



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA

**EFFECTO DE LOS CARBOHIDRATOS DIETÉTICOS SOBRE EL
METABOLISMO INTERMEDIARIO DEL MERO ROJO
EPINEPHELUS MORIO.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

ANA MARIA CASTILLO LOPEZ

TUTORA PRINCIPAL:

DRA. MARTHA GABRIELA GAXIOLA CORTES

(UNIDAD ACADEMICA YUCATAN UNAM)

COMITÉ TUTOR:

**DR. CARLOS ALFONSO ÁLVAREZ GONZÁLEZ (UNIVERSIDAD JUAREZ AUTONOMA DE
TABASCO)**

DRA. RUTH PEDROZA ISLAS (UNIVERSIDAD IBEROAMERICANA).

**DRA. CRISANTEMA HERNÁNDEZ GONZÁLEZ (CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN
ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO, A.C., UNIDAD MAZATLAN)**

**DR. ROBERTO CIVERA CERECEDO (CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS DEL
NOROESTE CIBNOR)**

SISAL, YUCATÁN, FEBRERO 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



**EFFECTO DE LOS CARBOHIDRATOS DIETÉTICOS SOBRE EL
METABOLISMO INTERMEDIARIO DEL MERO ROJO
EPINEPHELUS MORIO.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

ANA MARIA CASTILLO LOPEZ

TUTORA PRINCIPAL:

DRA. MARTHA GABRIELA GAXIOLA CORTES

(UNIDAD ACADEMICA YUCATAN UNAM)

COMITÉ TUTOR:

DR. CARLOS ALFONSO ÁLVAREZ GONZÁLEZ (UNIVERSIDAD JUAREZ AUTONOMA DE TABASCO)

DRA. RUTH PEDROZA ISLAS (UNIVERSIDAD IBEROAMERICANA).

DRA. CRISANTEMA HERNÁNDEZ GONZÁLEZ (CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO, A.C., UNIDAD MAZATLAN)

DR. ROBERTO CIVERA CERECEDO (CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS DEL NOROESTE CIBNOR)

SISAL, YUCATAN, FEBRERO 2018

Dedicatoria

A VERA Y BRAULIO

Esta tesis de doctorado fue financiada por el proyecto 219713-3 PAPIIT de la UNAM, la beca de doctorado otorgada por CONACYT, y gracias al apoyo técnico de M. en C. Jaime Suárez Bautista, Ing. Adriana Paredes Medina, M. en C. Karla Susana Escalante Herrera, M. en C. Ariadna Berenice Sánchez Arteaga, M. en C. Carmen Galindo de Santiago, Ing. Rafael Eduardo Pacheco Góngora.

Resumen

El nivel de inclusión más adecuado de proteína para el género *Epinephelus morio* es de alrededor de 50%, sin embargo, en el género se ha logrado modificar la energía en los alimentos al incluir carbohidratos como almidones, logrando disminuir el nivel de inclusión de las proteínas hasta 44%. Los carbohidratos representan una fuente de energía que puede sustituir la proteína como sustrato energético y pueden ser utilizados por los peces *E. morio* ya que estos cuentan con actividad de α -amilasa y α -glucosidasa en los ciegos pilóricos e intestino (Castillo, 2011).

El presente estudio tuvo como objetivo determinar el efecto de diferentes fuentes de carbohidratos en el metabolismo intermediario del mero *E. morio*. Para ello, el estudio fue dividido en 5 partes. En el Capítulo I se evaluaron los metabolitos glucosa y glucógeno así como las enzimas digestivas (α -amilasa y α -glucosidasa) y 4 enzimas del metabolismo intermediario (PK, GK, FBPasa, ALAT), en juveniles silvestres del medio natural en diferentes épocas el año, encontrando que no hay diferencias en la actividad enzimática de las enzimas digestivas. Sin embargo la PK tuvo mayor actividad en época de lluvias ($6.0 \pm 0.5 \text{ U mg}^{-1}$ de proteína; $p > 0.05$), época donde es posible encontrar las presas preferenciales de este pez, y es en nortes donde las reservas se acumularon, por lo que se encuentra el valor del glucógeno más alto ($69.4 \pm 6.7 \text{ mg g}^{-1}$ hígado); esta condición permitió a estos peces migrar para la época de secas, ya que en secas se encontraron los peces de menor talla; estos peces llegaron después reclutarse a las costas de Sisal para alimentarse y buscar refugio. En el capítulo II se muestran los resultados de un ensayo preliminar para evaluar la utilización de dos fuentes de almidón (trigo y maíz) con diferentes características a un nivel de inclusión de 15%. El alimento que contenía almidón de maíz crudo (AMC) permitió obtener la mayor ganancia en peso (865.63 g en 61 días), coeficiente térmico de crecimiento (CTC) y el coeficiente de crecimiento (CDC). El tratamiento AMC fue mejor utilizado quizás por tener en promedio el gránulo de almidón más pequeño y por tener una distribución de gránulo unimodal. La actividad de las enzimas digestivas (α -amilasa y α -glucosidasa) no fue diferente entre los peces de ambos tratamientos. Sin embargo, al evaluar la enzimas reguladoras del metabolismo intermediario en AMC y REF, se observó una tendencia a ser mayor la actividad de la PK ($104.8 \pm 8.1 \text{ U mg}^{-1}$ proteína) en AMC, mientras que la FBPasa y la ALAT tuvieron mayor actividad en los peces alimentados con el alimento que no contenía almidón (REF).

En el capítulo III para determinar la curva de tolerancia a la glucosa en *E. morio*, fueron alimentados por 61 días peces con una tratamiento con AMC (15% de carbohidrato) y un tratamiento sin almidón REF, se utilizaron dos métodos para suministrar la glucosa: oral e intraperitoneal. El método que mostró más eficiencia en esta prueba fue cuando se suministró la glucosa vía intraperitoneal. Los peces alimentados con AMC presentaron una mejor regulación de la glucosa, ya que la recuperación de los niveles fue a las 24 hrs., a diferencia de los peces que fueron alimentados con el alimento REF. *E. morio* fue capaz de regular la glucosa postprandial en 24 hrs., a diferencia de otras especies carnívoras como *S. aurata* y *D. labrax* que lo hacen a las 72 hrs.

En el Capítulo IV se evaluaron almidones con diferentes tamaños de gránulo, porcentaje de amilopectina: amilosa, y con diferente tratamiento: crudo y gelatinizado. Los almidones

utilizados fueron almidón de maíz crudo (AMC): almidón de papa crudo (APC), almidón de papa gelatinizado (APG) y almidón de maíz waxy (AMW) utilizando en este experimento, con un nivel de inclusión de 20 % de carbohidratos. No se detectaron diferencias significativas en la actividad de las enzimas digestivas (α -amilasa y α -glucosidasa), mientras que se logró activar a las enzimas reguladoras del metabolismo intermediario (GK, PK, FBPasa; G6P-DH, 6PG-DH y ALAT). Los AMC y AMW mostraron los valores más altos en el CDC y CTC ($p < 0.05$). La actividad enzimática de la GK mostró el valor significativamente más alto ($p < 0.05$) con el alimento AMC (5.2 ± 0.9 U/mg de proteína), así como la mayor actividad de la HK-I se presentó en los juveniles alimentados con AMC (23.4 ± 2.7 U/ mg^{-1} de proteína). La 6PG-DH fue mayor con el alimento AMC (71.1 ± 7.6 U/ mg^{-1} de proteína). La PK presentó el valor más alto con el alimento AMC (56.9 ± 7.4 U/m g^{-1} de proteína). El almidón de papa no fue el mejor utilizado por los peces, quizás el tamaño de gránulo de la papa que es muy grande (~ 100), disminuyó la velocidad de hidrólisis de las enzimas digestivas. Los valores de la glucosa se mantuvieron constantes, lo que puede indicar que *E. morio* puede tolerar 20% de inclusión de carbohidratos sin presentar hiperglucemia. En el capítulo IV se llevó a cabo el último ensayo: el experimento de ayuno, alimentación y realimentación utilizando un tratamiento con AMC. Los resultados mostraron que los peces mantuvieron estable la glucosa durante el periodo de ayuno, lo que sugiere que *E. morio* tiene la capacidad de mantener su metabolismo en homeostasis, activando las rutas metabólicas que logren regular la glucosa durante la restricción alimenticia. Sin embargo, el valor del glucógeno en el hígado de los peces disminuyó durante el ayuno (73.6 ± 8 mg g^{-1} , $p < 0.05$) lo que indica que *E. morio* utiliza al glucógeno como sustrato energético durante el ayuno. Para los días de realimentación, este pez presenta el valor de la FBPasa más alto en el día 1, sugiriendo que la primera ruta en activarse es la gluconeogénesis, para recuperar el glucógeno de reserva. Los peces presentaron la mayor actividad de GK en el día 12, y la mayor actividad de PK en el día 20, lo mismo que las enzimas 6PG-DH y la G6P-DH, encargadas de formar ribulosa 5- fosfato en la ruta de la vía de las pentosas fosfato. *E. morio*, al ser un pez carnívoro, logra mantener periodos de ayuno prolongado, además tener una eficiente recuperación de la regulación metabólica. Es posible aseverar que *E. morio* presenta un aumento en la actividad GK al ser alimentado con alimento que contiene almidón, y además es capaz de regular la homeostasis de la glucosa, después de recibir una carga de glucosa postprandial, en un tiempo de 24 horas. Se concluye que el AMC fue la fuente de almidón que permitió obtener los mejores resultados en los parámetros zootécnicos evaluados, y lograr activar las rutas glucolíticas a través de las enzimas GK disminuyendo las vías glucoeogénicas. *E. morio* es un pez omnívoro capaz de tolerar 20 % de inclusión en su alimento sin presentar hiperglucemia

Palabras clave. *E. morio*, metabolismo intermediario, glucosa y glucogeno

Summary

The most suitable level of inclusion of protein for *Epinephelus morio* is around 50%, however, in the genus it has been possible to modify the energy in feeds by including carbohydrates (cbh) such as starches, reducing the level of inclusion of protein down to 44%. cbh represent a source of energy that can replace protein as an energy substrate; and can be used by juveniles *E. morio* since they have activity of α -amylase and α -glucosidase in pyloric caeca and intestine (Castillo, 2011).

The objective of the present study was to determine the effect of different cbh sources on intermediary metabolism of *E. morio* and the present study was divided into 5 parts.

In Chapter I, glucose and glycogen metabolites were evaluated, as well as digestive enzymes (α -amylase and α -glucosidase) and four metabolic enzymes (PK, GK, FBPase, ALAT), in juveniles caught at different times of the year in their natural environment. There was no difference in activity of digestive enzymes. However, PK was more active ($6.0 \pm 0.5 \text{ Umg}^{-1}$ protein) during the rainy season ($p > 0.05$), a period where it is possible to find preferential preys of this fish. During Nortes period, the reserves were accumulated and so the highest glycogen value was found in liver ($69.4 \pm 6.7 \text{ mg g}^{-1}$). Such condition allowed these fish to migrate to the dry season where smaller fish were found. These fish arrived later to be recruited along the coasts of Sisal to feed and find refuge.

Chapter II showed results of a preliminary trial to evaluate the utilization of wheat and corn starches at 15% inclusion level. Diet containing raw corn starch (RCS) allowed the highest weight gain (866g in 61 days) through 2 coefficients (CDC and CTC). RCS treatment was best perhaps because it exhibited on average the smallest starch granule and a unimodal granules distribution. Digestive enzyme activities (α -amylase and α -glucosidase) were not different between fish of both treatments. However, when evaluating intermediary metabolic enzymes with RCS and REF diets, there was a tendency to get more active PK ($104.8 \pm 8.1 \text{ Umg}^{-1}$ protein) in RCS, while FBPase and ALAT had higher activity in fish fed REF (without starch).

In Chapter III, to determine the glucose tolerance curve in *E. morio*, fish were fed RCS treatment (15% cbh) and a non-starch REF diet for 61 days. Among two methods to supply glucose (oral or intraperitoneal) the most efficient was glucose administered intraperitoneally. Fish fed RCS presented a better glucose regulation, since the recovery of initial level was done in 24 h. unlike fish fed REF. *E. morio* was able to regulate postprandial glucose in 24 h contrasting with other carnivorous species (*S. aurata* and *D. labrax*) that did it after 72h.

In chapter IV, starches were evaluated for different granule sizes, amylopectin:amylose percentage and crude or gelatinized. Starches were crude corn starch (RCS), raw potato starch (RPS), gelatinized potato starch (GPA) and waxy corn starch (WCS) at 20% inclusion level. No significant differences were detected in α -amylase or α -glucosidase, activities whereas it was possible to activate intermediary metabolic enzymes (GK, PK, FBPase, G6P-DH, 6PG-

DH and ALAT). RCS and WCS diets showed the highest values in CDC and CTC ($p < 0.05$). GK activity showed the highest value ($p < 0.05$) with RCS (5.2 ± 0.9 U/mg protein), as well as the greatest activity in HK-I in juveniles (23.4 ± 2.7 U/mg⁻¹ protein). RCS diet produced highest activities on 6PG-DH and PK with 71.1 ± 7.6 U/mg⁻¹ protein and 56.9 ± 7.4 U/mg⁻¹ protein respectively. Potato starch was not the best utilized by fish, perhaps the size of potato granules was too large ($\sim 100\mu$), slowing down the hydrolysis by digestive enzymes. Glucose values remained constant, which may indicate that *E. morio* tolerate 20% cbh without presenting hyperglycemia.

In chapter IV, RCS diet with 20% maize was used during fasting and feeding experiment. Glycaemia remained stable during fasting period suggesting that *E. morio* had the ability to maintain its homeostasis. Active metabolic pathways regulate glucose during feed restriction. However, glycogen value (73.6 ± 8 mg g⁻¹) in the liver decreased during fasting ($p < 0.05$), which indicates that *E. morio* utilized this substrate during fasting. During refeeding, this fish presents the highest FBPase value on day 1. It is suggested that the first route to be activated is gluconeogenesis, to recover glycogen reserve. GK had its highest level on day 12, and PK on day 20, as well as 6PG-DH and G6P-DH, responsible for ribulose 5-phosphate in pentose phosphate pathway (PPP). *E. morio*, being a colossal carnivorous fish, managed to maintain a prolonged fasting period, in addition to having an efficient recovery of its metabolic regulation. Therefore, *E. morio* presented an increase in GK activity when fed a diet with starch. It can regulate its postprandial glucose homeostasis after receiving a glucose load, in a time shorter than a carnivorous fish such as trout.

RCS was the source of starch that allowed obtaining the best result with zootechnical parameters evaluated; glycolytic routes are active. *E. morio* is able to adapt to a diet with 20% cbh without showing signs of hyperglycemia.

Key words: Grouper, intermediary metabolism, glucose, glycogen, fish, carbohydrate

Agradecimientos

A la Dra. Gabriela Gaxiola Cortés por el acompañamiento académico y su amistad hasta el final de este trabajo. Al Dr. Alfonso Alvarez González por sus consejos y apoyo en todo momento. La Dra Ruth Pedroza Isla y a la Dra. Crisantema Hernández por su consejos. Al Dr. Roberdo Civera Cerecedo por sus observaciones y aportaciones para mejorar este trabajo, muchas gracias.

A mis compañeros y equipo de trabajo por su ayuda en todos los procesos técnicos y de análisis de datos M. en C. Jaime Suárez Bautista, Ing. Adriana Paredes Medina, M. en C. Karla Susana Escalante Herrera, M. en C. Ariadna Berenice Sánchez Arteaga, M. en C. Carmen Galindo de Santiago.

Un agradecimiento especial al Dr. Gerad Cuzón por todos los consejos y apoyo para realizar los artículos de este trabajo.

A los alumnos que apoyaron en algún momento esta investigación.

Vera y Braulio, lo mejor de esta vida, dedico este trabajo y el esfuerzo y mi profundo agradecimiento por su comprensión por todo el tiempo invertido en este proyecto y que ustedes compartieron paso a paso a mi lado.

Antonia al formarme en el camino de ser y Alberto por enseñarme tu apreciación a la vida, a los seres vivos y tu espíritu de gran naturalista.

A cada miembro de mi familia, a mis tías y maestras por que siempre están en tiempo y distancia: Guadalupe, Teresa, Alejandra, María, Yaqueline, Elda.

Para mi abuela Fidela Almazán.

A Tomas Boschi por tu compañía y consejos para sortear la vida, gracias.

A mi maestra Librada Novelo te admiro y respeto.

A mis amigos Rosa Artega Silva, Alejandro Valderrama, Oscar Juárez, Jose Carlos Pintado.

Mis maestros Alfredo Fernández Valdes, Luli Cuevas Góngora, Kelsang Chime.

A la comunidad de Sisal

A las niñas y a los niños de Centro Comunitario Chimay.

Indice

Resumen	5
Abstract	7
Agradecimientos	9
Indice	10
Lista de Figuras	17
Lista de Tablas	20
Abreviaturas	25
Introducción General	26
Justificación	33
Hipótesis General	35
Objetivo General	36
Objetivos Específicos	36
Capítulo I	39
Juveniles silvestres del mero rojo <i>Epinephelus morio</i>	
Introducción	
I.1.1. Descripción de la especie	39
I.1.2. Distribución de <i>E. morio</i> en México y el Mundo.	40
I.1.3. Hábitos alimenticios de <i>E. morio</i>	40
I.1.4. Hábitat y nicho ecológico de <i>E. morio</i> .	41
I.2. Hipótesis	42
I.3. Objetivos específicos	42
I.4. Metodología	43
I.4.1. Área de Estudio	43
I.4.2. Obtención de los organismos	44
I.4.3. Datos merísticos	45
I.4.4. Disección de los organismos.	46

I.4.5.Método actividad enzimática de α -amilasa	48
I.4.6. Método actividad de α -glucosidasa	48
I.4.7. Determinación de la actividad de enzimas del metabolismo intermediario	49
I.4.8.Estadística	54
I.5.-Resultados	55
I.5.1. Variación de las tallas y metabolitos en las diferentes épocas del año	55
I.5.3.Enzimas digestivas de juveniles silvestres de <i>E. morio</i> del medio natural en en diferentes épocas del año.	57
I.5.4. Enzimas del metabolismo intermediario de los juveniles silvestres de <i>E. morio</i> del medio natural en nortes, lluvias y secas.	58
I.6.Discusión	59
I.6.1.Peso y talla de juveniles silvestres de <i>E. morio</i> en diferentes épocas del año.	
I.6.2. Actividad de α -amilasa y α -glucosidasa de juveniles silvestres de <i>E. morio</i> en tres épocas del año.	60
I.6.3.Actividad de las enzimas reguladoras del metabolismo intermediario en función a la disponibilidad del alimento en el medio natural de juveniles silvestres de <i>E. morio</i> en diferentes épocas del año.	61
I.7.Conclusiones	62
Capítulo II	63
Ensayo preliminar para determinar el efecto de las fuentes de carbohidratos en alimentos para juveniles de <i>E. morio</i>.	
II.1.Introducción	
II.1.1.Estructura y composición de los almidones.	

II.1.2.Utilización de almidones en las dietas para peces.	67
II.1.3.Mecanismo de las carbohidrasas	68
II.2.Hipótesis	70
II.3.-Objetivos específicos.	70
II.4.Metodología	71
II.4.1.Obtención de los organismos.	
II.4.2.Estanques y sistema de circulación	71
II.4.2.Alimento de mantenimiento:	73
II.4.3.Alimento experimental	74
II.4.4.Parámetros físico-químicos	77
II.4.5.Parámetros zootécnicos	77
II.4.6.Diseño experimental	77
II.4.7.Estadística	78
II.5.Resultados	79
II.5.1.Selección de almidones: maíz y trigo	
II.5.2.-Coeficiente Diario de Crecimiento	80
II.5.3.Coeficiente Térmico de Crecimiento	80
II.5.4.Glucosa, Glucógeno y Hematocrito	81
II.5.5.-Enzimas Digestivas	82
II.5.6.Enzimas reguladoras del metabolismo intermediario	83
II.5.7.Parámetros físico-químicos	84
II.6.Discusión	85
II.6.1.Factores que influyen en la utilización de los carbohidratos del alimento en <i>E. morio</i> . Relación amilosa:amilopectina	
Digestión	85
II.6.2. Digestión del almidón de acuerdo a su naturaleza: maíz y trigo.	
II.6.3.Efecto del tamaño y la forma de gránulos de maíz y trigo en la utilización de carbohidratos en <i>E. morio</i>	88

II.6.3. Efecto de la gelatinización de almidones en aprovechamiento de los carbohidratos en el <i>E. morio</i> .	89
II.6.4. Comparación de la actividad de enzimas reguladoras del metabolismo intermediario de peces alimentados con un tratamiento con AMC y un tratamiento sin almidón REF .	91
II.7.Conclusiones	92
Capítulo III	93
Tolerancia a la glucosa en <i>E. morio</i>.	
III.Introducción	
III.1.Glucosa, molécula energética	
III.1.2.Hiperglucemia en peces por glucosa postprandial.	
III.2.3.Mecanismo de acción y origen de las hexocinasas	94
III.2.4.La GK en su papel dentro de la homeostasis de la glucosa	94
III.3.Hipótesis	95
III.4.Objetivos	95
III.5.Metodología	96
III.3.1.Obtención de los organismos	96
III.3.2.Profilaxis	96
III.3.3.Sistema de Circulación.	97
III.3.4.Ensayo Grupal; determinación de la glucosa por grupo de peces.	97
III.3.5.Extracción de la glucosa	99
III.3.6.Diseño experimental: ensayo por individuo	99
III.3.7.Estadística	99
III.4.Resultados	102
III.4.1.Curva de tolerancia a la glucosa, ensayo grupal vía oral	

III.4.2. Curva de tolerancia a la glucosa, ensayo individual vía oral.	105
III.4.3. Curva de tolerancia a la glucosa, vía intraperitoneal	108
III.4.4. Metabolitos: glucosa y glucógeno	113
III.5. Discusión	115
III.5.1. Tolerancia de <i>E. morio</i> a la glucosa dietética	
III.5.2. Glucosa como indicador de estrés en peces	115
III.5.3. Adaptación a la dieta con carbohidratos	116
III.5.4. Comparación de la curva de tolerancia a la glucosa de <i>E. morio</i> con otras especies.	119
III.5.5. Enzimas que regulan el metabolismo intermediario.	120
III.6. Conclusiones	122
 Capítulo IV	
Utilización digestiva de almidones de acuerdo a su origen botánico (maíz, trigo o papa) y procesamiento (waxy o gelatinizado) en juveniles silvestres de <i>E. morio</i>.	124
 IV.1. Introducción	
IV.1.1. Procesamiento hidrotérmico en los almidones.	124
IV.1.2. Almidones modificados	125
IV.1.3. Metabolismo intermediario en peces	127
IV.1.4. Glucólisis	128
IV.1.5. Gluconeogénesis	131
IV.1.6. Vía pentosas fosfato:	131
IV.1.7. Catabolismo de proteínas	132
IV.2. Hipótesis	133
IV.3. Objetivos específicos	133

IV.4. Metodología	
IV.4.1. Obtención de los organismos.	134
IV.4.2. Alimento experimental	135
IV.4.3. Parámetros zootécnicos	136
IV.4.3. Disección de los organismos.	138
IV.4.4. Análisis bioquímicos	138
IV.4.5. Estadística	139
IV.5. Resultados	140
IV.5.1. Parámetros zootécnicos	
IV.5.2. Parámetros físicoquímicos	141
IV.5.3. Coeficiente diario de crecimiento y coeficiente término de crecimiento	142
IV.5.4. Glucosa, glucógeno y hematocrito	143
IV.5.5. Enzimas digestivas	144
IV.5.6. Enzimas reguladoras del metabolismo intermediario	145
IV.6. Discusión	147
IV.7. Conclusiones	154
Capítulo V	155
Efecto del ayuno y realimentación en el metabolismo intermediario en juveniles del mero rojo <i>E. morio</i>.	
V.1.1. Adaptaciones metabólicas de los peces al ayuno.	155
V.1.2. Cambios metabólicos de los peces durante la realimentación después de un periodo de ayuno.	157
V.2. Hipótesis	159
V.3. Objetivos específicos	159
V.4. Metodología	159
V.4.1. Obtención de los organismos.	

V.4.2.Diseño experimental.	160
V.4.3.- Composición de alimentos del tratamiento experimental.	162
V.4.4.Parámetros físico-químicos	164
V.4.5.Metabolitos: glucosa y glucógeno	164
V.4.6.Estadística	164
V.5.Resultados	165
	165
V.5.1.Glucosa y glucógeno en periodos de ayuno y realimentación en <i>E. morio</i> .	
V.5.2.Hematocrito e índice hepatosomático en periodos de ayuno y realimentación en <i>E. morio</i>	165
V.5.3.Enzimas reguladoras del metabolismo intermediario en periodos de ayuno y realimentación en <i>E. morio</i> .	167
V.6.Discusión	171
V.6.1.Efecto del ayuno en el metabolismo intermediario de los juveniles de <i>E. morio</i> .	
V.6.2. Metabolismo intermediario de juveniles de <i>E. morio</i> en realimentación.	173
V.7.Conclusiones	176
VI.-Conclusión general	177
V.I.I.. Referencias	179

Lista de Figuras

- Figura 1 Ilustración de *Epinephelus morio*.
- Figura 2 Mapa Satelital mostrando la ubicación de las costas de Sisal, sitio de captura de los juveniles silvestres de *E. morio*.
- Figura 3 Dispositivo para realizar la profilaxis después de la captura, de los juveniles silvestres de *E. morio*.
- Figura 4 Estructura química de la amilosa (Tester y Karkalas 2002)..
- Figura 5 Estructura química de la amilopectina. (Tester y Karkalas 2002).
- Figura 6 Empaquetamiento de las dobles hélices de la amilopectina, mostrando los 3 diferentes polimorfismos (Gallant *et al.*, 1997).
- Figura 7 Estructura del gránulo de almidón (Tester y Debon 2000; Bernal y Martínez, 2006).
- Figura 8 Forma y tamaño (promedio y desviación estándar) de gránulos de almidón
- Figura 9 Mecanismos de acción de la α -amilasa y la α -glucosidasa.
- Figura 10 Sistema experimental de recirculación utilizado en los bioensayos nutricionales. Dispositivo experimental del sistema de circulación.
- Figura 11 Dosis Suministro por vía oral de 170 mg de glucosa / 100 g de peso húmedo del pez. Organismos previamente. Peces anestesiados con aceite de clavo. Se utilizaron una sonda y una jeringa para introducir la solución, a través del esófago, hacia el estómago.
- Figura 12 Extracción de sangre sobre la línea lateral de los peces.
- Figura 13 Curva de tolerancia a la glucosa, en juveniles silvestres de *E. morio*, aclimatados por durante 5 semanas a una alimento de referencia, sin almidón (REF), conteniendo y

con 45 % de proteína y 6 % de lípidos. Tiempos de muestreo: 0, 1, 2, 4, 6, 12 y 24 horas.

