

## **Avances en Estudios Sobre Expresión y Actividad de Enzimas Digestivas en Juveniles de Totoaba (*Totoaba macdonaldi*, Gilbert 1890) Alimentados con Proteínas de Origen Vegetal.**

Mario. A. Galaviz<sup>a\*</sup>, Lus. M. López<sup>a</sup>, Idaly Trejo Escamilla<sup>a</sup>, Paola Pérez Arvizu<sup>a</sup>, Alejandra García Gasca<sup>b</sup>, Rubí Hernández Cornejo<sup>b</sup>, Alfonso Álvarez González, y Conal D. True<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Universidad Autónoma de Baja California (UABC), Facultad de Ciencias Marinas. PO Box 76, Ensenada B.C. 22860, México. E-mail: [mgalaviz@uabc.edu.mx](mailto:mgalaviz@uabc.edu.mx)

<sup>b</sup> Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, Unidad Mazatlán, Avenida Sábalo Cerritos s/n, Mazatlán, Sinaloa 82010, México

<sup>c</sup> Laboratorio de Acuicultura Tropical DACBIOL-UJAT, Carr. Vhsa-Cárdenas Km 0.5, Bosques de Saloya, Villahermosa, Tabasco, México.

---

### **Resumen**

En este documento se presentan los resultados de dos estudios donde se sustituyó harina de pescado (HP) por ingredientes de origen vegetal como el concentrado de proteína de soya (CPS) y harina de soya (HS), para el desarrollo de alimentos de calidad y económicamente viables para peces marinos carnívoros como totoaba (*Totoaba macdonaldi*). En ambos estudios se evaluó el efecto del CPS y HS como fuente alternativa en la sustitución parcial y total de la harina de pescado para conocer la actividad de enzimas digestivas y desarrollo productivo de los peces ante el cambio de fuente proteica en la dieta. En el primer experimento se formularon ocho dietas isotroféicas, donde se incrementó el nivel de CPS a 0%, 15%, 30%, 45%, 60%, 75%, 90% y 100% en sustitución de la HP, mientras que el segundo estudio se formularon cuatro dietas experimentales isotroféicas e isolipídicas con un incremento en la sustitución de harina de pescado por harina de soya: 33, 66 y 100% (HS-33, HS-66 y HS-100, respectivamente); y una dieta control de 100% harina de pescado (HS-0). Los resultados muestran que en el primer estudio con CPS la respuesta de la actividad de tripsina, quimiotripsina, fosfatasa alcalina y leucina aminopeptidasa mostraron diferencias significativas ( $P < 0.001$ ) entre los tratamientos, observándose mayor actividad en los peces alimentados con CD, SP15 y SP30. Así mismo con respecto a los niveles de expresión de tripsina y quimiotripsina, se observó que los niveles de estas dos enzimas se ven afectados conforme se aumenta los niveles de CPS en la dieta en sustitución de la HP. En el segundo estudio con HS los niveles de actividad de enzimas digestivas no se ven afectados con dietas que contengan

hasta el 33% de HS. En base los resultados encontrados en la presente investigación, el uso de la soya como CPS o HS puede ser utilizados como fuente de proteína en la dieta para juveniles de totoaba hasta un 33% sin afectar el crecimiento, desarrollo y salud de los organismos en cultivo.

Palabras claves. Expresión de genes, enzimas digestivas, soya, nutrición

## Introducción

Durante años se ha monitoreado la actividad pesquera y acuícola con el objetivo de encontrar un equilibrio adecuado entre las oportunidades y las amenazas a las que se enfrentan los ecosistemas naturales. La acuicultura durante las últimas décadas ha crecido de manera considerable, lo que ha ocasionado un incremento en la demanda de alimentos balanceado de alta calidad que son elaborados con proteínas y lípidos de origen marino, como harina y aceite de pescado, en especial de sardina y arenque, especies de pelágicos menores que son ricos de ácidos grasos (AG) y aminoácidos (AA) esenciales que requieren las especies en cultivo para un mejor desarrollo (García-Ortega 2010; Tacon, A.G.J, Hasan, M.R, Metian, M. 2011, FAO 2012). Sin embargo, los alimentos balanceados elaborados con estas fuentes ricas en AG y AA pueden representar arriba del 55% de los costos totales de producción, por lo tanto la industria dedicada a la elaboración de alimentos para acuicultura busca optimizar la manufactura, calidad y uso de los mismos con el fin de aumentar la eficiencia de producción, sin afectar el crecimiento, desarrollo y salud de los organismos en cultivo (Watanabe 2002). Tomando en cuenta que los principales ingredientes que se usan en la formulación de los alimentos provienen de las pesquerías, las cuales han llegado a su límite máximo de explotación y que año tras año existe una restricción en el uso actual y futuro de las harinas y aceites de pescado en alimentos acuícolas (Tacon, A.G.J. y Metian, M 2008), resultan relevantes las investigaciones enfocadas a encontrar fuentes alternativas de proteína y lípidos de origen vegetal para la elaboración de los alimentos acuícolas (Tacon & Metian 2008; Hardy R. W 2010, Ngandzali B. O., Zhou F., Xiong W., Shao Q.J. & Xu J.Z 2011). En este aspecto, los ingredientes provenientes de fuentes vegetales tienen un gran potencial en la industria acuícola debido a que algunos granos, como la soya, que contienen elevadas concentraciones de proteína, un buen perfil de aminoácidos, buena biodisponibilidad, y son económicamente accesibles en comparación con la harina y aceite de pescado. No obstante, existen ciertas restricciones en el uso de éstos productos vegetales debido a la palatabilidad, a la carencia de algunos aminoácidos esenciales (lisina, cisteína y metionina), así como a la presencia de factores antinutricionales tales como inhibidores de proteasas, glucosinolatos,

ácido fítico, saponinas, anti vitaminas liposolubles, entre otros (Francis G, Makkar H.P.S. & Becker K 2001, Chou R.L, Hera B.Y, Sua M.S, Hwang G, Wu Y.H & Chen H.Y 2004). Los factores antinutricionales presentes en la harina y derivados de soya limitan la utilización de ciertos nutrientes esenciales (por ejemplo los aminoácidos lisina y metionina) (Ganga R., Montero D, Bell J.G, Atalah E, Ganuza E, Vega-Orellana O, Tort L, Acerete L, Afonso J.M. Benitez-Santana T, Fernández V.A. Izquierdo M 2011), por medio de la actividad de factores antitripsicos o inhibidores de proteasas los cuales son compuestos termolábiles de naturaleza proteica que inhiben o modifican las enzimas digestivas como la tripsina o quimotripsina, alterando la digestibilidad de la proteína e incrementando las secreciones digestivas del páncreas (acetilcolina, gastrina e histamina) (Norton, 1991; Francis *et al.*, 2001; Merrifield D.L, Olsen R.E, Myklebust R, Ringø E 2010 ).

