *Aquaculture*, 465: 48-49. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.08.020>
- Li, Y., Kortner, T. M., Chikwati, E. M., Belghit, I., Lock, E. J., y Krogdahl, Å., (2020). Total replacement of fish meal with black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae meal does

not compromise the gut health of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 520: 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.734967>

López Cepeda J., Garrido N., Núñez H., y Vilaxa-Olcay, A., (2020). Descripción Morfológica e Histológica del Tejido Hepático de *Gambusia holbrooki* (Pisces: Poeciliidae) que Habita en la Provincia de Arica - Chile. *International Journal of Morphology*, 38(3): 645,649. <https://dx.doi.org/10.4067/S071795022020000300645>

López Hernández Abimael., (2014). Extracción, identificación y cuantificación de ácidos grasos presentes en las larvas y pupas del insecto comestible denominado ticoco. Universidad Tecnológica de la Mixteca. 12502.pdf (utm.mx)

López LM., Durazo E., Rodríguez -Gómez A., True CD., Viana MT., (2006). Composición proximal y perfil de ácidos grasos de juveniles silvestres y cultivados de *Totoaba macdonaldi*. *Ciencias Marinas*, 32(2). [https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S018538802006000400009](https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S018538802006000400009)

Lu Ronghua, Chen Yanna, Yu Weipeng, Lin Mengjun, Yang Goukun, Qin Chaobin, Meng Xiaolin, Zhang Yanmin, Ji Hong, Nie Guoxing. Defatted black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae meal can replace soybean meal in juvenile Grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) diets. *Aquaculture reports*, 18: 3. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2020.100520>

Luo Jian-Bo., Feng Lin, Jiang Wei-Dan, Liu Yang, Wu Pei, Jiang Jun, Kuang Sheng-Yao, Tang Ling, Zhang Yong-An, Zhou Xiao-Qiu., (2014). The impaired intestinal mucosal immune system by valine deficiency for young grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) is associated with decreased immune status and regulating tight junction proteins transcript abundance in the intestine. *Fish & Shellfish Immunology*, 40(1): 2. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.07.003>

Magalhães Rui, Sánchez López Antonio, Silva Lal Renato, Martínez Llorens Silvia, Olivia Teles Aires, Peres Helena., (2017). Black soldier fly (*Hermetia illucens*) pre-pupae

- meal as a fish meal replacement in diets for European seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture*, 476: 82. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.04.021>
- Maldonado-Othón Carlos A., De la Re-Vega Enrique, Perez-Velazquez Martin, Gonzalez-Felix Mayra L., (2020). Replacement of fish oil by camelina and black soldier fly larvae oils in diets for juvenile *Totoaba macdonaldi* and their effect on growth, fatty acid profile, and gene expression of pancreatic lipases. *Aquaculture*, 552: 1. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.737985>
- Malpica J., (2017): Naturalista: Totoaba (*Totoaba macdonaldi*). México ambiental. <https://www.mexicoambiental.com/totoaba-totoaba-macdonaldi/>
- Maulu S., Langi S., Hasimuna O. J., Missinhoun D., Munganga B. P., Hampuwo B. M., Naftal N., Elsabagt M., Doan H. v., Kari Z. A., Dawood M. A., (2022). Recent advances in the utilization of insects as an ingredient in aquafeeds: A review. *Animal nutrition*, 11: 334-349. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2022.07.013>
- Megías M, Molist P, Pombal M.A., (2021) Tipos celulares: Enterocito. Atlas de histología vegetal y animal. <http://mmegias.webs.uvigo.es/inicio.html>.
- Megías M, Molist P, Pombal M.A., (2022) Tipos celulares: Hepatocito. Atlas de histología vegetal y animal. <http://mmegias.webs.uvigo.es/8-tipos-celulares/hepatocito.php>
- Mendoza Roldan Miguel Ángel., (2012). Estudio histológico del sistema digestivo en diferentes estadios de desarrollo de la cachama blanca (*Piaractus brachypomus*). Universidad de La Salle, Bogotá- Colombia. (pg. 8, 39, 40), [https://ciencia.lasalle.edu.co/medicina\\_veterinaria](https://ciencia.lasalle.edu.co/medicina_veterinaria)
- Mikolajczak Z., Rawskib M., Mazurkiewicz J., Kieronczyk B., Kolodziejek P., Pruszyńska-Oszmalek E., Józefiak D., (2022). The first insight into black soldier fly meal in Brown trout nutrition as an environmentally sustainable fish meal replacement. *Animal*, 15(1): 4. <https://doi.org/10.1016/j.animal.2022.100516>
- Mroue Ruiz Fadya Hussein., (2021). Desarrollo de un protocolo de Metabarcoding para la identificación de presas de *Totoaba macdonaldi* a partir del contenido estomacal. Universidad Autónoma de Baja California. Tesis. (pg. 32-33).