- Figura 14 Curva de tolerancia a la glucosa en juveniles silvestres de *E. morio*, aclimatados durante por 5 semanas a una alimento conteniendo 15% de almidón de maíz crudo. Tiempos de muestreo: 0, 1, 2, 4, 6 12 y 24 horas. 15%.
- Figura 15 Curva de tolerancia a la glucosa en juveniles silvestres de *E. morio*, aclimatados durante por 5 semanas a una alimento con almidón de maíz crudo (AMC) al 15% y un alimento de referencia, sin almidón (REF). Tiempos de muestreo: 0, 1, 2, 4, 6 12 y 24 horas.
- Figura 16 Curva de tolerancia a la glucosa suministrada vía oral en juveniles silvestres de *E. morio*, aclimatados por durante 5 semanas a una alimento de referencia, sin almidón (REF) conteniendo y con 45 % de proteína, y 6 % de lípidos y 0% de carbohidratos. Tiempos de muestreo en intervalos de: 0 h , 1h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h y 24 horas.
- Figura 17 Curva de tolerancia a la glucosa suministrada vía oral en juveniles silvestres de *E. morio*, aclimatados por durante 5 semanas a un alimento con almidón de maíz crudo (AMC) 15%, y con 45 % de proteína y 6 % de lípidos. Tiempos de muestreo: 0h , 1h, 2h, 3h, 4h, 5h y 24 horas.
- Figura 18 Curva de tolerancia a la glucosa suministrada vía oral en juveniles silvestres de *E. morio*, aclimatados por 5 semanas a un tratamiento sin almidón (REF) comparado con un tratamiento con almidón AMC 15% y con 45 % de proteína y 6 % de lípidos, en intervalos de 0h , 1h, 2h, 3h, 4 h, 5h 12h y 24h. Se utilizaron 3 peces y un testigo.
- Figura 19 Curva de tolerancia a la glucosa suministrada vía intraperitoneal en juveniles silvestres de *E. morio*, aclimatados por 5 semanas a un tratamiento sin almidón (REF) conteniendo 45 % de proteína y 6 % de lípidos y 0% de carbohidratos. En intervalos de tiempo; 0h, 1h, 2h, 3h, 4h, 5h 12h y 24h. Se utilizaron 3 peces y un testigo.
- Figura 20 Curva de tolerancia a la glucosa suministrada vía intraperitoneal en juveniles silvestres de *E. morio*, aclimatados por 5 semanas a un tratamiento con almidón de maíz (AMC) conteniendo 45 % de proteína y 6 % de lípidos y 20% de carbohidratos. En intervalos de tiempo; 0h, 1h, 2h, 3h, 4h, 5h 12h y 24h. Se utilizaron 3 peces y un testigo.

- Figura 21 Curva de tolerancia a la glucosa suministrada vía intraperitoneal en juveniles silvestres de *E. morio*, aclimatados por 5 semanas un tratamiento con almidón de maíz crudo (AMC) y un tratamiento sin almidón (REF). En intervalos de tiempo; 0h, 1h, 2h, 3h, 4h, 5h 12h y 24h. Se utilizaron 3 peces y un testigo.
- Figura 22 Curva de tolerancia a la glucosa suministrada vía oral y vía intraperitoneal en juveniles silvestres de *E. morio*, aclimatados por 5 semana de un tratamiento sin almidón (REF) En intervalos de tiempo; 0h, 1h, 2h, 3h, 4h, 5h 12h y 24h. Se utilizaron 3 peces y un testigo.
- Figura 23 Curva de tolerancia a la glucosa suministrada vía oral y vía intraperitoneal en juveniles silvestres de *E. morio*, aclimatados por 5 semanas con un tratamiento de almidón de maíz (AMC). En intervalos de tiempo; 0h, 1h, 2h, 3h, 4h, 5h 12h y 24h. Se utilizaron 3 peces y un testigo.
- Figura 24 Esquema de los tejidos que presentan sensores de GK y mantienen la homeostasis de la glucosa. Fuente: extraído de Gomis *R., et al.*, (2000).
- Figura 25 Tejidos que presentan sensores de GK y mantienen a homeostasis de la glucosa. Tomado de (Gomis *R., et al.*, 2000)
- Figura 26 Transporte facilitado de la glucosa al interior de la célula por (GLUT-2), y fosforilación de la glucosa por la GK, para incorporar a la vía de la glucólisis. Mecanismo regulador de la insulina (Cuesta A., 2004).
- Figura 27 Tracto digestivo de *E. morio*: A) peces con 20 días de ayuno, B) peces con 12 días de alimentación, C) peces con 20 días de realimentación.

Lista de Tablas

- Tabla 1 Protocolos para determinar la actividad enzimática específica y autores.
- Tabla 2 Peso (g) y longitud total (cm) de juveniles silvestres de *E. morio*, capturados en tres épocas de año (Lluvias, Nortes, Secas).
- Tabla 3 Glucosa en plasma (mg dl^{-1}) y glucógeno en hígado (mg g^{-1} hígado), en juveniles silvestres de *E. morio* en época de nortes, secas y lluvias.
- Tabla 4 Actividad enzimática específica (U mg^{-1} proteína) de α -amilasa y α -glucosidasa (mU mg^{-1} proteína) en los juveniles silvestres del medio natural de *E. morio*.
- Tabla 5 Actividad enzimática específica (U mg^{-1} proteína) de FBPasa, G6P-DH y 6PG-DH, en los juveniles silvestres del medio natural de *E. morio*. Kruskal Wallis ($p < 0.05$; promedio \pm ES).
- Tabla 6 Características morfológicas de los gránulos de almidón de maíz, trigo y papa. (Bello — Pérez y Paredes-López, 1999).
- Tabla 7 Composición química proximal ($\text{g}/100$ g de materia seca, excepto humedad) de algunos gránulos de almidón (Paredes *et al.*, 1990; Tomas y Atwell, 1999).
- Tabla 8 Cantidades y composición en ingredientes establecidos para el alimento de mantenimiento de los juveniles *E. morio*, utilizado durante su el periodo de aclimatación.
- Tabla 9 Composición en ingredientes de alimentos que contienen diferentes fuentes de almidón maíz crudo (AMC), almidón de maíz waxy (AMW), papa crudo (APC), y papa gelatinizado (APG)], y un alimento de referencia, sin almidón (REF). Tratamiento experimental con 45% proteínas, 6% lípidos y 15% de carbohidratos. Fuentes de carbohidratos Almidón de Maíz Crudo (AMC), Almidón de maíz gelatinizado (AMG). Almidón de trigo crudo (AMT) y tratamiento de referencia sin almidón (REF).

- Tabla 10 Diseño Experimental del ensayo preliminar para determinar el efecto del nivel de inclusión y la fuente de carbohidratos en alimentos para juveniles de *E. morio*.
- Tabla 11 Parámetros Globales; Crecimiento, Supervivencia, alimento suministrado de los grupos con las 4 tratamientos experimentales y el grupo control. Almidón Trigo Crudo (ATC), Almidón de trigo gelatinizado (ATG), Almidón de Maíz Crudo (AMC), Almidón Maíz gelatinizado (AMG), alimento sin almidón (REF).
- Tabla 12 Coeficiente Diario de Crecimiento (CDC) y Coeficiente Térmico de Crecimiento (CTC) de los juveniles silvestres aclimatados a los tratamientos de almidón; Almidón de Trigo Crudo (ATC), Almidón de Trigo Gelatinizado (ATG), Almidón de Maíz Crudo (AMC), almidón de maíz gelatinizado (AMG) y tratamiento de Referencia sin almidón (REF).
- Tabla 13 Glucógeno en hígado ($\text{mg g}^{-1}\text{hígado}$), glucosa en plasma (dl ml^{-1}) y hematocrito en de juveniles silvestres alimentados con alimentos que contienen diferentes fuentes de almidón [maíz crudo (AMC), maíz waxy (AMW), papa crudo (APC), y papa gelatinizado (APG)], y un alimento de referencia, sin almidón (REF).
- Tabla 14 Actividad de la α -glucosidasa (mU.mg^{-1} de proteína) y α -amilasa (U.mg^{-1} de proteína) en ciegos pilóricos e intestinos de organismos los juveniles alimentados con alimentos que contienen diferentes fuentes de almidón [maíz crudo (AMC), maíz waxy (AMW), papa crudo (APC), y papa gelatinizado (APG), y un alimento de referencia, sin almidón (REF). experimentales en los 5 tratamientos; almidón de trigo crudo (ATC), almidón de trigo gelatinizado (ATG), almidón de maíz crudo (AMC), almidón de maíz gelatinizado (AMG) y tratamiento de referencia (REF).
- Tabla 15 Actividad (U mg^{-1} proteína) de las enzimas reguladoras del metabolismo intermediario (U mg^{-1} proteína) en hígado de los juveniles experimentales en las 5 tratamientos con alimentos que contienen diferentes fuentes de almidón [maíz crudo (AMC), maíz waxy (AMW), papa crudo (APC), y papa gelatinizado (APG), y un alimento de referencia, sin almidón (REF).
- Tabla 16 Promedio de los parámetros físicos- químicos del agua de cultivo registrados, en la mañana y en la tarde, durante el

período de aclimatación bioensayo de crecimiento, durante la mañana y la tarde. Temperatura (°C), pH, Oxígeno Disuelto (mg/L) y salinidad (ppt).

- Tabla 17 Diseño experimental del Ensayo Grupal: Tratamientos AMC y REF; Factor a evaluar glucosa en plasma 0, 1, 2, 3, 6, 12, 24 horas después del suministro oral.
- Tabla 18 Resumen de las curvas de tolerancia a la glucosa de *E. morio* en los ensayos Grupal e Individual, en juveniles aclimatados a alimento REF (sin almidón) y al alimento AMC (con almidón), con la glucosa administrada vía oral (O) y vía intraperitoneal (IP).
- Tabla 19 Glucógeno (mg.g⁻¹) y gGlucosa (mg.dl⁻¹) en juveniles de *E. morio* aclimatados por 6 semanas a un tratamiento con alimento sin almidón (REF) y a un alimento con almidón (AMC).
- Tabla 20 Enzimas que regulan el metabolismo intermediario, evaluadas en juveniles silvestres aclimatados a un tratamiento con Almidón de Maíz Crudo (AMC) y un tratamiento sin almidón (REF).
- Tabla 21 Tratamiento experimental 45% proteínas, 6% lípidos y 20% carbohidratos: Almidón de Papa Crudo (APC) y Almidón de Papa Gelatinizado (APG) con gránulos grandes (15 – 100 μ m y 78% amilopectina), y Almidón de Maíz Crudo (AMC), con gránulos más pequeños (5-25 μ m y 73 % de amilopectina).
- Tabla 22 Diseño experimental para determinar la utilización digestiva de almidones de acuerdo a su origen botánico (maíz, trigo o papa) y procesamiento (waxy o gelatinizado) en juveniles silvestres de *E. morio*; Factor a evaluar el tamaño de gránulo, porcentaje amilopectina; Respuesta a evaluar; Supervivencia, Biomasa, CTC/CDC, Glucosa en Plasma/Glucógeno en Hígado, Enzimas digestivas:- α -amilasa/ α -glucosidasa, Enzimas metabolismo intermediario:GK, PK;FBPASA, G6P-DH,6PG-DH ASAT.
- Tabla 23 Parámetros Globales; Biomasa inicial y final, Supervivencia, Ganancia en peso, tasa de crecimiento específico (SGR), Factor de Condición (FC) en los 4 tratamientos experimentales y el grupo control. Almidón Maíz Crudo (AMC), Almidón Maíz Waxy (AMW), Almidón de Papa Crudo (APC), Almidón Papa Gelatinizado (APG), tratamiento sin almidón (REF).

Tabla 24	Promedio de los parámetros físico químicos registrados durante el período experimental, de los tratamientos AMC, AMW, APC, APG y REF, en la mañana y la tarde. Temperatura (°C), pH, Oxígeno Disuelto (mg/L) y salinidad (ppt).
Tabla 25	Coefficiente diario de Crecimiento (CDC) y Coeficiente térmico de Crecimiento (CTC) de los juveniles silvestres aclimatados a los tratamientos almidón; Almidón de Maíz Crudo (AMC), Almidón de Maíz Waxy (AMW), Almidón de Papa Crudo (APC), Almidón de Papa Gelatinizado (APG) y al tratamiento de Referencia sin almidón (REF).
Tabla 26	Glucosa en Plasma (mg. dL ⁻¹), Glucógeno en hígado (mg.g ⁻¹), Hematocrito (%), Índice Hepatosomático (IHS %), en los tratamientos experimentales y el grupo control. Almidón Maíz Crudo (AMC), Almidón Maíz Waxy (AMW), Almidón de Papa Crudo (APC), Almidón Papa Gelatinizado (APG), tratamiento sin almidón (REF).
Tabla 27	Actividad específica de la α -amilasa (U.mg proteína ⁻¹), y la α -glucosidasa (mU.mg de proteína ⁻¹) en los tratamientos experimentales y el grupo control. Almidón Maíz Crudo (AMC), Almidón Maíz Waxy (AMW), Almidón de Papa Crudo (APC), Almidón Papa Gelatinizado (APG), tratamiento in almidón (REF).
Tabla 28	Actividad Enzimática específica (U mg ⁻¹ proteína) del metabolismo intermediario en el hígado de <i>E. morio</i> : Almidón de Maíz Crudo (AMC), Almidón de Maíz Waxy (AMW), Almidón de Papa Crudo (APC), Almidón de Papa Gelatinizado (APG) y tratamiento de Referencia sin almidón (REF).
Tabla 29	Distribución de tanques y periodo de realimentación.
Tabla 30	Diseño Experimental de Alimentación, Ayuno y Realimentación de los juveniles silvestres de <i>E. morio</i> , aclimatados a un tratamiento con 20% de carbohidrato (almidón de maíz).

- Tabla 31 Composición de alimentos en el Tratamiento Experimental de Almidón de Maíz Crudo 20%, lípidos 5.5% y proteínas 47.2 %, de los juveniles en el experimento de ayuno y realimentación
- Tabla 32 Glucosa en Plasma (mg.dL-1), Glucógeno en hígado (mg.g-1), Hematocrito (%) se compararon con una prueba de ANDEVA 1 VIA Tukey y el Índice Hepatosomático (IHS %) con una no paramétrica de Mann- Whitney en juveniles silvestres de *E. morio* en 20 días de alimentación con una tratamiento que contiene 20% de AMC, y 20 días de ayuno.
- Tabla 33 Glucosa en Plasma (mg.dL-1), Glucógeno en hígado (mg.g-1), Hematocrito (%), índice hepatosomatico en diferentes días de realimentación (1, 4, 6, 12, 20).
- Tabla 34 Actividad enzimática de las enzimas reguladoras del metabolismo intermediario en juveniles de *E. morio*, alimentados con una tratamiento con AMC con un nivel de 20% durante 20 días; y juveniles en periodo de 20 días de ayuno.
- Tabla 35 Actividad enzimática de las enzimas reguladoras del metabolismo intermediario en juveniles de *E. morio*, realimentados con una tratamiento con AMC con un nivel de 20% durante diferentes periodos de realimentación (1, 2, 4, 6, 12, 20).

Abreviaturas

AMC	Almidón de maíz crudo
AMG	Almidón de maíz gelatinizado
AMW	Almidón de maíz waxy
APC	Almidón de papa crudo
APG	Almidón de papa gelatinizado
ATC	Almidón de trigo crudo
ATG	Almidón de trigo gelatinizado
CTC	Coefficiente de Térmico de crecimiento
CDC	Coefficiente de crecimiento
DTT	Ditriotreitol 1,4-Ditro-teritol
FBpasa	Fructosa 1,6-bifosfato
GDH	Glutamato deshidrogenasa
GK	Glucocinasa
G6P	Glucosa 6-fosfato
6PG-DH	6-fosfogluconato deshidrogenasa
G6P-DH	Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa
ALAT	Alanino Aminotransferasa
ASAT	Aspatato Aminotransferasa
LDH	Lactato deshidrogenasa
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido
NADP	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
PEP	Fosfoenolpiruvato
PK	Piruvato cinasa

Introducción general

La captura de peces al final de los años 1990's representaba el 75% de la producción total, alcanzando en el 2001 alrededor de 90 millones de toneladas (FAO, 2010). La acuicultura de especies de importancia comercial se fue incrementando anualmente a una tasa de producción de 6.2% (Failler, 2015), pero a pesar de este importante desarrollo de la producción acuícola, existe una gran dependencia de la captura de pescado para la elaboración de alimentos balanceados, que incluyen una gran porcentaje de harina y aceite de pescado (FAO, 2014).

Para producir por acuicultura de forma sostenible es necesario buscar nuevas fuentes de proteínas y de sustitutos energéticos para la elaboración de alimentos que cubran los requerimientos energéticos de las especies cultivadas.

La inclusión de carbohidratos en las dietas surge como una alternativa para disminuir el nivel de inclusión de proteínas, por lo que se ha generado un importante desarrollo de metodologías nuevas y de estudios encaminados a conocer la adaptación de las especies para la utilización de los carbohidratos como fuentes de energía.

Los carbohidratos proveen de energía a los organismos y además son precursores en diversas reacciones de síntesis y de óxido-reducción que se convertirán en intermediarios de componentes estructurales de las células (Hochachaka 1969; Tarr, 1972 y Demaël, 1978). Los peces tienen relativamente altos requerimientos de aminoácidos esenciales, de manera que los carbohidratos son pobremente utilizados y representan una última opción metabólica de fuente de energía para estos animales, por lo que las proteínas y los lípidos son los sustratos energéticos preferentes para los peces (Walton y Cowey, 1981).

En los peces, después de ingerir una carga de glucosa en la dieta los niveles de glucosa se elevan rápido y no retornan a sus niveles basales hasta después de un tiempo prolongado, esta condición los identifica como organismos intolerantes a la glucosa. Durante los años 70's aumentó el interés por los estudios dirigidos a conocer los mecanismos de regulación de la glucosa en peces, evaluando la tolerancia a partir de una curva, midiendo la concentración

de insulina e inyectando insulina exógena después de una carga de glucosa dietética (Wilson 1995, Panserat 2005). Otros estudios consistieron en evaluar la respuesta a diferentes inclusiones de carbohidratos en los alimentos, desde azúcares simples (glucosa, dextrina, fructosa, maltosa) hasta más complejos como el almidón (Mazeaud, 1973; Palmer, 1974; Bergot, 1979; Cowey *et al.*, 1977).

Las investigaciones apuntaban a que los peces presentaban los mecanismos para utilizar glucosa dietética como sustrato energético, ya que se observó que después de una ingesta prolongada de alimento con carbohidratos, los peces podían almacenar la energía en forma de glucógeno y lípidos, de manera muy similar a los mamíferos.

Según Panserat (2014) se generaron 3 hipótesis sobre la hiperglucemia inducida por la glucosa postprandial en peces:

1. Baja fosforilación de la Hexocinasa (HK) en tejidos insulina-sensibles, así como bajo número de transportadores de insulina en músculo.
2. Ausencia de la expresión inducible de la Glucocinasa (GK), en el hígado.
3. En algunas especies, los aminoácidos son reconocidos como moléculas que pueden actuar como glucosa y pueden inducir a la secreción de insulina.

De manera que las respuestas a estas hipótesis han sido abordadas por muchos investigadores para entender los procesos involucrados en la regulación de la glucosa por los peces.

En 1973, el estudio de las enzimas hexocinasas involucradas en esta reacción se estaba desarrollado para mamíferos. Se sabía que existían ciertas isoformas de las hexocinasas que actuaban de manera diferente en función de la concentración de glucosa; algunas isoformas presentaban mayor afinidad por lo que su K_m era baja (0.01-0.1 mM) y eran inhibidas por Glucosa 6-fosfato (G6P), pero se observó que en muchos animales altas concentraciones de glucosa en plasma podían inducir una isoforma más específica a glucosa, y que no era inhibida por la G6P, además presentaba baja afinidad por la glucosa, por lo tanto, su K_m era más alta (10mM), de manera que la respuesta más aceptada para explicar la capacidad de un organismo a la glucosa radicaba en la capacidad de fosforilar la glucosa a G6P (Newsholme

y Start, 1973). Se demostró que algunos peces, rumiantes y aves no presentaban actividad de la GK y el mecanismo de control de la glucosa dependía únicamente de la actividad de las isoformas de hexocinasas con alta afinidad.

Uno de los trabajos pioneros para determinar actividad en peces fue el de Abel *et al.* (1978), quienes reportaron la inducción de actividad de GK en la trucha arcoíris después de ser alimentada con alto contenido en carbohidratos en el alimento. Sin embargo, es hasta que **Tranulis *et al.* y Borrebaek *et al.*,(1996)** , iniciaron estudios mas detallados del mecanismo de la GK en el hígado del salmón, después de lograr la purificación de la GK. La presencia de la GK ha sido confirmada en varias especies como la trucha arcoíris, *D. labrax*, *P. fluviatilis*, carpa común (Borrebaek., 2000, Panserat *et al.*, 2000; Casseras *et al.*, 2000; Enes *et al.*, 2006; citados en Panserat, 2014).

Walton y Cowey (1981) en su revisión sobre metabolismo intermediario, describen los mecanismos principales de utilización de la glucosa dietética: una vez formada la glucosa-6P ya no puede cruzar la membrana celular, queda atrapada dentro de la célula y es cuando es destinada a tres rutas principales: a) glucólisis (vía Embden-Meyerhof), b) formación de glucógeno (glucogenogénesis), y c) vía de las pentosas fosfato.

Glucogenogénesis

Una vez formada G6P, es convertida en un isómero glucosa-1-P por una fosfoglucomutasa (EC. 2.7.5.1) que según los autores ha sido detectada en varios tejidos de peces (Nagayama *et al.*, 1972). La glucosa 1-P y uridina trifosfato forman un intermediario, la UDP-glucosa, la cual fue detectada en hígado de carpa y trucha (Zhivkov, 1971). Esta UDP-glucosa es un intermediario que se convierte en glucógeno a través de la acción de una glucógeno sintetasa (EC 2.4.1.11), enzima que ha sido detectada en el hígado y el músculo de la trucha arcoíris, carpa, lampreas (Ingram, .1970; Murat y Plisets-kaya, 1977).

Glucólisis

Se ha detectado la actividad de todas las enzimas que participan en la glucólisis en varios tejidos de peces, como *Salmo salar*, *Oncorhynchus mykiss*, *Sparus aurata*, *Dicentrarchus labrax* (Panserat, 2001; Walton y Cowey, 1976; Nakai et al., 1960; Metón et al., 2003; Vieigas et al., 2012). La G6P es catabolizada a piruvato en este proceso interviene enzimas que son consideradas como punto control de la glucólisis, como las hexocinasas (incluyendo GK), piruvato cinasa (PK) y la fosfofructocinasa (PFK-1). La glucosa convertida en lactato (en condiciones anaeróbicas) o piruvato (en condiciones aeróbicas) es oxidada en el ciclo de Krebs. Se ha observado que todos los tejidos de peces pueden utilizar la glucosa por varias rutas, McLeod (1963) detectó la formación de lactato a partir de glucosa al adicionar hexocinasa de levadura a diferentes tejidos en la trucha, encontrando actividad glucolítica en orden decreciente corazón>músculo>cerebro>hígado>riñón. Sin embargo, Knox (1980) detectó la mayor actividad en el hígado en esta misma especie.

Vía de las Pentosas Fosfato

En esta ruta metabólica se genera gran parte del poder reductor que se utiliza para la formación de lípidos, por medio de la producción del NADPH, y se lleva a cabo por la acción de dos enzimas deshidrogenasas: la 6-fosfato deshidrogenasa (G6P-DH) y la 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PG-DH). El ciclo de las pentosas es una vía alternativa de oxidación de la glucosa que produce NADPH, en esta vía se forman equivalentes de reducción y pentosas fosfato que son necesarias para la síntesis (Shimeno, 1982). Se ha reportado en peces, principalmente carnívoros, existe una actividad mayor de la G6P-DH (Barroso, 1999).

Catabolismo de Proteínas

El hígado es el órgano que genera la mayor cantidad de precursores para procesos de biosíntesis, en la cual la mayor parte de la glucosa está destinada a seguir rutas anabólicas, dejando como segunda opción la glucosa para formación de piruvato, para la oxidación (Cowey y Dalton, 1981).

En peces la mayoría de los cetoácidos destinados a la oxidación provienen del catabolismo de aminoácidos y estos precursores son destinados al ciclo de Krebs si es que se requiere energía para producir ATP, o bien cuando no hay requerimientos energéticos, estos precursores son direccionados a la formación de G6P, por medio de la vía de la gluconeogénesis (Cowey y Dalton 1981).

En términos generales, para los años 80's se tenía el conocimiento de la presencia de la maquinaria enzimática involucrada en la homeostasis de la glucosa, que aportaba información sobre la intolerancia que los peces presentaban ante cargas de glucosa. Moon (2001) realiza una revisión de los estudios que hasta entonces se habían hecho para entender el mecanismo de homeostasis de la glucosa en los peces; una síntesis de estos estudios se presenta a continuación.

- 1) Casi todos los peces presentan una tasa de consumo de oxígeno que representa un 10% de la tasa de los mamíferos, de manera que la absorción de nutrientes, en general el metabolismo de los peces, es más bajo que los mamíferos, lo que implica una tasa de consumo de glucosa más lenta.
- 2) Han sido identificados varios tipos de transportadores GLUT en el músculo de peces, y presentan vías de señalización para la insulina similares a las de los mamíferos (Ebeling et al., 1998).
- 3) No se considera que los peces presenten una deficiencia en la cantidad de insulina que sea la consecuencia a la intolerancia a la glucosa, pero sí se sabe que hay un bajo número de receptores de insulina.
- 4) Existen otras hormonas que de manera indirecta pueden influir en la homeostasis de la glucosa, como glucagón, somatostatinas, hormonas del crecimiento, catecolaminas cortisol.

En los años siguientes, los estudios sobre la regulación de la glucosa fueron más detallados, incluyendo estudios *in vitro* de cultivo de hepatocitos y conociendo los genes implicados en la homeostasis de la glucosa. Por ejemplo, se hicieron estudios aislando hepatocitos de *Anguilla rostrata* (Renaud y Moon, 1980) demostrando que la gluconeogénesis en los hepatocitos fue estimulada por el lactato, el glicerol y la alanina, siendo potencialmente

estimulada por la presencia de glucagón, generando el mayor formación de glucógeno. Foster et al. (1993) en la especie *Myxine glutinos*, encontraron una diferenciación en función de los hepatocitos dentro del hígado; encontraron una región predominantemente gluconeogénica y oxidativa, y otra región con preferencia por glucogenólisis y glucolisis. Panserat et al., (2000), trabajando con la trucha arcoíris, demostraron por primera vez la fosforilación de la glucosa en peces carnívoros en presencia de la GK; en estudios posteriores, se demostró la expresión de GK no solo en hígado, sino también en hipotálamo y páncreas (Polakof et al., 2007).

Entre los trabajos realizados recientemente sobre las enzimas del metabolismo intermediario, sobresalen los estudios de Fernández et al. (2006) en *Sparus aurata*, quienes utilizaron tres niveles de inclusión de almidón (5%, 18% y 26%) logrando obtener una alta correlación entre la actividad de la Fosfofructocinasa-1 (PFK-1), PK, Glucosa 6-fosfafo deshidrogenasa (G6P-DH) y la 6PG-DH al incrementar el nivel de inclusión. Posteriormente, Enes (2010), en la misma especie, utilizó diferentes fuentes de carbohidratos (almidón de maíz gelatinizado, dextrina, maltosa y glucosa) encontrando que los peces presentaron hiperglucemia durante 6 horas después de ser alimentados, y que esta condición fue menor en los alimentados con almidón. La actividad de la GK y PK fue mayor en los peces alimentados con glucosa, y menor en los alimentados con maltosa. En la *S. sarba*, al utilizar 2% y 20% de dextrina por un periodo de 4 semanas, la expresión de ARN mensajero de la GK y la G6P-DH incrementó, y también aumentó el índice hepatosomático. Los autores concluyen que la *S. sarba* es capaz de adaptarse a una dieta con altos contenidos de dextrina, que le permite reorganizar las rutas metabólicas; esto se demostró debido al aumento del glucógeno en hígado (Leung et al., 2011).

