



Investigación e Innovación en Nutrición Acuícola

**Editores: Lucía Elizabeth Cruz Suárez,
Mireya Tapia Salazar, Martha Guadalupe
Nieto López, David A. Villarreal Cavazos,
Julián Gamboa Delgado, y Carlos A.
Martínez Palacios**

Investigación e Innovación en Nutrición Acuícola
2022, Monterrey, Nuevo León, México

Editores: Lucía Elizabeth Cruz Suárez, Mireya Tapia Salazar, Martha Guadalupe Nieto López, David Alonso Villarreal Cavazos, Julián Gamboa Delgado y Carlos A. Martínez Palacios.

Programa Maricultura
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad Autónoma de Nuevo León 2022

Copias disponibles en:
Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Ciencias Biológicas
Programa Maricultura
Cd. Universitaria
San Nicolás de los Garza, Nuevo León
C.P. 66455
Tel.+Fax. 818352 6380
E-mail: lucia.cruzsr@uanl.edu.mx

Para citar alguna parte de ésta obra siga el siguiente estilo:

- Autores del escrito. 2022. Nombre del artículo. Editores: Lucía Elizabeth Cruz Suárez, Mireya Tapia Salazar, Martha Guadalupe Nieto López, David Alonso Villarreal Cavazos, Julián Gamboa Delgado y Carlos A. Martínez Palacios. Investigación e innovación en nutrición acuícola, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, pp.473 ISBN: 978-607-27-1732-9. El cuidado de la presente edición, así como su realización estuvo a cargo de los editores.

La reproducción total o parcial de ésta obra requiere la autorización escrita por los titulares del derecho de autor.

Los editores hacemos extensivo nuestro profundo agradecimiento:

- A las personas que colaboraron en la edición técnica de estas memorias

Directorio

Dr. Santos Guzmán López
Rector

Dr. Juan Paura García
Secretario. General

Dr. Celso José Garza Acuña
Secretario extensión y cultura

Lic. Antonio Ramos Revillas
Director de Editorial Universitaria

Dr. José Ignacio González Rojas
Director de la Facultad de Ciencias Biológicas

Editores

Lucía Elizabeth Cruz Suárez, Denis Ricque Marie, Mireya Tapia Salazar, Martha Guadalupe Nieto López, David Alonso Villarreal Cavazos, Julián Gamboa Delgado, y Carlos A. Martínez Palacios.

Dirección de edición: Programa Maricultura, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, Dra. Lucía Elizabeth Cruz Suárez, Av. Universidad S/N, Ciudad Universitaria, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, C.P. 66455
Email: elicruz@hotmail.com, lucia.cruzsr@uanl.edu.mx
Teléfonos: 52 8183526380

Primera edición 2022. ©Universidad Autónoma de Nuevo León. ©L. Elizabeth Cruz Suárez, ©Mireya Tapia Salazar, ©Martha Guadalupe Nieto López, ©David Alonso Villarreal Cavazos, ©Julián Gamboa Delgado, ©Carlos A. Martínez Palacios.

ISBN:978-607-27-1732-9. El cuidado y edición estuvo a cargo de los editores. El contenido es responsabilidad de los autores.

Párrafo legal: Reservado todos los derechos conforme a la ley. Prohibida la reproducción total o parcial de la obra sin previa autorización por escrito del titular propietario y editor de la obra.

Efecto de Manano-Oligosacáridos en el Crecimiento, Actividad de Enzimas Digestivas t Expresión de Genes Relacionados a la Mucosa Intestinal de Larvas de Pejelagarto *Atractosteus tropicus*

Claudia Ivette Maytorena Verdugo^{1,3*}, Emyr Saul Peña Marín^{1,2}, Álvarez-Villagómez, Carina Shianya, Pérez-Jiménez, Graciela María¹, Sepúlveda-Quiroz, César Antonio¹, Susana del Carmen de la Rosa-García¹, Rafael Martínez-García¹, Carlos Alfonso Álvarez González¹

¹Laboratorio de Fisiología en Recursos Acuáticos-DACBIOL, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Carretera Villahermosa Cárdenas Km 0.5, 86139 Villahermosa, Tabasco, México.

²Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Av. Insurgentes Sur 1582, Col. Crédito Constructor, Del. Benito Juárez C.P., 03940, Ciudad de México.

³División Académica Multidisciplinaria de Jalpa de Méndez, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Carretera estatal libre Villahermosa-Comalcalco Km 27 S/N, Ranchería, 86205 Jalpa de Méndez, Tabasco. *Correspondencia: clau.maytorena@gmail.com

Resumen

Los manano-oligosacáridos (MOS) son carbohidratos ramificados de cadena corta no digeribles compuestos por hasta 10 unidades de manosa unidas por enlaces α -(1,3) y α -(1,6), obtenidos de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y su uso en acuicultura está bien documentado. El objetivo fue probar si MOS suplementado en la dieta de larvas de pejelagarto influye en los parámetros de crecimiento, la actividad de las enzimas digestivas y la expresión de genes relacionados con la barrera intestinal, para fortalecer a los animales en esta etapa crítica. La ganancia de peso de las larvas disminuyó con 2 y 4 g Kg⁻¹ de MOS. No se registraron diferencias de peso entre las larvas Control y las larvas alimentadas con 6 g Kg⁻¹ MOS. La longitud total más alta se registró en las larvas alimentadas con 6 g Kg⁻¹ MOS en comparación con las larvas control. Las larvas alimentadas con 2 y 4 g Kg⁻¹ de MOS también aumentaron su longitud. No hubo diferencias significativas en la ganancia de peso absoluta y el factor de condición K que estuvieran relacionadas con la inclusión de MOS en las dietas. En la tasa de crecimiento específica se observó un incremento con el tratamiento con 6 g Kg⁻¹ MOS. En cuanto la supervivencia, con los tratamientos 2 y 4 Kg⁻¹ MOS, las larvas tuvieron una menor supervivencia. La Figura 2 muestra el efecto de MOS sobre la actividad de las enzimas digestivas. La actividad de tripsina (Fig. 2C) aumentó con la adición de MOS a las dietas en comparación con el control, pero la actividad de leucina aminopeptidasa solo aumentó con 6 g Kg⁻¹ de MOS. La actividad de lipasa aumentó en las larvas alimentadas

con 2 y 4 g Kg⁻¹ de MOS. La actividad de α -amilasa fue mayor en las larvas alimentadas con 2 g Kg⁻¹ de MOS y 4 g Kg⁻¹ de MOS que en las larvas alimentadas con el control y 6 g Kg⁻¹ MOS. La expresión de *zo-2* fue mayor con el tratamiento 6 g Kg⁻¹ de MOS. La abundancia de transcritos de *cl-3* fue menor con 2 g Kg⁻¹ de MOS, pero mayor con 6 g Kg⁻¹ de MOS, y para *muc-2*, todas las concentraciones de MOS aumentaron la abundancia de transcritos, con resultados más altos usando 4 g Kg⁻¹ de MOS. En este estudio, la incorporación de manano-oligosacáridos en el alimento para larvas de pejelagarto, tiene un efecto positivo, siendo la concentración de 6 g Kg⁻¹ en donde se observaron los mejores resultados, por lo que incluir este prebiótico en las dietas para larvas es una buena opción para el cultivo de esta especie.