Por su parte, la soya es un ingrediente empleado de manera importante en la industria acuícola debido a la composición de las proteínas que la conforman, ya que la estructura de sus aminoácidos es muy similar a las proteínas de origen animal (Watanabe. 2002); sin embargo, es un producto que posee elementos desfavorables como 22% de oligosacáridos, inhibidores de proteasas que genera cambios morfológicos en el intestino (vacuolización supra nuclear de las células de absorción, acortamiento del plegamiento de la mucosa y presencia de células inflamatorias), lo que afecta la digestión de la proteína y la asimilación de los aminoácidos (2006, Murray H.M., Lall S.P., Rajaselvam R., Boutilier L.A., Blanchard B., Flight R.M., Colombo S., Mohindra V., Douglas S.E 2010). No obstante dichos elementos pueden ser desactivados durante el proceso de manufactura por medio de temperaturas elevadas (Aragão C, Conceição L.E.C, Dias J, Marquez A.C, Gomez E, Dinis M.T 2003; Vucelić-Radović V, Barić M, Stanojević S, Pešić M, Hristić M, Miladinović J, Prijjić Lj., Srebrić M 2005, Merrifield D.L, Olsen R.E, Myklebust R, Ringø E 2011). De esta manera, la mayoría de las semillas contienen inhibidores que protegen sus componentes de la degradación no intencional, ejemplo de esto, son los inhibidores para la hidrólisis de la proteína y lípidos, así como la absorción de minerales. Estos inhibidores pueden ser proteínas simples o complejas y son desnaturalizadas por medio de tratamientos con calor, extracción de alcohol y fermentación (Hardy 2010). El mecanismo de acción de

los inhibidores en los organismos comienza con la unión de éstos a la enzima blanco (tripsina y en menor medida quimotripsina) formando complejos estequiométricos estables lo que en consecuencia inhibe su actividad. Al inhibir la actividad de estas enzimas se estimula la secreción de pancreocimina-colecistoquinina de la pared intestinal las cuales estimulan la secreción de tripsina del tejido pancreático (Krogdahl *et al.* 2003); sin embargo, después de un tiempo prolongado de haber obligado al páncreas a producir una gran cantidad de enzimas, se produce una hipertrofia pancreática (Hardy 2010, Silva M.R y Silva M.A 2000), la cual consiste en el agrandamiento de las células pancreáticas y por lo tanto del órgano.

Las proteasas son enzimas que actúan sobre proteínas o sobre ellas mismas, rompiendo los enlaces peptídicos produciendo fragmentos de proteína de menor tamaño (eg. tripeptidos, dipeptidos) o incluso hasta aminoácidos libres. Las proteasas en general tienen diversas funciones como: resistencia inmunitaria, apoptosis, replicación celular y digestión de los alimentos (Werner. 2008). Es así que la proteína animal consiste de cadenas de L-amino ácidos ligados a otros aminoácidos a través de enlaces peptídicos (-NH·CO-). Para permitir que las proteínas sean biodisponibles, éstas deben ser hidrolizadas por endopeptidasas extracelulares, las cuales rompen los enlaces péptidos a lo largo de la cadena proteínica, y por exopeptidasas que rompen los aminoácidos terminales. La acción de estas enzimas libera oligopeptidos, dipeptidos y aminoácidos. En este aspecto, los oligopéptidos y dipéptidos son además hidrolizados por otras enzimas contenidas en las células epiteliales intestinales para ser absorbidas posteriormente. Dentro de estas enzimas se encuentran: la pepsina, tripsina, quimiotripsina. Los peces poseen proteasas de tipo ácido (pepsina) segregadas en el estómago y proteasas de tipo básico o neutro (tripsina, quimiotripsina, carboxipeptidasas, etc.). Al igual que en los vertebrados, las enzimas proteolíticas pancreáticas en peces son secretadas como proenzimas inactivas y es en el intestino medio el único sitio de activación de éstas enzimas (Conceição L., Aragão C., Rønnestad I 2011). Para medir las enzimas presentes en los tejidos de los animales, existen diferentes metodologías que se han desarrollado durante décadas, por ejemplo técnicas histoquímicas, bioquímicas y más recientes las moleculares. Esta última técnica ha tomado

gran importancia debido a que se logra un panorama más certero de la síntesis de proteínas que se están utilizando con respecto a la nutrición del animal. Sin embargo, pocos estudios han aplicado las técnicas de estudios bioquímicos y moleculares para describir la relación entre la transcripción de una enzima digestiva y su correspondiente actividad enzimática (Mario A. Galaviz, Lus M. López, Alejandra García Gasca, Carlos Alfonso Álvarez González, Conal D. True, Enric Gisbert 2015).

La expresión y actividad de enzimas digestivas que son secretadas por el páncreas sufren modificaciones durante el desarrollo y maduración de órganos que forman el sistema digestivo en los peces (Péres A. Zambonino Infante.J.L, Cahu, C 1998). Así mismo, la síntesis de estas enzimas puede ser modulada por genes, hormonas, condiciones ambientales y la nutrición de los organismos (Peres *et al.* 1998). La secreción y el contenido de proteasas, lipasas y amilasas en los organismos, sufren cambios en respuesta a la cantidad de sustratos empleados en relación a la técnica utilizada (Lhoste *et al.* 1994, Wang C, Xie S, Zhu, X, Lei W, Yang Y, Liu J 2006).

De esta manera, la aplicación de las técnicas de bioquímica, biología celular y molecular durante la nutrición de los juveniles de peces marinos puede ser una herramienta útil, ya que puede ayudar a determinar si los cambios en la cantidad de enzimas digestivas reflejan el control en el nivel de la transcripción o de traducción de los genes implicados, así como, permite la identificación de genes específicos que participan en la regulación del desarrollo gastrointestinal (Zambonino Infante y Cahu. 2001). En los últimos años, el número de estudios realizados donde se llevan a cabo la relación de expresión y actividad de enzimas digestivas en peces han sido escasos (Douglas S.E, Gawlicka A., Mandlam, S, Gallant, J.W 1998, Péres *et al.*, 1999; García-Gasca A, Galaviz M, Gutiérrez JN, García-Ortega A 2006; Galaviz M, García-Ortega A, Gisbert E, López LM, García-Gasca A 2012, Galaviz *et al.* 2015). La regulación de la expresión de enzimas digestivas es especie-específica, y esta modulada por la edad. Por lo tanto, la expresión génica de estas enzimas dependientes de células acinares están reguladas por al menos dos señales fisiológicas complejas que son hormonas y dieta (Moal, J, Daniel, J.Y, Sellos, D, Van Wormhoudt, A,

Samain, J.F 2000, Wang, C.F, Xie, S.Q, Zheng, K.K, Zhu, X.M, Lei, W, Yang, Y.X, Liu, J.K 2006). Es por ello que los estudios de expresión y actividad de enzimas digestivas en juveniles de peces marinos representan una fuente de información importante sobre el funcionamiento de la fisiología digestiva de peces marinos, con el propósito de formular dietas adecuadas durante las diferentes etapas de crecimiento.

La totoaba se encontraba clasificada en el género *Cynoscion*, género en el que la totoaba fuera la especie que alcanzaba la mayor talla dentro de su familia (Sciaenidae) con tallas cercanas a los dos metros de longitud (Berdegué. 1955) y pesos superiores a los 135 kg (Cannon. 1966). Actualmente se encuentra clasificada como *Totoaba macdonaldi*, en un género y especie única para esta familia y es un pez endémico del Golfo de California (Cisneros-Mata, M., Botsford, L.W, Quinn, J.F 1997). A partir de 1975 ha sido incluida en la lista de especies en peligro de extinción (CITES, 2005). A principios de 1900 se exportaba su vejiga gaseosa a oriente para ser utilizado como ingrediente principal en una sopa gourmet (Berdegué. 1955). En 1942, la captura de esta especie alcanzó un máximo de 2,261 toneladas. Sin importar el incremento en el esfuerzo pesquero, la producción anual fluctuó hasta llegar a capturar sólo 58 toneladas en 1975 (Flanagan y Hendrickson 1976).

Aunque se han postulado diversas causas probables que afectan a las poblaciones de este importante recurso, la información que existe sobre la totoaba sigue siendo muy limitada. Se han llevado a cabo estudios sobre su desarrollo embrionario (Morales-Ortiz 1999), desarrollo larval (Sandoval-Garibaldi 2001) y requerimientos nutricionales. En éstos últimos, se ha investigado el efecto de diferentes niveles de ácidos grasos, dietas isoprotéicas, niveles de alimentación, etc. (López, L.M., Durazo, E., Rodríguez, M.A., True, C., Viana, M.T 2006, Solórzano-Salazar 2006; Vizcaíno-Pérez 2008, Bañuelos-Vargas, I, López, L.M, Pérez-Jiménez, A, Peres, H 2014).