El interés generado por el estudio de especies comerciales surge a partir de hacer una acuicultura que proponga modelos de nutrición basados en la fisiología y metabolismo de las especies, alimentos de bajo costo que aseguren la adaptación de los organismos al cultivo, y disminuyendo la producción pesquera. En el año 2030 se espera que la producción acuícola para consumo humano represente el 50 % de la producción total (Failler, 2009). Sin embargo, esta meta depende del desarrollo de las metodologías del cultivo especializado, ya que las

especies de peces carnívoras dependen de la pesca comercial de peces pequeños para satisfacer la fuente de proteína y lípidos, que provienen principalmente de la harina y aceite de pescado (Tacon, 2008; Kristofersson et al., 2006). De manera que incluir alimento de bajo costo con la sustitución de proteína por carbohidratos, es vital para el desarrollo de una acuicultura sustentable, y de ahí surge la necesidad de realizar estudios sobre el uso de los carbohidratos dietéticos como fuente energética en las especies de cultivo, que nos puedan generar un mejor entendimiento sobre la bioquímica, fisiología y metabolismo de las peces (Viegas, 2012)

Epinephelus morio es un pez de gran importancia económica en el Sureste del país, y una de las especies más comerciales del Golfo de México (Brulé y Deniel, 1989), lo que coloca a las poblaciones silvestres en una situación crítica por sobreexplotación por pesca, ya que en las últimas décadas la población se ha reducido a un tercio de la original (Doi *et al.*, 1981, Arreguí *et al.*, 1987, Burgos-Rosas y Pérez-Pérez, 2006).

En esta situación, *E. morio* se convierte en una especie candidata a ser cultivada. En otros países como Tailandia, Malasia, Singapur, Hong Kong y China se está desarrollando el cultivo de especies del género *Epinephelus*, teniendo resultados positivos.

Es por ello que el estudio dirigido a conocer los requerimientos nutricionales de la especie daría la pauta a la formulación de alimentos que permitan mantener y aclimatar las especies al cautiverio, con el objetivo de lograr su adaptación a las condiciones en cultivo, así como contar con alimentos que contengan menores cantidades de proteína y que puedan ser comercializados.

Sobre *E. morio*, se desconoce el nivel óptimo de inclusión de carbohidratos y la capacidad regulatoria de la glucosa dietética, sin embargo, se sabe que un pez carnívoro presenta la maquinaria enzimática necesaria para digerir carbohidratos, ya que se demostró en juveniles silvestres del medio natural actividad de α -amilasa y α -glucosidasa (Castillo, 2011), además Silva *et al.* (2014), con experimentos realizados en digestibilidad *in vivo* e *in vitro*, determinó que el nivel óptimo de inclusión de proteína para la especie es de 45%.

Justificación

E. morio es un pez que a pesar de tener un amplio espectro de presas en su dieta es considerado un carnívoro estricto y presenta como presas preferenciales a los crustáceos (Brulé, 1986 y 1994). Asimismo, es un pez que durante su vida tiene migraciones estacionales relacionadas a su conducta alimentaria y reproductiva (López, 2009). En condiciones ambientales no favorables, cuando las presas preferenciales no están disponibles, *E. morio*, al presentar esta gama tan amplia de presas en su dieta, puede reducir la competencia. Se ha demostrado que los peces pueden cambiar su perfil metabólico al ser sometidos a cambios en su dieta; se conoce que los peces tienen enzimas y rutas metabólicas que les permiten regular el metabolismo de carbohidratos en el alimento (Cowey y Walton, 1989; Baanante *et al.*, 1991; Shimeno *et al.*, 1993 y 1996, Metón *et al.*, 1999, 2003 y 2004). Se ha demostrado también que en ciertas especies de peces carnívoros los carbohidratos pueden ser asimilados, permitiendo un balance energético y la disminución en el porcentaje de proteína en el alimento (Chen y Chen, 1986; Chen y Tsai 1994; Douglas *et al.*, 2000).

En cuanto a los carbohidratos existen muchas interrogantes; las evidencias demuestran que ciertos peces pueden presentar la maquinaria enzimática necesaria que les permita utilizar los carbohidratos como fuente energética, considerando también la fuente de almidón, y la presencia de hexocinasas capaces de fosforilar la glucosa dietética, en especial la GK (hexocinasa IV), enzima considerada clave en la glucólisis, y principal reguladora de la glicemia por presentar una Km alta que le permite fosforilar más cantidad de glucosa (Tranulis *et al.*, 1994; Panserat *et al.*, 1999; Fernández *et al.*, 2006; Enes *et al.*, 2010; Metón *et al.*, 2003 y 2010). Se ha demostrado que juveniles silvestres de *E. morio*, presentan actividad de la α -amilasa y la α -glucosidasa (Castillo, 2011). Se sabe que durante el proceso de digestión de los almidones, la α -amilasa rompe los enlaces α -D-(1-4)-glucosídicos del almidón, y que la distribución y relación de la amilosa y la amilopectina en el gránulo contribuye en la estructura y propiedades funcionales de los diferentes almidones. La amilopectina por su conformación ramificada puede presentar mayor disponibilidad de los enlaces α (1-4) glucosídicos sobre los cuales actúa la α -amilasa (Bello-Pérez, 2002).

Se sabe que los peces presentan adaptaciones metabólicas para enfrentar periodos de ayuno prolongado. Los peces carnívoros y migratorios, mantienen los niveles de glucógeno como principal reserva energética, obteniendo la glucosa necesaria de vías gluconeogénicas (Farbridge y Leatherland, 1992). Sin embargo, y a pesar de lo anterior, existe controversia sobre la capacidad de los peces carnívoros para asimilar y utilizar los carbohidratos como fuente energética, y en consecuencia son necesarios estudios para conocer el verdadero estado fisiológico de las sustituciones en su alimentación, así como también es necesario tener conocimiento sobre la capacidad de cambiar el perfil metabólico y de adaptación a estas nuevas fuentes energéticas con la presencia de actividad enzimática de la GK.

Hipótesis general

E. morio en el medio natural presenta actividad de la α -amilasa y la α -glucosidasa en intestinos y ciegos pilóricos (Castillo, 2011). Se espera un incremento en la actividad de estas enzimas digestivas en peces alimentados con los almidones que presenten la mayor disponibilidad de enlaces α -D-(1-4)-glucosídicos. Como resultado de esta digestión, se espera una mayor concentración de glucosa circulante en plasma, que será la señal para la activación de la glucocinasa del hígado (hexocinasa IV). Esto permitirá un incremento de la fosforilación de la glucosa dietética, que podrá ser asimilada dentro del metabolismo intermediario de este órgano. La presencia de la actividad glucocinasa hepática permitirá considerar a los juveniles silvestres del mero rojo *E. morio*, como omnívoros con tendencia a la carnivoría, como ha sido descrito para otras especies (Van Schaftingen, 1994; Blin y Panserat, 1999).

Objetivo general

Evaluar en el mero rojo *E. morio* la utilización de diferentes fuentes de almidones dietéticos, a través de la actividad de enzimas digestivas (α -amilasa y la α -glucosidasa), la glucosa en plasma y la actividad de enzimas clave del metabolismo intermediario en hígado (GK, PK, G6P-DH, 6PG-DH, ALAT, ASAT y FBPasa).

Objetivos específicos

Capítulo I

Juveniles silvestres del mero rojo *Epinephelus morio*

1. Evaluar la glucosa en sangre y el glucógeno en hígado de los juveniles silvestres de *E. morio* en diferentes épocas del año: lluvias, nortes y secas.
2. Evaluar la actividad de la α -amilasa y la α -glucosidasa de los juveniles silvestres de *E. morio* en diferentes épocas del año: lluvias, nortes y secas.
3. Evaluar la actividad de las enzimas clave del metabolismo intermediario (PK, G6P-DH, 6PG-DH, FBPasa) del hígado de juveniles silvestres de *E. morio* en diferentes épocas del año: lluvias, nortes y secas.

Capítulo II

Ensayo preliminar para determinar nivel de inclusión y mejor fuente de carbohidratos dietéticos en los juveniles de *E. morio* con dos fuentes botánicas diferentes: almidón de maíz y almidón de trigo.

4. Evaluar la actividad de la α -amilasa y la α -glucosidasa en ciegos pilóricos e intestino de juveniles silvestres de *E. morio* alimentados con almidones nativos de maíz y trigo, de diferentes tamaños de gránulo de almidón (maíz 5 a 25 μ m, trigo 2-38 μ m).

5. Evaluar la actividad de la α -amilasa y la α -glucosidasa con almidones de maíz y trigo, en su forma nativa y tratados por el proceso de gelatinización, en ciegos pilóricos e intestino de los juveniles silvestres de *E. morio*.

6. Evaluar la glucosa en sangre y el glucógeno en hígado de juveniles silvestres de *E. morio* alimentados con los almidones nativos y gelatinizados de maíz y trigo.

7. Evaluar la actividad de las enzimas reguladoras del metabolismo intermediario en organismos alimentados con alimentos que contienen o no almidón.

Capítulo III

Tolerancia a la glucosa de juveniles silvestres de *E. morio* aclimatados a alimento con carbohidratos.

8. Determinar las curvas de tolerancia a la glucosa en juveniles silvestres de *E. morio* alimentados con alimentos que contienen o no 15 % de almidón.

9. Determinar la actividad de las enzimas del metabolismo intermediario en juveniles silvestres de *E. morio* alimentados con alimentos que contienen o no 15 % de almidón.

Capítulo IV

Utilización digestiva de almidones de acuerdo a su origen botánico (maíz, trigo o papa) y procesamiento (waxy o gelatinizado) en juveniles silvestres de *E. morio*.

10. Determinar la actividad de la α -amilasa y la α -glucosidasa en ciegos pilóricos e intestino de juveniles silvestres de *E. morio* alimentados con alimentos que contienen almidones nativos de maíz y papa con diferentes tamaños de gránulo de almidón (maíz 5 a 25 μm , trigo 2-38 μm , y papa 15 a 100 μm).

11. -Evaluar la actividad de la α -amilasa y la α -glucosidasa en ciegos pilóricos e intestino de juveniles silvestres de *E. morio* alimentados con alimentos que contienen almidones de maíz y papa en su forma nativa, y gelatinizados.

12. Evaluar la actividad de la α -amilasa y la α -glucosidasa en ciegos pilóricos e intestino de juveniles silvestres de *E. morio* alimentados con alimentos que contienen almidones de maíz, papa y almidón de maíz waxy con diferentes cantidades de amilopectina (73 %, 78% y 99 % respectivamente).

13. Evaluar la glucosa en sangre y el glucógeno en hígado de juveniles silvestres de *E. morio* alimentados con alimentos que contienen almidones nativos y gelatinizados de maíz, papa y maíz waxy rico en amilopectina (99%).

14. Evaluar si existe actividad de la glucocinasa en juveniles silvestres de *E. morio* alimentados con alimentos que contienen almidones nativos y gelatinizados de maíz nativo, papa y maíz waxy rico en amilopectina (99%).

15. Evaluar la actividad de las enzimas del metabolismo intermediario (PK, G6P-DH, 6PG-DH, FBPasa, GK y la ASAT) en el hígado de juveniles alimentados con alimentos que contienen almidón de maíz y papa (nativo y gelatinizado), y almidón de maíz waxy.

Capítulo V

Efecto del ayuno y realimentación en la actividad de las enzimas reguladoras del metabolismo intermediario en juveniles silvestres alimentados con un alimento que contiene almidón de maíz nativo.

16. Evaluar los cambios en la actividad de las enzimas (GK, PK, FBPasa, G6P-DH, 6PG-DH, ASAT y ALAT) del metabolismo intermediario en juveniles de *E. morio* alimentados con un alimento que presente la mayor actividad enzimática en periodo de ayuno y a diferentes días de realimentación.

Capítulo I Juveniles silvestres del mero rojo *Epinephelus morio*

I.1.Introducción

I.1.1.Descripción de la especie

Epinephelus morio pertenece a la familia de los serránidos, que son un grupo de peces cuya definición ha sido controversial, por no presentar un rasgo distintivo. Thomson *et al.* (1978) coinciden en que los serránidos son peces generalizados con aletas espinosas y con pocas características diagnósticas que les permitan diferenciarse de otros peces Perciformes. Sin embargo, los estudios filogenéticos (Johnson, 1975; Baldwin y Johnson, 1993) han permitido establecer que la Familia Serranidae es un grupo monofilético (Hennig, 1996) debido a cuatro especializaciones: una innovadora (tres espinas sobre el opérculo), y las demás reductivas (ausencia del uroneural posterior, espina procurrente y tercer cartílago radial pleural) (Gosline, 1966; Johnson, 1975; Kendall 1984), (Figura 1).

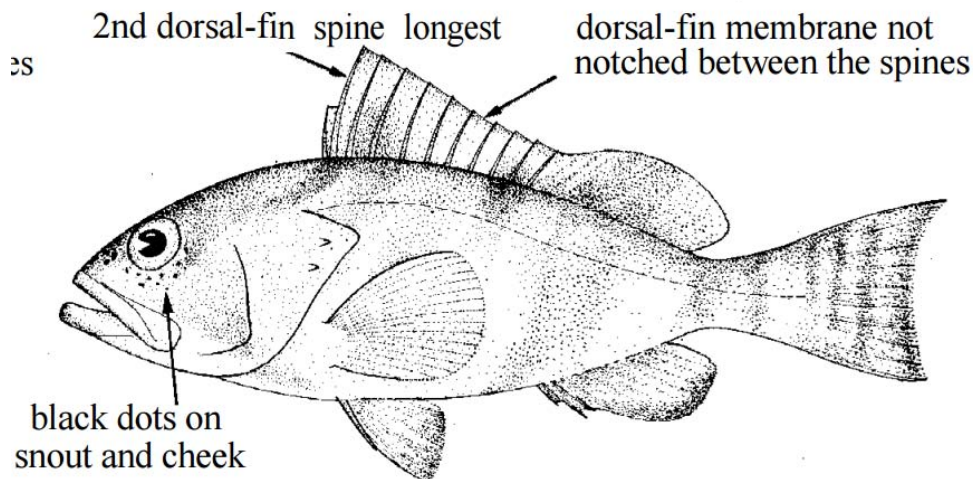


Figura 1. Ilustración de *Epinephelus morio*.

I.1.2. Distribución de *E. morio* en México y el mundo

Los serránidos como *E. morio*, presentan una distribución batimétrica que está en función de los cambios ontogénicos de la especie. Los huevos pelágicos eclosionan como larvas, formando parte del zooplancton, después como juveniles buscan sitios de refugio y se reclutan en zonas litorales someras, generalmente en presencia de pastos marinos donde se alimentan y crecen (Sadovy y Eklund, 1999). Cuando alcanzan una talla de adulto, migran hacia aguas más profundas con sustratos coralinos-rocosos (Heemstra y Randall, 1993). *E. morio* es una especie hermafrodita protogínica secuencial, madura primero como hembra al menos una vez, y después como macho el resto de las veces (Brulé *et al.*, 1999). Los individuos más pequeños que habitan las zonas costeras son sexualmente inmaduros. La mayoría madura como hembra y alcanzan una talla de maduración (54.5 cm, LF) después, migran hacia aguas más profundas (25 a 90 m), alejadas de la costa. Los machos maduros son más grandes y sólo es posible encontrarlos a mayores profundidades (Renan *et al.*, 2003).

E. morio presenta movimientos estacionales que se encuentra relacionados con la preparación para su etapa reproductiva. Los juveniles presentan un desplazamiento Oeste-Este, sincronizado con la agregación reproductiva de los adultos, pero manteniéndose siempre cerca de la costa (Arreguín-Sánchez *et al.* 1997). Los movimientos en verano están relacionados con la entrada de la masa de agua fría proveniente de la surgencia de Cabo Catoche, es entonces en verano y otoño que el mero se distribuye a lo largo de la plataforma continental con un desplazamiento al Oeste, alejándose de las aguas frías (López y Arreguín, 2007).

I.1.3. Hábitos alimenticios de *E. morio*

El fitoplancton y zooplancton constituyen un alimento potencial para las etapas tempranas de los serránidos, como lo indican Farfán *et al.* (2007) en su trabajo realizado con lutjánidos y serránidos de la Plataforma continental de Yucatán. Al examinar contenidos estomacales de las larvas es posible encontrar restos de huevo y nauplios de copépodos, larvas de moluscos, poliquetos, dinoflagelados y restos de fitoplancton compuesto por numerosas algas que contienen gran cantidad de proteína (Escribano, 2002). Esta gran diversidad de presas refleja la gran flexibilidad y oportunismo en el comportamiento trófico que las larvas de peces de los serránidos tienen en el medio para mantener una nutrición adecuada. (Hunter, 1981; Schmitt,

1986). Se han realizado diversos trabajos sobre los hábitos alimenticios en juveniles y adultos de serránidos, a través del estudio del contenido estomacal. Los cangrejos son las presas más abundantes en los contenidos estomacales de *E. morio*. En el Banco de Campeche, la especie *Stenorynchus seticornis* es la presa predominante, así como algunos peneidos como el camarón *Penaeus duorarum*, otros decápodos como *Palunirus argus*, *Scyllarus sp.*, algunos braquiuros como májidos, portúnidos, xántidos y calápodos, así como restos de anomuros, estomatópodos, cefalópodos y octópodos. Los peces reportados como presas fueron, *Balistes sp.*, *Apogo sp.*, *Diplectrum formosum*, *Haemulon sp.*, algunos tetradóntidos, serránidos, haemúlidos, morénidos y engráulidos (Giménez, E., *et al.* 2001). Brulé y Déniel (1996) reportan restos de algas, equinodermos, conchas de moluscos y en ocasiones, corales en estómagos de peces juveniles y adultos. Estos autores también reportan a los crustáceos como principal componente en las dieta. Brulé (1996) encontró una relación entre la talla y las presas; individuos menores a 55 cm de longitud furcal (LF) presentan mayor frecuencia de ocurrencia de crustáceos y cangrejos, mientras que a partir de esa talla las presas preferentes son peces. Varios autores (Longhurst, 1960; Randall y Brock, 1960; Randall, 1965 y 1967) sostienen la hipótesis de que los serránidos de tallas adultas, en general, son piscívoros.

I.1.4. Hábitat y nicho ecológico de *E. morio*.

E. morio, como otros serránidos bentónicos, se encuentra adaptado al lecho marino; su distribución está restringida a los márgenes continentales, a profundidades hasta de 300 m (Smith, 1961; Moe, 1969). La forma y color de su cuerpo se encuentran muy relacionados con el lecho marino y su papel como depredador. *E. morio* es un depredador que persigue a sus presas a distancias cortas, posee un cuerpo robusto, por lo que se esconde en cuevas para esperar a sus presas y con su gran boca engulle. Además, presenta patrones de coloración asociados con el fondo marino, como camuflaje y utiliza su aleta dorsal como defensa ante los depredadores, usándola como ancla (Helfman, 2009). Se ha reportado incluso que algunas especies como *E. morio* pueden modificar el lecho marino haciendo huecos donde pueden generar hábitats para otras especies bentónicas (Coleman y Williams, 2002; Coleman *et al.*, 2010).

I.2.Hipótesis

E. morio es un serránido que en el medio natural se alimenta principalmente de crustáceos, moluscos y peces (Brulé y Déniel, 1996; Giménez et al., 2001). Se espera encontrar mayor actividad de las enzimas amilasa y glucosidasa en juveniles silvestres en la época del año en que exista mayor disponibilidad de alimento, así como mayor actividad de enzimas reguladoras de metabolismo intermediario, al obtener glucosa 6-fosfato cuando hay suficiente alimento para almacenarlo en forma de glucógeno.

I.3.Objetivos específicos Capítulo I

- a) Evaluar la glucosa en sangre y el glucógeno en hígado de juveniles silvestres de *E. morio* en diferentes épocas del año: lluvias, nortes y secas.
- b) Evaluar la actividad de la α -amilasa y la α -glucosidasa de juveniles silvestres de *E. morio* en diferentes épocas del año: lluvias, nortes y secas.
- c) Evaluar la actividad de las enzimas clave del metabolismo intermediario (PK, G6P-DH, 6PG-DH, FBPasa) del hígado de juveniles silvestres de *E. morio* en diferentes épocas del año: lluvias, nortes y secas.

I.4. Metodología

Para determinar las condiciones fisiológicas en las que se encuentra la especie *E. morio* en el medio natural, fueron capturados de 20 juveniles por cada época del año en costas adyacentes a Sisal con pesos de 80 a 260 g . Se consideraron 3 épocas del año (nortes y lluvias en 2012 y secas en 2013). Para ello, se evaluaron las enzimas digestivas (amilasa y glucosidasa), las enzimas del metabolismo intermediario (GK, PK, G6P-DH, 6PG-DH, FBPasa), y además se determinaron la glucosa en plasma y el glucógeno en hígado.

I.4.1. Área de Estudio

El puerto de Sisal se localiza a 53 km al Noreste de la ciudad de Mérida, en el Estado de Yucatán. Está limitado geográficamente al Este con el Puerto de Chuburná, al Oeste con la reserva de Celestún, y al Sur con el municipio de Hunucmá. En esta región la pesca del mero rojo representa la actividad pesquera más importante, después de la pesca del pulpo (Figura 2).

La costa de Sisal es una isla de barrera según su descripción geomorfológica (Carranza et al., 1975), compuesta de una playa de barrera en la parte oceánica, en la que se dan procesos de transporte de material sedimentario, que junto con los procesos físicos como el oleaje, corrientes, mareas y viento, la convierten en una zona muy dinámica. Esta playa se encuentra rodeada por humedales y manglares, y los fondos marinos están caracterizados por la presencia de pastos marinos.

El clima es árido, con temperaturas promedio entre los 25 y 30 °C durante todo el año, mientras que la precipitación anual no rebasa los 500 mm (Briton y Morton, 1989). Las estaciones del año están definidas por: época de nortes (octubre-marzo), época de secas (abril-junio) y época de lluvias (julio-septiembre). (Leipper 1954; Merino, 1992).



Figura 2. Mapa Satelital mostrando la ubicación de las costas de Sisal, sitio de captura de los juveniles silvestres de *E. morio*.

I.4.2. *Obtención de los organismos*

Para obtener los juveniles silvestres en las tres épocas del año, se realizaron muestreos estacionales: época de lluvias (julio 2012), época de nortes (noviembre 2012) y época de secas (mayo 2013).

Los juveniles fueron capturados en las costas adyacentes a Sisal, utilizando una lancha con motor fuera de borda (70 HP) y con anzuelo. Los peces fueron transportados en un tanque Rotoplas de 500 L con aireación provista por una bomba, hacia la Unidad Académica Yucatán (UAY) de la Universidad nacional Autónoma de México.

En dichas instalaciones, los juveniles permanecieron 24 horas en reposo, previo a la toma de muestras, en un tanque de 200 L con aireación y en oscuridad, para minimizar el estrés. No se realizó ningún manejo de profilaxis a los juveniles para no generar estrés. En estas 24 horas se mantuvieron aclimatados para la toma de muestras (Figura 3).



Figura 3. Dispositivo para realizar la profilaxis después de la captura, de los juveniles silvestres de *E. morio*.

1.4.3. Datos merísticos

Ante de iniciar la biometría de los peces, estos fueron anestesiados con aceite de clavo por 5 minutos (2.5 ml/10 L), dentro de un contenedor. Se registró el tiempo de exposición al anestésico. Una vez anestesiados, los peces fueron medidos considerando la Longitud total (LT), Longitud furcal (LF), altura considerando la mitad de la aleta dorsal y la base del abdomen y el peso (g) de cada individuo.

Determinación de glucosa y hematocrito

Después de registrar los datos merísticos, los peces fueron colocados en posición horizontal y recta. La cola se sostuvo por la base y se realizó a punción, a un centímetro posterior al término de la aleta anal.

Para realizar esta punción, se utilizaron jeringas de 3 ml enjuagadas con heparina (Heparina marca Inhepar 5000U/ml) . Se obtuvieron 500µl de sangre por pez.

Para determinar el hematocrito, se tomaron 3 muestras por pez, con tubo capilar heparinizado. Posteriormente, los tubos fueron sellados y centrifugados en una centrifuga (IEC CENTRA MP4R, International Equipement Company).por una hora a una velocidad de 2290 rpm a °14 C por 60 minutos.

El hematocrito se calculó de acuerdo a la fórmula: volumen de células rojas x 100 /volumen total de sangre (Daisley, 1973).

Para la cuantificación de la glucosa, la sangre heparinizada fue centrifugada a 13,200 rpm por 5 minutos a 4°C. Después se colectó el plasma en tubos Eppendorf. Se tomaron 20 µl de plasma y fueron diluidos en 40µl de solución isotónica para peces (515 mOsm) (Maitland, 1990). . La cuantificación de la glucosa se realizó con un kit comercial, Bayer-Sera-Pak Plus B01 4509-01, y utilizando una curva patrón.

1.4.4. Disección de los organismos.

La disección de los individuos se realizó con un corte, introduciendo una tijera fina por la cloaca, y avanzando hacia el centro de los opérculos. Se realizó un segundo corte, desde el costado izquierdo del pez hasta el extremo superior del opérculo, y un tercer corte, paralelo al opérculo que une a los dos anteriores permitiendo la separación la zona de tejido muscular, cortando previamente las costillas. En ese momento los órganos quedaron descubiertos. El estómago, hígado e intestinos fueron extraídos y pesados. Posteriormente fueron congelados en nitrógeno líquido, y luego almacenados a -40°C en un ultracongelador (TOY-REY, Adrian Michigan U.S.A.) hasta la realización del análisis bioquímico.

Glucógeno

Para la medición del glucógeno se utilizó una porción de aproximadamente 20 mg de tejido del hígado, la cual fue pesada en una balanza analítica (Modelo Explorer OHAUS. U.S.A.) . El tejido fue colocado en un tubo Eppendorf de 1.5 ml, que contenía 200µl de ácido

tricloroacético TCA al 5%, y se homogenizó durante un minuto en un homogenizador (Eberbach homogenizador rotativo, modelo E2355). Se centrifugó a 7,000 rpm en una centrífuga Eppendorf (Modelo 5415C U.S.A.), durante 6 minutos. Se tomaron 100 µl del sobrenadante y se colocó en un tubo Eppendorf de 1.5 ml con 500 µl de etanol al 95%. Se homogenizó con ayuda de una micropipeta. Después se incubó en una estufa a 37 °C por 3 horas. A continuación se centrifugó a 13,000 rpm por 15 minutos. El sobrenadante se eliminó y se escurrieron los tubos en forma invertida sobre un papel absorbente. Como resultado, se obtuvo un botón blanco de material sedimentado en la parte inferior de la pared del tubo Eppendorf “paquete sedimentado”. A continuación se agregó 20 µl de agua destilada hirviendo a este botón que contenía el glucógeno con el fin de romper enlaces a alta temperatura. Finalmente se agregaron 200 µl de fenol al 5% a cada muestra. Para preparar el blanco, se utilizaron 20 µl de agua destilada hirviendo+200µl de fenol al 5%+1ml de ácido sulfúrico concentrado. La solución estándar se preparó con 10µl del estándar de glucosa (1 mg/ml) +200 µl de fenol al 5%+1 ml de ácido sulfúrico.

Para realizar la lectura en el lector de microplacas (Bio-Rad Benchmark Plus Microplate Spectrophotometer, Waukegan, IL.) se agregó 1 ml de ácido sulfúrico a las muestras. Después se agitó en Vortex y se dispensaron 200 µl por pozo de la microplaca. Este mismo proceso se realizó para el blanco y el estándar, y se realizó por triplicado.

La lectura de la absorbancia se hizo a 490 nm con un lector de microplacas.

El cálculo de la concentración de glucógeno se realizó de la siguiente manera:

Calculo:

$$\text{Glucógeno (mg/g)} = (((\text{PM} - \text{PBCO}) / (\text{PStd.})) * (1) * (0.1 / \text{PeT}) * (0.9)) * F$$

Donde:

PM=Promedio de absorbancia de la muestra

PBCO=Promedio de absorbancia del Blanco

PStd=Promedio de absorbancia del estándar

Estándar de glucosa (Kit comercial Bayer) 100 mg/dl= 1mg/ml

Volumen del extracto = 100 µL= 0.1 ml

Peso del tejido (g) = Pet

Factor de conversión de glucosa a valores de glucógeno = 0.9

Factor de Dilución= FD (se aplica solo en caso de que se haya hecho una dilución)

Preparación de los reactivos:

Se preparó ácido tricloroacético al 5%, fenol al 5% y alcohol etílico absoluto anhidro al 95% (etanol).