Keywords: *prebióticos; sistema digestivo; pejelagarto*

Introducción

Mejorar la nutrición de los peces a través de la dieta es un problema que la acuicultura quiere resolver. La investigación en nutrición de peces implica el estudio de los materiales necesarios para mantener la vida, la formación y reparación de los tejidos corporales y la producción de energía traducida al consumo de alimento y los mecanismos fisiológicos involucrados en su regulación, requerimientos e interacciones de nutrientes, vías metabólicas y utilización de nutrientes, crecimiento de los peces, reproducción y desarrollo temprano (Jobling, 2016); sin embargo, la atención se ha centrado en los animales sin considerar la microbiota. La microbiota juega un papel importante en el sustento vital de cualquier ser vivo, por lo que, a la hora de diseñar una dieta para cualquier especie, es importante tener en cuenta su papel.

El intestino representa la interfaz natural entre la microflora intestinal y el huésped; de hecho, las superficies mucosas del tracto gastrointestinal son los sitios principales donde los microorganismos ambientales y los antígenos interactúan con el huésped, a través de intensas interacciones cruzadas (Montalto *et al.*, 2009). El microbioma es la comunidad microbiana que ocupa un hábitat razonablemente bien definido que tiene propiedades químicas distintas y describe el genoma de todos los microorganismos (simbióticos y patógenos) que viven en los vertebrados; el microbioma intestinal comprende el genoma colectivo de microbios que habitan en el intestino, incluidas bacterias, arqueas, virus y hongos (Berg *et al.*, 2020).

La colonización microbiana, el establecimiento, la composición y la diversidad en el tracto gastrointestinal de los peces es un proceso complejo y se cree que refleja la composición microbiana de la cría, la dieta y su entorno (Nayak, 2010). Los microorganismos en el intestino utilizan moléculas grandes no digeribles para el huésped, y la descomposición metabólica por parte de los microorganismos en el intestino actúa sobre el perfil y funcionalidad de la microbiota intestinal, otorgándole una acción positiva sobre el huésped para mejorar la eficiencia alimentaria y el crecimiento (Gainza y Romero, 2020). Ejemplos de estas moléculas no digeribles son los prebióticos, que son sustratos que los microorganismos del huésped utilizan de forma selectiva y confieren un beneficio para la salud (Gibson *et al.*, 2017).

Los manano-oligosacáridos (MOS) son carbohidratos ramificados de cadena corta no digeribles compuestos por hasta 10 unidades de manosa unidas por enlaces α -(1,3) y α -(1,6), obtenidos de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y su uso en acuicultura está bien documentado (Ringø *et al.*, 2010). El uso de MOS para bloquear la colonización de patógenos se deriva de la concepción de que ciertos polisacáridos podrían usarse para bloquear el mecanismo de reconocimiento y adhesión de patógenos potenciales a moléculas en las superficies de los tejidos del huésped (competencia por los sitios de unión). Esta acción reduciría la adhesión de los patógenos al tracto digestivo, dejándolos excretados en las heces. Esto puede conducir a la mejora de la integridad y el rendimiento de la barrera epitelial intestinal (Gainza y Romero 2020).

El microbioma intestinal de *A. tropicus* comprende *Fusobacteria* (42,26%), *Proteobacteria* (31,40%), *Firmicutes* (12,96%) y *Bacteroidetes* (11,79%) con nueve cepas con potencial probiótico, *Lactococcus lactis* CAU929, CAU6600, CAU9951 y Cp6; *Cetobacterium* H69, *Aeromonas hydrophila* P5 y WR-5-3-2, *Aeromonas sobria* CP DC28, *Aeromonas hydrophila* (Méndez-Pérez *et al.*, 2020). La presencia de esas cepas con potencial probiótico ayuda a explicar los resultados en juveniles de *A. tropicus* alimentados con MOS al 0.2%, donde la adición de MOS aumentó la ganancia de peso, la tasa de crecimiento específico y la tasa de eficiencia proteica (Nájera-Arzola *et al.*, 2018). Sin embargo, no está claro si estas cepas probióticas podrían ayudar al pejelagarto en una etapa larval, o si la microbiota en etapa larval posea cepas que pueden hidrolizar manano-oligosacáridos, mejorando su crecimiento. y desempeño en esta etapa crítica, por lo que, en este trabajo, para dar un acercamiento a contestar estas preguntas, el objetivo fue probar si MOS suplementado en la dieta de larvas de pejelagarto influye en los parámetros de crecimiento, la actividad de las enzimas digestivas y la expresión de genes relacionados con la barrera intestinal, para fortalecer a los animales en esta etapa crítica.

Materiales y métodos

Dietas experimentales

En este experimento se utilizó una dieta base (Frías-Quintana *et al.*, 2016) y se adicionaron 2, 4 y 6 g Kg⁻¹ de MOS a los tratamientos. Las dietas experimentales (Tabla 1) se mantuvieron

a -20 °C hasta su uso. Antes de iniciar el bioensayo, las dietas fueron molidas y tamizadas para obtener tamaños de partícula específicos (20-150 µm) de acuerdo con el crecimiento larvario.

Tabla 1. Composición de las dietas experimentales.

Ingredientes (g Kg ⁻¹) / MOS (g Kg ⁻¹)	0	2	4	6
Harina de pescado ^a	300	300	300	300
Harina de pollo ^a	150	150	150	150
Harina de cerdo ^a	150	150	150	150
Harina de soya ^a	150	150	150	150
Almidón ^b	174.5	172.5	170.5	168.5
Aceite de soya ^c	69	69	69	69
MOS ^d	0	2	4	6
Mezcla de minerales ^e	0.5	0.5	0.5	0.5
Mezcla de vitaminas ^e	1	1	1	1
Gelatina ^f	2	2	2	2
Vitamina C ^g	2	2	2	2
Vitamina E ^g	1	1	1	1

^a Proteínas Marinas y Agrícolas S.A. de C.V., Guadalajara, Jalisco; ^b Pronat Ultra, Yucatán, México; ^c Industrias Ragasa S.A. de C.V.; ^d Agaviótica, Monterrey, Nuevo León; ^e Composición de la mezcla de vitaminas y minerales: vitamina A, 10,000,000 UI; vitamina D3, 2,000,000 UI; vitamina E, 100,000 UI; vitamina K3, 4.0 g; tiamina B1, 8.0 g; Riboflavina B2, 8.7 g; Piridoxina B6, 7.3 g; vitamina B12, 20.0 mg; niacina, 50.0 g; ácido pantoténico, 22.2 g; Inositol, 0.15 mg; ácido nicotínico, 0.16 mg; ácido fólico, 4.0 g; biotina, 500 mg; vitamina C, 10.0 g; Colina 0.3 mg, Excipiente c.s.p. 2 g; manganeso, 10 g; magnesio, 4.5 g; zinc, 1.6 g; hierro, 0.2 g; cobre, 0.2 g; yodo, 0.5 g; selenio, 40 mg; Cobalto 60 mg; ^f D'gari, Productos alimenticios Relámpago, S.A. de C.V.; ^g Rovimix Stay-C 35 DSM, Jalisco.