Actualmente la Unidad de Biotecnología en Piscicultura de la Facultad de Ciencias Marinas de la Universidad Autónoma de Baja California, lleva a cabo el desarrollo de la biotecnología de cultivo de ésta especie, mismo que se encuentra enfocado a lograr el inicio de

un programa de repoblamiento a partir de reproductores mantenidos en cautiverio (True C.D, A. Silva Loera y N. Castro Castro 1997, True C.D, N. Castro-Castro, G. Sandoval-Garibaldi y C. Morales-Ortiz 2001). Aunque ya se ha logrado el cultivo de esta especie, existen limitantes para escalarlo a nivel comercial. En vista de lo anterior, investigación básica y aplicada recientes se centran en la obtención de información detallada sobre la nutrición y fisiología digestiva durante la engorda de esta especie cuando se sustituye la harina de pescado por proteína de origen vegetal como la soya. El propósito de esta investigación es analizar el efecto de la proteína y harina de soya sobre la expresión y actividad de las enzimas digestivas de totoaba, con la intención de poder diseñar dietas económicamente viables, sin afectar el desarrollo, crecimiento y salud de los peces en cultivo.

## **Materiales y Métodos**

### **Manejo de peces**

Se realizaron dos experimentos con *T. macdonaldi* para evaluar el concentrado de proteína de soya (CPS) y harina de soya (HS) como fuentes de proteínas. Los peces utilizados en los dos estudios fueron obtenidos de la Unidad de Biotecnología en Piscicultura (UBP) de la Facultad de Ciencias Marinas de la Universidad Autónoma de Baja California, México. Los peces fueron transferidos a las instalaciones experimentales las cuales consistieron de un sistema de recirculación termo regulado equipado con 24 tanques de fibra de vidrio de 120 L de capacidad para el estudio con CPS y 12 tanques de las mismas características que el estudio anterior para el estudio de HS. Durante el ensayo de ambos experimentos, la temperatura fue mantenida a  $23.2 \pm 0.4^{\circ}\text{C}$  y el fotoperiodo fue programado a 12:12 h (luz:oscuridad). La concentración promedio de la salinidad fue de 34‰ y el oxígeno fue mantenido arriba del 6mg/l durante todo el experimento.

## Formulación de dietas

Para el primer experimento que consistió en la utilización de CPS, fueron formuladas ocho dietas experimentales siendo isoprotéicas, incrementado la sustitución de harina de pescado por CPS (0, 15, 30, 45, 60, 75, 90 y 100%), mientras que para el estudio con HS, se formularon cuatro dietas experimentales isoprotéicas (proteína cruda: 50%, materia seca) e isolipídicas (lípidos crudos: 12%, materia seca) con un incremento en la sustitución de harina de pescado por harina de soya: 33, 66 and 100% (HS-33, HS-66 y HS-100, respectivamente); y una dieta control de 100% harina de pescado (HS-0).

Para ambos estudios, todos los ingredientes fueron mezclados en un procesador de alimentos (Hobart, Troy, OH, USA). La mezcla húmeda fue peletizada a través de un molde de 3 mm de diámetro en un molidor de carne comercial, posteriormente los pellets fueron secados durante 18 horas en un horno de convección con salida de humedad a  $70 \pm 5^\circ\text{C}$ . Los pellets secos fueron fraccionados a un tamaño menor y posteriormente tamizados para eliminar el polvo fino, posteriormente fueron almacenados a  $-20^\circ\text{C}$  hasta su uso.

Previo al comienzo del experimento, los peces fueron aclimatados a las instalaciones y a la dieta control (AS-0) por un periodo de dos semanas. Al finalizar la aclimatación, 480 ( $50.5 \pm 1.0$  g) y 420 ( $4.03 \pm 0.1$  g) (experimento 1 y 2) juveniles de totoaba fueron seleccionadas al azar y asignadas a sus respectivos tanques a una densidad de 20 y 35 peces/tanque. Cada dieta experimental fue asignada al azar en tres diferentes tanques (triplicados), la alimentación fue a aparente saciedad dos veces al día (09:00 y 16:00 h) durante 60 días.

## Biometrías y obtención de muestras

Los peces fueron pesados al inicio, después de 4 semanas y al final del experimento bajo el efecto de anestesia ( $100 \text{ mg L}^{-1}$  de aceite de clavo). Del stock inicial se tomaron muestras de peces para su análisis correspondiente, y al final del experimento se seleccionaron 4 peces al azar de cada tanque los cuales fueron almacenados a  $-20^\circ\text{C}$  para

subsecuentemente realizar análisis proximales de pez entero. Se seleccionaron otros 10 peces de cada tanque para tomar muestras de hígado y músculo los cuales fueron congelados a  $-20^{\circ}\text{C}$  para realizar futuros análisis. El peso húmedo de los organismos y sus respectivos hígados fueron registrados para la determinación del índice hepatosomático.

### **Actividad enzimática digestiva**

Se extrajo el sistema digestivo (estómago e intestino) de 3 organismos de cada tanque los cuales fueron congelados inmediatamente después de la disección en hielo seco y almacenados a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Los análisis iniciaron con la preparación del homogenizado de las dos primeras partes del intestino obteniendo 3 homogenizados de cada tanque (9 por tratamiento). La actividad de las enzimas se cuantificó en un espectrofotómetro modelo DR 5000 UV-Vis marca HACH. Las enzimas que se analizaron para estudiar la hidrólisis de proteínas fueron proteasas alcalinas totales, tripsina, quimotripsina, leucina aminopeptidasa, además de medir la actividad de fosfatasa alcalina y  $\alpha$ -amilasa.

### **Análisis molecular**

#### **Extracción de ARN**

El análisis molecular se realizó según la metodología descrita por García-Gasca *et al.* (2006). El ARN total fue extraído de tejido de usando reactivo Trizol (Invitrogen), seguido por dos tratamientos de DNAsa para eliminar completamente el ADN genómico. La síntesis de ADNc se llevó a cabo con 5  $\mu\text{g}$  de ARN total y la enzima transcryptasa reversa MMLV (Promega) en presencia de random primers.

#### **PCR Cuantitativo (qPCR).**

La expresión de genes de tripsina, quimotripsina, fosfatasa alcalina y 18s ribosomal fue cuantificada de manera relativa con un termociclador de tiempo real CFX96 BioRad usando SYBER GREEN®. Las muestras de ADNc de totoaba de los diferentes

tratamientos fueron analizadas por triplicado y se utilizó como control interno el gen 18s ribosomal (los primers para qPCR se muestran en la Tabla 4). Las reacciones de PCR se realizaron bajo las siguientes condiciones: 95 °C por 2.5 minutos, y 40 ciclos a 95 °C por 30s, 60 °C por 30s y 72 °C por 30s. La elaboración de la curva estándar de cada uno de los genes se realizó por medio de diluciones seriadas del ADNc amplificado con los primers de tripsina, quimotripsina, fosfatasa alcalina y 18s ARNr. Se utilizaron los valores del ciclo umbral (CT) y el número de copias en escala logarítmica (log copy number) obtenidos del análisis de dilución serial para realizar un análisis de regresión lineal y calcular cada una de las curvas estándar.

Para el cálculo del número de copias (C0) en muestras no conocidas se empleó el modelo de regresión lineal:

$$y = a + b (CT)$$

Donde:

y= nivel de expresión de cada gen, a= intercepto, b= pendiente de la curva estándar y CT= ciclo umbral.

Finalmente para normalizar la C0 de cada muestra se dividió la C0 de cada uno de los genes por el C0 de 18s rRNA y por último cada muestra normalizada se dividió por el calibrador que en este caso fue la muestra de la dieta control.