1.4.5. Método actividad enzimática de α -amilasa

La técnica empleada para medir la actividad de esta enzima fue la de Somogy-Nelson (Fernández, 2002). La actividad enzimática fue evaluada en ciegos pilóricos e intestino, y se identificó usando como sustrato almidón al 2% en el tampón citrato-fosfato 100 mmol l-1, NaCl 50 mmol l-1, pH7.5 con una incubación de 30 minutos a 25 °C para medir los azúcares reductores a 600nm. La actividad específica fue expresada en U/mg de proteína soluble.

La medición de la proteína soluble fue realizada con la técnica Bradford (1976), que consistió en colocar 10 μ l de muestra diluida a 1:10 de homogeneizado enzimático en una micro placa con 200 μ l de Bradford con 5 min de incubación a temperatura ambiente, y leyendo a 595 nm.

1.4.6. Método actividad enzimática de α -glucosidasa

La actividad de α -glucosidasa en ciegos pilóricos e intestinos fue cuantificada utilizando 920 μ l de buffer sodio - fosfato (pH 7.6), 60 μ l de extracto enzimático diluido 1:10 y 20 μ l de paranitrofenol glucopiranoside (PNPG). El ensayo fue incubado por 60 minutos a 37°C. La reacción se paró con carbonato de sodio 1M, y 40 finalmente se leyó la absorbancia en el lector de microplacas a 415 nm (Clark et al., 1984). La actividad de la α -glucosidasa, fue expresada en mU/mg de proteína (Papoutsoglou y Lyndond, 2005).

Para realizar los cálculos de la actividad específica se utilizaron las siguientes ecuaciones:

Ecuación 1. Cálculo de la actividad en unidades por ml.

Unidad /ml = D abs x volumen final reacción (ml) / CEM x tiempo (min) x volumen extracto (ml)

Ecuación 2. Cálculo de la actividad en unidades por mg de proteína soluble en el extracto.

Unidades /mg proteína soluble = (Unidades / ml) / mg soluble / ml

Donde:

La D abs es el incremento de absorbancia a una determinada longitud de onda por minuto; volumen final reacción: el volumen final de la reacción; CEM: el coeficiente de extinción molar del producto de la reacción.

1.4.7. Determinación de la actividad de enzimas del metabolismo intermediario

Extracción de hígado:

En la extracción de los órganos se utilizó una solución salina previamente fría para lavar el órgano. Una vez disecado el órgano, fue lavado y secado con papel absorbente. Con precaución se retiró todo el tejido accesorio y la grasa mesenterial. Inmediatamente después, el hígado fue prensado con pinzas planas, previamente enfriadas en nitrógeno líquido, y las pinzas fueron introducidas directamente al nitrógeno con el tejido. El hígado fue finamente triturado en un mortero, previamente enfriado, y posteriormente se almacenó a -80°C en tubos Falcon de 15 ml.

Pesaje del tejido:

Los tubos Falcón con el tejido fueron transportados en un contenedor portátil de nitrógeno líquido para su pesaje. Con una espátula previamente enfriada en nitrógeno líquido fue tomado el tejido (0.0500 g a 0.0600 g). El pesaje se realizó de tal forma que se evitó el contacto del tejido con las paredes del tubo; el tejido siempre se mantuvo congelado. Una vez pesado el tejido, el tubo fue colocado en hielo escarchado y ahí se agregó la solución amortiguadora de homogenizado, siempre en frío. Una vez que se fue colocado el tejido en la solución amortiguadora, el tejido se estabilizó a una temperatura no mayor de 4°C .

Preparación de la solución amortiguadora del homogenizado:

La solución amortiguadora se preparó en dos tiempos: uno previo a la homogenización, y otro justo al momento de hacer los homogenizados.

1.- Se preparó una solución 10X de solución amortiguadora de la manera siguiente:

Para 200 ml de
Tris-HCl 500mM
EDTA 40 mM
NaF 500 mM

2.- Dos soluciones stock:

A) Solución stock de DTT a 2M

B) Solución stock de PMSF 200 mM

En el momento justo antes de homogenizar se preparó una solución amortiguadora con una concentración 1X y se agregó la sacarosa en 1M.

Homogenizado

Se utilizó un pistilo de Ultra turrax del diámetro del tubo de ensayo, donde fue colocado el tejido. La velocidad a la que debe homogenizar es a 3.5 durante 10 segundos. Se tuvo cuidado de no meter aire a la muestra, no hacer burbujeo. Una vez homogenizada la muestra fue colocada en un tubo Eppendorf en hielo. Cada vez que se cambió de tratamiento, el pistilo fue lavado con la solución amortiguadora de homogenización con 3 ml, dos veces, y secado perfectamente.

Obtención del extracto puro:

Se centrifugó a 6,000 g durante 40 minutos a -4°C, y se recuperó el sobrenadante, procurando obtener una muestra limpia y clara. Para las enzimas PK, FBPasa, G6P-DH y 6PG-DH se utiliza el extracto concentrado, pero para la ASAT, se hace una dilución a 1:10 (495 ul de solución amortiguadora y 5 ul de extracto puro).

Tiempo de incubación:

Para determinar el tiempo de incubación y la cantidad de sustrato donde se encuentra la mayor actividad enzimática se realizaron diferentes ensayos para poder realizar las evaluaciones de la piruvato cinasa (PK), de la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6P-DH), la 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PG-DH), la fructosa 1-6 bifosfatasa (FBPasa), la glucocinasa (GK) y la alanino transferasa (ALAT).

Para determinar la actividad específica de las enzimas metabólicas PK, la G6P-DH, la 6-PG-DH, la FBPasa, la GK y la ASAT se utilizó la técnica descrita por Mentón (2007), adaptada a los métodos descritos anteriormente por Bonamusa et al. (1992).

Actividad de la PK:

Para medir la actividad de la Piruvato cinasa, se utilizó como sustrato ADP (20 ul) en una solución amortiguadora a pH 7.4 de Glicina –glicina más KCl y MgCl₂ como cofactores, utilizando dos coenzimas como PEP; NADH y LDH. La incubación se llevó a cabo durante 5 a 6 minutos con 7µl de sustrato, y la lectura se realizó a 340 nm. La actividad enzimática fue expresada como cantidad de NADP liberada por minuto.

Actividad de la G6P-DH:

Para determinar la actividad específica de G6P-DH se utilizó como sustrato NADP y una solución amortiguadora de Imidazol – HCl pH 7.7 con MgCl₂ como cofactor. La incubación se llevó a cabo durante 5 a 6 minutos con 7µl de sustrato, y la lectura se realizó a 340 nm. La actividad enzimática fue expresada como cantidad de NADP liberada por minuto.

Actividad de la 6PG-DH:

Para determinar la actividad específica de la 6PG-DH, se utilizó NADP y una solución amortiguadora de Imidazol – HCl pH 7.7 con MgCl₂ como cofactor. La incubación se llevó a cabo durante 5 a 6 minutos con 7µl de sustrato, y la lectura se realizó a 340 nm. La actividad enzimática fue expresada como cantidad de NADP liberada por minuto.

Actividad de la fructosa 1-6 bifosfatasa (FBPasa):

Para determinar la actividad específica de la FBPasa, se usó una solución amortiguadora de imidazol-HCl, pH 7.7 y MgCl₂. Como sustrato se usó NADP y como cofactores B-mercaptoetanol y F 1,6-P₂, PG1 y G6P-DH. La incubación se llevó a cabo durante 5 a 6 minutos con 7µl de sustrato, y la lectura se realizó a 340 nm. La actividad enzimática fue expresada como cantidad de NADP liberada por minuto.

Actividad de la glucocinasa (GK):

Para determinar la actividad específica de la glucocinasa (GK) se utilizó Tri-HCl, pH 7.75, MgCl₂ y KCl, DTT, y glucosa 1M.

La actividad de esta enzima se evaluó a partir de la actividad de la Hexocinasa1 (HK-I), la Hexocinasa 2 (HK-II) y la glucosa deshidrogenasa (GDH), el cálculo se obtuvo con la siguiente ecuación:

$$GK = HK-I - HK-II - 1/3 GDH$$

Para determinar la actividad de las enzimas HK-I, HK-II y GDH, se utilizó una solución amortiguadora de Tris-HCl, pH 7.5, MgCl₂, KCl, DTT. Para la HK-I se utilizó un sustrato de glucosa con una concentración 1M y para la HK-II una concentración de glucosa 10mM. Se utilizó NADP para las tres enzimas, y sólo para la GDH fue necesario utilizar G6P-DH. La incubación y la cantidad de sustrato fueron determinadas a partir de ensayos de prueba. La lectura se realizó a 340 nm. La actividad enzimática fue expresada como cantidad de NADP liberada por minuto.

La actividad de la enzima del metabolismo de aminoácidos alanino amino transferasa (ALAT):

Para determinar la actividad de estas dos enzimas se utilizó un Kit comercial de Roche que contiene dos reactivos para la ALAT con LAD y NAHD. Las muestras se incubaron durante 1 minuto a 30 °C, y la lectura se realizó a 340 nm. Los protocolos de las enzimas y sus autores están citados en la tabla 1.

Tabla 1. Protocolos para determinar la actividad enzimática específica y autores.

ENZIMA	AMORTIGUADOR	pH	ABS (nm)	AUTOR
<i>α-Amilasa</i>	Tris	7.0	600	Roby y Whelan, (1968)
<i>α-Glicosidasa</i>	Tris	7.6	420	Clack <i>et al.</i> (1984)
<i>Glucocinasa</i>	Imidazole	7.75	340	Tranulis <i>et al.</i> (1996)
<i>Piruvato Cinasa</i>	Glicina	7.5	340	Morales <i>et al.</i> (1990)
<i>Fructosa 1,6-bifosfatasa</i>	Imidazole	7.4	340	Morales <i>et al.</i> (1990)
<i>Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa</i>	Imidazole	7.7	340	Bautista (1988); Morales <i>et al.</i> (1990)
<i>6-Fosfogluconato deshidrogenasa</i>	Imidazole	7.7	340	Morales <i>et al.</i> (1990)
<i>ALAT (U/l)</i>	Imidazole	7.4	340	Morales <i>et al.</i> (1990)
<i>ASAT (U/l)</i>	Imidazole	7.4	340	Morales <i>et al.</i> (1990)

1.4.8. Estadística

Para analizar los valores en las tres estaciones del año, se aplicaron las pruebas de homocedasticidad de la variancia de Hartley, Cochran y Barlett. El peso y longitud, presentaron normalidad y homogeneidad, por lo se aplicó un ANDEVA prueba de Tukey de una vía con un valor de significancia de $p < 0.05$. Glucosa y glucógeno, enzimas digestivas y del metabolismo intermediario, no presentaron homogeneidad de varianza de manera que se aplicó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis con una valor de significancia de $p < 0.05$ (Daniels, 2002).

I.5.Resultados

I.5.1. Variación de las tallas y metabolitos en las diferentes épocas del año

Los peces más grandes se encontraron durante la época de Nortes (2013), estos juveniles también presentaron los pesos más grandes con respecto a las otras estaciones del año. Sin embargo, para la época de secas del año siguiente (2014), los peces encontrados fueron los de menor talla (Tabla 2). Estas diferencias fueron significativas (260 ± 9 y 88 ± 10 g, respectivamente; $p < 0.05$).

Tabla 2. Peso (g) y longitud total (cm) de juveniles silvestres de *E. morio*, capturados en tres épocas de año (Lluvias, Nortes y Secas).

	Peso (g)	Longitud total (cm)
Julio 2013 Lluvias n=14	147 ± 10^b	22.5 ± 4^b
Noviembre 2013 Nortes n=20	260 ± 9^a	26 ± 4^a
Mayo 2014 Secas n=13	88 ± 10^c	19 ± 4^c

Valores promedio \pm ES Prueba de Tukey ANDEVA de una vía. Valores con superíndice distintos dentro de cada columna, indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

La glucosa en épocas de secas mostró el valor promedio significativamente más alto (50.9 ± 2.9 mg/dL). Durante la época de lluvias se obtuvo un valor promedio de 39.3 ± 2.8 (mg dl⁻¹), que fue significativamente mayor al obtenido en la época de nortes (23.28 ± 4.7 mg dl⁻¹), ($p < 0.05$) (Tabla 3).

Tabla 3 Glucosa en plasma (mg dl⁻¹) y glucógeno en hígado (mg g⁻¹hígado), en juveniles silvestres de *E. morio* en época de nortes, secas y lluvias ($p < 0.05$, \pm ES).

Época	Glucosa (mg dl ⁻¹)	Glucógeno (mg g ⁻¹ hígado)
Lluvias	39.3 ± 2.8^b n=14	60 ± 7.8^a n=11
Nortes	25.6 ± 2.3^b n=20	69.4 ± 6.7^a n=15
Secas	50.9 ± 2.9^a n=13	48 ± 7.2^a n=13

Valores promedios \pm ES. Prueba de ANDEVA UNA VIA $P < 0.05$

El glucógeno en los juveniles silvestres no fue diferente entre las tres épocas del año. En la época de “nortes” se encontró el mayor valor del glucógeno (69 ± 33.0 , mg g⁻¹hígado), mientras que en la época de lluvias se obtuvo el valor más bajo (48 ± 16 , mg g⁻¹hígado).

1.5.3. Enzimas digestivas de juveniles silvestres de *E. morio* del medio natural en diferentes épocas del año.

La actividad de la α -amilasa mostró los valores significativamente más elevados en los ciegos pilóricos que en los intestinos durante las tres épocas del año ($p < 0.05$). La α -amilasa en ciegos pilóricos no tuvo diferencias entre las épocas del año ($p > 0.05$). Sin embargo, se encontró una mayor actividad de la α -amilasa en los intestinos con respecto a los ciegos pilóricos durante la época de nortes siendo significativa (88.7 ± 57 U mg^{-1} proteína; $p < 0.05$).

La glucosidasa presentó la mayor actividad en los ciegos pilóricos y durante la época de nortes (179.0 ; m U mg^{-1} proteína) ($p < 0.05$), la menor actividad de la α -glucosidasa se presentó en la época de lluvias (112 ± 23.9 ; mU mg^{-1} proteína) (Tabla 4).

Tabla 4. Actividad enzimática específica (U mg^{-1} proteína) de α -amilasa y α -glucosidasa (mU mg^{-1} proteína) en los juveniles silvestres del medio natural de *E. morio*. Kruskal Wallis ($p < 0.05$; promedio \pm ES).

	α -Amilasa (U mg^{-1} proteína)		α -Glucosidasa (mU mg^{-1} proteína)		
	Ciegos pilóricos	Intestinos	Ciegos pilóricos	Intestinos	
Nortes n=14	519 ± 101^a	88.7 ± 57^a	179 ± 24^a	63 ± 30^a	n=7
Lluvias n=20	484 ± 101^a	43 ± 24^b	112 ± 23.9^b	36 ± 12.9^a	n=7
Secas n=13	488 ± 101^a	44 ± 31^b	161 ± 23.9^{ab}	77 ± 32.5^a	n=6

Valores promedio \pm ES, Prueba No Paramétrica Kruskal Wallis ($p < 0.05$).

1.5.4. Enzimas del metabolismo intermediario de los juveniles silvestres de E. morio del medio natural en nortes, lluvias y secas.

La PK no mostró diferencias significativas durante las tres épocas del año ($p > 0.05$). La FBPasa presentó mayor actividad específica en la época de lluvias ($79.0 \text{ mU mg}^{-1} \text{ proteína}^{-1}$), sin embargo, no se detectaron diferencias significativas entre las tres épocas del año. La actividad de la G6P-DH solo varió de 11.0 en lluvias a 9.5 en nortes, $\text{mU mg.proteína}^{-1}$, respectivamente, ($p > 0.05$). La 6PG-DH presentó la mayor actividad en nortes y la menor actividad en secas (9.0 y $8.0 \text{ U mg}^{-1} \text{ proteína}$, respectivamente) (Tabla 5).

Tabla 5. Actividad enzimática específica ($\text{U mg}^{-1} \text{ proteína}$) de FBPasa, G6P-DH y 6PG-DH, en los juveniles silvestres del medio natural de *E. morio*. Kruskal Wallis ($p < 0.05$; promedio \pm ES).

	PK	FBPasa	G6P-DH	6PG-DH
Lluvias	6.0 ± 0.5^a	79.0 ± 11^a	11.0 ± 2^a	8.0 ± 1^a
Nortes	4.9 ± 0.5^a	65.0 ± 11^a	9.5 ± 2^a	9.0 ± 2^a
Secas	2.0 ± 0.5^a	63.0 ± 11^a	10.3 ± 2^a	8.0 ± 2^a

Valor promedio \pm ES. n=6. Prueba No Paramétrica Kruskal Wallis ($p < 0.05$)

I.6. Discusión

I.6.1. Peso y talla de juveniles silvestres de E. morio en tres épocas del año.

Los serránidos son estrategas K, tienen un crecimiento lento, madurez sexual tardía, y larga vida. Los serránidos presentan una distribución batimétrica que está en función de los cambios ontogénicos de la especie. Los huevos pelágicos eclosionan como larvas formando parte del zooplancton. Después, como juveniles, buscan sitios de refugio y se reclutan en zonas litorales someras, generalmente en presencia de pastos marinos donde se alimentan y crecen (Sadovy y Eklund, 1999). Las poblaciones encontradas en las costas adyacentes a Sisal representan organismos juveniles que han llegado a estos hábitats para alimentarse y buscar refugio. Los juveniles encontrados durante la época de lluvias del 2013 permanecieron en estas costas alimentándose y creciendo, por lo que en el mes de nortes los peces encontrados fueron los de mayor talla (Tabla 2). Para el siguiente año, durante la época de secas en mayo, los peces encontrados quizás fueron de una nueva población que recientemente llegó a reclutarse en estas costas, por lo que los juveniles presentaron tallas menores (Tabla 2). Se ha determinado que el patrón de distribución de *E. morio* es batimétrico y se encuentra muy relacionado con sus cambios ontogénicos. Estos peces permanecen en la zona costera como juveniles de 60 a 130 días de edad, creciendo y alimentándose hasta alcanzar su madurez sexual (41.0 cm a 85.4 Lf) Randall 1993; Brulé *et al.*, 1999; Renan *et al.*, 2003;). De acuerdo a estos estudios, es posible que los peces encontrados en nortes y lluvias del año 2013, pertenecían a poblaciones similares reclutadas en el mismo periodo, y que los peces encontrados en la época de secas del 2014 fueron de otro periodo de reclutamiento.

Aunque las diferencias en los valores de glucógeno no fueron significativas durante las tres épocas, es en nortes donde se encontró el mayor valor; quizás los juveniles de la época de lluvia, estuvieron acumulando energía en forma de glucógeno (Tabla 3). Diversos trabajos sobre hábitos alimenticios de *E. morio* reportan que durante la época de lluvias es posible encontrar a las presas preferenciales de estos peces en mayor abundancia. Al respecto, Brulé (1993), analizó las variaciones estacionales del contenido estomacal de los juveniles de *E. morio* en Progreso, Yucatán encontrando que la frecuencia de presas fue mayor en el periodo

cálido y lluvioso (mayo a octubre). Asimismo, reportó que independientemente de la época del año, las presas más frecuentes fueron los crustáceos.

Los peces de la época de nortes, con mayor contenido de glucógeno, se encontraban acumulando energía necesaria para entrar a su periodo reproductivo. Los individuos que viven en ambientes con una marcada estacionalidad deben resolver varios problemas energéticos para sobrevivir y prepararse para los estados reproductivos. Además de sobrevivir a las fluctuaciones ambientales, los juveniles deben hacer frente a las variaciones en el alimento, generando estrategias para adquirir y almacenar energía para su crecimiento, depredación y para los desplazamientos estacionales (Post, 2001).

No se detectaron diferencias significativas en los niveles de glucosa entre las poblaciones de lluvias y nortes, sin embargo, en los juveniles de menor talla encontrados en época de secas, los valores fueron significativamente mayores.

1.6.2. Actividad de α -amilasa y α -glucosidasa de juveniles silvestres de *E. morio* en tres épocas del año.

Se observó mayor actividad de amilasa en los ciegos pilóricos que en los intestinos, mientras que no se detectaron diferencias significativas a nivel de ciegos pilóricos entre las épocas del año, y en cambio, en los intestinos, se encontró la mayor actividad en los nortes (88.7 ± 57 U mg^{-1} proteína). Esta actividad podría estar relacionada con la mayor cantidad del glucógeno en las tres épocas (69.4 ± 6.7 mg g^{-1} hígado). Un proceso similar ocurre en la actividad de la glucosidasa, encontrando el valor más alto durante la época de nortes, siendo esta diferencia significativa; quizás esta actividad de la glucosidasa de como resultado una mayor concentración de glucógeno en la época de nortes, apoyando la idea de que en este periodo los juveniles se encontraban acumulando reservas energéticas para su periodo reproductivo y para llevar a cabo sus movimientos estacionales.

1.6.3. Actividad de las enzimas reguladoras del metabolismo intermediario en función a la disponibilidad del alimento en el medio natural de juveniles silvestres de E. morio en tres épocas del año.

Brulé (1991), determinó la variación temporal del régimen alimenticio en juveniles de *E. morio* en las costas de Progreso, Yucatán. Encontró que los equinodermos y los estomatópodos fueron individuos que estuvieron presentes únicamente en la época de nortes. El autor reporta los índices más altos de frecuencia de ocurrencia de las presas preferenciales (decápodos) en la época de lluvias y secas. *E. morio* es un pez omnívoro, que presenta una gran variedad de presas en su dieta, y quizás esta plasticidad le ha permitido, durante el periodo de nortes, comer las presas más abundantes (como equinodermos y estomatópodos) que le han permitido acumular glucógeno a partir de glucosa vía glucólisis, disminuyendo la ruta gluconeogénica. Sin embargo, a pesar de encontrar diferencias significativas en la glucosidasa, encargada de romper los disacáridos a monosacáridos, en las enzimas del metabolismo intermediario no se encontraron diferencias entre las tres épocas de año. Las poblaciones de *E. morio* que viven en ambientes con variaciones estacionales, deben resolver varios problemas para sobrevivir a la primera reproducción, para asegurar el éxito de reproductivo. Además de enfrentar fluctuaciones en los alimentos, los juveniles deben destinar energía para el crecimiento y acumular la mayor cantidad de ésta para periodos de escasez en los recursos (Rogers y Smith 1993). Probablemente, los meros, al ser peces oportunistas y tener esta amplia gama de presas, han podido resolver metabólicamente las deficiencias alimenticias generadas por las variaciones estacionales de sus presas preferenciales (decápodos). Además, *E. morio*, al ser depredador tope poco especializado, y que en el medio natural pueden comer una amplia gama de presas obteniendo la glucosa principalmente de vía gluconeogénica, a pesar de no encontrar sus presas preferidas, es capaz de mantener la glucosa dietética para producir ATP, por vía gluconeogénica, y por lo tanto, enzimas como la FBPasa no tienen actividad significativamente diferente en las tres épocas del año. Sin embargo, la FBPasa presenta mayor actividad que enzimas como la PK, involucrada en le glucólisis.

La PK que es la enzima que interviene en la vía de la glucólisis, y no mostró diferencias significativas a lo largo del año, al igual de las enzimas de la ruta de las pentosas fosfato la G6P-DH y la 6PG-DH (Tabla 5), que no presentaron diferencias en las tres épocas del año.

Estas son evidencias que sugieren que el mero rojo en el medio natural tiene más activa la ruta gluconeogénica, por la cual obtiene energía de la glucosa que entra por estas vías metabólicas para producir ATP, y por tanto, las enzimas involucradas en la glucólisis como la PK, tienen menor actividad (Tabla 5) ya que representan una vía poco utilizada cuando los peces se encuentran en el medio natural y disponen de una dieta rica en proteínas provenientes de sus presas preferidas como decápodos, moluscos y otros peces.

I.7. Conclusiones

1. Los juveniles de *E. morio* en la época de lluvias, fueron creciendo hasta la época de nortes donde se encontraron las tallas mayores. Los peces de lluvias y nortes son aparentemente del mismo reclutamiento en estas zonas costeras, mientras que en secas los juveniles encontrados parecen pertenecer a un segundo reclutamiento.
2. Con base en los resultados obtenidos, es posible sugerir que los peces de lluvias y nortes (los de mayor talla) se alimentaron en la zona acumulando glucógeno como reserva, para después migrar a aguas más profundas para reproducirse. Además, es durante nortes que los juveniles acumularon reservas por la gran disponibilidad de alimento proveniente de la época de lluvias, ya que es en nortes donde se encontró la mayor cantidad de glucógeno. Es durante la época de lluvias donde es posible encontrar la mayor abundancia de presas preferenciales de *E. morio*, a pesar de no presentar diferencias significativas en las enzimas digestivas, es en época de nortes donde se encontró la mayor actividad de α -amilasa y α -glucosidasa, asociado a los valores de glucógeno más altos.
3. No se detectaron variaciones en la actividad de las enzimas reguladoras del metabolismo intermediario entre las tres épocas de año. Sin embargo, es durante la época de lluvias en donde se encuentran los valores más altos de la FBPasa y la PK, que pueden estar asociados a que es en lluvias donde existe mayor disponibilidad de las presas de *E. morio*

Capítulo II

Ensayo preliminar para determinar el efecto de las fuentes de carbohidratos en alimentos para juveniles de *E. morio*.

II.1.Introducción

II.1.1.Estructura y composición de los almidones.

El almidón es la molécula de reserva energética en las plantas superiores: La síntesis de esta molécula sucede en los amiloplastos, dentro de los plastidios, a partir de la fijación del dióxido de carbono y agua, hasta formar grandes cadenas que pueden llegar a tener hasta 2,000 ó 3,000 unidades de glucosa (Gómez, 2003). Este polisacárido está formado por dos moléculas, la amilosa y la amilopectina, que a nivel macroscópico están organizadas en partículas discretas formando gránulos. Los gránulos son insolubles en agua a temperatura ambiente y presentan anillos concéntricos formados por regiones amorfas y regiones cristalinas (Badui-Dergal, 2006). El gránulo presenta un punto llamado *hilum* del cual se originó la polimerización de la amilosa y la amilopectina; esta estructura puede estar en el centro o en la periferia del gránulo. La forma que presentan los gránulos puede variar dependiendo de la planta que lo sintetizó; pueden existir gránulos redondos, irregulares, lenticulares, poliédricos, poligonales y lenticulares (Jane, 1994).

La amilosa es una molécula formada por unidades de glucosa unidas por enlaces α -D-(1-4), y cada seis unidades de glucosa, la molécula se curva formando una hélice. Esta molécula presenta un grado de polimerización de 100 a 1,000 unidades de glucosa. La amilosa se encuentra distribuida en la periferia del gránulo, la amilosa puede presentar algunas ramificaciones (Badui-Dergal, 2006) (Figura 4).

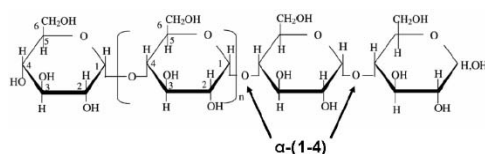


Figura. 4. Estructura química de la amilosa (Tester y Karkalas, 2002).