Bioensayo

Las larvas de *A. tropicus* se obtuvieron de un stock de reproductores de desove inducido (1 hembra y 3 machos) de un lote reproductor en el Laboratorio de Acuicultura Tropical DACBIOL-UJAT, México. El desove se indujo inyectando LHRHa (30 µg Kg⁻¹ de peso) a la hembra en un tanque circular de 2000 L. Cuatro días después de la eclosión (dah), las larvas de *A. tropicus* se distribuyeron aleatoriamente en doce tanques experimentales de 70 L con un sistema de recirculación operado por una bomba de agua de 0.5 HP y un filtro biológico. La calidad del agua se monitoreó diariamente utilizando un oxímetro YSI 85 (Ysi, Yellow Springs, OH) y un potenciómetro A HANNA HI 991001 (HANNA instruments, Woonsocket, RI) manteniendo una temperatura promedio de 27.1 ± 0.8 °C, oxígeno disuelto alrededor de 5.7 ± 0.2 mg L⁻¹ y pH cercano a 7.3 ± 0.2. Los tanques se inspeccionaron

diariamente en busca de mortalidad, y cualquier exceso de comida y heces se retiró de los tanques.

Los tratamientos se realizaron por triplicado utilizando 150 larvas por tanque y el experimento tuvo una duración de 20 días. Desde el día uno, las larvas fueron alimentadas con polvo de la dieta correspondiente y nauplios de *Artemia* cuatro veces al día (7:00, 11:00, 15:00 y 19:00 h). Seis días después de la eclosión, las larvas fueron alimentadas con una mezcla de sus correspondientes dietas experimentales y biomasa de *Artemia*, y a partir del día 12, solo con las dietas experimentales hasta el final del experimento. Al final del ensayo, se tomaron muestras de nueve larvas por tratamiento (tres por réplica) para cuantificar la actividad de enzimas digestivas, también se recolectaron nueve larvas por tratamiento (tres larvas por réplica) y se mantuvieron en una solución para conservar el ARN (RNAlater) y así poder hacer el análisis de expresión génica. Todas las larvas recolectadas se lavaron con agua destilada y se cortaron cabezas y colas. Todas las muestras fueron congeladas a -80°C hasta su análisis.

Evaluación de los parámetros de crecimiento

Al inicio, día 12 y final del experimento (día 20), se tomaron muestras de larvas de cada tratamiento y réplica experimental para determinar el peso húmedo (g), utilizando una balanza analítica (Ohaus HH120, Shenzhen, China), y la longitud total (cm) a través de fotografía a escala, calculada con el Software Image 1.5. Al final de la prueba, se calcularon los siguientes parámetros, ganancia de peso absoluta (AWG): peso final (g) - peso inicial (g); tasa de crecimiento específica (SGR): $[(\text{peso final} - \text{peso inicial}) / \text{días}] \times 100$; factor de condición (K): $(\text{peso corporal medio final} / \text{longitud corporal media final}) \times 100$; y supervivencia (S): $(\text{número de peces finales} / \text{número de peces iniciales}) \times 100$.

Cuantificación de enzimas digestivas

Se homogenizaron tres muestras de larvas por cada réplica experimental en agua destilada con pistilos en una proporción 1 a 10. Después los homogenados se centrifugaron a 10,000 g a 4°C por 15 min. El sobrenadante se conservó en alícuotas y se almacenó a -80°C hasta su uso. La proteína soluble se cuantificó con el método de Bradford (1976).

Proteasas ácidas y alcalinas

La actividad de proteasas ácidas totales de los extractos se cuantificó usando hemoglobina al 0.5% como sustrato en amortiguador de glicina-HCl 100 mM a pH 2.0, la reacción se detuvo con ácido tricloroacético (ATC) al 10% y se midió la absorbancia de la tirosina liberada a 280 nm (Anson 1938). La actividad de proteasas alcalinas totales se determinó con la técnica descrita por Walter (1984), utilizando caseína al 1% en amortiguador Tris-HCl 100 mM + CaCl₂ 10 mM a pH 9.0. La reacción se detuvo con ATC al 10% y se midió la absorbancia de la tirosina liberada a 280 nm.

Quimotripsina

La actividad de quimotripsina se cuantificó usando SAApNA como sustrato (Cat. No. S7388, Sigma-Aldrich). Se preparó una solución madre de 50 mM del sustrato con DMSO, después la solución de trabajo se preparó a una concentración de 1.25 mM con Tris-HCl 50 mM, pH 8.0. Se mezclaron quince microlitros de extracto del sistema digestivo con 135 µl del sustrato con amortiguador para medir la absorbancia de la nitroanilida liberada a 410 nm en una cinética de 30 min (García-Carreño *et al.*, 1994).

Tripsina

La actividad de tripsina se cuantificó utilizando BAPNA como sustrato (Cat. No. B4875, Sigma-Aldrich). Se preparó una solución madre de 122.78 mM del sustrato con DMSO y la solución de trabajo se preparó diluyendo la solución madre a una concentración de 2 mM con Tris-HCl 50 mM, pH 8.0. Se mezclaron quince microlitros del extracto del sistema digestivo con 135 µl del sustrato para medir la absorbancia de la nitroanilida liberada a 410 nm en una cinética de 15 min (García-Carreño *et al.*, 1994).

Leucina-aminopeptidasa

La actividad de leucina aminopeptidasa se cuantificó usando L-leucina-*p*-nitroanilida como sustrato (Cat. No. L9125, Sigma-Aldrich). Se preparó una solución madre de 250 mM del sustrato con DMSO y la solución de trabajo se preparó a una concentración de 4 mM diluida con fosfato de sodio 50 mM, pH 7.2. Se mezclaron quince microlitros del extracto del sistema digestivo con 135 µl de la mezcla de sustrato y amortiguador para medir la

absorbancia de la nitroanilida liberada a 410 nm en una cinética de 30 minutos (Maraoux *et al.*, 1973).

Lipasa

La actividad de lipasa se determinó utilizando acetato de β -naftilo (100 mM) como sustrato disuelto en Tris-HCl 50 mM a pH 7,5 con taurocolato de sodio (100 mM) a 37 °C deteniendo la reacción con ATC a 0.72 N. Posteriormente se añadió un colorante (Fast blue 100 mM) y una mezcla de etanol/acetato de etilo 1:1 y se midió la absorbancia a 540 nm usando un ϵ de 0.02 ml $\mu\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ (Versaw *et al.*, 1989).