### **Análisis estadístico**

Los resultados son presentados como media  $\pm$  error estándar. La normalidad de los datos fue determinada por la prueba de Kolmogorov-Smirnov test y la homocedasticidad con la prueba de Levene. Se realizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) para procesar los resultados, seguida de una prueba de Tukey de comparaciones múltiples para comparar el comportamiento de las dietas (HS-0, HS-33, HS-66 y HS-100). Todos los análisis se llevaron a cabo usando el programa Sigma Stat versión 3.5 y se empleó un nivel de significancia de 0.05.

## Resultados

### Expresión y actividad de enzimas digestivas

#### Primer experimento con CPS

Los niveles de actividad de proteasas digestivas de juveniles de totoaba presentaron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) en respuesta a los diferentes niveles de inclusión de CPS en la dieta. Los niveles de actividad de tripsina osciló entre  $0.17 \pm 0.00$  a  $0.073 \pm 0.00$   $\text{mU} \times 10^{-3} \text{ mg proteín}^{-1}$ , la actividad más alta fue observada en juveniles alimentados con la dieta control (CD) siendo significativamente diferente ( $P < 0.001$ ) con respecto al resto de los tratamientos. Por otra parte los niveles de quimiotripsina fueron variando con respecto a la sustitución de CPS en la dieta, observándose valores de 4.69 a 9.31  $\text{mU} \times 10^{-3} \text{ mg proteín}^{-1}$ , la actividad más alta se presentó en CD, SP15 y SP30 siendo significativamente diferentes ( $P < 0.001$ ) al resto de los tratamientos. En cuanto a la actividad de la fosfatasa alcalina los valores obtenidos fueron de 1.89 a 4.18  $\text{mU} \times 10 \text{ mg proteín}^{-1}$ , mostrando la mejor respuesta en las dietas CD, SP15 y SP30, observándose diferencias significativas ( $P < 0.001$ ) con respecto al resto de las dietas. La actividad de leucina aminopeptidasa presentó diferencias significativas por la inclusión de SPC ( $P < 0.001$ ), en esta enzima se obtuvieron valores de  $0.13 \pm 0.01$  a  $0.24 \pm 0.00$   $\text{mU} \times 10^{-3} \text{ mg proteín}^{-1}$ , donde la actividad más alta se presentó en SP15 y SP30, con respecto a las dietas con mayor inclusión de SPC.

Tabla 1. Actividad de enzimas digestivas de juveniles de *Totoaba macdonaldi* alimentados con diferentes niveles concentrado de harina de soya en la dieta. Los datos están representados en  $\text{mU} \times 10^{-3}$  mg proteína.

	Tratamientos							
	DC	CPS15	CPS30	CPS45	CPS60	CPS70	CPS90	CPS100
Tripsina	0.073±0.0 <sup>a</sup>	0.037±0.0 <sup>b</sup>	0.039±0.0 <sup>b</sup>	0.025±0.0 <sup>c</sup>	0.021±0.0 <sup>cd</sup>	0.020±0.0 <sup>cd</sup>	0.018±0.0 <sup>d</sup>	0.017±0.0 <sup>d</sup>
Quimotripsina	9.31 <sup>a</sup>	8.08 <sup>b</sup>	8.58 <sup>ab</sup>	6.19 <sup>c</sup>	5.99 <sup>c</sup>	4.92 <sup>d</sup>	4.72 <sup>d</sup>	4.69 <sup>d</sup>
Fosfatasa alcalina	4.13 <sup>a</sup>	4.18 <sup>a</sup>	4.14 <sup>a</sup>	3.45 <sup>b</sup>	2.51 <sup>c</sup>	2.03 <sup>d</sup>	1.92 <sup>d</sup>	1.89 <sup>d</sup>
L-aminopeptidasa	0.24±0.00 <sup>b</sup>	0.25±0.01 <sup>a</sup>	0.26±0.01 <sup>a</sup>	0.21±0.01 <sup>bc</sup>	0.20±0.00 <sup>c</sup>	0.14±0.00 <sup>d</sup>	0.15±0.01 <sup>d</sup>	0.13±0.01 <sup>d</sup>

### Segundo experimento con HS

La presencia de harina de soya en las dietas, modificó la actividad de la mayoría de las enzimas digestivas analizadas en éste estudio. La proteasa alcalina disminuyó significativamente su actividad en presencia en los tratamientos que contenían arriba del 33% de HS. Contrario a esto, la enzima Leucina aminopeptidasa incrementó significativamente su actividad en la dieta HS-100 comparativamente con el resto de las dietas. La tripsina mostró su mayor actividad en ausencia de harina de soya (HS-0), y presentó valores significativamente menores en el resto de las dietas. La quimotripsina no presenta diferencias significativas en su actividad. La enzima  $\alpha$ -amilasa presenta su mayor actividad en la dieta HS-0 y disminuye conforme se incrementa la harina de soya en las dietas, mostrando su menor valor en la dieta HS-100. Tabla 2.

Tabla 2. Actividad de enzimas digestivas de juveniles de *Totoaba macdonaldi* alimentados con diferentes niveles de harina de soya en la dieta.

Dieta	HS-0	HS-33	HS-66	HS-100
<i>Proteasa Alcalina</i> U mg prot <sup>-1</sup>	19.29 ± 0.3 <sup>a</sup>	20.5 ± 0.45 <sup>a</sup>	13.8 ± 1.90 <sup>b</sup>	0.8 ± 0.38 <sup>b</sup>
<i>Leucina Aminopeptidasa</i> mU x 10 <sup>-3</sup> mg proteína <sup>-1</sup>	0.71 ± 0.03 <sup>b</sup>	0.70 ± 0.03 <sup>b</sup>	0.64 ± 0.04 <sup>b</sup>	0.96 ± 0.05 <sup>a</sup>
<i>Tripsina</i> mU x 10 <sup>-3</sup> mg proteína <sup>-1</sup>	5.20 ± 0.17 <sup>a</sup>	2.69 ± 0.14 <sup>b</sup>	1.16 ± 0.15 <sup>c</sup>	0.78 ± 0.38 <sup>c</sup>
<i>Quimotripsina</i> mU x 10 <sup>-3</sup> mg proteína <sup>-1</sup>	2.27 ± 0.5	1.46 ± 0.42	1.19 ± 0.3	1.40 ± 0.37
<i>Alfa amilasa</i> mU x 10 <sup>-3</sup> mg proteína <sup>-1</sup>	5.26 ± 0.18 <sup>a</sup>	3.43 ± 0.35 <sup>b</sup>	2.91 ± 0.40 <sup>b</sup>	1.39 ± 0.22 <sup>c</sup>

Con respecto a la expresión de enzimas digestivas, actualmente se cuenta con las secuencias y primers específicos para tripsina, quimotripsina, pepsina y fosfatasa alcalina, mismas que se han estudiado para larvas y ahora en juveniles de *T. macdonaldi* (Tabla 3).

Tabla 3. Secuencias de genes de enzimas digestivas evaluadas en el presente estudio.