La amilopectina es una molécula ramificada, ya que posee enlaces α -D-(1-4) y en cada ramificación enlaces α -D-(1-6), mismos que representan sólo el 5-6%. Cada rama forma la parte lineal de esta molécula y tiene de 20 a 30 glucosas; cada 10 ó 12 glucosas se forma una nueva ramificación. Debido a su estructura ramificada posee mayor exposición de enlaces α -D-(1-4) –glucosídicos, a diferencia de la amilosa que presenta una estructura helicoidal, y por lo tanto, menor exposición de estos enlaces; la amilopectina presenta un grado de polimerización de 40,000 unidades de glucosa. Esta molécula se encuentra distribuida de manera radial en el gránulo, las ramificaciones externas llegan a la periferia del gránulo donde se mezclan con la amilosa, formando una red de menor grado de susceptibilidad a la hidrólisis generando una menor digestibilidad (Kearsley, 1995). La forma y distribución de la amilopectina ha sido ampliamente estudiada ya que representa la mayor parte del gránulo, además, su estructura y complejidad le confiere al almidón características específicas (Figura 5)

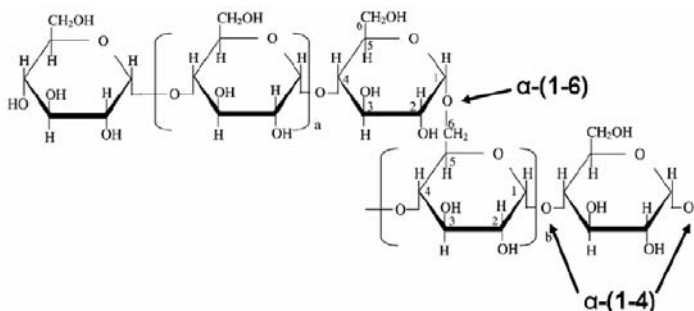


Figura 5. Estructura química de la amilopectina. (Tester y Karkalas, 2002).

La amilopectina presenta 3 polimorfismos de empaquetamiento: el A, en el que las dobles hélices de la amilopectina están empaquetadas en forma monocíclica y contienen de 4-8 moléculas de agua; están presentes en la mayoría de los cereales y en algunos tubérculos como yuca y camote. El polimorfismo B, presenta las dobles hélices empaquetadas en forma hexagonal y tiene 36 moléculas de agua; se encuentra presente en el almidón de papa. El polimorfismo C, presenta ambos polimorfismos, y se encuentra presente en el almidón de leguminosas (Buleon et al., 1998; Imberty et al., 1991) (Figura 6).

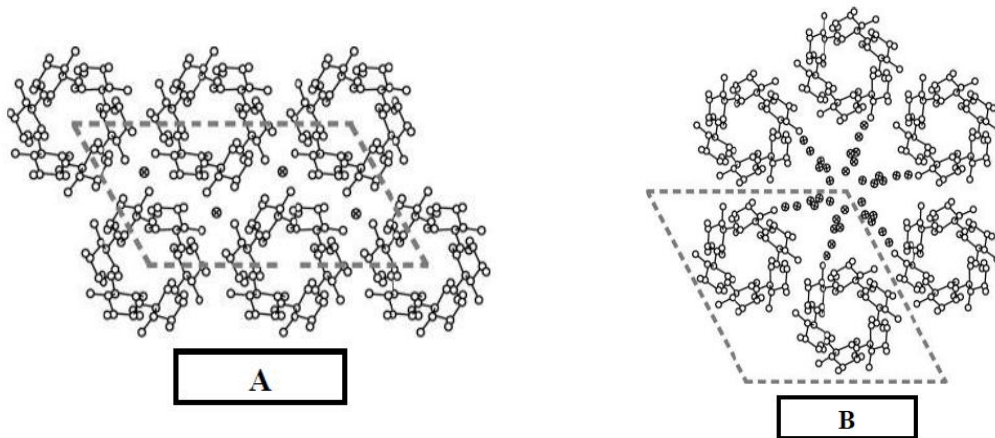


Figura 6.Empaquetamiento de las dobles hélices de la amilopectina, mostrando los 3 diferentes polimorfismos (Gallant *et al.*, 1997).

El gránulo de almidón presenta zonas amorfas y cristalinas alternadas. La región amorfa presenta la mayor cantidad de enlaces α -D-(1-6) y está formada por ramificaciones de la amilopectina y por la amilosa. La zona cristalina está conformada por las ramificaciones de la amilopectina que forman dobles hélices, de manera que la amilosa permanece amorfa en el gránulo difundida entre la amilopectina (Jane, 2006) (Figura 7).

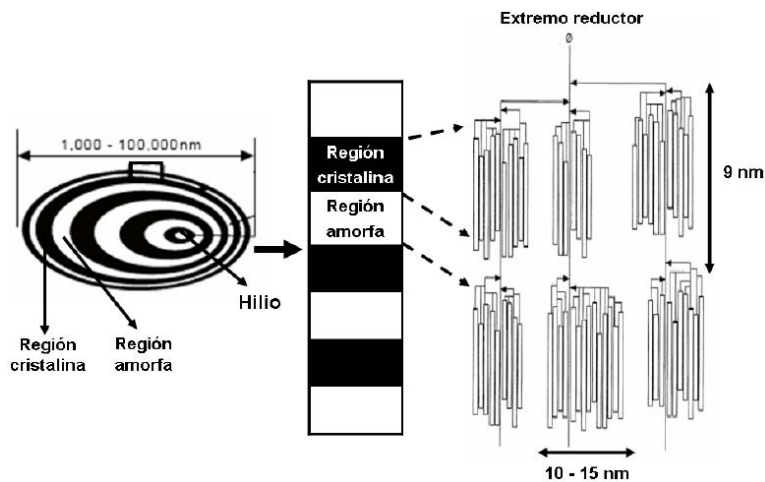


Figura 7. Estructura del gránulo de almidón (Tester y Debon 2000; Bernal y Martínez 2006)

Tabla 6. Características morfológicas de los gránulos de almidón de maíz, trigo y papa. (Bello – Pérez y Paredes-López, 1999).

Almidón	Gránulo	Superficie	Tamaño (μm)	Distribución	Gelatinización (C°)	Amilosa: Amilopectina
Maíz	Poliédrico y esférico	Rugosa	5-30	Unimodal	62-70	27:73
Trigo	Lenticular	-	2-38	Bimodal	53-65	24:76
Papa	Esférico	Lisa	5-100	Unimodal	58-63	22:78

Los gránulos de almidón contienen otros componentes que se encuentran en menor cantidad, entre ellos se encuentran las proteínas, lípidos y minerales (Figura 8).

Tabla 7. Composición química de algunos gránulos de almidón (Paredes et al., 1990; Tomas y Atwell 1999)

Fuente	Humedad (%)	Carbohidratos (%)	Proteínas (%)	Lípidos (%)	Cenizas (%)
Arroz	15	83.15	0.45	0.8	0.5
Maíz	13	85.92	0.35	0.6	0.1
Trigo	14	84.59	0.4	0.8	0.15
Sorgo	13	85.92	0.3	0.7	0.08
Papa	19	80.41	0.06	0.05	0.4
Tapioca	13	86.59	0.1	0.1	0.2
Amaranto	6	92.10	0.1	0.4	1.4
Plátano	12.6	80.27	2.03	2.2	1.3

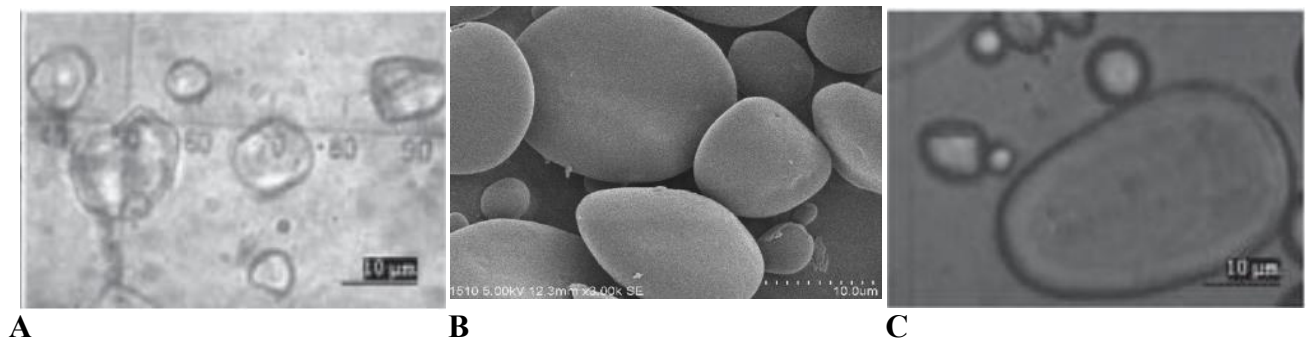


Figura 8. Forma y tamaño (promedio y desviación estándar) de gránulo de almidón A) almidón de maíz ($12.7 \mu\text{m} \pm 5.6$), almidón de trigo (bimodal: largos $> 10 \mu\text{m}$ y pequeños $< 10 \mu\text{m}$) almidón de papa ($15.2 \mu\text{m} \pm 10.6$), (Medina J. Zen que et al 2014), (Tao et al, 2016).

II.1.2.Utilización de almidones en los alimentos para peces.

Los almidones son utilizados en los alimentos balanceados para peces con el objetivo del ahorro de proteína en el alimento, en especial en peces con gran importancia económica y que consumen alta cantidad de proteína como los carnívoros *S. aurata*, *D. labrax*, *D. dentex*, *O. mykiss* y *S. salar* (Aknes 1995; Lin *et al.*, 1997; Ruohonen *et al.* 2003; Enes *et al.*, 2006; Kumar *et al.*, 2008; Fernández, 2011). Sin embargo, el porcentaje de inclusión de los carbohidratos ha sido pobremente estudiado en peces, ya que varía entre especies y entre estados ontogénicos. Las primeras aportaciones a los estudios sobre el uso de carbohidratos dietéticos establecieron un adecuado nivel que es necesario para reducir el catabolismo de las proteínas y lípidos, para la producción de energía (Wilson, 1994, Moon, 2000). Wilson (1994) señaló que la digestibilidad de los carbohidratos depende también de la complejidad de este nutriente y de los hábitos alimenticios de los peces. Por ejemplo. los peces omnívoros muestran mejores índices de digestibilidad del almidón que peces carnívoros. Los carbohidratos más simples, como la dextrina maltosa o glucosa, son digeridos más rápido que los carbohidratos de mayor peso molecular. El almidón de maíz y trigo han sido ampliamente

utilizados en la formulación de alimentos para peces como *S. aurata*, *D. labrax*, *O. mykiss* y *S. salar* (Aknes 1995; Lin et al., 1997; Ruohonen et al. 2003; Enes et al., 2006; Kumar et al., 2008; Fernández, 2011).

Diversos trabajos han determinado que los peces de agua dulce y tropicales presentan una mejor eficiencia para digerir los carbohidratos, a diferencia de los peces marinos o de agua templada (Shimeno et al., 1977; Hofer y Sturmbauer, 1985). Esta diferencia puede estar relacionada con la cantidad relativa de amilasa presente en el sistema digestivo de varias especies. Por ejemplo, en especies herbívoras la digestión de carbohidratos es mucho más alta ya que presentan mayor actividad de enzimas como la amilasa. Chiou and Ogino (1975) reportaron valores de digestibilidad en carpa, de 85% para el almidón cocinado de papa y de 55% para el almidón crudo de papa. La digestibilidad del almidón cocinado disminuyó conforme se incrementó el nivel de inclusión del mismo en alimentos para bagre. El bagre (Wilson y Poe, 1985) y la tilapia del Nilo (Popma, 1982) mostraron digerir más del 70% de la energía del almidón de maíz crudo. Cruz (1975) mostró que el almidón cocinado era 12.1% más digestible que el almidón crudo cuando ambos eran ofrecidos en un 30% de inclusión en alimentos para el bagre. Shimeno *et al.*, (1977) encontraron que la actividad de la amilasa en el sistema digestivo de la carpa era 80 veces más alta que en la especie *Seriola quinqueradiata*. Hofer and Sturmbauer (1985) reportaron que la actividad de la amilasa en el tracto digestivo de la carpa era de 10 a 30 veces mayor que en la trucha.

II.1.3.Mecanismo de acción de las carbohidrasas

Las carbohidrasas en peces presentan mayor actividad en la región del duodeno, en los ciegos pilóricos y en el páncreas (Hidalgo y Alliot, 2003). Las carbohidrasas pueden dividirse funcionalmente en polisacaridasas y glucosidasas. Las polisacaridasas hidrolizan los enlaces glucosídicos de los carbohidratos de cadena larga como el almidón y el glucógeno. La más común es la α -amilasa (EC. 3.2.2.3), que hidroliza todos los enlaces α 1-4 glucosídicos de la parte lineal de la molécula del almidón, produciendo disacáridos como la maltosa. En cambio, un tipo de α -glucosidasa actúa sobre la amilopectina rompiendo los enlaces α 1-6 glucosídicos de las porciones ramificadas, liberando así disacáridos. Finalmente la α 1-4 glucosidasa (EC 3.2.1.4), romperá estos disacáridos para producir glucosa lista para ser integrada al

metabolismo de los carbohidratos (Lehninger, 1995) (Figura 9). Las carbohidrasas presentan su mayor actividad en valores de pH que van de 7 a 9. En el páncreas se ha encontrado la mayor actividad de estas enzimas digestivas.

En el presente trabajo se determinará la actividad de estas dos enzimas: la α -amilasa y la α 1-4 glucosidasa.

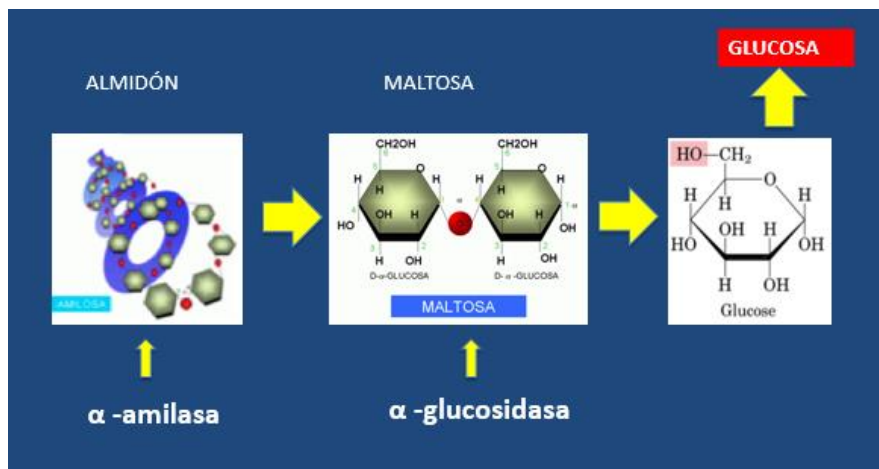


Figura 9. Mecanismo de acción de la α -amilasa y la α -glucosidasa.

Entre los trabajos realizados en enzimas digestivas, destaca el de Moyano (2002). Él caracterizó la actividad de la α -amilasa en 5 especies de espáridos del mediterráneo. El autor encontró la mayor actividad específica en la especie considerada herbívora (40.9×10^3 U mg⁻¹ de proteína) y la menor actividad en las especies carnívoras *P. pagrus* y *D. annularis* (9.5×10^3 y 6.2×10^3). En particular, en *E. morio*, Castillo (2011) encontró en ciegos pilóricos la mayor actividad específica de la α -amilasa en lluvias, nortes y secas (2.75 , 1.79 y 0.87×10^3 U mg⁻¹ de proteína, respectivamente). Estos resultados demostraron la presencia de la actividad de la α -amilasa en *E. morio*. De acuerdo a la clasificación de Moyano, *E. morio* se podría clasificar como un pez carnívoro, en vista de su baja actividad de α -amilasa, comparado con otros peces herbívoros. (Fernández y Moyano, 2002).

Kumar (2008) menciona que las variaciones en la actividad de las enzimas como la α -amilasa y α -glucosidasa, la glucosa en plasma y las enzimas del metabolismo intermediario pueden

ser un potencial indicador en la selección apropiada de la fuente de carbohidratos y tipos de almidones para la formulación de alimentos para la nutrición de los organismos, por lo que en el presente capítulo se determinó la actividad de estas enzimas digestivas con diferentes fuentes de almidones, así como indicadores metabólicos, como la glucosa y el glucógeno, para determinar la utilización digestiva de estos carbohidratos dietéticos en *E. morio*.

II.2.Hipótesis

E. morio en el medio natural presenta actividad de la α -amilasa y la α -glucosidasa en intestino y ciegos pilóricos (Castillo 2011). Estas enzimas digestivas actúan sobre los enlaces α -D-(1-4)-glucosídicos. Dependiendo de la forma, tamaño de gránulo y proporción de amilosa:amilopectina en los gránulos de almidón se espera un incremento en la actividad de estas enzimas y una mejor asimilación del almidón destinado para crecimiento y almacenamiento en peces alimentados con almidones que tengan mayor disponibilidad de enlaces α -D-(1-4)-glucosídicos.

II.3.Objetivos específicos.

4. Evaluar la actividad de la α -amilasa y la α -glucosidasa en ciegos pilóricos e intestino de juveniles silvestres de *E. morio* alimentados con almidones crudos de maíz y trigo, de diferentes tamaños de gránulo de almidón (maíz 5 a 25 μ m, trigo 2-38 μ m).
5. Evaluar la actividad de la α -amilasa y la α -glucosidasa con almidones de maíz y trigo, en su forma cruda y tratados por el proceso de gelatinización, en ciegos pilóricos e intestino de los juveniles silvestres de *E. morio*.
6. Evaluar la glucosa en sangre y el glucógeno en hígado de juveniles silvestres de *E. morio* alimentados con los almidones crudos y gelatinizados de maíz y trigo.
7. Evaluar la actividad de las enzimas reguladoras del metabolismo intermediario en organismos alimentados con alimentos que contienen o no almidón.

II.4. Metodología

II.4.1. Obtención de los organismos.

Se capturaron 200 juveniles silvestres de *E. morio* en las costas adyacentes a Sisal, a bordo de una lancha de motor fuera de borda de 40 Hp, utilizando como arte de pesca cordel y anzuelos.

Los juveniles fueron transportados en un Rotoplas de 1,000 L a la Unidad Académica Yucatán (UAY), y tuvieron aireación constante durante el viaje.

Al llegar a la UAY, fueron colocados en tanques circulares de 1,000 L para su de su aclimatación y disminuir el estrés de la captura. Se les proporcionó un alimento de mantenimiento (Tabla 11) y permanecieron en estos tanques durante 15 días.

II.4.2. Estanques y sistema de circulación

A los 15 días de ser capturados, los peces fueron transportados al sistema experimental. Los peces fueron seleccionados según un rango de peso 100g- 300g. El sistema experimental consistió en 15 tanques circulares de 500 L con un circuito cerrado de circulación de agua. Este sistema experimental está adaptado al sistema Noruego de recirculación, donde la calidad de agua es uniforme y existe la posibilidad de manipular la velocidad del agua de manera independiente del caudal. Los sistemas de aireación y recirculación fueron constantes con un Blower de 2HP. La recirculación de agua en los tanques se mantuvo en 30 veces/día, por medio de una bomba hidráulica marca Vertex de 115 V con potencia de 1.5 HP (Figura 10).

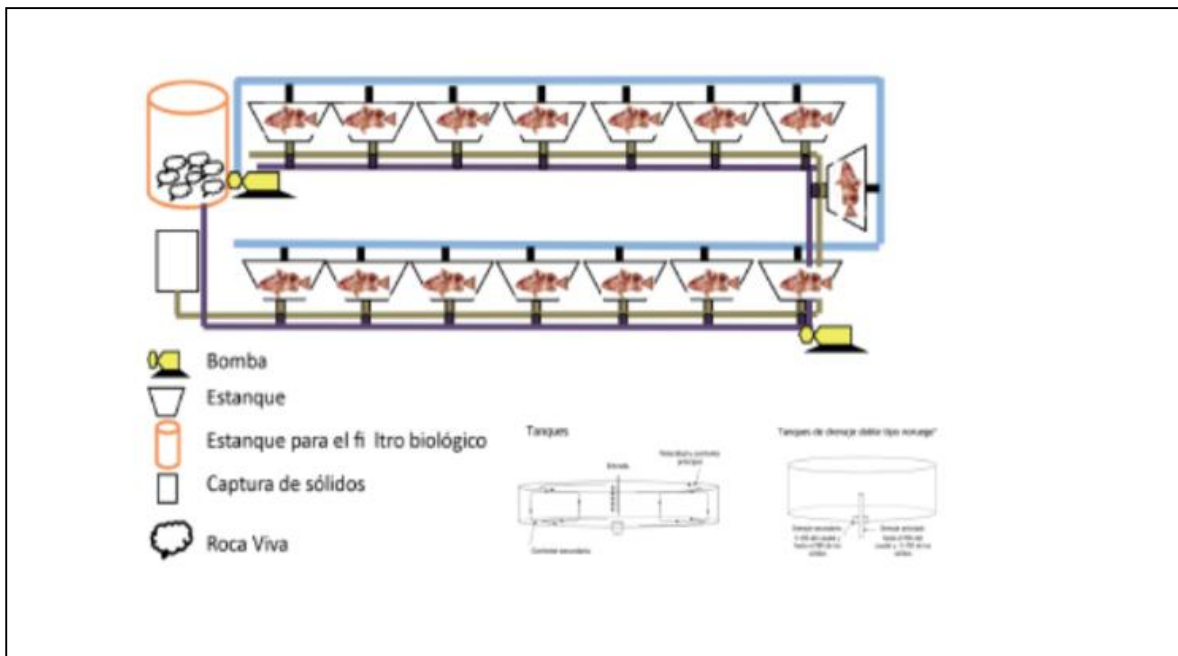


Figura 10. Sistema experimental de recirculación utilizado en los bioensayos nutricionales. Dispositivo experimental del sistema de circulación.

II.4.2. Alimento de mantenimiento.

Tabla 8. Cantidades y composición en ingredientes establecidos para el alimento de mantenimiento de los juveniles *E. morio*, utilizado durante su el periodo de aclimatación. La formulación del alimento (Silva, 2010).

DIETA DE MANTENIMIENTO	
INSUMO	PORCENTAJE DE INCLUSIÓN (%)
CPSP ¹	3.6
Concentrado proteico de soya ²	7.2
Carboximetil celulosa ³	0.7
Pasta de soya ⁴	5.7
Gluten de trigo ⁵	7.2
Almidon de trigo ⁶	6.5
Harina de pescado ⁷	31.5
Vitamina y minerales ⁸	1.4
Calamar ⁹	36.2
Total	100
<i>Análisis Proximal</i> (g/100 g de materia seca, valores teóricos)	
Proteína	56.4
Lípidos	4.2
Fibra	10

¹Concentrado proteico soluble de pescado (CPSP Sopropeche, Boulogne s/mer, Francia); PROFINE
²Concentrado proteico de soya (VIMIFOS, México); ³Carboximetilcelulosa (DROSADA S.A. de C.V., México);
⁴Pasta de Soya (AGYDSA Jalisco), ⁵Gluten de trigo (Gluten y almidones comerciales S.A de C.V, México);
⁶Almidón de Trigo (Gluten y almidones comerciales S.A de C.V, México), ⁷Harina de Pescado (Proteínas Marina y Agropecuarias S.A. de C.V. Guadalajara, Jalisco), ⁸Vitaminas y Minerales ROVIMIX STAY C-35 (Importado por ROCHE VITAMINAS Guadalajara, Jalisco) Composición: vit A: 1.200.00 IU: vit B1: 4,800 mg: vit. B12: 4,800 mg: vit B6: 4,800 mg: vit D3: 200,00IU: vit, K3: 2,400 mg: ácido fólico 1,200 mg; biotin: 48 mg; pantotenato de calcio: 12,000 mg: cloruro de colina 108 g; niacina 24, 000 mg; selenio: 100 mg; yodo:10mg: cobalto: 10 mg:cobre: 3,000 mg: hierro 50,000 mg; magnesio: 20,000 mg; zinc: 30, 000 mg; vehiculo 1,00g; antioxidantes: 25 g. ; ⁹Calamar Fresco (Sisal Yucatán).

II.4.3.-Alimentos experimentales.

Para elaborar el alimento experimental se utilizaron las mejores fuentes de proteína, seleccionadas previamente en experimentos de digestibilidad aparente *in vivo* y de digestibilidad *in vitro* para la especie *E. morio* (Silva *et al.*, 2010). Este alimento contenía 45% de proteína, 6% de lípidos y 15% de carbohidratos. Estos últimos, provenientes de diferentes fuentes de almidones: almidón de maíz crudo (AMC), almidón de maíz gelatinizado (AMG), almidón de trigo crudo (ATC), almidón de trigo gelatinizado (ATG). El alimento control o de referencia (REF) contenía talco como ingrediente de relleno, sustituyendo el porcentaje del almidón a probar (Tabla 9).

En esta dieta fue utilizada la canola tratada con fitasa para romper factores antinutricionales de este alimento. Para tratar la harina de canola con fitasa se dejó incubando la harina durante 3 hrs con movimiento continuo en una proporción de 1:20 (harina:agua), con una cantidad de enzima fitasa de 1.6 U/g (Ronozyme P5000 CT). Después de esta incubación la harina se dejó secar a 60 °C por 12 horas (Nwanna *et al.*, 2007 citado por Gamboa 2011).

Para gelatinizar los almidones se hidrataron los almidones en una proporción de 1:4 (agua :almidón), y se colocó en el horno de microondas para cocinar por 10 minutos, hasta observar el cambio de opaco a transparente durante la gelatinización de los almidones.

Elaboración de los alimentos.

Todos los ingredientes fueron tamizados a 500 μ . Los macronutrientes (harinas, aceite) fueron pesados en una balanza (5 k L- EQ Series TOR REY NL:), los micronutrientes (vitaminas, aminoácidos) pesados en una balanza granataria OAHUS Explorer, cada alimento por separado.

Dentro de una mezcladora para 5 k (L-EQ Serua TOR REY) Se mezclaron los macroingredientes colocando en el orden siguiente: Harina de pescado, CPSP, Pasta de Soya, almidón crudo (según el tratamiento maíz o trigo), los almidones gelatinizados se mezclaron al final. La carboximetilcelulosa fue mezclada con agua caliente e incorporada al final de la

mezcla. Los micronutrientes fueron mezclados en una mezcladora Kitchen aid ultra power para 2 k. Al final los micronutrientes mezclados fueron incorporados a la mezcladora de los macronutrientes. Se agregó del 15% al 20% agua. La mezcla se extruyó posteriormente a través de un molino de carne (División maquinaria S.A. de C.V. TOR REY, NL. Los pellets fueron almacenados en un refrigerador a -20 °C.

Se alimentó a los juveniles de *E. morio* dos veces al día (9:00 y 16:00 h), proporcionando una cantidad equivalente al 3% del promedio de la biomasa por tanque (10 individuos). Se utilizaron 3 tanques para cada alimento, de manera que 30 juveniles conformaron el lote de cada tratamiento. En total se alimentaron 150 juveniles de *E. morio* durante todo el experimento, mismo que tuvo una duración de 61 días. Al finalizar el experimento se sacrificaron 10 individuos por tratamiento, seleccionándolos de manera aleatorizada, para los análisis bioquímicos y metabólicos.

Tabla 9. Composición en ingredientes de alimentos que contienen diferentes fuentes de almidón maíz crudo (AMC), almidón de maíz waxy (AMW), papa crudo (APC), y papa gelatinizado (APG)], y un alimento de referencia, sin almidón (REF).

Tratamiento experimental con 45% proteínas, 6% lípidos y 15% de carbohidratos.

Fuentes de carbohidratos almidón de maíz crudo (AMC), almidón de maíz gelatinizado (AMG), almidón de trigo crudo (AMT) y tratamiento de referencia sin almidón (REF).