<https://repositorioinstitucional.uabc.mx/server/api/core/bitstreams/b9c3ef1a-97c7-4eea-99cc-235968e2bad6/content>

- Mohan K., Rajan Karthick D., Ganesan Ramu A., Divya D., Johansen J., Zhang S., (2023). Chitin, chitosan and chotoooligosaccharides as potential growth promoters and inmunostimulans in aquaculture: A comprehensive review. *International journal of biological macromolecules*, 252: 1,2. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.126285>
- Mohan K., Rajan Karthick D., Muralisankar T., Ganesan Ramu A., Sathishkumar P., Revathi N., (2022). Use of black soldier fly. (*Hermetia illucnes L.*) larvae meal in aquafeeds for a sustainable aquacultura industry: A review of past and future needs. *Aquaculture*, 553. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738095>
- Moutinho S., Pedrosa R., Magalhaes R., Olivia-Teles A., Parasi G., Peres H., (2021). Black soldier fly (*Hermetia illucens*) pre-pupae larvae meal in diets for European seabass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles: Effects on liver oxidative status and fillet quality traits during shelf-life. *Aquaculture*, 522: 5. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.736080>
- Muñoz Játiva Carla E., (2022). Efecto de dietas elaboradas a base de harina de larvas de *Hermetia illucens* sobre parámetros zootécnicos y hematológicos de alevines de *Oncorhynchus mykiss*. Universidad de las Fuerzas Armadas; (Pg. 38,61) <https://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/35885/1/IASA%20I-TT-%200016.pdf>
- Nejedli Srebrenka, Tlak Gajger Ivana., (2013). Hepatopancreas in some sea fish from different species and the structure of the liver in teleost fish, common pandora, *Pagellus erythinus* (Linnaeus, 1758) and whiting *Merlangius Merlangus euxinus* (Nordmann, 1840)., *Veterinarski Arhiv*, 84(3): 441-452. [https://www.researchgate.net/publication/293639724\\_Hepatopancreas\\_in\\_some\\_sea\\_fish\\_from\\_different\\_species\\_and\\_the\\_structure\\_of\\_the\\_liver\\_in\\_teleost\\_fish\\_common\\_pandora\\_Pagellus\\_erythinus\\_Linnaeus\\_1758\\_and\\_whiting\\_Merlangius\\_merlangus\\_euxinus\\_Nordmann\\_](https://www.researchgate.net/publication/293639724_Hepatopancreas_in_some_sea_fish_from_different_species_and_the_structure_of_the_liver_in_teleost_fish_common_pandora_Pagellus_erythinus_Linnaeus_1758_and_whiting_Merlangius_merlangus_euxinus_Nordmann_)

- Nogales M. S., Gobbi P., Jósefiak D., Mazurkiewicz J., Dudek K., Rawski M., Kieronczyk B., Jósefiak A., (2019). Insect meals in fish nutrition. *Reviews in Aquaculture*, 11(4): 1080 - 1103. <https://doi.org/10.1111/raq.12281>
- Oonincx DGAB, van Broekhoven S., van Huis A., van Loon JJA., (2015). Feed conversation, survival and development, and composition of four insect species on diets composed food by-products. *PLOS ONE*, 12(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0144601>
- Oviedo Olvera M., V., García Trejo J.M., Gutiérrez Antonio C., (2022). Mosca soldado-negro: Eslabón perdido en la cadena de revalorización de residuos orgánicos. *Ciencia*, 73(3): 54-57. [https://amc.mx/revistaciencia/images/revista/73\\_3/PDF/09\\_73\\_3\\_1304.pdf](https://amc.mx/revistaciencia/images/revista/73_3/PDF/09_73_3_1304.pdf)
- Pérez, R., Romeu, B., Lastre, M., Morales, Cabrera, O., Reyes, L., González, E., Sifontes, S., y Pérez, O., (2014). Inmunopotenciadores para la acuicultura. *VacciMonitor*, 23(1):1-3. [www.finlay.sld.cu/vaccimonitor.htm](http://www.finlay.sld.cu/vaccimonitor.htm)
- Plummer, P. 1987. Glycogen determination in animal tissues, An Introduction to Practical Biochemistry 3rd edn. *McGraw Hill Book, Maiden head*, (Pg. 332)
- Rimoldi Simona, Ceccotti Chiara, Brambilla Fabio, Faccenda Filippo, Antonini Micaela, Terova Genciana. (2023). Potential of shrimp waste meal and insect exuviae as sustainable sources of chitin for fish feeds. *Aquaculture*, 567: 1. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2023.739256>
- Rojas Lemus M., Milán Chávez R., Delgado Medina A., Bizarro Nevares P., Cano Gutiérrez G., Cafaggi Padilla D, Cervantes Yépez S., y Fortoul van der Goes, T. I., (2017). El hepatocito como un ejemplo de interacción entre la biología celular y las rutas metabólicas. *Revista de la Facultad de Medicina (México)*, 60(2): 52-58. <https://www.medigraphic.com/pdfs/facmed/un-2017/un172j.pdf>
- Roldan J. J., (2020). Evaluación histomorfométrica e histoquímica del intestino anterior de alevinos de tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*) suplementadas con aceites esenciales en el alimento. En lima-Perú. En Universidad Peruana Cayetano Heredia. ( Pg. 8-10).