α -Amilasa

La actividad de α -amilasa se cuantificó utilizando como sustrato almidón al 2% y citrato de sodio (100 mM), NaCl 50 mM, pH 7.5. Se incubaron 5 μl de la muestra a 37 °C durante 60 min y la actividad se cuantificó a 600 nm con un ϵ de 3,400 ml $\mu\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$. Todos los datos obtenidos se muestran como U mg^{-1} (Robyt & Whelan, 1968).

Extracción de ARN y síntesis de ADNc

El ARN total de cada muestra de larvas se aisló usando Trizol (Invitrogen, Waltham, MA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La concentración y la pureza de las muestras de ARN se evaluaron mediante la relación de absorbancia a 260 y 280 nm en un espectrofotómetro (Jenway GenovaNano, Cole-Parmer, Staffordshire, Reino Unido). Un microgramo de ARN se transcribió inversamente en ADNc en un termociclador (Mastercycle nexus GSX1, Eppendorf, Hamburgo, Alemania) utilizando el kit de transcripción inversa de ADNc de alta capacidad (Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR, ThermoScientific, Waltham, MA) en un volumen final de 20 μl , siguiendo las recomendaciones del fabricante. El programa de PCR estándar utilizado fue: 5 min a 65 °C, 10 min a 25 °C, 50 min a 42 °C (extensión de cadena de ADNc), 15 min a 70 °C (inactivación de transcriptasa inversa) y finalmente 20 min a 37 °C.

Análisis de expresión génica

La expresión génica de marcadores de la función de barrera intestinal se seleccionó con base en el trabajo de Pérez-Jiménez (en proceso), siendo *zo-1*, *zo-2*, *cl-3*, *cl-15*, y *muc-2* los genes seleccionados. Las reacciones de qPCR se realizaron en un termociclador en tiempo real CFX96TM (BioRad, Hercules, CA) usando 10 µl de la mezcla Sso EvaGreen (BioRad, Hercules, CA), 9 µl de ADNc (5 ng µl⁻¹) y 0.15 µM de cada cebador, en un volumen final de 20 µl en las siguientes condiciones: un ciclo de desnaturalización de 10 min a 95 °C seguido de 40 ciclos de 15 s a 95 °C y 1 min a 60 °C.

Se realizó un control negativo con cada ejecución reemplazando la plantilla de ADNc con agua estéril en la mezcla de qPCR. Todas las reacciones se realizaron por duplicado. El gen de β-actina se utilizó como referencia para la normalización. La expresión génica relativa se calculó mediante la fórmula ΔΔCt (Livak & Schmittgen, 2001).

Análisis estadístico

Para todos los análisis se realizó ANOVA de una vía y en caso de encontrar diferencias se utilizó la prueba de Tukey utilizando el software GraphPad Prism 9 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA) con un valor de significancia de 0.05.

Resultados

Parámetros de crecimiento influenciados por la suplementación con MOS

La ganancia de peso de las larvas disminuyó con 2 y 4 g Kg⁻¹ de MOS (0.0745 ± 0.065 g y 0.0653 ± 0.001 g). No se registraron diferencias de peso entre las larvas Control y las larvas alimentadas con 6 g Kg⁻¹ MOS (0.080 ± 0.001 g y 0.082 ± 0.003 g) ($p > 0.05$) (Fig. 1A). La longitud total más alta se registró en las larvas alimentadas con 6 g Kg⁻¹ MOS (2.775 ± 0.031 cm) en comparación con las larvas control (2.588 ± 0.043 cm). Las larvas alimentadas con 2 y 4 g Kg⁻¹ de MOS también aumentaron su longitud (2.646 ± 0.026 cm y 2.67 ± 0.05 cm) (Fig. 1B).

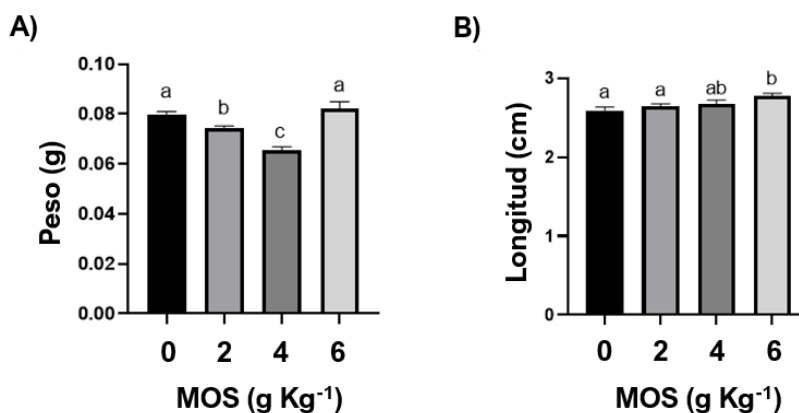


Figura 1. Efecto de mannano-ligosacáridos en el crecimiento de larvas de pejelagarto. Las letras sobre las barras indican diferencias entre los grupos ($p > 0.05$).

En la Tabla 2 se presentan los resultados de parámetros de crecimiento. No hubo diferencias significativas en la ganancia de peso absoluta y el factor de condición K que estuvieran relacionadas con la inclusión de MOS en las dietas. En la tasa de crecimiento específica se observó un incremento con el tratamiento con 6 g Kg⁻¹ MOS ($p = 0.0226$). En cuanto la supervivencia, con los tratamientos 2 y 4 Kg⁻¹ MOS, las larvas tuvieron una menor supervivencia ($p = 0.0005$ y $p = 0.0001$, respectivamente).

Tabla 2. Parámetros de crecimiento e índices de utilización del alimento en larvas alimentadas con MOS.

Parámetro / MOS (g Kg ⁻¹)	0	2	4	6
AWG (g pez ⁻¹)	0.042 ± 0.009	0.056 ± 0.009	0.055 ± 0.009	0.067 ± 0.016
SGR (% d ⁻¹)	5.31 ± 0.81 ^a	7.23 ± 0.71 ^a	7.35 ± 0.72 ^a	7.79 ± 1.13 ^b
K	0.439 ± 0.051	0.484 ± 0.050	0.430 ± 0.044	0.446 ± 0.076
S (%)	24.87 ± 1.26 ^a	15.14 ± 2.57 ^b	13.16 ± 0.72 ^b	25.28 ± 1.67 ^a

Efecto de MOS sobre la actividad de las enzimas digestivas

La Figura 2 muestra el efecto de MOS sobre la actividad de las enzimas digestivas. La actividad de proteasas alcalinas y ácidas no cambió con la suplementación con MOS al comparar los grupos con el control (Fig. 2A y 2B), lo mismo se observó con la actividad de quimotripsina (Fig. 2D). La actividad de tripsina (Fig. 2C) aumentó con la adición de MOS a las dietas (2 g Kg⁻¹ MOS, $p = 0.0072$; 4 g Kg⁻¹ MOS, $p = 0.0213$; 6 g Kg⁻¹ MOS, $p = 0.0048$) en comparación con el control, pero la actividad de leucina aminopeptidasa solo aumentó

con 6 g Kg⁻¹ de MOS ($p = 0.0074$; Fig. 2E). La actividad de lipasa aumentó en las larvas alimentadas con 2 y 4 g Kg⁻¹ de MOS ($p = 0.0021$ y $p = 0.0085$), la actividad de lipasa en el grupo de 6 g Kg⁻¹ de MOS fue igual a la del grupo control (Fig. 2F). La actividad de α -amilasa fue mayor en las larvas alimentadas con 2 g Kg⁻¹ de MOS y 4 g Kg⁻¹ de MOS que en las larvas alimentadas con el control y 6 g Kg⁻¹ MOS ($p = 0.0387$ y $p = 0.0146$; Fig. 2G).