*Los datos de los análisis proximales fueron obtenidos del trabajo Silva A.F. (2014).

	AMC	AMG	ATC	ATG	REF
Insumo					
Harina de Pescado ¹	35.84	35.84	35.84	35.84	35.84
Canola tratada con fitasa ²	10	10	10	10	10
Concentrado Proteico de Soya ³	20	20	20	20	20
CPSP ⁴	10	10	10	10	10
Almidón de Maíz Crudo ⁵	15	15	15	15	15
Almidón de Maíz Gelatinizado		15			
Almidón de Trigo Nativo			15		
Almidón de Trigo Gelatinizado				15	
Talco ⁶					15
Lisina ⁷	0.58	0.58	0.58	0.58	0.58
Leucina	1.05	1.05	1.05	1.05	1.05
Premezcla de Vitaminas para peces tropicales ⁸	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50
Stay C ⁹	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03
Carboximetilcelulosa ¹⁰	1	1	1	1	1
Total (%)	100	100	100	100	100
<i>Análisis Proximal*</i>					
(g/100 g de materia seca)					
Proteína				57.18%;	
Lípidos				6.9 %	
Fibra				2.9 %	
Cenizas				13.91 %	
Extracto libre de nitrógeno				14.8 %	
Energía calórica (kJ g ⁻¹)				15 kJ/g	

¹Harina de pescado Menhaden Special Selection (APLIGEN S.A de C.V CDMX); ²Canola tratada con Fitasa DSM Ronozyme P5000 CT (5000 U7g). ³Concentrado proteico soluble de pescado (CPSP Sopropeche, Boulogne s/mer, Francia); PROFINE Concentrado proteico de soya (VIMIFOS, México); ⁴Carboximetilcelulosa (DROSADA S.A. de C.V., México); ⁵Almidón de Trigo y Maiz, (Gluten y almidones comerciales S.A de C.V, México); ⁶Talco (silicato de magnesio); ⁷Lisina y Leucina Future Foods S.A. de C.V. CDMX; ⁸Vitaminas: acetato de retinol 18000 (IU kg⁻¹ diet); cholecalciferol,2000 (IU kg⁻¹ diet); acetato de alfa tocoferol, 35; sodium menadione bisulphate,10; tiamina-HCl, 15; riboflavina, 25; 50; pyridoxina HCl, 5; folic acid 10; cianocobalamina, 0.02; biotina, 1.5; ácido ascórbico,50; inositol, 400. ⁹ROVIMIX STAY C-35 (Importado por ROCHE VITAMINAS Guadalajara Jal.) Composición: vit A: 1.200.00 IU: vit B1: 4,800 mg: vit. B12: 4,800 mg: vit B6: 4,800 mg: vit D3: 200,00IU: vit, K3: 2,400 mg: ácido fólico 1,200 mg: biotin: 48 mg; pantotenato de calcio: 12,000 mg: cloruro de colina 108 g; niacina 24, 000 mg; selenio: 100 mg; yodo:10mg; cobalt: 10 mg:cobre: 3,000 mg: hierro 50,000 mg; magnesio: 20,000 mg; zinc: 30, 000 mg; vehiculo 1,00g; antioxidantes: 25 g; ¹⁰Carboximetilcelulosa (DROSADA S.A. de C.V., México).

III.4.4.-Parámetros físico-químicos.

La calidad del agua fue monitoreada diariamente. Para ello, se midieron la temperatura, el oxígeno disuelto, el pH, y la salinidad, por medio de un equipo multiparámetros (Hach®, modelo HQ40d).

II.4.5.-Parámetros zootécnicos

Los parámetros zootécnicos a evaluar fueron los siguientes: supervivencia (%) = No. de animales vivos al final de experimento/ total de animales X 100; Biomasa final = No. de animales vivos al final de experimento * peso promedio final; Factor de condición = Peso/ Longitud total³; Coeficiente de crecimiento por día = ((peso final ^{1/3} - peso inicial ^{1/3})/No. de días) * 100, Coeficiente térmico de crecimiento = (peso final ^{1/3} - peso inicial ^{1/3}) (coeficiente de crecimiento) *(temperatura promedio °C) *100; Tasa de crecimiento específico (SGR, por sus siglas en inglés) = (log peso final- log peso inicial/ días); Ganancia en peso = (Biomasa final-biomasa inicial)/tiempo.

II.4.6. Diseño Experimental

El diseño experimental consistió en colocar 10 peces cada tanque del dispositivo en total 15 tanques, como fueron 5 tratamientos diferentes se destinaron 3 tanques por tratamiento; los parámetros fisicoquímicos fueron monitoreados por la mañana y por la tarde.

Durante los días de experimento 61 días, los juveniles fueron alimentados con 3% de la biomasa total de cada tanque, otorgando 1.5% por la mañana (8:00 a.m) y 1.5 % por la tarde (5:00 p.m). Las respuestas a evaluar fueron: supervivencia, biomasa, CTC, CDC, metabolitos (glucosa en plasma y glucógeno en hígado); las enzimas digestivas α -amilasa y α -glucosidasa y en el tratamiento del almidón que obtuvo el mejor crecimiento y en la tratameinto que no contenía almidón se registraron las actividades de las enzimas del metabolismo intermediario: GK, PK, FBpasa, ALAT. Se utilizó una ANDEVA de Bloque anidada y la prueba No paramétrica de Kruskal-Wallis cuando los resultados no presentaron homogeneidad de varianza. (Tabla 10)

Tabla 10. Diseño Experimental del ensayo preliminar para determinar el efecto del nivel de inclusión y la fuente de carbohidratos en alimentos para juveniles de *E. morio*.

<i>Fuente de Carbohidrato</i>	<i>Diseño experimental</i>	<i>Repetición Tratamiento</i>	<i>Respuesta a Evaluar</i>
ATC	N= 30	3 tanques/tratamiento	<ul style="list-style-type: none"> • Supervivencia • Biomasa • CTC
ATG	ANDEVA de Bloque Anidada p < 0.05		<ul style="list-style-type: none"> • CDC • Glucosa en Plasma • Glucógeno en Hígado
AMC			<ul style="list-style-type: none"> • Enzimas digestivas: • α-amilasa y α-glucosidasa
AMG			<ul style="list-style-type: none"> • Enzimas metabolismo intermediario: • GK, PK, FBpasa, ALAT
REF			

II.4.7.-Estadística

El hematocrito, la CDC y CTC, y el Índice hepatosomático fueron transformados a arco seno; y los valores de la glucosa transformados a logaritmo.

Para CDC y CTD se verificó la homogeneidad de varianza con la prueba de Hartley, Cochran y Barlett, y se aplicó una prueba de Duncan con un valor de significancia de $p < 0.05$.

Para glucosa, glucógeno, actividad enzimática, IHS y Hematocrito se verificó la homocedasticidad con la prueba de homogeneidad de Levene. La normalidad se verificó con una prueba de Shapiro-Wilk. Posteriormente, se aplicó un ANDEVA de bloque anidada con el objetivo de considerar la varianza entre cada tanque del sistema experimental con un valor de significancia de $p < 0.05$. Cuando los datos no presentaron homogeneidad de varianza se hizo una prueba no-paramétrica Kruskal Wallis con valor de significancia de ($p < 0.05$). Se utilizó el paquete estadístico Statgraphics versión 6.0.

II.5.-Resultados

II.5.1.-Selección de almidones: maíz y trigo

El experimento mostró que los juveniles silvestres alimentados con la dieta AMC tuvieron el mayor valor de Ganancia en Peso 855.63 (g / 61 días). A pesar que los juveniles silvestres alimentados con dieta AMG mostraron la biomasa final más alta (6900.08 g), presentaron los valores más bajos de ganancia en peso (13.69 g /61 días). Los juveniles silvestres alimentados con la dieta REF presentaron los valores más bajos de biomasa final (6109.69 g) (Tabla 11).

Tabla 11 - Parámetros Globales; Crecimiento, Supervivencia, alimento suministrado de los grupos con las 4 dietas experimentales y el grupo control. Almidón Trigo Crudo (ATC), Almidón de trigo gelatinizado (ATG), Almidón de Maíz Crudo (AMC), Almidón Maíz Gelatinizado (AMG), Dietas in almidón (REF).

	DIETA				
	ATC	ATG	AMC	AMG	REF
Alimento entregado	2354.8	2250.44	2333.54	2330.58	2307.33
Biomasa inicial (g)	6214.1	5779.0	5729.9	6194.0	6096.0
Biomasa final (g)	6733.72	6334.37	6585.53	6900.88	6109.69
Ganancia en peso (g)*	519.62	555.37	855.63	706.88	13.69
No de Peces inicial	30	30	30	30	30
No de Peces final	27	27	28	29	27

Sobrevivencia (%)	90	90	93.3	96.6	90
-------------------	----	----	------	------	----

*Ganancia en Peso en 61 días de experimento.

II.5.2.-Coeficiente diario de crecimiento

El coeficiente diario de crecimiento más elevado fue obtenido en los peces del tratamiento AMC (0.73), y el más bajo con el tratamiento que contenía AMG (0.54), siendo estos significativamente diferentes entre sí. Los tratamientos ATG y AMT no fueron diferentes entre sí, ni tampoco los tratamientos ATC y REF (Tabla 11).

II.5.3.-Coeficiente térmico de crecimiento

El coeficiente térmico de crecimiento significativamente más elevado fue encontrado en los juveniles silvestres tratamiento AMC (0.0271 g / C° /días). Los peces de los tratamientos que mostraron los valores más bajos de CTC fueron alimentados con el tratamiento REF y el tratamiento ATC (0.025 y 0.020 g /C°/días, (Tabla 12).

Tabla 12.- Coeficiente Diario de Crecimiento (CDC) y Coeficiente Térmico de Crecimiento (CTC) de los juveniles silvestres aclimatados a los tratamientos de almidón; Almidón de Trigo Crudo (ATC), Almidón de Trigo Gelatinizado (ATG), Almidón de Maíz Crudo (AMC), almidón de maíz gelatinizado (AMG) y Dieta de Referencia sin almidón (REF). Todas los tratamientos experimentales isocalóricas; 45% proteína, 6% lípidos y 15 % carbohidratos. Juveniles alimentados por 61 días. Prueba de Duncan ($p < 0.05$) promedio \pm ES.

	ATC	ATG	AMC	AMG	REF
CDC	0.55 \pm 0.07 ^b	0.71 \pm 0.07 ^b	0.73 \pm 0.07^a	0.54 \pm 0.07 ^b	0.68 \pm 0.08 ^b
CTC	0.020 \pm 0.003 ^b	0.026 \pm 0.003 ^{ab}	0.027 \pm 0.003^a	0.019 \pm 0.003 ^b	0.025 \pm 0.002 ^{ab}

Valores promedio \pm ES. ANDEVA Prueba de Duncan ($p < 0.05$) *.

II.5.4.-Glucosa, Glucógeno y Hematocrito

La concentración más alta de glucosa se presentó en los juveniles alimentados con el tratamiento REF (sin almidón) y en los del tratamiento AMG (58 y 47.7 dl ml⁻¹); p< 0.05), (Tabla 12)

Los valores significativamente más bajos de glucosa se encontraron en los juveniles alimentados con el tratamiento AMC (42 dl ml⁻¹) (Tabla 13).

El glucógeno no varió significativamente entre los tratamientos. Los valores más altos se observaron en los peces de los tratamientos AMC, AMG y ATG. El valor más bajo fue encontrado en los juveniles alimentados con los tratamientos ATC y REF (Tabla 12).

Los peces no presentaron diferencias en el hematocrito entre los 5 diferentes tratamientos, sin embargo en los juveniles alimentados con el tratamiento REF se encontró el menor valor del hematocrito (37.3 ± 2.3) (Tabla 13).

Tabla 13- Glucógeno en hígado (mg g⁻¹hígado), glucosa en plasma (dl ml¹) y hematocrito en de juveniles silvestres alimentados con alimentos que contienen diferentes fuentes de almidón maíz crudo (AMC), maíz waxy (AMW), papa crudo (APC), y papa gelatinizado (APG)], y un alimento de referencia, sin almidón (REF).

	ATC	ATG	AMC	AMG	REF
Glucosa (mg.dl ⁻¹) *	44.0 ± 24.9 ^{ab}	47.4 ± 13.1 ^a	40.47 ± 12.1 ^b	47.9 ± 18.7 ^a	58.4 ± 12.1 ^a
Glucógeno (mg.g ⁻¹) *	112.7 ± 57.8 ^a	145.1 ± 39.7 ^a	148.6 ± 36.9 ^a	148.2 ± 63.2 ^a	113.8 ± 11.1 ^a
Hematocrito (%) **	47.6 ± 2.4 ^a	47.5 ± 2.3 ^a	43.0 ± 2.52.5 ^a	46.9 ± 2.5 ^a	37.3 ± 2.3 ^b

Valores promedio ± ES. ANDEVA de bloque anidado (p< 0.05) *.

Prueba no-paramétrica Kruskal Wallis (p<0.05) ** Promedio ± ES

II.5.5.-Enzimas Digestivas

Los valores más altos los mostraron los juveniles alimentados con el tratamiento ATC ($1.5 \pm 0.2 \times 10^3$ U mg⁻¹ proteína) y los más bajos fueron encontrados en los juveniles alimentados con el tratamiento AMC ($1 \pm 0.2 \times 10^3$ U mg⁻¹ proteína U mg⁻¹ de proteína).

La actividad de la α -amilasa en intestinos fue menor, que la encontrada en los ciegos pilóricos, sin embargo entre los tratamientos no se encontró diferencias significativas (Tabla 13).

La actividad de la α -glucosidasa no mostró diferencias significativas en los juveniles alimentados entre los 5 tratamientos. Los valores más altos se presentaron en el intestino pero a diferencia de la α -amilasa no presentaron diferencias entre ciegos pilóricos e intestino, la mayor actividad se encontró en los juveniles alimentados con el tratamiento AMC en los intestinos (0.14 ± 0.02 mU mg⁻¹ proteína) (Tabla 14).

Tabla 14 .- Actividad de la α -glucosidasa (mU.mg⁻¹ de proteína) y α -amilasa (U.mg⁻¹ de proteína) en ciegos pilóricos e intestinos de organismos los juveniles alimentados con alimentos que contienen diferentes fuentes de almidón [maíz crudo (AMC), maíz waxy (AMW), papa crudo (APC), y papa gelatinizado (APG), y un alimento de referencia, sin almidón (REF). experimentales en los 5 tratamientos; almidón de trigo crudo (ATC), almidón de trigo gelatinizado (ATG), almidón de maíz crudo (AMC), almidón de maíz gelatinizado (AMG) y dieta de referencia (REF).

	ATC	ATG	AMC	AMG	REF
α -Amilasa ciegos pilóricos	427.0 \pm 225.8 ^a	1197.9 \pm 238.0 ^a	974.2 \pm 238.0 ^a	1373.5 \pm 269.9 ^a	1257.4 \pm 238.0 ^a
α -Amilasa intestinos	287.8 \pm 55.4 ^a	232.2 \pm 55.4 ^a	107.2 \pm 58.8 ^a	374.1 \pm 55.5 ^a	258.5 \pm 52.6 ^a
α -Glucosidasa ciegos pilóricos	0.08 \pm 0.02 ^a	0.1 \pm 0.02 ^a	0.07 \pm 0.02 ^a	0.10 \pm 0.02 ^a	0.09 \pm 0.02 ^a
α -Glucosidasa intestinos	0.11 \pm 0.02 ^a	0.10 \pm 0.02 ^a	0.14 \pm 0.02 ^a	0.13 \pm 0.02 ^a	0.12 \pm 0.2 ^a

Prueba no-paramétrica Kruskal Wallis con valor de significancia de (p<0.05). Promedio \pm ES.

II.5.6.-Enzimas reguladoras del metabolismo intermediario

En cuanto a las enzimas que regulan el metabolismo intermediario se encontró a la FBPasa con mayor actividad en los juveniles alimentados con el tratamiento REF ($48.8 \pm .7$, U mg⁻¹ proteína), la PK fue mayor en los juveniles alimentados con el tratamiento AMC, la G6P-DH no presentó diferencias, sin embargo la ALAT presentó mayor actividad en los juveniles alimentados con el tratamiento REF y esta diferencia fue significativa (117.8 ± 168.7 , U mg⁻¹ proteína) (Tabla. 15).

Tabla 15.- Actividad de las enzimas reguladoras del metabolismo intermediario (U mg⁻¹ proteína) en hígado de los juveniles experimentales en los 5 tratamientos; almidón de trigo crudo (ATC), almidón de trigo gelatinizado (ATG), almidón de maíz crudo (AMC), almidón de maíz gelatinizado (AMG) y el tratamiento de referencia (REF). Prueba no-paramétrica Kruskal Wallis con valor de significancia de ($p < 0.05$). Promedio \pm ES

N=7	AMC	REF
<i>Fructosa-1,6-bisfosfatasa</i>	10.8 ± 5.4^b	48.8 ± 5.7^a
<i>Piruvato cinasa</i>	104.8 ± 8.1^a	89.2 ± 17.4^a
<i>Glucosa-6-fosfato dehidrogenasa</i>	48.8 ± 0.02^a	52.8 ± 8.1^a
<i>Alanino aminotransferasa</i>	341.4 ± 226.3^b	1178.8 ± 168.7^a

Promedio \pm ES. Prueba no-paramétrica Kruskal Wallis con valor de significancia de ($p < 0.05$).

II.5.7.-Parámetros Físico-Químicos

Tabla 16.- Promedio de los parámetros físicos- químicos del agua de cultivo registrados, en la mañana y en la tarde, durante el período de aclimatación bioensayo de crecimiento, durante la mañana y la tarde. Temperatura (°C), pH, Oxígeno Disuelto (mg/L) y salinidad (ppt).

Parámetros	Promedio	Mínimos	Máximos
Temperatura (°C) am	28.2 ± 1.6	24.4	29.2
Temperatura (°C) pm	27.5 ± 1.8	26.2	29.3
Salinidad (ppt)	37.4 ± 0.1	36.2	37.8
OD (mg/L) am	6.3 ± 0.3	5.74	6.74
OD (mg/L) pm	6.1 ± 0.3	5.54	6.58
pH am	8.2 ± 0.1	8.06	8.44
pH pm	8.3 ± 0.2	7.94	8.59

Valores promedio ± DE.

II.6. Discusión

II.6.1. Factores que influyen en la utilización de los carbohidratos dietéticos en *E. morio*.

Relación amilosa:amilopectina

La relativa eficiencia de la utilización de los carbohidratos en peces, está asociada a factores como el nivel de inclusión, fuente y el tratamiento tecnológico aplicado (Wilson, 1994; Stone, 2003; Krogdahl *et al.*, 2005).

El almidón de maíz presenta una proporción de amilopectina de 73%, menor al presente en el almidón de trigo que es de 76%. La disponibilidad del almidón por ser digerido se encuentra en función de la exposición de los enlaces α -D-(1-4)-glucosídicos presentes en las molécula de amilosa y amilopectina, como se ha explicado en la parte introductoria de este capítulo, la molécula de amilopectina tiene mayor cantidad de enlaces α -D-(1-4)-glucosídicos sobre los que actúa la α -amilasa, de manera que en este trabajo se esperaba encontrar una mayor digestión en los almidones con mayor amilopectina. Sin embargo, el tratamiento AMC fue el mejor utilizada dado que *E. morio* presentó el valor más alto de CDC (0.73), así como CTC (0.271 3g/Cº/días), y la mayor ganancia en peso (52.8g) (Tabla 11).

Estos resultados sugieren que la diferencia entre el porcentaje de amilopectina del almidón de maíz y trigo, 73% contra 76%; respectivamente, no parece influir en la actividad de las enzimas digestivas, ya que entre los cinco tratamientos no existieron diferencias significativas (Tabla 13).

Digestión

II.6.2. Digestión del almidón de acuerdo a su naturaleza: maíz y trigo.

En mamíferos, la digestión del almidón inicia en la boca con el contacto de la α -amilasa salival para formar oligosacáridos que se dirigen al intestino delgado. En peces, es en la región exocrina del páncreas donde son producidos los zimógenos precursores de la α -amilasa. Este órgano se encuentra difuso alrededor del duodeno, de los ciegos pilóricos y entre el mesenterio de *E. morio* (Castillo, 2000). Las secreciones enzimáticas del páncreas dentro del intestino ocurren en respuesta a la presencia de alimento. Esta respuesta está controlada por la producción de hormonas como la secretina y la colecistocinina. La respuesta se desencadena

por la presencia de lípidos y aminoácidos que entran en la parte superior del intestino en condiciones ácidas y desencadenan la cascada de señalización para la producción de enzimas pancreáticas (Fontaine, 1979).

El almidón al entrar al duodeno y la región de los ciegos pilóricos es digerido por la α -amilasa. La velocidad inicial de reacción de esta hidrólisis disminuye con el aumento del grado de ramificación del polisacárido, principalmente debido a un impedimento estérico. Los productos residuales de esta reacción, maltosas y dextrinas ramificadas, son convertidos en glucosa por las enzimas maltosa-glucoamilasa, sucrosa-isomaltasa y α -glucosidasa intestinal (Lehmann y Robin, 2007) para después ser absorbidos en el intestino distal por las células epiteliales con borde de cepillo que contienen a la α -glucosidasa, enzima que completa la digestión de los disacáridos en glucosa y transportada al torrente sanguíneo por transporte facilitado que involucra acarreadores de Na^+ ; la glucosa depende del Na^+ para ser transportada (Castelló, 1993).

La digestión del almidón no solo depende del evento hidrolítico, existen otros factores como la difusión de la enzima hacia el sustrato y la adsorción de la enzima al sustrato.

La difusión de la enzima α -amilasa hacia el sustrato es considerado un paso importante de la hidrólisis. Las interacciones del almidón con lípidos, proteínas y otros componentes de los alimentos pueden evitar una difusión y adsorción efectiva de la enzima hacia el almidón (Colonna *et al.*, 1992). En el caso de los tratamientos utilizados en este experimento, todos contenían los mismos ingredientes, el mismo porcentaje de proteínas y lípidos, sólo el tratamiento de referencia carecía de carbohidratos, de manera que la difusión de la enzima hacia el sustrato probablemente no fue diferente entre los tratamientos experimentales.

En cuanto a la adsorción efectiva de la enzima hacia el almidón, se ha demostrado que existen diferencias entre gránulos de almidón de diferentes orígenes, por ejemplo, los patrones de digestión en almidones de cereales, tubérculos y leguminosas son diferentes: los almidones crudos del maíz y el trigo contienen poros y/o canales, los cuales permiten la penetración de la enzima α -amilasa, resultando en un mecanismo de digestión de dentro del gránulo hacia fuera (Zhang *et al.*, 2006). En contraste, el almidón de papa y otros almidones tipo B son digeridos por un proceso conocido como ex corrosión, empezando en la superficie del gránulo hacia su interior (Gallant *et al.*, 1997).

Las propiedades de digestión del almidón han sido clasificadas en base a la cantidad de glucosa liberada durante el transcurso de su digestión y en gran medida la digestión de los almidones dependen de la proporción de la amilosa:amilopectina dentro del gránulos. Almidones con un mayor porcentaje de amilosa serán mas lentos en la digestión, en caso de los almidones utilizados en este ensayo, presentan maíz y trigo, 27% contra 24%; respectivamente (Parada S. 2008). Por ejemplo en particular la estructura del almidón depende de la proporción amilosa: amilopectina como ya se ha explicado anteriormente los cereales pueden contener entre un 15 y 28% de amilosa, algunas como los almidones modificados contienen menos de 1% cuando menor es la proporción de amilosa, es mayor la gelatinización y con esto se facilita la digestión por las amilasas, logrando un mayor IG. Explicado en otras palabras entre menos amilosa presente en el gránulo mayor será el IG y por el contrario entre mas amilosa habrá menos gelatinización y con ello un IG menor.

Una forma de evaluar la respuesta de utilización de los almidones es utilizar al Índice Glucémico (IG) como indicador, el cual representa un valor numérico único propio de cada alimento que resulta de dividir el área bajo la curva de la respuesta glicémica del alimento que se esta probando por el área bajo la curva de la respuesta glicémica de un alimento estándar (glucosa). Utilizando una cantidad de 50 g de alimento (el experimental y el estándar), utilizando un tiempo postprandial de medición determinado y constante (180 minutos) tomando muestras a intervalos (Parada S. 2008).

De acuerdo a estas mediciones se ha logrado obtener escalas de valores de IG para diversos alimentos; se considera bajo de 0-50, un IG de valor moderado de 55-69 y por arriba de 70 es considerado con un IG alto. En este trabajo no se evaluo el IG de cada almidón, pero se ha reportado un IG 85 para el almidón de maíz y de trigo (Nutients Review, www.nutrientsreview.com, Enero 2018). De acuerdo a este valor los almidones utilizados en este ensayo presentan IG alto. Como se ha mencionado anteriormente, no se detectaron diferencias significativas en la actividad de las amilasas y en las α -glucosidasas (Tabla 11), sin embargo, en los peces alimentados con el tratamiento AMC con un porcentaje mayor de amilosa (27%) se encontraron los valores más bajos de glucosa en plasma (40.5 mg.dl^{-1}) (Tabla 13). Estos resultados podrían sugerir que los juveniles alimentados con el tratamiento AMC presenta un IG menor que los otros tratamientos, sugiriendo quizás una digestión más lenta

que permitió una mejor asimilación de la glucosa dietética, con el valor de glucógeno más alto (148.6 mg.g^{-1}) y el mejor coeficiente de crecimiento de los peces (Tabla 12 y 13).

Se conoce que la velocidad de digestión de un carbohidrato afecta la absorción de la glucosa, como consecuencia a los mecanismos reguladores de la respuesta glucémica y lipídica postprandial (Brites et al., 2011). La baja digestión y absorción de los carbohidratos puede mantener regulados los niveles de glucosa en la sangre (Augustin et al., 2002). Los niveles de glucosa que se mantuvieron más bajos en este experimento fueron en los peces alimentados con AMC, quizás este almidón presentó un mayor grado de resistencia a ser digerido lo que permitió a los peces alimentados con este tratamiento, lograron una digestión más lenta, y como resultado una mejor asimilación de la glucosa que fue almacenada como glucógeno y destinada a crecimiento (Tabla 13).

II.6.3.- Efecto del tamaño y la forma de gránulo maíz y trigo en la utilización de los carbohidratos en *E. morio*.

Se considera que los gránulos de almidón a partir de 1- 20 μm son pequeños y de 20 a 100 μm como largos. La clasificación de los gránulos usualmente se divide en unimodal y bimodal, este último presenta dos tamaños de gránulos: tipo A > 10 μm y tipo B < 10 μm . En este experimento se utilizó el almidón de trigo que presenta una distribución bimodal y el gránulo de maíz con una distribución unimodal. Diferentes trabajos han demostrado que la susceptibilidad del almidón a ser hidrolizado depende en parte al tamaño del gránulo. Los gránulos de almidón de mayor tamaño son digeridos a una velocidad menor en comparación a los gránulos de almidón de menor tamaño, debido a que los gránulos de mayor tamaño tienen una superficie relativa más pequeña para la hidrólisis enzimática (Tester *et al.*, 2004). Los resultados de este experimento sugieren que el tratamiento AMC fue el mejor asimilado. Este almidón presenta una distribución unimodal, y un tamaño de gránulo que en promedio es menor al gránulo del almidón de trigo.

En cuanto a la distribución de los tamaños de los gránulos en el maíz y trigo, se ha reportado que la heterogeneidad de tamaño afecta significativamente las propiedades físicoquímicas del almidón, entre más heterogéneo se aumenta el área de superficie por unidad de volumen y

también puede aumentar la biodisponibilidad de los macronutrientes (Wondra et al., 1995), de manera que esta podría explicar que el tratamiento ATC presentara una actividad enzimática mayor ($1,427 \text{ U mg}^{-1}$ proteína, $p > 0.05$). Sin embargo, los resultados mostraron que el tratamiento ATC no fue el mejor asimilado en los juveniles de *E. morio*.