[https://repositorio.upch.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12866/8139/Evaluacion\\_RoldanJuarez\\_Jesus.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://repositorio.upch.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12866/8139/Evaluacion_RoldanJuarez_Jesus.pdf?sequence=1&isAllowed=y)

Rondón Barragán, I., (2004). Inmunoestimulantes en medicina veterinaria. En Universidad de los Llanos. En Meta-Colombia. *Orinoquia*, 8(2): 1-10. <https://www.redalyc.org/pdf/896/89680206.pdf>

Rueda G. Miguel F., (2011). Breve historia de una gran desconocida: La acuicultura. De revista Eubacteria: Especial biología marina, de Universidad de Murcia en España, 2 (26): 1,2. <https://www.um.es/eubacteria/acuicultura.pdf>

Rueda López S., Lazo Juan P., Correa Reyes G., Viana María T., (2011). Effect of dietary protein and energy levels on growth, survival and body composition of juvenile *Totoaba macdonaldi*. *Aquaculture*, 319(3): 2. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.07.007>

Sánchez Elisa I., (2019). Técnica de tinción Hematoxilina-Eosina Azul Alcían. De atlas de histología vegetal y animal. En España. (Pg. 1) <https://mmevias.webs.uvigo.es/6-tecnicas/protocolos/p-tincion-h-e-aa.php>

Sastre, González D. R., (2020). Inclusión de harina de insectos en dieta de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) como fuente nutricional alternativa. En Universidad de Cundinamarca. En Facultad de Ciencias Agropecuarias. (Pg. 20-27). <https://repositorio.ucundinamarca.edu.co/bitstream/handle/20.500.12558/3464/Deyvid%20Rodrigo%20Sastre%20González.pdf?sequence=2&isAllowed=y>

SEMARNAT, 2017. NORMA Oficial Mexicana de Emergencia NOM-EM-169-SEMARNAT-2017, Que establece las especificaciones de marcaje para los ejemplares, partes y derivados de totoaba (*Totoaba macdonaldi*) provenientes de Unidades de Manejo para la Conservación de Vida Silvestre. [https://www.dof.gob.mx/normasOficiales/6726/semarnat2a11\\_C/semarnat2a11\\_C.html](https://www.dof.gob.mx/normasOficiales/6726/semarnat2a11_C/semarnat2a11_C.html)

Senlin Li, Hong Ji, Binxin Zhang, Jishu Zhou, Haibo Yu., (2017) Defatted black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae meal in diets for juvenile Jian Carp (*Cyprinus carpio* var. Jian): Growth performance, antioxidant enzyme activities, digestive enzyme

- activities, intestine and hepatopáncreas histological structure. *Aquaculture*, 477: 65-70. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.04.015>
- Siaddaiah GM., Kumar Rajesh, Kumaria Rakhi, Chandan NK., Debbarma Jackson, Damle DK., Das Arabinda, Giri SS., (2023). Dietary fishmeal replacement with *Hermetia illucens* (Black soldier fly, BSF) larvae meal affected production performance, whole body composition, antioxidant status, and health of snakehead (*Channa striata*) juveniles. *Animal Feed Science and Technology*, 297: 6. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2023.115597>
- Trejo Ramos Dora Alejandra, Histología sistémica de larvas y juveniles de *Totoaba macdonaldi* y su respuesta ante un evento de vibriosis. Centro de Investoagacion Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California (CICESE). (Pg. 6).
- True Conal David., (2012). Desarrollo de la biotecnia de cultivo de Tototaba macdonaldi. Universidad Autónoma de Baja California. (Pg.4,6) <https://repositorioinstitucional.uabc.mx/server/api/core/bitstreams/15f09579-3479-4605-b987-41cd8202c742/content>
- Tomberlin, J.K., Sheppard, D.C., & Joyce, J.A. (2005). Black soldier flies (Diptera: Stratiomyidae) colonization of pig carrion in South Georgia. *Forensic Science*, 50: 152-153.
- Urán P.A., Goncalves A.A., Taverne-Thiele J.J., Schrama J.W., Verreth J.A.J., Rombout J.H.W.M., (2008). Soybean meal índices intestinal inflammation in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Fish y shellfish immunology*, 25(6): 755-757. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2008.02.013>
- Vázquez Cachay María y Vega Acosta Hernán., (2012). Desarrollo del epitelio del tracto intestinal y su participación en la defensa del organismo en mamíferos. *REDVET Revista electrónico de veterinaria*, 13(1): 14-16. <https://www.redalyc.org/pdf/636/63624404011.pdf>
- Vázquez-Vera, L. y Chávez-Carreño, P., (2022). Diagnóstico de la acuicultura en México. Fondo Mexicano para la conservación de la Naturaleza, A.C. FMCN, México., 1era Ed. ISBN 978-607-99061-5-3