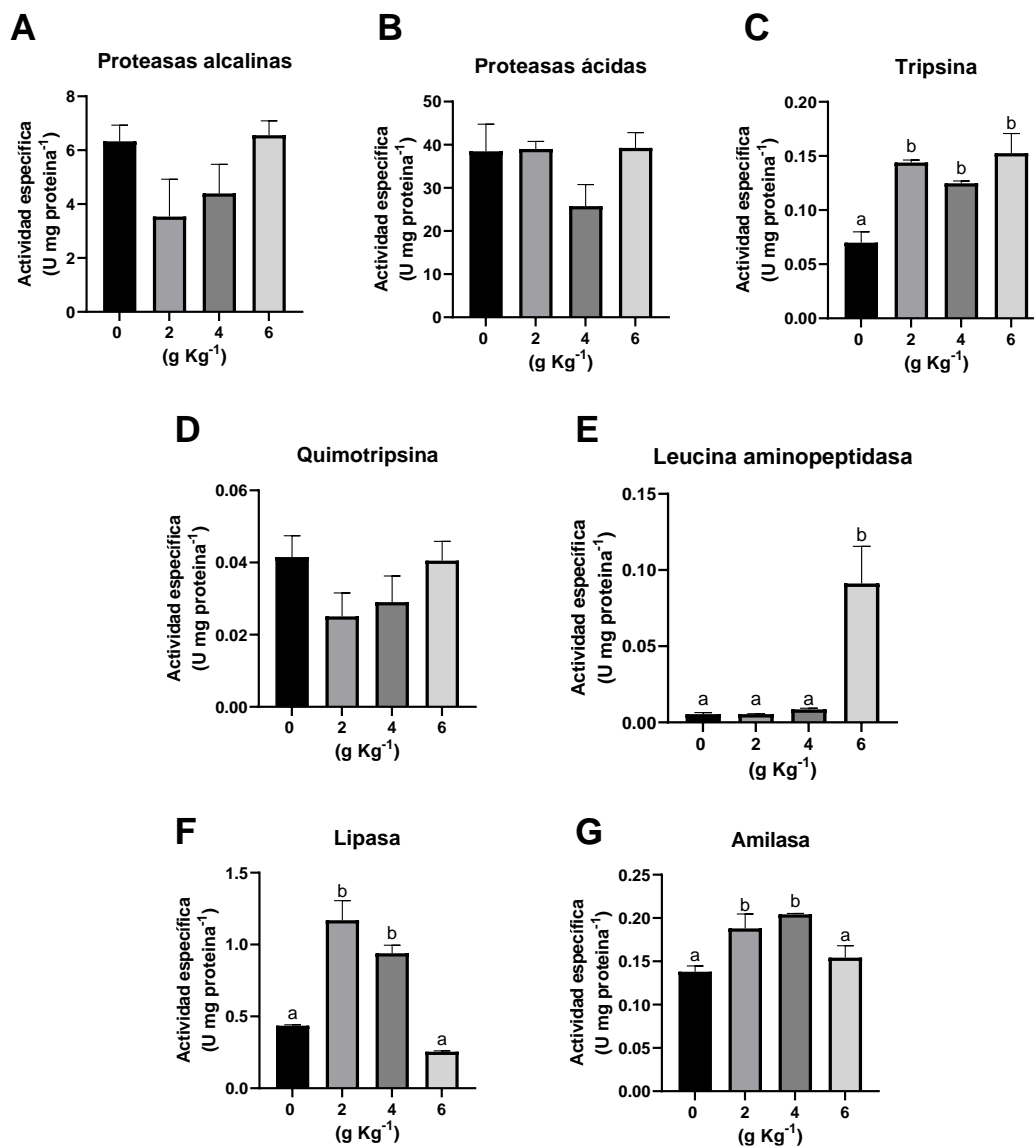


Figura 2. Efecto de mannano-ligosacáridos en la actividad de enzimas digestivas. Las letras sobre las barras indican diferencias entre los grupos ($p > 0.05$).

Efecto de MOS sobre la expresión génica de las proteínas de la barrera intestinal

La Figura 3 muestra la expresión relativa de *zo-1*, *zo-2*, *cl-3*, *cl-5* y *muc-2* bajo el efecto de MOS suplementado en la dietas para larvas de pejelagarto. La abundancia de transcritos de *zo-1* y *cl-15* no se vió afectada por la inclusión de MOS (Fig. 3A y 3D). Para los otros genes, la expresión de *zo-2* fue mayor con el tratamiento 6 g Kg⁻¹ de MOS ($p = 0.0334$), las concentraciones más bajas de MOS no tuvieron ningún efecto. La abundancia de transcritos de *cl-3* fue menor con 2 g Kg⁻¹ de MOS ($p = 0.0349$) pero mayor con 6 g Kg⁻¹ de MOS ($p = 0.0009$), y para *muc-2*, todas las concentraciones de MOS aumentaron la abundancia de transcritos, con resultados más altos usando 4 g Kg⁻¹ de MOS ($p = 0.0001$).