**> 18s RIBOSOMAL (443 nucleótidos) GenBank HM754483**

ATAAAATTCCAGCTGCCATAGCGGATCTTGATATCGCTGCAGTTAAACAACCTCG  
 TAGTTGGATCTCGGGATCGAGCCGTGCAACAGCCGCCGGGCCGACCACCGTCT  
 GTCCCAGCCCCTGCCTCTCGGGCGCCCTACGATGCTCTTAGCTGAGTGTGCCGC  
 GCGGTCCGAAGCGTCTACTTTGAAAAAATTAGAGTGTTCAAACCAGGCGCCGT  
 CGCCAGTAAACCGCAGCTACGAATATTGGAATAGAACTCCGGTTCTATTTTGTG  
 GGTTTTCTTCTCTGAACTGGGGCCATGATTAAGAGGGACGCCCGGGGGCATTTCG  
 TATTGTGCGGCTAGAGGTGAAATTCTTGACCCGGCAGAAGACGGACGAAAGCG  
 AAAGCATTGCAAGAATGTTTTATAATTCAAGAACGAAAGTCGGAGGTTTCG  
 AAGACGATCAGATACTGTCTAGTTCCGATCATCA

**> TRIPSINA (314 nucleótidos) Genbank HM754480**

ACATTGACATCATGCTGATCAAGCTGAGCAAGCCCGCCACCCTGAACAGCTAC  
 GTCCGCACCGTGTCCCTGGCCTCCAGCTGTGCAGCTGCTGGCACCCGCTGTCTG  
 ATCTCTGGATGGGGCAACACCAGCAGCTCTGGAAGCAACTACCCTGATCGTCT  
 GAGGTGCCTGGATGCCCCATCCTGAGCGACAGCAGCTGCAGGACTGCCTACT  
 GTGGACAGATCACTACAACATGTTCTGTTCTGGATTTGTGAGAGAGGCAAA  
 GACTCCTGGCGCGGTGGCGCTGTTGTCTCCGGGGTGTGCGTTGGTTCGG

**> QUIMOTRIPSINA (477 nucleótidos) GenBank HM754481**

CTGGCCATGGCAGGTGTCTCTGCAGCAATCCAATGGCTTCTACTTCTGTGGAGG  
 ATCTCTGATCAACGAGAAGTGGGTGGTGACCGCCGCTCACTGTAACGTCAGGA  
 CCTACCACCGTGTGGTCGCTGGAGAACACATCAAGGGCTACGGCTCCAACGAG  
 CACGTCAAGGTTCTGAAGCCCGCCAAAGTGTTCAACCCACCCCTACTGGAACCCC  
 CACACAATCAACAACGACATCTCCCTCATCAAGTTGTCCACCCCCGCCCCGCTG  
 GGCACAAACGTGTCCCCTGTCTGCCTCGCCGAGTCCCCGATGTCTTTTCCGCC  
 GGATGGACCTGCGTCAACTCCGGCTGGGGTCTGACCCGCTACAACGCTCCAG  
 TACTCCCAACACACTCCAGCAGGGCGCCCTGCCCTGCTGTCCAACGAGCAGT  
 GCAAGAAACACTGGGGCAGCAACATCTCCGGAATCATGATTTGTGCTGG

**> PEPSINA (450 nucleótidos) GenBank HM754482**

GGGGCgACCAGCCTCTGTCCATCCAGTACGCAGCTGgCAGCATGAccgGATATCT  
 GGGCAGCGACATTGTTGAGGTGCGACGCATCTCTGTGAACAACCAGGTGTGTG  
 GTTTCAGCGACTCAGAGGCTCTCTACATGCTCACATGCACGCTGATGGTATCC  
 TGGGACTGGCTCTCCAGTCCAATGCCTCTGACGATGTTGTGCCAGTCTTTGACA  
 ACATGATCAGCCAGCACCTGGTGTACAGACCCTGTTCTCTGTCTACCTGAGCA  
 GCAACAGTCAGCAGGGCAATGAGGTGCTCTCCGGTGGTATTGACAGCAACTAC  
 TACTACTGGACAAATTACCTGGATCCCTCTGACCTCTGCCACCTACTGGCAGATC  
 AAAATGGACAGTGTTACCATCAATGGACAGACTGTGGCCTGCTCTGATGGTTG  
 CGAGGCCATCATCGACAATC

> **FOSFATASA ALCALINA (428 BASES) (En proceso de registro)**

CTGCGACGCCTGCTCGTATACTGAAGGGTCAGCTAAACGTGCAGAGTGGAGAG  
 GAGACCCAGCTGGAGATGGACAAGTTCCCCTTTGTGTCTTTGGCCAAGACATAC  
 AACACTAACGCGCAGGTGCCAGACAGCGCCGGCACCGCCACAGCTTATCTCTG  
 CGGGGTCAAGGCCAATGAGGGCACGGTGGGAGTGAGTGCAGCTGCTGTCCGAT  
 CCCAGTGTAACACCACACAGGGCAATGTAGTCACCTCCATACTCAGATGGGCT  
 AAGGACGCAGGCAAGTCAGTGGGAATAGTGACAACAACCCGTGTCAACCATGC  
 GACTCCCAGTGTGCCTACGCCACAGCGTGGACAGAGACTGGTACTCCGACA  
 ATGAGATGCCACGTGAAGCTCTGCAGTCCGGCTGCAAAGACATCGCCAGACAA  
 CTC

A partir de estas secuencias se diseñaron los siguientes oligonucleótidos específicos por medio del programa PRIMER3, para amplificarlas por tiempo real (Tabla 4).

Tabla 4. Primers específicos de genes de enzimas digestivas evaluadas en el presente estudio.

Nombre	Primers específicos	Numero de GENBANK
TotoTryp F TotoTryp R	5'ACC CGC TGT CTG ATCT CTG GAT 3' 5'TTG TCG AGA GAG GCA AAG ACT CCT 3'	<b>HM754480</b>
TotoChemo F TotoChemo R	5'CGC TCA CTG TAA CGT CAG GAC CTA 3' 5'GGT GGA CAA CTT GAT GAG GGA GAT 3'	<b>HM754481</b>
TotoPepsin F TotoPepsin R	5'CTC TGA CGA TGT TGT GCC AGT CTT 3' 5'CAG AGG TCA GAG GGA TCC AGG TAA 3'	<b>HM754482</b>
Toto18sRib-F Toto18sRib-R	5'CTG AAC TGG GGC CAT GAT TAA GAG 3' 5'GTC TTC GAA CCT CCG ACT TTC GTT 5'	<b>HM754483</b>
Toto-FA-F Toto-FA-R	GGA GAT GGA CAA GTT CCC CTT TG GGT GTT ACA CTG GGA TCG GAC AG	<b>En proceso</b>

Hasta el momento se cuenta con la expresión de los genes de enzimas digestivas del experimento 1 que consiste en la sustitución de la harina de pescado por concentrado de proteína de soya en la dieta para juveniles de totoaba. mRNA de tripsina se detectó a niveles muy bajos durante el presente estudio. El nivel de expresión fue disminuyendo conforme se aumentaba el nivel de CPS en la dieta, lo cual podría indicar una inhibición de esta enzima por los factores antinutricionales contenido en el CPS (Figura 1A).

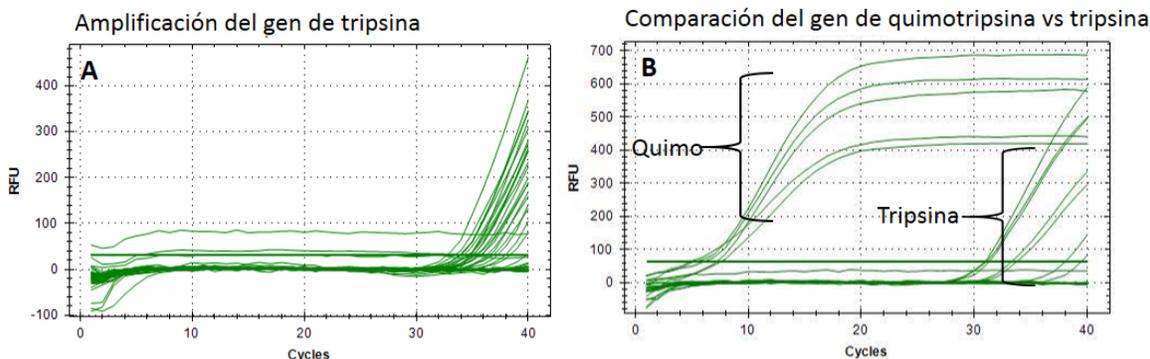


Figura 1. Amplificación de genes de tripsina (A) y quimotripsina vs tripsina (B) en muestras de intestino de juveniles de totoaba alimentados con dietas a base de CPS.