- Vilaplana Montse., (2001). Aspectos nutricionales y terapéuticos de la fibra dietética. *Ámbito farmacéutico: nutrición.* (Pg. 96, 98) <https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-pdf-13784>
- Villanueva Gutiérrez Emmanuel, Rodríguez Armenta Chrystian, González Félix Mayra L., Pérez Velázquez Martin. Incorporating hydrolyzed soy protein or black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae meal into feeds for *Totoaba macdonaldi*. *Aquaculture*, 554:1-2. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738152>
- Wang Guoxia, Peng Kai, Hu Junru, Yi Cangjin, Chen Xiaoyong, Wu Haomin, Huang Yanhua., (2019). Evaluation of dedatted black soldier fly (*Hermetia illucens* L.) Larvae meal as an alternative protein ingredient for juvenile Japanese seabass (*Lateolabrax japonicus*) diets. *Aquaculture*, 507: 148. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.04.023>
- Weththasinghe, P., Lagos, L., Cortés, M., Hansen, J. O., y Overland, M., (2021). Dietary Inclusion of Black Soldier Fly (*Hermetia Illucens*) Larvae Meal and Paste Improved Gut Health but Had Minor Effects on Skin Mucus Proteome and Immune Response in Atlantic Salmon (*Salmo salar*). *Frontiers in Immunology*, 12: 1-4. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.599530>
- Yen Ortega Eloy Eduardo (2020). Desempeño biológico de juveniles de *Totoaba macdonaldi* aclimatados a diferentes temperaturas y alimentados con distintos niveles de inclusión de harina de soya en la dieta. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California. (CICESE). (Pg. 13-14). [https://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1007/3324/1/tesis\\_Eloy%20Eduardo%20Yen\\_05%20nov%202020.pdf](https://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1007/3324/1/tesis_Eloy%20Eduardo%20Yen_05%20nov%202020.pdf)
- Zarantoniello Matteo, Zimbelli Andrea, Randazzo Basilio, Compagni Martina Delli, Truzzi Cristina, Antonucci Mateo, Riolo Paola, Loreto Nino, Asimani Andrea, Milanovic Vesna, Giorgini Elisabetta, Cardinaletti Gloriana, Tilli Francesca, Cipriani Renato, Gioacchini Giorgia, Olivotto Ike. (2020). Black soldier fly (*Hermetia illucens*) reared on roasted coffee by-product and *Schizochytrium* sp., as a sustainable terrestrial ingredient for aquafeeds production. *Aquaculture*, 518: 1-4. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734659>

- Zhang, J., Li, J., Peng, Y., Gao, X., Song, Q., Zhang, H., Elhag, O., Cai, M., Zheng, L., Yu, Z., y Zhang, J., (2022). Structural and functional characterizations and heterogenous expression of the antimicrobial peptides, Hedefensins, from black soldier fly, *Hermetia illucens* (L.). *Protein Expression and Purification*, 192:1–10. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2021.106032>
- Zhao Jingjing, Pan Jintao, Zhang Zhonghao, Chen Zhichu, Mai Kangsen, Zhang Yanjiao. (2023). Fishmeal protein replacement by defatted and full-fat black soldier fly larvae meal in juvenile turbot diet: Effects on the growth performance and intestinal microbiota. *Aquaculture nutrition*, 2023: 4. <https://doi.org/10.1155/2023/8128141>
- Zhoulin Yu, Zhenzhu Sun, Baigiao Ou, Meng Zhou, Yanhua Huang, Xiaohong Tan, (2023). Effects of partial replacement of fish meal with black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae, meal on growth performance, lipid metabolism and hepatointestinal health of juvenile Golden pompano (*Trachinotus ovatus*). *Aquaculture Reports*, 33: 4. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2023.101824>
- Zumbado, M., y Azofeifa, D., (2018). Insectos de importancia agrícola. En Heredia-Costa Rica. De *Programa Nacional de Agricultura Orgánica (PNAO)*, 1ra Ed., (Pg. 107-108). <https://www.acguanacaste.ac.cr/noticias/noticias-programa-de-investigacion/4171-guia-basica-de-entomologia-insectos-de-importancia-agricola>.