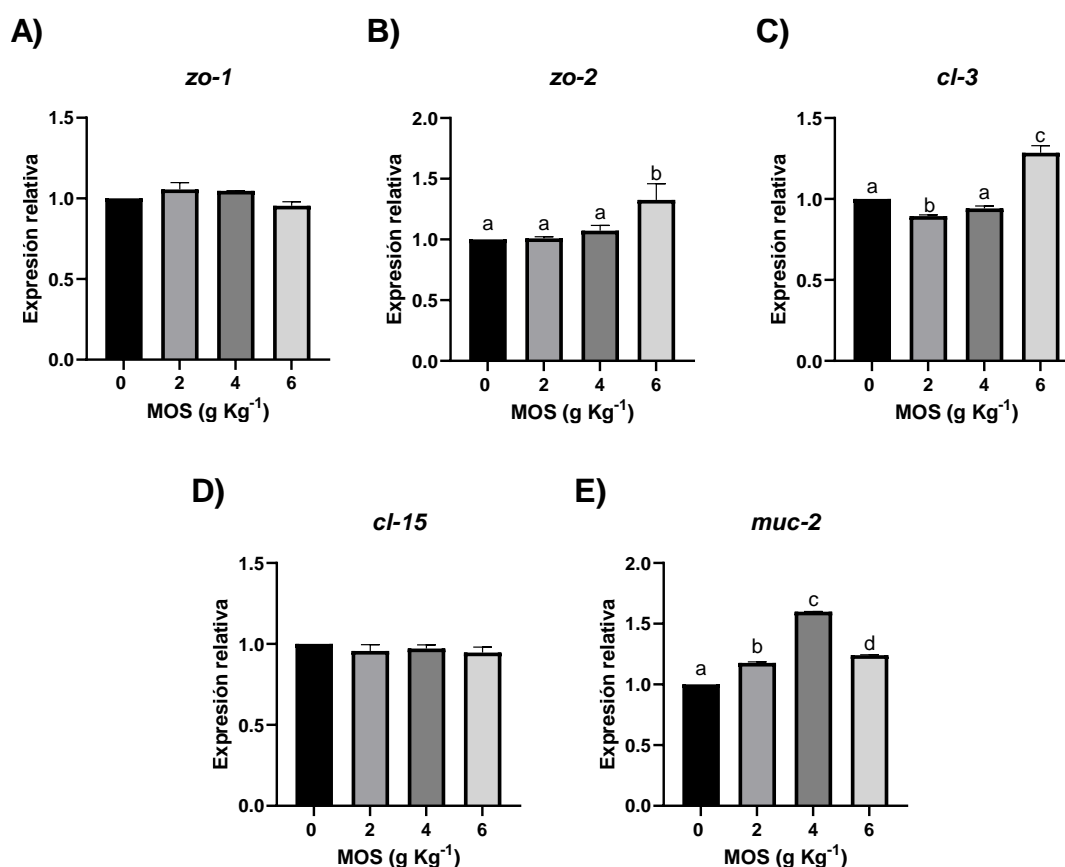


Figura 3. Efecto de mannano-ligosacáridos en la expresión relativa de los genes participantes en la barrera intestinal. Las letras sobre las barras indican diferencias entre los grupos ($p > 0.05$).

Discusión

Los prebióticos son ingredientes funcionales no digeribles que estimulan el crecimiento y/o metabolismo de bacterias en el tracto intestinal (Gatlin III & Peredo 2012). Para que un ingrediente se considere como prebiótico debe cumplir las siguientes características: (a) ser resistente a la acidez gástrica y no ser hidrolizado por las enzimas gastrointestinales, (b) no ser absorbidos por el tracto intestinal, (c) estimular selectivamente un número limitado de cepas benéficas, y (d) mejorar la inmunidad local o sistémica frente a la invasión de patógenos (Roberfroid 2007; Teng & Kim 2018). Algunos ejemplos de prebióticos usados en la acuicultura son los β -glucanos, manano-oligosacáridos y los fructooligosacáridos. Los β -glucanos son polisacáridos compuestos de unidades de glucosa unidas por enlaces β -(1,3)-glucosídicos. Dependiendo de la fuente de β -glucanos, se pueden encontrar diferencias estructurales entre éstos, siendo los de alto peso molecular los que activan leucocitos, estimulando su actividad fagocítica, citotóxica y antimicrobiana. Los β -glucanos de bajo peso molecular tienen menor efecto sobre las células y glucanos de cadena corta se consideran inactivos (Meena *et al.*, 2013). Los manano oligosacáridos son carbohidratos complejos que componen la pared celular de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* en donde monómeros de manosa se unen por enlaces glucosídicos y tienen la función de activar los receptores y proteínas de reconocimiento del sistema inmune innato en respuesta a sustancias desconocidas (Torrecillas *et al.*, 2014), mientras que los fructooligosacáridos están compuestos por monómeros de fructosa unidos por enlaces β -(2-1) glucosídicos formando cadenas cortas y medianas para terminar con un monómero de glucosa (Ringø *et al.*, 2010).

El uso de estos prebióticos en la acuicultura ha traído resultados con variaciones dependiendo del tipo de prebiótico y concentración, y el modelo de estudio, por ejemplo, la inclusión de fructooligosacáridos en una concentración de 10 g Kg⁻¹ en el alimento del salmón del Atlántico no tuvo efecto en el crecimiento ni digestibilidad, sin embargo, concentraciones de 2 y 6 g Kg⁻¹, aumentaron la sobrevivencia e inmunidad no específica de tilapias (Ringø *et al.*, 2010). En salmón del atlántico (*Salmo salar*), una inclusión de MOS aumentó los parámetros de crecimiento y mejoró la eficiencia alimenticia en comparación con FOS y GOS, y el alimento control (Grisdale-Helland *et al.*, 2008). En larvas de cobia (*Rachycentron canadum*), la inclusión de MOS favoreció la supervivencia y en el aumento

de las microvellosidades intestinales en concentraciones de 55 y 65 g Kg⁻¹ de MOS (Salze *et al.*, 2008). En juveniles de *Channa striata*, una inclusión de 2 g Kg⁻¹ de MOS aumentó la ganancia de peso absoluta (Talpur *et al.*, 2014), sin embargo, en las larvas de pejelagarto, la ganancia de peso absoluta y supervivencia disminuyó a concentraciones de 2 y 4 g Kg⁻¹ de MOS, pero usando 6 g Kg⁻¹ de MOS, la supervivencia aumentó fue igual al del grupo control. Es difícil relacionar todas las variantes que pueden afectar a la supervivencia de un cultivo larval, sin embargo, en muchos trabajos se ha coincidido en que la alimentación es un factor importante. Pérez-Jiménez (2020) encontró que la inclusión de FOS en las dietas para larvas de pejelagarto también aumentaban la supervivencia y la tasa de crecimiento específica a una concentración de 7.5 g Kg⁻¹.

La actividad de enzimas digestivas y sus cambios con respecto a la inclusión de prebióticos en la dieta tiene resultados diferentes si consideramos a la especie. En la carpa común (*Cyprinus carpio*), la actividad de proteasas totales, tripsina, lipasa y α -amilasa aumentó con una combinación de MOS y β -glucanos (Mohammadian *et al.*, 2019). En el fletán japonés (*Paralichthys olivaceus*), la actividad de amilasa y proteasas aumentó con 2.5 y 5 g Kg⁻¹ de MOS, respectivamente (Ye *et al.*, 2011). En larvas de pejelagarto, solamente la actividad de tripsina, leucina aminopeptidasa, lipasa y amilasa aumentó con la inclusión de MOS. Nájera-Arzola y colaboradores (2018) también encontraron un aumento en la actividad de enzimas digestivas con juveniles alimentados con 4 g Kg⁻¹ MOS. En este trabajo, la actividad de tripsina, lipasas y amilasas coincide con lo encontrado en juveniles, pero no con la actividad de leucina aminopeptidasa. Sepúlveda-Quiroz *et al.*, (2020) encontró que la inclusión de 5 g Kg⁻¹ FOS en las dietas de juveniles de pejelagarto aumentaba la actividad proteasas ácidas, quimotripsina y leucina aminopeptidasa, esto sugiere que los diferentes prebióticos más usados en la acuicultura, tienen efectos diferentes sobre una misma especie.