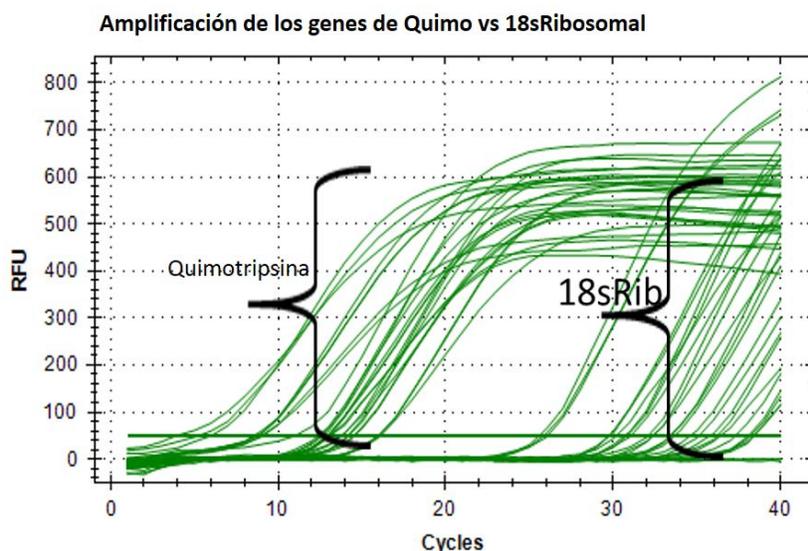


Figura 2. Amplificación de genes de quimotripsina y 18sRib en muestras de intestino de juveniles de totoaba alimentados con dietas a base de CPS.

El máximo nivel de mRNA de tripsina fue detectado en la dieta control, observándose que empieza a expresarse al ciclo 32, mientras que la expresión de las muestras de peces que fueron alimentados con la dieta que contenía 100% CPS fue detectado a niveles muy bajos al ciclo 38 aproximadamente. Al comparar los niveles de expresión de quimotripsina con respecto a tripsina se puede observar que esta enzima tiene niveles más elevados con respecto a tripsina, observándose que la expresión del gen en los juveniles alimentados con la DC empieza a expresarse al ciclo 8 y va disminuyendo conforme aumenta el nivel de sustitución de CPS por harina de pescado como fuente de proteína en la dieta (Figura 1B y 2).

## Discusión

Mediante estudios de fisiología digestiva en las diferentes etapas de desarrollo de peces marinos, se ha adquirido el conocimiento para entender el progreso de las enzimas digestivas y su papel en la digestión de los nutrientes contenidos en la dieta, por lo que se ha logrado la planificación de los modelos de alimentación y capacidades nutricionales de diversos peces marinos (Díaz-López, M, Moyano-López, F.J, García-Carreño, L.F, Alarcon, F.J., Sarasquete, M.C 1997; Zambonino-Infante & Cahu, C.L 2001; Álvarez-González, C.A, Moyano-López, F.J, Civera-Cerecedo, R, Carrasco-Chávez, V., Ortiz-Galindo, J.L, Dumas, S 2008). Es por ello, que actualmente los estudios se basan en el conocimiento detallado de actividad y expresión enzimática digestiva como proteasas, lipasas, amilasas, fosfatasas, entre otras. Por lo anterior, es importante el desarrollar investigación enfocada en la fisiología digestiva de los organismos determinada desde diferentes panoramas como la bioquímica y la biología molecular, ya que nos puede indicar el estado nutricional de los organismos en cultivo, de manera tal que los datos obtenidos pueden ser relevantes para establecer el momento preciso y el tipo de nutriente que el animal requiere y que será capaz de digerir de forma eficiente (Ueberschär. 1993, Alarcón & Martínez. 1998).

En la presente investigación observamos que los datos de los análisis enzimáticos, reflejan una alteración evidente en la actividad de las enzimas digestivas ya que con el incremento gradual del concentrado de proteína de soya y la harina de soya, la actividad se observó cada vez más disminuida, afectando directamente la digestión y asimilación de los nutrientes, especialmente de la proteína. De manera óptima, las enzimas realizan la hidrólisis de los nutrientes hasta su mínima expresión (aminoácidos libres) para posteriormente llevar a cabo el proceso de absorción a través de los enterocitos y ser transportados al hígado para su metabolismo (Rust. 2002). Sin embargo, si existe una falla en la actividad de éstas enzimas, los procesos de absorción y asimilación no pueden ser realizados de manera eficiente, afectando el estado de salud y el crecimiento de los organismos (Zambonino & Cahu. 2007). El concentrado de proteína de soya y la harina de soya son ingredientes que contiene factores antinutricionales los cuales anulan la actividad

de algunas de éstas enzimas, por lo que la respuesta fisiológica que se podría generar en los organismos que consumen dietas formuladas con éstos factores son pancreatitis e hipertrofia pancreática los cuales han sido ampliamente relacionados con el uso de productos de la soya (Hardy *et al.* 2010, Krogdahl *et al.* 2003, Francis G, Makkar H.P.S, Becker K 2001). Su mecanismo de acción es inhibiendo la actividad de enzimas proteolíticas, principalmente tripsina y quimotripsina las cuales se unen a la enzima blanco (tripsina y en menor medida quimotripsina) formando complejos estequiométricos estables lo que en consecuencia inhibe su actividad estimulando la secreción de pancreocimina-colecistoquinina de la pared intestinal las cuales estimulan la secreción de tripsina del tejido pancreático; sin embargo, después de un tiempo prolongado de haber forzado al páncreas a producir una gran cantidad de enzimas, se produce una hipertrofia pancreática, lo que a su vez limita la producción de enzimas pancreáticas (Hardy *et al.* 2010; Silva & Silva 2000) y su severidad depende del tiempo y de la cantidad del nutriente suministrado (Berg-Lea *et al.* 1989). Lundstedt L.M., Bibiano Melo J. F. & Moraes G (2004), hacen mención que los cambios en los alimentos formulados tales como el tipo, fuente y cantidad de nutriente pueden llegar a alterar el perfil de las enzimas digestivas o la concentración de las mismas y en consecuencia el aprovechamiento de los nutrientes, de manera que la habilidad de los peces para utilizar los nutrientes ingeridos depende también de la actividad de las enzimas digestivas presentes a lo largo del tracto digestivo, así como de la calidad y tipo de ingrediente con el que se fabrica el alimento (Ali, Haque, Chowdhury & Shariful 2009). En el presente estudio en ambos experimentos se observó que la tripsina y quimotripsina fueron disminuyendo conforme se aumentaba la proteína derivada de la soya, posiblemente los inhibidores presentes en estos ingredientes impiden la síntesis y secreciones de gránulos de zimógenos en el intestino para que puedan ser activada mediante la estimulación química del alimento. Tramati C, Savona B & Mazzola (2005), argumentan que es fundamental relacionar los procesos digestivos de la especie con la composición del alimento que se le proporciona al organismo, ya que sin duda responderán las enzimas digestivas conforme a su capacidad de hidrolizar el alimento que se le proporcione. Por lo que conocer la respuesta de la actividad enzimática de totoaba hacia las fuentes vegetales es

primordial y sobre todo de aquellas enzimas digestivas que pueden dar respuesta a un posible efecto por la incorporación de proteínas vegetal.