II.6.3.- Efecto de la gelatinización de almidones en aprovechamiento de los carbohidratos en el E. morio.

El almidón crudo es aquel que se encuentra de manera natural, es insoluble en agua a temperatura ambiente, y no ha experimentado ninguna modificación física o química. Este almidón tiene una alta resistencia al esfuerzo cortante y es mucho más susceptible al fenómeno de la retrogradación y sinéresis. El almidón puede ser modificado por procesos fisicoquímicos, como la gelatinización (Sánchez –Rivera *et al.*, 2005).

La gelatinización es un proceso endotérmico que genera la disociación de las moléculas de amilosa y amilopectina, que se encuentran en una conformación con dobles hélices, y pasan a una presentación amorfa. El proceso de gelatinización inicia con el hinchamiento de las partes amorfas del gránulo, rompiendo los puentes de hidrógeno entre las cadenas. Esta hidratación origina que la amilosa se difunda hacia el medio acuoso, hasta este momento el cambio es reversible, pero una vez alcanzando la temperatura de gelatinización ($\sim 100 \text{ }^\circ\text{C}$) es un proceso irreversible, y ocurre un cambio en el orden molecular del almidón, perdiendo su estructura cristalina nativa (French, 1984).

La temperatura de gelatinización, así como el grado de entalpia, dependen de la relación amilosa:amilopectina del gránulo de almidón, es decir, almidones con un mayor grado de ramificaciones de cadena corta tiene una temperatura de gelatinización menor, debido a que las ramificaciones de cadenas cortas no abarcan por completo lo largo de la lámina cristalina lo que produce irregularidades en el gránulo, a diferencia de los almidones con mayor número de ramificaciones de longitud larga que interactúan en mayor grado con la amilosa, y esta interacción genera una mayor temperatura de gelatinización y eleva el grado de entalpia . (Li *et al.*, 2008, citado por Bello P., 2012).

La retrogradación es el proceso que sucede cuando se enfría el gránulo y adquiere una conformación diferente al almidón nativo; sucede cuando las moléculas del almidón, después de la gelatinización y durante el enfriamiento, recuperan gradualmente su nueva organización, formando cristales compuestos por las dobles hélices que se unen por interacciones hidrofóbicas, y nuevamente forman puentes de hidrógeno. La molécula de la amilosa es la que retrograda más rápidamente, debido a su estructura lineal, en cambio la retrogradación de la amilopectina es más lenta como consecuencia de su estructura ramificada (Srichwong y Jane, 2007). La nueva conformación del gránulo, tendrá efectos en la susceptibilidad enzimática. El almidón de maíz tiene mayor porcentaje de amilosa por lo que su temperatura de gelatinización es más elevada y su retrogradación más rápida, estas características en conjunto, podrían explicar la baja actividad de la α -amilasa en los juveniles alimentados con AMC, pero al ser alimentados con AMG la actividad enzimática se incrementó (974 y 1,374 U mg⁻¹ de proteína) (Tabla 14). Después del tratamiento de gelatinización, los enlaces 1-4 glucosídicos se encontraron más expuestos a la hidrólisis enzimática. Al respecto, se sabe que el almidón nativo presenta una baja digestibilidad, debido a que es más rápido su tránsito a través del intestino disminuyendo el tiempo de absorción y evitando la acción de la α -amilasa (Spannhof y Plantikow, 1983). La disponibilidad del almidón para ser digerido se encuentra en función de la exposición de los enlaces α -D-(1-4)-glucosídicos presentes en las molécula de α -amilasa y amilopectina, sobre los cuales actúa la α -amilasa.

Como se ha mencionado anteriormente, las diferencias en la actividad de las enzimas digestivas no fueron significativas, y el AMC presentó la mejor asimilación, por encima del AMG. Sin embargo, la mayor actividad de la α -amilasa se encontró en el tratamiento ATC (1,427 U mg de proteína⁻¹), los resultados sugieren que para el trigo, el efecto de la gelatinización no modificó la hidrólisis enzimática. La amilosa y la amilopectina son moléculas que presentan conformaciones diferentes. La amilosa presenta una conformación helicoidal, haciendo que los enlaces α -D-(1-4) glucosídicos sean menos disponibles a la acción enzimática, mientras que la amilopectina es una molécula altamente ramificada, y por lo tanto, más susceptible a la degradación enzimática, por lo que el tratamiento ATC, presentó mayor hidrólisis enzimática (Pfeffer *et al.*, 1991; Hung *et al.*, 2006).

En cuanto a la α -glucosidasa, los resultados muestran que para todos los tratamientos, la mayor actividad se encontró en el intestino. A pesar de no existir diferencias significativas, la mayor actividad se encontró con el tratamiento AMC (0.14 mU.mg⁻¹ de proteína) (Tabla 14). Como se ha mencionado anteriormente, la α -glucosidasa es una endoenzima que se encuentra en las células con borde de cepillo en el intestino delgado, y es la que genera finalmente la glucosa que será transportada al hígado, donde se llevará a cabo la asimilación, para integrar a la glucosa al metabolismo intermediario.

II.6.4.- Comparación de la actividad de enzimas reguladoras del metabolismo intermediario de peces alimentados con un tratamiento con AMC y un tratamiento sin almidón REF.

A pesar de no encontrar diferencias significativas entre los tratamientos a nivel de la actividad de las enzimas digestivas (Tabla 14), fue posible encontrar una tendencia de ciertas enzimas reguladoras del metabolismo intermediario en los peces alimentados con el tratamiento AMC. Los peces presentaron una mayor actividad de la PK, mostró una mayor actividad en los peces alimentados con el tratamiento AMC con respecto a los alimentados con el tratamiento REF (104.8 y 89.2) (Tabla 15). Xiang-He *et al.*, (2015), reportan diferencias significativas en la actividad de la PK, a diferentes niveles de inclusión de almidón (10, 15, 20, 25 y 30 %) siendo mayor en un tratamiento que contenía 30 % de almidón de maíz (35.7 mU mg⁻¹ de proteína). En el experimento realizado aquí con 15 % de inclusión de carbohidratos en el alimento, fue posible encontrar una menor actividad en la enzima FBPasa, y en la enzima del catabolismo de proteínas ALAT, en peces alimentados con el tratamiento AMC ($p < 0.05$) (Tabla 15). Estos resultados sugieren que los peces que tuvieron una fuente de carbohidratos en la dieta, fueron capaces de reducir la ruta gluconeogénica y el catabolismo de proteínas.

II.7.-Conclusiones

1. Los resultados de este ensayo preliminar en el uso de almidones sugieren que la diferencia entre el porcentaje de amilopectina del almidón de maíz y trigo, 73% contra 76%; respectivamente, no parece influir en la actividad de las enzimas digestivas, ya que entre los cinco tratamientos no existieron diferencias significativas.
2. La microestructura del gránulo de almidón de maíz crudo AMC, por ser más pequeña presenta mayor superficie de contacto y favorece la exposición a la hidrólisis enzimática y al mismo tiempo mantener los valores de glucosa más bajos, considerando el IG como indicador de digestión este almidón tuvo un mayor grado de resistencia a ser digerido por los juveniles del mero rojo lo que hizo que esta digestión más lenta permitió un mayor crecimiento y mayor biomasa al final del experimento.
3. Las enzimas reguladoras del metabolismo intermediario que intervienen en la gluconeogénesis, FBPasa Y ALAT presentaron la menor actividad en el tratamiento AMC, lo que indica una disminución en el uso de proteínas como sustrato energético.

Capítulo III Tolerancia a la Glucosa de *Epinephelus morio*.

III.Introducción

III.1.2 Glucosa molécula energética

La glucosa es la molécula energética esencial para las células, en muchos vertebrados como los mamíferos constituyen la principal fuente de energía. A diferencia de los mamíferos se ha demostrado que en los peces la glucosa es obtenida principalmente por rutas gluconeogénica. Además, estos vertebrados presentan una tolerancia limitada a la glucosa, condición que ha sido estudiada en los últimos 30 años, demostrando que existen diferentes factores que llevan a los peces a tener una escasa utilización y capacidad de almacenamiento de la glucosa (Wilson 1994, Hemre et al 2002).

III.-2.2.Hiperglucemia en peces por glucosa postprandial.

La poca utilización de la glucosa proveniente de carbohidratos dietéticos genera niveles de hiperglucemia prolongada en peces alimentados con un alto contenido de carbohidratos y una de las hipótesis indica que esta intolerancia es consecuencia de un bajo número de receptores de insulina, niveles de insulina en el plasma y transportadores de glucosa (Hemre *et al.*, 2002; Krogdahl *et al.*, 2005; Legate *et al.*, 2001; Moon, 2001; Peres *et al.*, 1999). Por ejemplo entre las especies de peces la capacidad de una especie por utilizar la glucosa depende de los hábitos alimenticios, Panserat (2000), ordena a las especies dependiendo de su capacidad por utilizar la glucosa de la siguiente manera; la carpa>dorada>trucha. Sin embargo en estudios recientes se ha encontrado que sumado a esta limitación por utilizar glucosa, la poca adaptación de los peces a los carbohidratos involucra además el mecanismo por el cual la glucosa puede ser asimilada dentro de las rutas metabólicas. En todas las especies estudiadas existe el mismo mecanismo de fosforilación de la glucosa dietética y se encuentra regulado por las mismas enzimas y su actividad depende de los hábitos alimenticios de los peces, sin embargo la hipótesis más aceptada sobre la limitación del uso de los carbohidratos dietéticos en peces es precisamente la pobre capacidad de fosforilar la molécula de la glucosa (Cowey y Walton 1981; Wilson 1994; Krogdahl *et al.*, 2005; Panserat *et al.*, 2002).

III.-2.3. Mecanismo de acción y origen de las hexocinasas

Las enzimas que se encargan de esta tarea son transferasas que transfieren un grupo fosfato desde una molécula de alta energía, como al ATP a una hexosa como la glucosa y son conocidas como hexocinasas. Una vez que ha entrado la glucosa a la célula se encuentra disponible como sustrato energético en el momento de ser fosforilada por las hexocinasas. Las hexocinasas catalizan la primera reacción de la glucólisis, convirtiendo a la glucosa en glucosa-6-fosfato (G6P), (Wilson 1995, 2003; Cárdenas *et al.*, 1998). En los vertebrados han sido identificadas 4 hexocinasas: la I, II, III y la IV (Wilson 1995). La hexocinasa IV es conocida como glucocinasa (GK) y difiere de las I, II y III por su baja afinidad por la glucosa. Las hexocinasas I, II y III presentan alta afinidad por la hexosas (K_m 0.1 mM) y su reacción está regulada por la aparición de su producto, la G6P; estas tres enzimas son de mayor tamaño (100 kDa). La actividad de la hexocinasas I, II y III puede ser detectada en el riñón, el cerebro, los linfocitos y bazo. En cambio la glucocinasa (GK) presenta una baja afinidad por la glucosa (K_m alta de 5 a 12 mM), no es inhibida por la G6P y se encuentra únicamente en el hígado y en las células beta de los islotes de Langerhans en el páncreas. Esta enzima es de menor tamaño (50 kDa) (Wilson 1995, 2003; Cárdenas *et al.*, 1998).

III.2.4. La GK en su papel dentro de la homeostasis de la glucosa

La GK es una enzima que juega un papel importante en la homeostasis de la glucosa, ya que solo actúa cuando el sustrato está elevado. Se ha observado que una mutación en el gen de esta enzima está asociado con la diabetes mellitus no dependiente de insulina (Vionnet *et al.*, 1992).

En conjunto estas características y los diferentes mecanismos para regular la glucosa en peces, son los responsables de que los peces presenten diferentes niveles de tolerancia a la glucosa. Los peces cuentan con la maquinaria enzimática que les permite digerir y asimilar la glucosa, pero dependiendo de los hábitos alimenticios estas enzimas se encuentran en diferentes cantidades (Cowey y Walton, 1989; Baanante *et al.*, 1991; Shimeno *et al.*, 1993, 1996, Metón *et al.*, 1999, 2003 y 2004) (Chen y Chen, 1986; Chen y Tsai 1994; Douglas *et al.*, 2000). Según Moyano (1996) la cantidad de amilasa presente en las especies es mayor en peces herbívoro>omnívoro>carnívoro. Además la glucosa proporcionada en la dieta aumenta los

niveles de glucosa en plasma después de la ingesta en peces (Capilla *et al.*, 2003; Novoa *et al.*, 2004; Panserat *et al.*, 2002; Papatryphon *et al.*, 2001). Y esta glucosa dietética es asimilada y destinada a rutas anabólicas en hígado, músculo rojo y músculo blanco (Blasco *et al.*, 1996; Blasco *et al.*, 2001). En particular *E. morio* es un pez carnívoro y que en estudios previos en juveniles silvestres fue posible encontrar actividad de amilasa y glucosidasa en ciegos pilóricos y en intestino, por lo tanto cuenta con la maquinaria para poder digerir almidones (Castillo 2013), además se ha demostrado en este género existe un nivel de asimilación de los carbohidratos dietéticos y son destinados a la conversión de lípidos (Chen y Chen, 1986; Chen y Tsai 1994; Douglas *et al.*, 2000)

Por lo tanto este capítulo tiene como objetivo evaluar la capacidad de los juveniles de *E. morio* para tolerar la glucosa a partir de una curva de tolerancia cuando los peces han sido adaptados a una dieta con carbohidratos.

III.3.-Hipótesis

E. morio es un pez carnívoro, por lo que se espera encontrar una tolerancia limitada a la glucosa, sin embargo en el medio natural se alimenta de una gran diversidad de presas, por lo que presenta una maquinaria enzimática que le permite digerir carbohidratos (Castillo 2011). Por lo tanto, al ser alimentado por un tiempo de aclimatación con una dieta que contenga almidón de maíz crudo se espera que después de una ingesta de glucosa (vía oral o vía intraperitoneal) se activen las vías metabólicas como la glucolisis y la gluconeogénesis que le permitirán recuperar sus niveles iniciales de glucosa y salir de estado hipergluémico.

III.4.-Objetivos

8. Determinar las curvas de tolerancia a la glucosa en juveniles silvestres de *E. morio* alimentados con alimentos que contienen o no 15 % de almidón.
9. Determinar la actividad de las enzimas del metabolismo intermediario en juveniles silvestres de *E. morio* alimentados con alimentos que contienen o no 15 % de almidón.

III.5.-Metodología

Test de Tolerancia de la Glucosa de los juveniles de mero rojo *E. morio*

Para la determinación de la tolerancia a la glucosa se realizaron dos ensayos con peces aclimatados a un tratamiento que contenía almidón de maíz crudo (AMC) y un tratamiento sin almidón (REF).

En el primero ensayo (Grupal) se realizó la evaluación de la glucosa suministrando vía oral y en grupo de peces a este ensayo se le llamó, determinación de la glucosa por grupos de peces.

El segundo ensayo (Individual) se suministró la glucosa vía oral y vía intraperitoneal a peces individualmente.

III.3.1.-Obtención de los organismos

Para obtener los juveniles silvestres para la prueba de tolerancia a la glucosa se utilizó una lancha con motor fuera de borda 70 Hp y con anzuelo fueron capturados los juveniles en las costas adyacentes a Sisal. Los peces fueron transportados en un tinaco Rotoplas de 500 L con una bomba para aireación (marca), hacia la UAY (Unidad Académica Yucatán).

En las instalaciones los juveniles permanecieron 24 horas en reposo previo a ser colocados en el sistema experimental.

III.3.2.-Profilaxis

Se realizaron dos baños para la profilaxis de los peces, primero en agua dulce durante 10 minutos y después en un baño de formol al 0.03% durante 10 minutos.

Los peces fueron anestesiados con aceite de clavo (0.03 ml de aceite/10 l de agua) según López- Olmeda (2009). Se registró el tiempo de exposición al anestésico. Una vez anestesiados los peces fueron medidos considerando la Longitud total (Lt.), Longitud furcal, altura y el peso (g) de cada individuo.

III.3.3.-Sistema de circulación..

Para llevar a cabo este experimento fueron utilizado el sistema de circulación descrito previamente en el capítulo II Figura 10.

En este sistema de circulación cerrado fueron colocados 10 peces por cada tanque. Los juveniles fueron aclimatados a los dos tratamientos durante 6 semanas. Diariamente se registró la temperatura, el oxígeno disuelto y la salinidad con un multiparámetros de la marca Hach®, modelo HQ40d. Se alimentó diariamente el 3% del promedio de la biomasa en dos periodos, por la mañana y por la tarde (9:00 am y 4:00 pm), la tratamiento experimental contenía 15 % de almidón de maíz crudo y el tratamiento control no contenía carbohidratos.

Enzimas del metabolismo intermediario, glucosa y glucógeno

Se seleccionaron al azar 10 peces de cada tratamiento (AMC y REF) antes de llevar a cabo el experimento de la curva de tolerancia a la glucosa, con el objetivo de determinar glucógeno, glucosa y enzimas del metabolismo intermediario (los protocolos están descritos ampliamente en el capítulo I).

III.3.4.-Ensayo Grupal; Determinación de la glucosa por grupo de peces.

Previo al experimento, los peces fueron dejados en ayuno por 24 horas, tratando de no hacer ningún tipo de manejo, para reducir el estrés.

Para poder realizar esta prueba fue necesario anestésiar a los peces con aceite de clavo (0.03 ml de aceite/10 l de agua) y suministrar la solución de glucosa (170 mg glucosa / 100 g de peso húmedo) mediante una sonda pasando por el esófago, mientras el pez estaba anestesiado (Cuzón, *com. pers.*).

Diseño experimental: Ensayo Grupal

Para las evaluaciones se eligieron al azar 5 peces de diferentes tanques para formar el grupo experimental, y un pez para el grupo control, al cual se le suministró solo agua. Al finalizar se proporcionó la dosis a cada conjunto de los peces, luego fueron regresados a sus tanques para ser evaluados en los diferentes tiempos; 0h,1h, 2h, 3h, 6h,12h y 24h horas después de suministrar la dosis de glucosa vía oral (Tabla 17).

Tabla.17. Diseño experimental del Ensayo Grupal: Tratamientos AMC y REF; Factor a evaluar glucosa en plasma 0, 1, 2, 3, 6, 12, 24 horas después dell suministro oral.

Diseño Experimental	Tratamiento	Factor a Evaluar	Respuesta a Evaluar
N= 5	Inclusión 15% de carbohidrato		
ANDEVA DE dos vías	AMC (Almidón de Maíz Crudo)	Glucosa en Plasma	Curva de tolerancia a la glucosa con peces alimentados con dos dietas diferentes.
p < 0.05	Vs	(mg/dl)/ tiempo	
	REF (dietas in. Almidón).	0, 1, 2, 3, 6, 12, 24 horas	
	Dosis de glucosa (170 mg /100 g p Húmedo		
	vs		
	Control solo agua		

III.3.5.-Extracción de la Glucosa

Para la prueba grupal:

Al final de cada periodo de tiempo a cada pez se le realizó una punción en el costado por arriba de la línea media para obtener la muestra de sangre (Figura 12).

La muestra de sangre fue almacenada en frío y centrifugada a 4°C , por 5 minutos a 800 g se colectó el plasma y fue colocado en tubos Eppendorf (como se menciona previamente en el protocolo de extracción de glucosa en capítulo I).

Para la prueba individual:

Se tomó una gota de sangre con jeringa durante cada hora para medir en el glucómetro de la marca Free-Style.

III.3.5.- Determinación de la glucosa

Para la prueba grupal, se tomaron 20 μl de plasma y fueron diluidos en los 40 μl en solución isotónica para peces (515 mOsm). La cuantificación de la glucosa se detectó en plasma y se realizó con un kit comercial, Bayer-Sera-Pak Plus B01 4509-01 utilizando una curva patrón. (se menciona previamente en el protocolo de extracción de glucosa en capítulo I).

Para los peces evaluados individualmente se realizaron las lecturas con un analizador de glucosa Free, Style, que mide glucosa en la sangre.

III.3.6.- Diseño experimental: Ensayo por individuo

Para determinar la curva de tolerancia individual de juveniles silvestres de *E. morio* se suministró la dosis de glucosa (170 mg / 100 g peso húmedo) a 3 peces de cada tratamiento y durante 0, 2, 3,4, 5, 12 y 24 horas se realizó un punción para tomar una pequeña muestra de sangre y medirla con el medidor de Freestyle Optimun. Se destinó un cuarto pez como testigo. La curva de tolerancia a la glucosa fue evaluada también cuando la dosis de glucosa fue suministrada por medio de una inyección intraperitoneal.

III.3.7. Estadística

Los valores de la glucosa fueron transformados a logaritmo, ya que no presentaban homogeneidad de varianza. Ya como logaritmo, se verificó la homogeneidad con la prueba de Homogeneidad de Levene. La normalidad se verificó con una prueba de Shapiro-Wilk, y después se aplicó una ANDEVA de dos vías con prueba de Tukey con un valor de significancia de $p < 0.05$

Para glucosa y glucógeno, de los 20 individuos elegidos al azar en los tratamientos REF y AMC se hizo una prueba no-paramétrica Kruskal Wallis con valor de significancia de $p < 0.05$ La misma prueba se realizó en las enzimas que no presentaron homogeneidad. Se utilizó el paquete estadístico Statgraphics versión 6.0



Figura 11. Dosis Suministro por vía oral de 170 mg de glucosa / 100 g de peso húmedo del pez. Organismos previamente. Peces anestesiados con aceite de clavo. Se utilizaron una sonda y una jeringa para introducir la solución, a través del esófago, hacia el estómago.



Figura 12. Extracción de sangre sobre la línea lateral de los peces.

III.4. Resultados

III.4.1. Curva de tolerancia a la glucosa ensayo grupal Vía Oral:

Tratamiento de Referencia

En peces del grupo experimental como en el testigo, los valores iniciales fueron bajos (37.8 ± 3.1 y 35 mg /dl de glucosa; respectivamente). Sin embargo por este método se registró el primer pico de glucosa dos horas después de suministrar la glucosa (101.6 ± 83.3 y 68 mg de glucosa $\cdot dl^{-1}$; respectivamente ($p < 0.05$). El valor del grupo experimental fue más alto que el testigo. Para las siguientes horas la tendencia es a disminuir los valores de glucosa tanto en el grupo experimental como en el testigo. Es en la medición de las 12 h después de la dosis de glucosa cuando se observa el pico más alto de glucosa en el grupo experimental (115.4 ± 19.7 y 46.9 mg de glucosa $\cdot dl^{-1}$) y fue significativamente mayor a la glucosa encontrada e 0 h y 1 h después de suministrar la glucosa ($p < 0.05$). El testigo presenta una tendencia a disminuir la glucosa en las próximas mediciones. Sin embargo en la última medición en 24 h el grupo experimental mostró valores significativamente menores que el pico más alto (30.1 ± 4.7 y 37.3 mg de glucosa /dl; respectivamente) $p < 0.05$ (Figura 13)

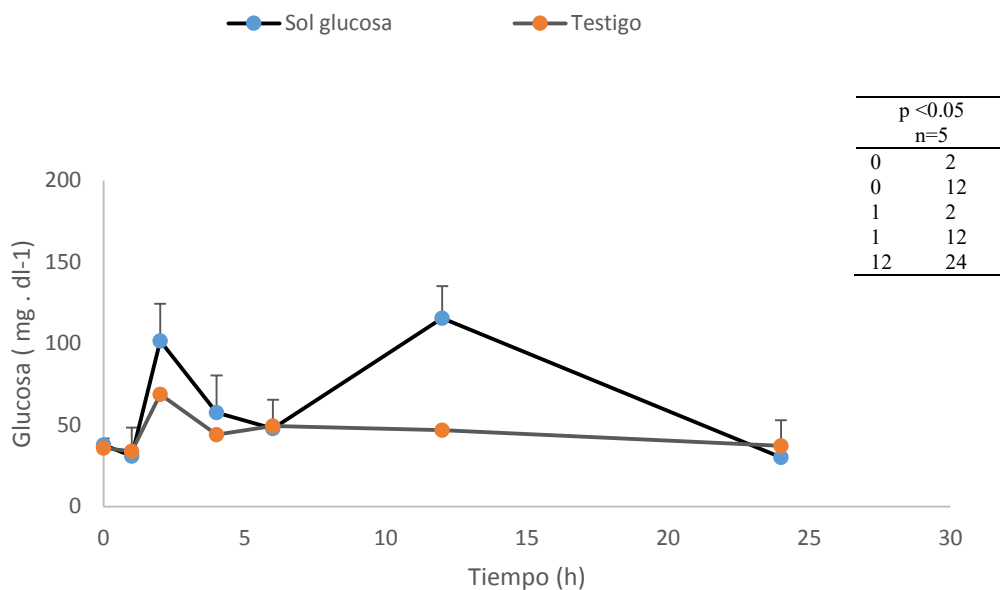


Figura 13 Curva de tolerancia a la glucosa, en juveniles silvestres de *E. morio*, aclimatados por durante 5 semanas a una alimento de referencia, sin almidón (REF), conteniendo y con 45 % de proteína y 6 % de lípidos. Tiempos de muestreo: 0, 1, 2, 4, 6, 12 y 24 horas; n=5 experimental, un pez de testigo. Promedio \pm EE. ANDEVA de dos vías ($p < 0.05$).

Tratamiento almidón de maíz crudo: AMC

Los juveniles silvestres alimentados con el tratamiento que contenía almidón de maíz crudo, presentaron el pico de glucosa más alto en la segunda hora después de la dosis suministrada ($119.6 \pm 25.3 \text{ mg}\cdot\text{dl}^{-1}$). Este valor fue significativamente más alto con respecto a la glucosa inicial (0 y 1 h) y la medición final (24 h). La tendencia para el grupo experimental fue a disminuir en las siguientes horas, pero de manera similar que los juveniles alimentados con la dieta de referencia, este grupo presentó un segundo pico de glucosa 12 horas después de la dosis (88.75 ± 61.1 y $88.6 \text{ mg}\cdot\text{dl}^{-1}$; respectivamente) este pico fue diferente a la medición final (24 h) ($p < 0.05$). El grupo experimental mostró el valor más bajo ($20.0 \pm 1.1 \text{ mg}\cdot\text{dl}^{-1}$). El testigo, mostró su valor más altos a las 6 horas de suministrar el agua, sin embargo 24 horas después de la manipulación logró obtener el valor más bajo de la glucosa ($18.12 \text{ mg}\cdot\text{dl}^{-1}$), (Figura 14).