Algunos de los efectos beneficiosos de los manano-oligosacáridos en la dieta sobre el rendimiento de los peces, y el consumo y la utilización del alimento se han relacionado con una mejora en la integridad funcional de la membrana del enterocito, en relación con una mayor asimilación o digestión de nutrientes específicos o con posibles cambios en los niveles de péptidos que regulan el sistema de saciedad (señales de saciedad y apetito) como NYY,

CCK y ghrelina, y el sistema a largo plazo (reservas de energía corporal), proporcionando información para el sistema de alimentación central hipotalámico que controla la ingesta de alimento y en consecuencia la liberación de enzimas digestivas. Sin embargo, parece que la forma del MOS suplementado, la dosis y la duración de la suplementación en relación con la especie y el tamaño de los peces, así como las condiciones adecuadas de crianza son factores determinantes para lograr mejoras en el crecimiento y la conversión alimenticia (Torrecillas *et al.*, 2014). Es por lo anterior que en este trabajo también se midió la expresión de genes que son parte de la barrera intestinal. En muy pocos trabajos se han considerado a las proteínas que forman parte de la barrera intestinal como parámetros para evaluar el efecto de prebióticos en alguna especie. Sepúlveda-Quiroz *et al.*, (2020) reportaron que juveniles de *A. tropicus* alimentados con 10 y 15 g Kg⁻¹ de FOS aumentaban la expresión de *muc-2*. Mientras que, Nieves-Rodríguez *et al.*, (2018) no encontraron diferencias en la expresión de *muc-2* con la suplementación de β-glucanos en juveniles de *A. tropicus*. En este trabajo, las larvas de pejelagarto que fueron alimentadas con 4 g Kg⁻¹ tuvieron una mayor expresión de este gen, el cual codifica a la proteína mucina-2 la cual es el mayor componente del moco intestinal, y ayuda a proteger contra enfermedades inflamatorias (Heazlewood *et al.*, 2008). El papel principal de las claudinas es la regulación de la selectividad paracelular a iones pequeños. Las claudinas son equivalentes a poros selectivos de carga que promueven la permeabilidad de iones específicos, aunque también hay ejemplos de claudinas que generalmente aumentan en lugar de restringir la permeabilidad paracelular (Findley & Kovac, 2010). En este trabajo, las larvas de pejelagarto disminuyeron la expresión de *cl-3* con 2 g Kg⁻¹ MOS y la aumentaron con 6 g Kg⁻¹ MOS. Pérez-Jiménez (2020) también encontró que la expresión de *cl-3* aumentaba con la presencia de 7.5 g Kg⁻¹ FOS usando como modelo, larvas de pejelagarto. ZO-2 es una proteína de unión estrecha periférica que pertenece a la familia de proteínas de guanilato quinasa asociada a membrana la cual permite la interacción con una amplia variedad de moléculas, incluidas las proteínas de adhesión celular, los componentes del citoesqueleto y los factores nucleares (González-Mariscal *et al.*, 2017). En larvas de pejelagarto, la expresión de *zo-2* aumentó con el tratamiento 6 g Kg⁻¹ MOS. Pérez-Jiménez (2020) también encontró un aumento de este gen cuando larvas de pejelagarto se alimentaron con 7.5 g Kg⁻¹ FOS. En peces, los trabajos que consideran la expresión de proteínas de la barrera intestinal son casi nulos, y es en donde éste y otros

trabajos en donde se ha utilizado al pejelagarto como modelo dan pauta para explorar el efecto de otros prebióticos, incluso probióticos y simbióticos en estos genes.

Conclusión

En este estudio, la incorporación de manano-oligosacáridos en el alimento para larvas de pejelagarto, tiene un efecto positivo, siendo la concentración de 6 g Kg⁻¹ en donde se observaron los mejores resultados de crecimiento y actividad de enzimas digestivas. En cuanto a la expresión de genes de la barrera intestinal, los tratamientos con 4 y 6 g Kg⁻¹ MOS, también generaron resultados positivos al aumentar la expresión de *zo-2*, *cl-3*, y *muc-2*. Aun queda trabajo por hacer en esta línea de investigación, ya se encontró que MOS tiene un efecto positivo en las larvas, por lo que se infiere que la microbiota intestinal posee cepas que tienen la maquinaria enzimática para poder utilizar a estos carbohidratos como sustrato, por lo que se sugiere que en futuros trabajos se busque identificar a estas cepas de la microbiota intestinal.

Referencias

- Anson, M. L. (1938). The estimation of pepsin, trypsin, papain, and cathepsin with hemoglobin. *The Journal of General Physiology*, 22 (1): 79–89. <https://doi.org/10.1085/jgp.22.1.79>
- Berg, G., Rybakova, D., Fischer, D., Cernava, T., Champomier Vergès, M. C., Charles, T., Chen, X., Cocolin, L., Eversole, K., Herrero Corral, G., Kazou, M., Kinkel, L., Lange, L., Lima, N., Loy, A., Macklin, J. A., Maguin, E., Maunchline, T., McClure, R., Mitter, B., Ryan, M., Sarand, I., Smidt, H., Schelkle, B., Roume, H., Seghal Kiran, G., Selvin, J., Soares Correa de Souza, R., van Overbeek, L., Singh, B. K., Wagner, M., Walsh, A., Sessitsch, A., Schloter, M. (2020). Microbiome definition re-visited: old concepts and new challenges. *Microbiome*, 8, 103. <https://doi.org/10.1186/s40168-020-00875-0>
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Findley, M. K., Koval, M. (2010) Regulation and roles for claudin-family tight junction proteins. *IUBMB Life*, 61, 431-437. <https://doi.org/10.1002/iub.175>
- Frías-Quintana, C. A., Domínguez-Lorenzo, J., Álvarez-González, C. A., Tovar-Ramírez, D., Martínez-García, R. (2016). Using cornstarch in microparticulate diets for larvicultured tropical gar (*Atractosteus tropicus*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 42, 517-528. <https://doi.org/10.1007/s10695-015-0156-4>
- Gainza, O. & Romero, J. (2020) Effect of mannan oligosaccharides on the microbiota and productivity parameters of *Litopenaeus vannamei* shrimp under intensive cultivation in Ecuador. *Scientific Reports*, 10: 2719. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59587-y>
- García-Carreño, F. L., Hernández-Cortés, M., & Haard, N. F. (1994). Enzymes with peptidase and proteinase activity from the digestive systems of a freshwater and a marine decapod. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 42, 1456–1461.
- Gibson, G. R., Hutkins, R., Sanders, M. E. Prescott, S. L., Reimer, R. A., Salminen, S. J., Scott, K., Stanton, C., Swanson, K. S., Cani, P. D., Verbeke, K., Reid, G. (2017). The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 14, 491-502. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.75>
- González-Marisal, L., Miranda, J., Raya-Sandino, A., Domínguez-Calderón, A., Cuellar-Perez, F. (2017) ZO-2, a tight junction protein involved in gene expression, proliferation, apoptosis, and cell size regulation. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1397, 35-53. <https://doi.org/10.1111/nyas.13334>
- Grisdale-Helland, B., Helland, S. J., Gatlin III, D. M. (2008) The effects of dietary supplementation with mannanoligosaccharide, fructooligosaccharide or galactooligosaccharide on the growth and feed utilization of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 283: 163-167. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.07.012>