## Conclusiones

Con base en los resultados generados a partir de la presente investigación de ambos experimentos, se concluye que la proteína derivada de soya es un ingrediente que puede sustituir de manera parcial a la harina de pescado en un porcentaje cercano al 30% sin afectar el crecimiento y desarrollo de juveniles de *Totoaba macdonaldi*. Los conocimientos obtenidos constituyen un avance importante para el desarrollo de la industria de alimentos destinados para la acuicultura en México, en especial para el cultivo de especies como totoaba. Así mismo, estos resultados son clave para apoyar de manera certera el cultivo de esta especie en Baja California, tal y como se realiza con otras especies de peces marinos en otros países, por lo que el éxito de dichos desarrollos tecnológicos se basa en un buen control y conocimiento exhaustivo del proceso de alimentación, digestión y nutrición durante el desarrollo fisiológico digestivo en peces.

## Agradecimientos:

La presente investigación fue apoyada por la Universidad Autónoma de Baja California (UABC), México, por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) de México, con el proyecto S0007-2011-08 y las becas número 206339 y 20929. Los autores agradecen a todo el personal de la Unidad de Biotecnología en Piscicultura de la Facultad de Ciencias Marinas UABC por todo el apoyo brindado en la realización de los estudios experimentales, además agradecemos al personal del laboratorio de Biología Molecular del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo CIAD Unidad-Mazatlán, por el soporte incondicional para la realización de análisis de expresión de genes.

## Referencias

- Alarcón-López, F.J. (1997) Procesos digestivos en peces marinos: Caracterización y aplicaciones prácticas. Tesis de doctorado. Universidad de Almería. Departamento de Biología Aplicada. Almería. España. Pp. 292
- Ali H., Haque M. M., Chowdhury M. M. R. & Shariful M. I. (2009) *In vitro* protein digestibility of different feed ingredients in Thai koi (*Anabas testudineus*). *Journal of the Bangladesh Agricultural University* 7, 205–210.
- Álvarez-González, C. A., Moyano-López, F.J., Civera-Cerecedo, R., Carrasco- Chávez, V., Ortiz-Galindo, J.L., Dumas, S., (2008) Development of digestive enzyme activity in larvae of spotted sand bass *Paralabrax maculatofasciatus*. I: Biochemical analysis. *Fish Physiology and Biochemistry* 34, 373-384.
- Aragão C., Conceição L.E.C., Dias J., Marquez A.C., Gomez E., Dinis M.T. (2003) Soy protein concentrate as a protein source for Senegalese sole (*Solea senegalensis*. Kaup 1858) diets: effects on growth and amino acid metabolism of postlarvae. *Aquaculture Research* 34, 1443-1452.
- Bañuelos-Vargas, I., López, L.M., Pérez-Jimenez, A., Peres, H. (2014) Effect of fishmeal replacement by soy protein concentrate with taurine supplementation on hepatic intermediary metabolism and antioxidant status of totoaba juveniles (*Totoaba macdonaldi*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 170, 18-25.
- Berg-Lea T., Brattås L. y Krogdahl A. (1989) Soybean proteinase inhibitors affect nutrient digestion in rainbow trout. En: *Recent Advances of Research in Antinutritional Factors in Legume Seeds* (ed. by J. Huisman, T.F.B. van der Pool y I. Liener), pp.99-102. Pudoc, Wageningen
- Berdegú, A.J., (1955) La pesquería de la totoaba (*Cynoscion macdonaldi*), en San Felipe, Baja California. *Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural* 16(1-4), 45-78. Cannon R. 1966. *The Sea of Cortés*. Lane Magazine and Book Co., Menlo Park, Calif.
- Chou R.L., Hera B.Y., Sua M.S., Hwang G., Wu Y.H. & Chen H.Y. (2004) Substituting fish meal with soybean meal in diets of juvenile cobia *Rachycentron canadum*. *Aquaculture* 229, 325-333.
- Cisneros-Mata, M., Botsford, L.W., Quinn, J.F., (1997) Projecting of *Totoaba macdonaldi*, a population with unknown age-dependent variability. *Ecol. Appl* 7, 968–980.
- CITES. (2005) Appendices I, II and III (12/01/2005). *Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora*, Geneva, Switzerland, 49 pp.
- Conceição L., Aragão C., Rønnestad I. (2011) Proteins. In *Larval Fish Nutrition*, First Ed. Edyted by G. Joan Holt. John Wiley y Sons, Inc.
- Díaz-López, M., Moyano-López, F.J., García-Carreño, L.F., Alarcon, F.J., Sarasquete, M.C. (1997) Substrate-SDS-PAGE determination of protease activity through larval development in sea bream. *Aquaculture International* 5, 461-471.

- Douglas S.E., Gallarnt J.W. & Bullerwell, C.E. (1999) Molecular investigation of aminopeptidase N expression in the winter flounder, *Pleuronectes americanus*. *Journal of Applied Ichthyology* 15, 80-86.
- Douglas, S.E., Gawlicka, A., Mandlam, S., Gallant, J.W., (1999) Ontogeny of the stomach in winter flounder: characterization and expression of the pepsinogen and proton pump genes and determination of pepsin activity. *Journal of Fish Biology*. 55, 897-915.
- FAO. (2012) El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2012. Roma. 231 pp.
- Flanagan, C. A., Hendrickson, J.R., (1976) Observations on the comercial fishery and reproductive biology of the Totoaba (*Totoaba macdonaldi*) Gilbert 1890 in the northern Gulf of California. *Fishery Bulletin* 74(3), 531-544.
- Francis G, Makkar H.P.S., Becker K. (2001a) Antinutritional factors present in Plant-derived alternate fish feed Ingredients and their effects in fish. *Aquaculture* 3-4:197-227.
- Francis G, Makkar H.P.S., Becker K. (2001b) Effects of cyclic and regular feeding of a *Quillaja* saponin supplemented diet on growth and metabolism of common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Fish Physiology and Biochemistry* 24, 343-350.
- Ganga R., Montero D., Bell J.G., Atalah E., Ganuza E., Vega-Orellana O., Tort L., Acerete L., Afonso J.M. Benitez-Sanatana T., Fernández V.A. Izquierdo M. (2011) Stress response in sea bream (*Sparus aurata*) held under crowded conditions and fed diets containing linseed and/or soybean oil. *Aquaculture* 311, 215–223
- Galaviz M, Garcia-Ortega A, Gisbert E, Lo´pez LM, Garcı´aGasca A (2012) Expression and activity of trypsin and pepsin during larval development of the spotted rose snapper (*Lutjanus guttatus*). *Comparative Biochemistry and Physiology B* 161, 9–16
- Galaviz M.A, L´opez L.M., Garcı´a-Gasca A, ´Alvarez Gonz´alez C.A, True C, Gisbert E (2015) Digestive system development and study of acid and alkaline protease digestive capacities using biochemical and molecular approaches in totoaba (*Totoaba macdonaldi*) larvae. *Fish Physiology and Biochemistry*. 41:1117–1130.
- Garcı´a, A. *et al.* (2010) Uso de ingredientes de origen vegetal como fuentes de proteı´na y lı´pidos en alimentos balanceados para peces marinos carnı´voros. En: Cruz-Suarez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-L´opez, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J. (Eds), *Avances en Nutrici´on Acuı´cola X - Memorias del D´ecimo Simposio Internacional de Nutrici´on Acuı´cola*, 8-10 de Noviembre, San Nicol´as de los Garza, N. L., M´exico. ISBN 978-607-433-546-0. Universidad Aut´onoma de Nuevo Le´on, Monterrey, M´exico, pp. 321-340.
- Garcı´a-Gasca A, Galaviz M, Gutie´rrez JN, Garcı´a-Ortega A (2006) Development of the digestive tract, trypsin activity and gene expression in eggs and larvae of the bullseye puffer fish (*Sphoeroides annulatus*). *Aquaculture* 256, 366–376
- Hardy R.W. (2010) Utilization of plant proteins in fish diets: effects of global demand and supplies of fishmeal. *Aquaculture Research* 41(5), 770-776

- Krogdahl A., Bakke-McKellep A.M., Baeverfjord G. (2003) Effects of graded levels of standard soybean meal on intestinal structure, mucosal enzyme activities, and pancreatic response in Atlantic salmon (*Salmo salar L.*). *Aquaculture Nutrition* 9, 361, 371.
- Lhoste, E.F., Rszlewicz, M., Gueugneau, A.M., Coning, T., (1994) Adaptation of exocrine pancreas to dietary proteins: effect of the nature of protein and rat strain on enzyme induction and messenger mRNA levels. *J. Nutr. Biochem.* 5, 84–94.
- López, L.M., Durazo, E., Rodríguez, M.A., True, C., Viana, M.T., (2006) Proximate composition and fatty acids profile of wild and cultured juveniles *Totoaba macdonaldi*. *Ciencias Marinas.* 32(2), 303-309.
- Lundstedt L.M., Bibiano Melo J. F. & Moraes G. (2004) Digestive enzymes and metabolic profile of *Pseudoplattystoma corruscans* (Teleostei: Siluriformes) in response to diet composition. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 137, 331-339.
- Merrifield D.L., Dimitoglou A., Foey A., Davies S.J., Baker R.T.M., Bøggwald J., Castex M., Ringø E. (2010) The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids. *Aquaculture*, 302, 1-18.
- Merrifield D.L., Olsen R.E., Myklebust R., Ringø E. (2011) Dietary Effect of Soybean (*Glycine max*) Products on Gut Histology and Microbiota of Fish, Soybean and Nutrition, Prof. Hany El-Shemy (Ed.), ISBN: 978-953-307-536-5.
- Moal, J., Daniel, J.Y., Sellos, D., Van Wormhoudt, A., Samain, J.F., (2000) Amylase mRNA expression in *Crassostrea gigas* during feeding cycles. *J. Comp. Physiol.* 170B, 21–26.
- Morales-Ortíz C. (1999) Descripción del desarrollo embrionario de totoaba (*Totoaba macdonaldi*) bajo condiciones de laboratorio. Tesis de licenciatura, Universidad Autónoma de Baja California, Ensenada, B.C., México, 56 pp.
- Murray H.M., Lall S.P., Rajaselvam R., Boutilier L.A., Blanchard B., Flight R.M., Colombo S., Mohindra V., Douglas S.E. (2010) A nutrigenomic analysis of intestinal response to partial soybean meal replacement in diets for juvenile Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus*, L. *Aquaculture* 298, 282–293.
- Ngandzali B. O., Zhou F., Xiong W., Shao Q.J. & Xu J.Z. (2011) Effect of dietary replacement of fish meal by soybean protein concentrate on growth performance and phosphorus discharging of juvenile black sea bream, *Acanthopagrus schlegelii*. *Aquaculture Nutrition* 17, 526:535.
- Norton G. (1991) Proteinase inhibitors. En: D'Mello F.J.P., Duffus J.H. Eds., *Toxic Substances in Crops Plants*. The Royal Society of Chemistry, Thomas Graham House, Science Park, Cambridge CB4 4WF, Cambridge: 68-106.
- Péres, A., Zambonino Infante, J.L., Cahu, C., (1998) Dietary regulation of activities and mRNA levels of trypsin and amylase in sea bass *Dicentrarchus labrax* larvae. *Fish Physiology and Biochemistry* 19, 145–152.
- Rust M. (2002) Nutritional Physiology. In *Fish Nutrition*. Third edition. Edited by John E. Halver and Ronald W. Hardy.

- Sandoval-Garibaldi G. (2001) Desarrollo morfológico de la totoaba (*Totoaba macdonaldi*) (Gilbert, 1890) durante su estadio larval en condiciones de laboratorio. Tesis de licenciatura, Universidad Autónoma de Baja California, Ensenada, B.C., México. 75 p.
- Silva M.R. y Silva M.A.A.P. (2000) Revisão fatores antinutricionais: inibidores de proteases e lectinas. Revista de Nutricion Campinas 13(1), 3-9
- Solórzano Y. (2006) Efecto de niveles de alimentación sobre el crecimiento y composición química de juveniles de *Totoaba macdonaldi*. Tesis de Maestría Universidad Autónoma de Baja California. Facultad de ciencias marinas.
- Tacon A.G.J. y Metian M. (2008) Global overview on the use of fish meal and fish oil in industrially compounded aquafeeds: Trends and future prospects. Aquaculture 285, 146-158
- Tacon A.G.J., Hasan M.R., Metian M. (2011) Demand and supply of feed ingredients for farmed fish and crustaceans: trends and prospects. FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper No. 564. 87 pp.
- Tramati C., Savona B. & Mazzola A. (2005) A study of the pattern of digestive enzymes in *Diplodus puntazzo* (Cetti, 1777) (Osteichthyes, Sparidae): evidence for the definition of nutritional protocols. *Aquaculture International* 13, 89-95.
- True C.D., N. Castro-Castro, G. Sandoval-Garibaldi y C. Morales-Ortiz. (2001) Reproducción Controlada de *Totoaba macdonaldi* (Gilbert). Resumen de ponencia oral del VII Congreso de la Asociación de Investigadores del Mar de Cortés. Pag. 82.
- True C.D., A. Silva Loera y N. Castro Castro. (1997) Acquisition of *Totoaba macdonaldi* (*Sciaenidae*) broodstock: field handling, decompression and prophylaxis of an endangered species. *Progressive Fish-Culturist*. 59(3).
- Vizcaíno E. (2008) Efecto en el crecimiento, consumo, sobrevivencia y composición proximal de juveniles de *Totoaba macdonaldi*, alimentados con dietas isoprotéicas formuladas con distintos niveles de energía. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Baja California. Facultad de ciencias marinas.
- Werner M. 2008. Bioquímica. Fundamentos para Medicina y Ciencias de la Vida. Editorial Reverté, S. A. Pag. 651.
- Wing-Keong N., Cheong-Yew C., Wang Y., Romano N. (2013) Effects of dietary fish and vegetable oils on the growth, tissue fatty acid composition, oxidative stability and vitamin E content of red hybrid tilapia and efficacy of using fish oil finishing diets. *Aquaculture* 372–375, 97–110
- Wang C, Xie S, Zhu, X, Lei W, Yang Y, Liu J (2006) Effects of age and dietary protein level on digestive enzyme activity and gene expression of *Pelteobagrus fulvidraco* larvae. *Aquaculture* 254, 554–562.
- Watanabe T. (2002) Strategies for further development of aquatic feeds. *Fisheries Science* 68, 242-252.
- Ueberschär, B., (1993) Measurement of proteolytic enzyme activity: Significance and application in larval fish research. Part III 233-239 *In: Physiological and Biochemical Aspects of Fish Development*. Edited by B.T. Walther and H.J. Fhyn. University of Bergen, Norway.

- Vucelić-Radović V., Barić M., Stanojević S., Pešić M., Hristić M., Miladinović J., Prijić Lj., Srebrić M. (2005) Biološki vredni proteini domaćih sorti soje u proizvodnji riblje hrane. II Međunarodna konferencija, “Ribarstvo“, Zbornik predavanja. Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet, pp. 272-278.
- Zambonino-Infante, J.L., Cahu, C.L., (2001) Ontogeny of the gastrointestinal tract of marine fish larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology C* 130, 477- 487.
- Zambonino-Infante, J.L., Cahu, C.L., (2007) Dietary modulation of some digestive enzymes and metabolic processes in developing marine fish: Applications to diet formulation. *Aquaculture* 268, 98-105.