- Heazlewood, C., Cook, M., Eri, R., Price G., Tauro, S., Taupin, D., Thornton, D., Png, C., Crockford, T., Cornall, R., Adams, R., Kato, M., Nelms, K., Hong, N., Florin, T., Goodnow, C. & McGuckin, M. (2008). Aberrant mucin assembly in mice causes endoplasmic reticulum stress and spontaneous inflammation resembling ulcerative colitis. *PLoS Medicine*, 5(3), e54. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0050054>
- Jobling, M. (2016). Fish nutrition research: past, present and future. *Aquaculture International*, 24: 767-786. <https://doi.org/10.1007/s10499-014-9875-2>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the $2(-\Delta\Delta C(T))$ method. *Methods*, 25(4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Maroux, S., Louvard, D., & Barath, J. (1973). The aminopeptidase from hog intestinal brush border. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)–Enzymology*, 321(1), 282–295. [https://doi.org/10.1016/0005-2744\(73\)90083-1](https://doi.org/10.1016/0005-2744(73)90083-1)
- Méndez-Pérez, R., García-López, R., Bautista-López, J. S., Vázquez-Castellanos, J., Álvarez- González, C., Peña-Marín, E., Baltierra-Trejo, E., Adams-Schroeder, R., Domínguez-Rodríguez, V., Melgar-Valdés, C., Martínez-García, R., Moya, A., Gómez-Cruz, R. (2020). High-throughput sequencing of the 16S rRNA gene to analyze the gut microbiome in juvenile and adult tropical gar (*Atractosteus tropicus*). *Latin American Journal of Aquatic Research*, 48(3). <https://doi.org/10.3856/vol48-issue3-fulltext-2419>
- Montalto, M., D'Onofrio F. D., Gallo, A., Cazzato, A., Gasbarrini, G. (2009) Intestinal microbiota and its functions. *Digestive and Liver Disease Supplements*, 3(2), 30-34. [https://doi.org/10.1016/S1594-5804\(09\)60016-4](https://doi.org/10.1016/S1594-5804(09)60016-4)
- Mohammadian, T., Nasirpour, M., Tabandeh, M. R., Mesbah, M. (2019) Synbiotic effects of β -glucan, mannan oligosaccharide and *Lactobacillus casei* on growth performance, intestine enzymes activities, immunehematological parameters and immune-related gene expression in common carp, *Cyprinus carpio*: An experimental infection with *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture*, 511, 634197. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.06.011>
- Nájera-Arzola, I. C. Álvarez-González, C. A., Frías-Quintana, C. A., Peña, E., Martínez-García, R., Camarillo-Coop, S., Méndez-Marín, O., Gisbert, E. (2018). Evaluation of Mannan oligosaccharides (MOS) in balanced diets for tropical gar juveniles (*Atractosteus tropicus*). *Hidrobiológica*, 28(3), 239-246.
- Nayak, S. K. (2010). Role of gastrointestinal microbiota in fish. *Aquaculture Research*, 41(11), 1553-1573. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2010.02546.x>
- Nieves-Rodríguez, K., Álvarez-González, C., Peña-Marín, E., Vega-Villasante, F., Martínez-García, R. & Camarillo-Coop, S. (2018). Effect of β -Glucans in diets on growth, survival, digestive enzyme activity, and immune system and intestinal barrier gene expression for Tropical Gar (*Atractosteus tropicus*) juveniles. *Fishes*, 3(3), 27. <https://doi.org/10.3390/fishes3030027>

- Pérez-Jiménez, G. M. (2020) Efecto del prebiótico fructooligosacárido (FOS) sobre la fisiología digestiva y barrera intestinal en larvas de pejelagarto (*Atractosteus tropicus*). Tesis de Maestría. División Académica de Ciencias Biológicas. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
- Ringø, E., Olsen, R. E., Gifstad, T. Ø., Dalmo, R. A., Amlund, H., Hemre, G.-I., Bakke, A. M. (2010). Prebiotics in aquaculture: a review. *Aquaculture Nutrition*, 16, 117-136. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2009.00731.x>
- Roby, J. F., & Whelan, W. (1968). Amylases. In J. A. Radley (Ed.), *Starch and its derivatives*. London, UK: Chapman and Hall.
- Salze, G., McLean, E., Schwarz, M. H., Craig, S. R. (2008) Dietary mannan oligosaccharide enhances salinity tolerance and gut development of larval coho. *Aquaculture* 274, 148-152. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.11.008>
- Sepúlveda-Quiroz, C. A., Peña-Marín, E. S., Pérez-Morales, A., Martínez-García, R., Alvarez-Villagomez, C. S., Maytorena-Verdugo, C. I., Camarillo-Coop, S., Vissio, P. G, Pérez Sirkin, D., Tovar-Ramírez, D., Galaviz, M., Álvarez-González, C. A. (2020) Fructooligosaccharide supplementation in diets for tropical gar (*Atractosteus tropicus*) juvenile: Effects on morphophysiology and intestinal barrier function. *Aquaculture Research*, 00, 1-14. <https://doi.org/10.1111/are.14867>
- Talpur, A. D., Munir M. B., Mary, A., Hashim, R. (2014) Dietary probiotics and prebiotics improved food acceptability, growth performance, haematology and immunological parameters and disease resistance against *Aeromonas hydrophila* in snakehead (*Channa striata*) fingerlings. *Aquaculture*, 426-427, 14-20. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.01.013>
- Torrecillas, S., Montero, D., Izquierdo, M. (2014) Improved health and growth of fish fed mannan oligosaccharides: Potential mode of action. *Fish & Shellfish Immunology* 36, 525-544. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2013.12.029>
- Versaw, W., Cuppett, S. L., Winters, D. D., & Williams, L. E. (1989). An improved colorimetric assay for bacterial lipase in nonfat dry milk. *Journal of Food Science*, 54(6), 232-254. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1989.tb05159.x>
- Walter, H. E. (1984). Proteinases: Methods with hemoglobin, casein and azocoll as substrates. In: Bergmeyer, H. U. (Ed.), *Methods of Enzymatic Analysis Vol. 5* (pp. 270-277). Verlag Chemie. Weinheim, Germany
- Ye, J.D., Wang, K., Li, F. D., Sun, Y. Z. (2011) Single or combined effects of fructo- and mannan oligosaccharide supplements and *Bacillus clausii* on the growth, body composition, digestive enzyme activity, innate immune response and lipid metabolism of the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture Nutrition*, 17:e902e11. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2011.00863.x>