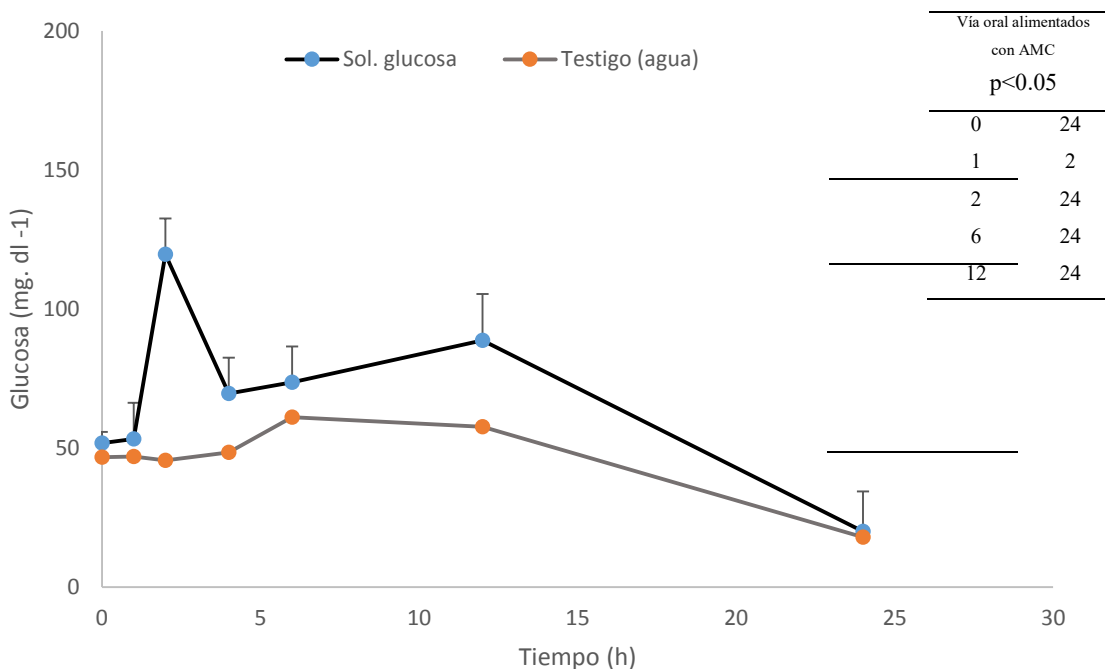


Figura 14. Curva de tolerancia a la glucosa en juveniles silvestres de *E. morio*, aclimatados durante por 5 semanas a una alimento conteniendo 15% de almidón de maíz crudo. Tiempos de muestreo: 0, 1, 2, 4, 6 12 y 24 horas. 15%.

Al comparar los niveles de glucosa entre los juveniles alimentados con los tratamientos de REF y AMC se encontró que en el tiempo 0 h y 1 h no existieron diferencias significativas entre los dos tratamientos. Sin embargo se encuentra el pico más alto de la glucosa en el tiempo 2 h para los dos tratamientos. Este valor de glucosa en la dieta AMC es significativamente más alto cuando es comparado contra el tiempo 0, 1, 24 h de el tratamiento REF ($p < 0.05$). La glucosa en 6 h del tratamiento REF, mostró mayor valor que la glucosa en 4 h de el tratamiento AMC ($p < 0.05$), (Figura 15).

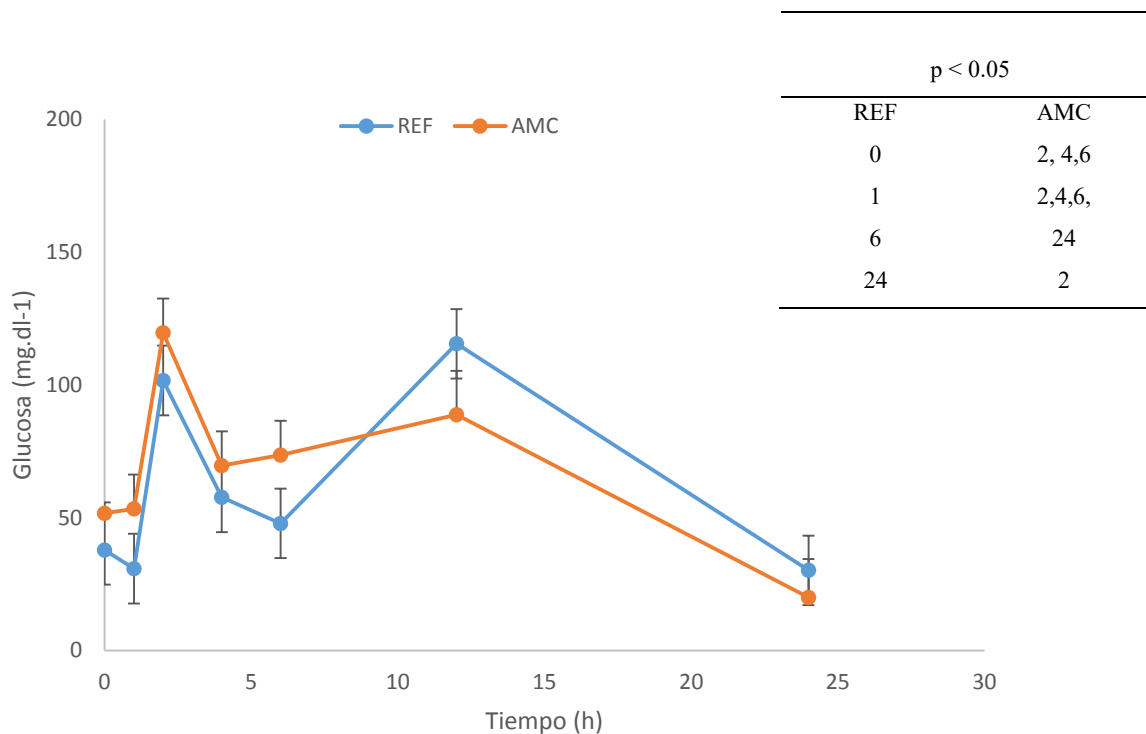


Figura 15 Curva de tolerancia a la glucosa en juveniles silvestres de *E. morio*, aclimatados durante por 5 semanas a una alimento con almidón de maíz crudo (AMC) al 15% y un alimento de referencia, sin almidón (REF). Tiempos de muestreo: 0, 1, 2, 4, 6 12 y 24 horas.

III.4.2. Curva de tolerancia a la glucosa ensayo individual vía oral:

Tratamiento de Referencia

Los juveniles alimentados con el tratamiento de referencia y que fueron dosificados con la glucosa mostraron valores más altos de glucosa que el testigo al inicio de la medición en el tiempo 0 h (145 ± 52.5 y 93 mg.dl^{-1} ; respectivamente). Esta tendencia a aumentar la glucosa del grupo experimental y a disminuir en el testigo se mantuvo, hasta que en la hora 5 se registró el pico de glucosa más alto en el grupo de referencia ($246 \pm 95.3 \text{ mg.dl}^{-1}$). Durante las próximas mediciones, la glucosa en el grupo experimental disminuyó hasta alcanzar su valor más bajo a las 24 horas ($46.6 \pm 15.5 \text{ mg.dl}^{-1}$). El testigo mantuvo la tendencia a disminuir los valores durante toda la prueba (Figura 16). Las diferencias en esta prueba no fueron significativas entre los tiempos ($p > 0.05$)

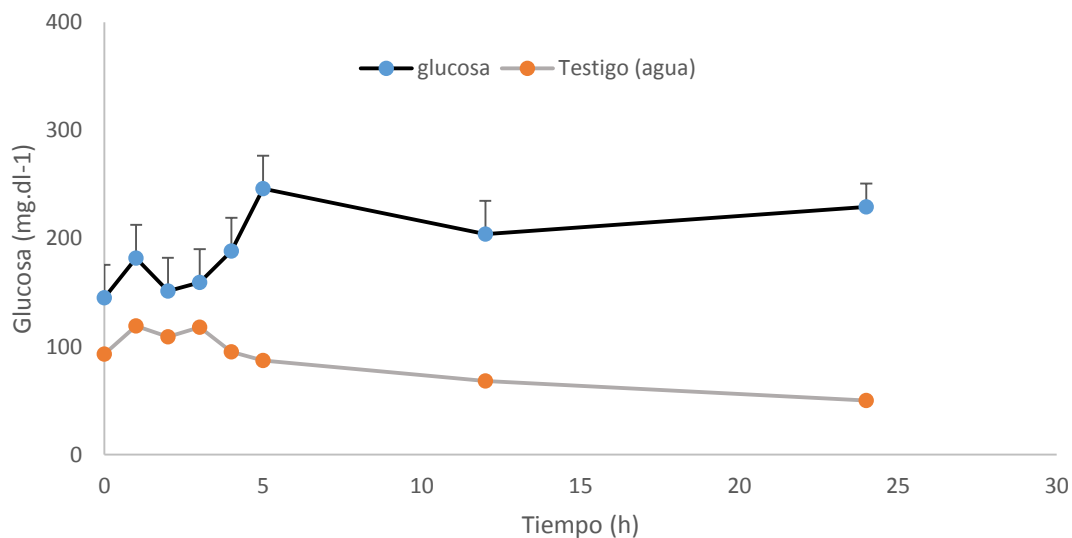


Figura 16.- Curva de tolerancia a la glucosa suministrada vía oral en juveniles silvestres de *E. morio*, aclimatados por durante 5 semanas a una alimento de referencia, sin almidón (REF) conteniendo y con 45 % de proteína, y 6 % de lípidos y 0% de carbohidratos. Tiempos de muestreo en intervalos de: 0 h , 1h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h y 24 horas.

Tratamiento con Almidón de Maíz Crudo

Los juveniles silvestres aclimatados a el tratamiento con almidón de maíz crudo mostraron el pico de glucosa más alto en la hora 4 después de la dosis de glucosa (324.6 ± 33.6 mg .dl⁻¹) este valor fue significativo con respecto al tiempo 0 h ($p < 0.05$). Después del tiempo 4 h la glucosa tendió a disminuir pero las diferencias no fueron significativas en los tiempos 5 h, 12 h, 24 h con respecto al pico más alto de la glucosa ($p > 0.05$).

La tendencia del testigo durante todo la prueba fue a disminuir los valores de glucosa, se registró el valor más bajo en la medición de 24 horas (38 mg.dl⁻¹), (Figura 17).

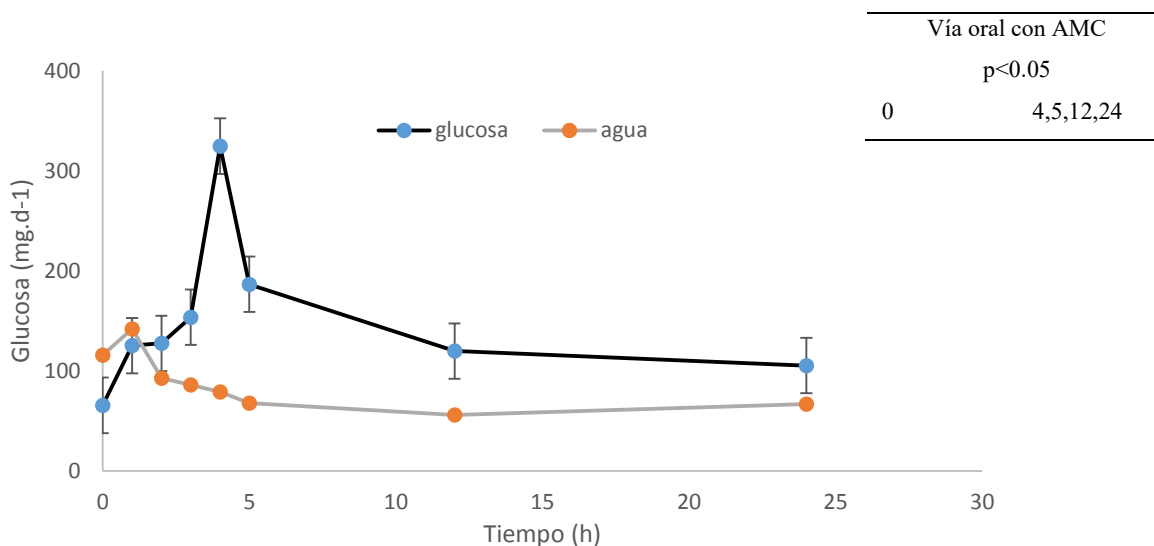


Figura 17.- Curva de tolerancia a la glucosa suministrada vía oral en juveniles silvestres de *E. morio*, aclimatados por durante 5 semanas a un alimento con almidon de maíz crudo (AMC) 15%, y con 45 % de proteína y 6 % de lípidos. Tiempos de muestreo: 0h , 1h, 2h, 3h, 4h, 5h y 24 horas.

Cuando se compararon los juveniles alimentados con dieta REF y dieta AMC, los valores registrados fueron más altos en los peces aclimatados a la dieta AMC (324.6 ± 33.6 y 246 ± 95.3 mg.dl⁻¹; respectivamente). Los juveniles aclimatados a la dieta AMC presentaron diferencias significativas con los juveniles alimentados con dieta REF en los tiempos 0 h, 1 h, 4 h, 5 h, 12 h y 24 h ($p < 0.05$), (Figura 18).

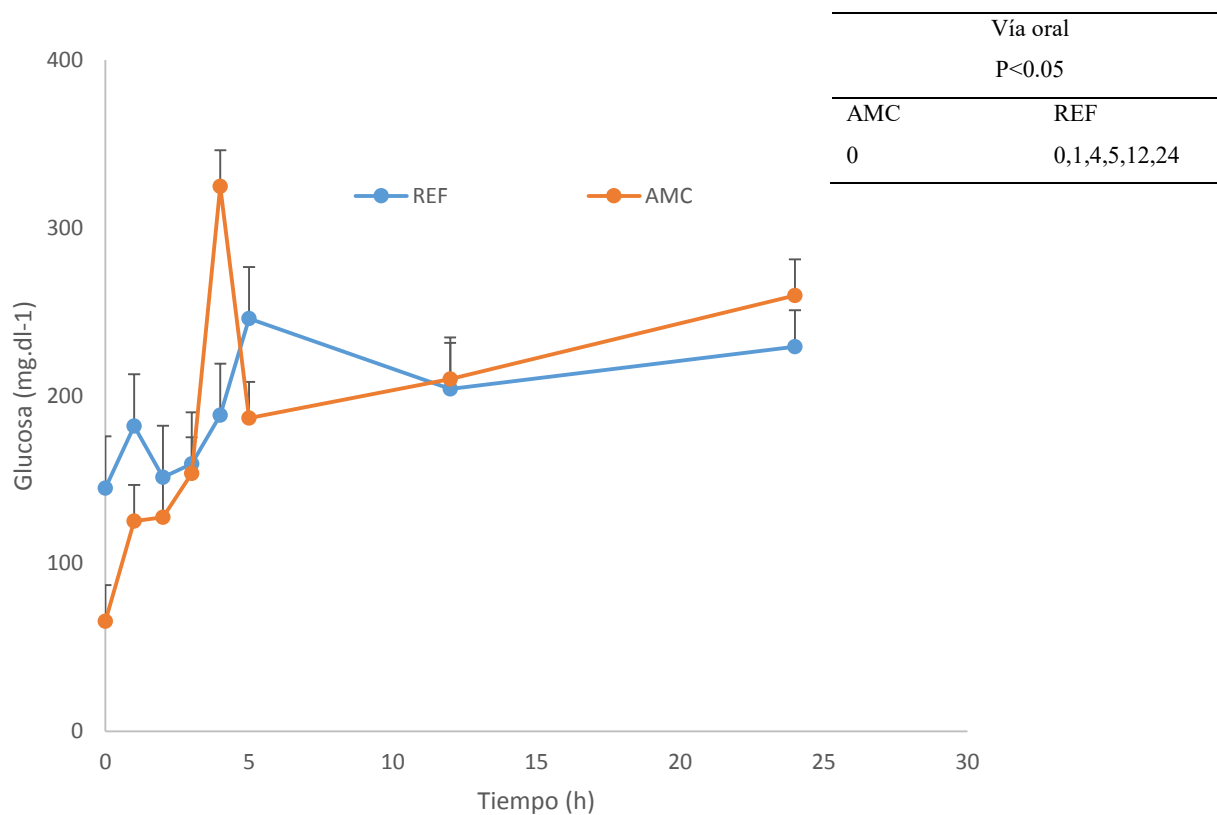


Figura 18. Curva de tolerancia a la glucosa suministrada vía oral en juveniles silvestres de *E. morio*, aclimatados por 5 semanas a un tratamiento sin almidón (REF) comparado con un tratamiento con almidón AMC 15% y con 45 % de proteína y 6 % de lípidos, en intervalos de 0h , 1h, 2h, 3h, 4 h, 5h 12h y 24h. Se utilizaron 3 peces y un testigo. ANDEVA de dos vías $p < 0.05$.

III.4.3.-Curva de tolerancia a la glucosa Vía intraperitoneal:

Tratamiento de Referencia

En esta prueba, la glucosa registró el valor más alto en la hora 12 después de la inyección ($491 \pm 15.5 \text{ mg.dl}^{-1}$), siendo esta diferencia significativa con respecto al tiempo 0 h. El grupo de peces alimentados con el tratamiento de referencia que recibieron la dosis vía oral, se registró el primer pico en tiempo 5 h ($246 \pm 95.3 \text{ mg.dl}^{-1}$). Sin embargo desde la medición en tiempo 2 h. 3 h, 4 h, 5 h y 12 h los valores de la glucosa fueron significativamente más altos que la hora 0 h. A la 24 h de suministrar la dosis, la glucosa disminuyó, sin embargo esta concentración no tuvo diferencias significativas con el tiempo inicial 0 h ($p > 0.05$). El testigo presentó el valor más alto en tiempo 5 h (167 mg.dl^{-1}), manteniendo una tendencia a disminuir hacia las próximas horas, el valor más bajo para el testigo fue en la medición de 24 h posteriores a la inyección (30 mg.dl^{-1}) (Figura 19)

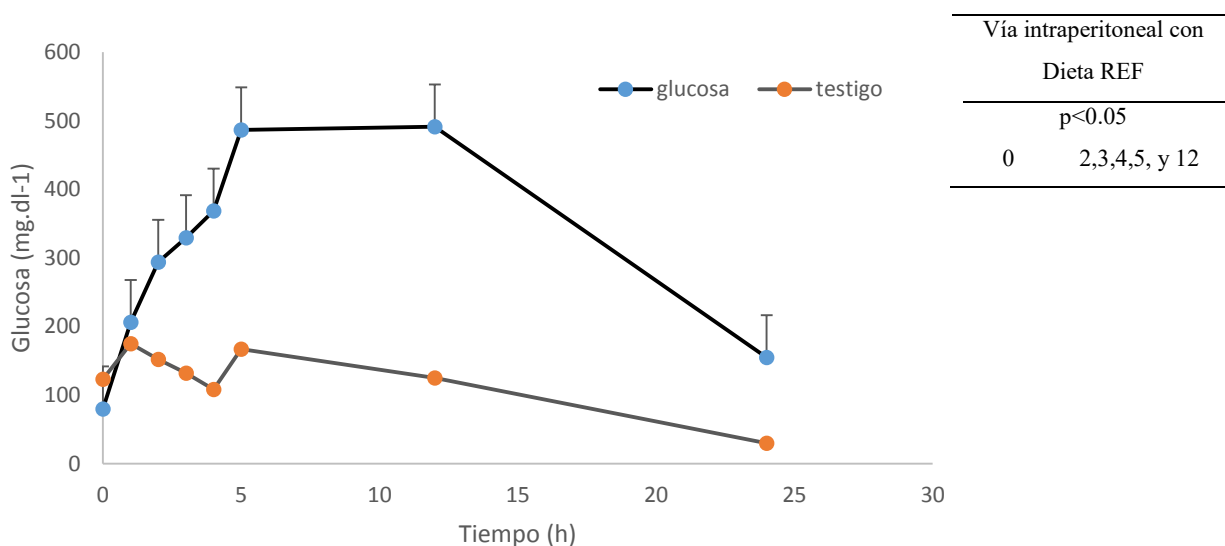


Figura 19. Curva de tolerancia a la glucosa suministrada vía intraperitoneal en juveniles silvestres de *E. morio*, aclimatados por 5 semanas a un tratamiento sin almidón (REF) conteniendo 45 % de proteína y 6 % de lípidos y 0% de carbohidratos. En intervalos de tiempo; 0h, 1h, 2h, 3h, 4h, 5h 12h y 24h. Se utilizaron 3 peces y un testigo. ANDEVA de dos vías $p < 0.05$.

Tratamiento de almidón de maíz crudo: AMC

Los juveniles silvestres alimentados con el tratamiento AMC e inyectados con la dosis de glucosa presentaron a partir del tiempo 1h, un incremento en los valores siendo estos significativamente mayores al tiempo inicial 0h ($p < 0.05$). El pico más alto se presentó en el tiempo 4 h ($396.33 \pm 82.6 \text{ mg.dl}^{-1}$), después existió una tendencia a disminuir y alcanzar el valor más bajo en la medición de 24 horas ($22. \pm 3 2.5 \text{ mg.dl}^{-1}$). La concentración de la glucosa inicial 0 h, no presentó diferencias significativas con el tiempo final 24 h ($p > 0.05$).

El testigo en esta prueba mostró el valor más elevado en la 4 hora (281 mg.dl^{-1}), siendo menor que el valor del grupo experimental en el mismo tiempo. Después de este pico los valores de glucosa del testigo tuvieron una tendencia a disminuir hasta las 24 horas donde se registró un valor más bajo que el valor inicial para este testigo (65 mg.dl^{-1} ;) El la cantidad de glucosa en los peces experimentales fue más baja en la hora 24 h que el valor final del testigo (22.33 mg.dl^{-1} y 65 mg.dl^{-1}), (Figura 20).

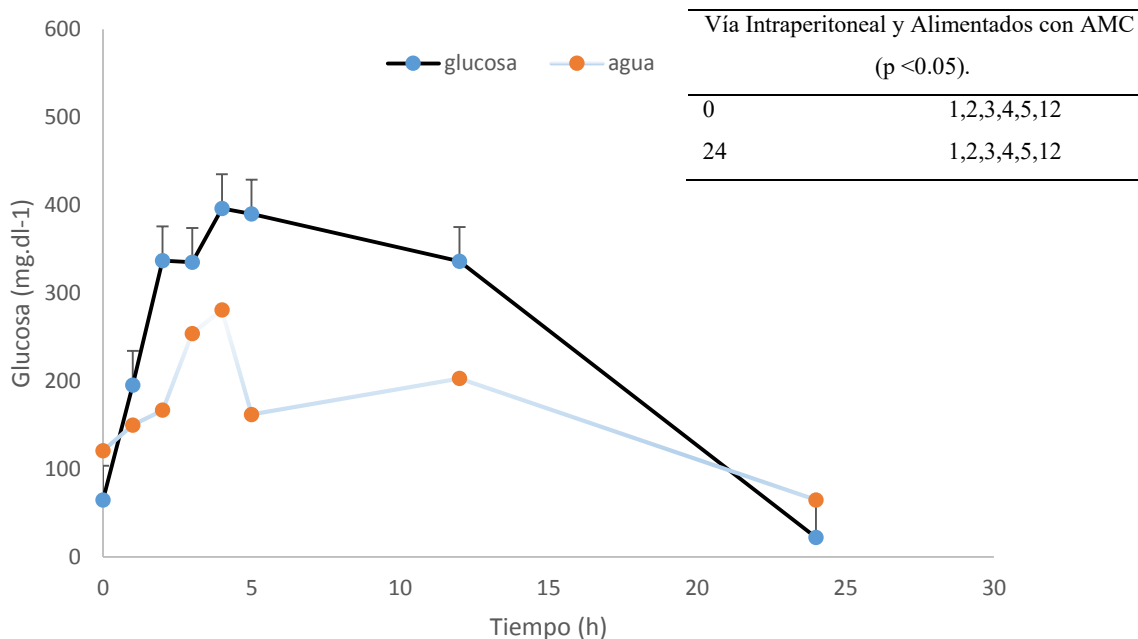


Figura 20. Curva de tolerancia a la glucosa suministrada vía intraperitoneal en juveniles silvestres de *E. morio*, aclimatados por 5 semanas a un tratamiento con almidón de maíz (AMC) conteniendo 45 % de proteína y 6 % de lípidos y 20% de carbohidratos. En intervalos de tiempo; 0h, 1h, 2h, 3h, 4h, 5h 12h y 24h. Se utilizaron 3 peces y un testigo. ANDEVA de dos vías $p < 0.05$.

Comparando los dos tratamientos AMC y REF, se encontró que los valores de la glucosa después del tiempo 2 h de la dieta AMC, fueron más altos que el tiempo 0h en REF ($p < 0.05$). El tiempo 1 h, 2 h, y 3 h en REF fueron diferentes al tiempo 24 h de AMC. El tiempo 4 h, 5 h y 12 h de REF fueron mayores que el tiempo 24 h de AMC ($p < 0.05$). El pico más alto en REF se presentó en el tiempo 12 h sin embargo no presentó diferencias significativas con el mismo tiempo de AMC (12 h). El pico de AMC se presentó en el tiempo 4 h ($p > 0.05$). El tiempo final 24 h en ambas dietas el valor de la glucosa disminuyó, pero en AMC el valor fue menor que en REF (22.33 y 154.66 $\text{mg}\cdot\text{dl}^{-1}$ $p < 0.05$), (Figura 21)

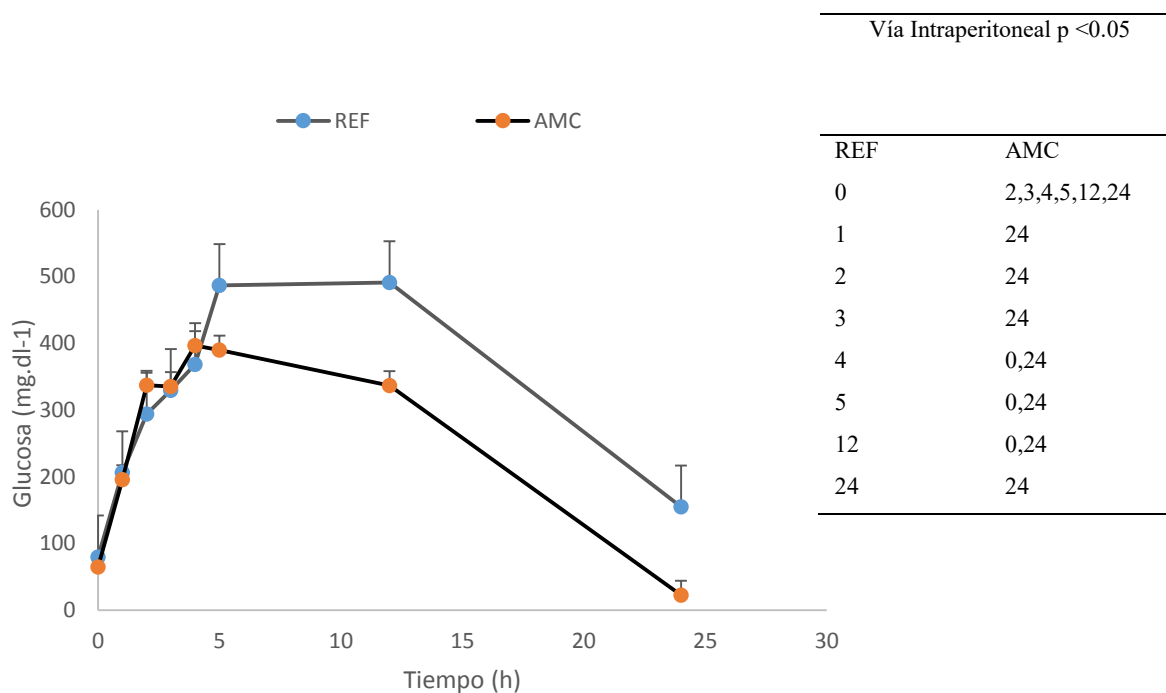


Figura 21. Curva de tolerancia a la glucosa suministrada vía intraperitoneal en juveniles silvestres de *E. morio*, aclimatados por 5 semanas un tratamiento con almidón de maíz crudo (AMC) y un tratamiento sin almidón (REF). En intervalos de tiempo; 0h, 1h, 2h, 3h, 4h, 5h 12h y 24h. Se utilizaron 3 peces y un testigo. ANDEVA de dos vías $p < 0.05$.

En los peces que se les proporciono la dosis de glucosa vía oral en el tiempo 0h presentaron diferencias con el tiempo 5h, 12h y 24h ($p<0.05$). En el tiempo 2h y 3h de vía oral, los peces presentaron diferencias con los dos puntos más altos de la curva del vía intraperitoneal 5h y 12 h ($p<0.05$), y solo el pico más alto de la curva de glucosa vía oral en el tiempo 5h presento diferencias con el tiempo 0h de la curva de glucosa por vía intraperitoneal (Figura 22).

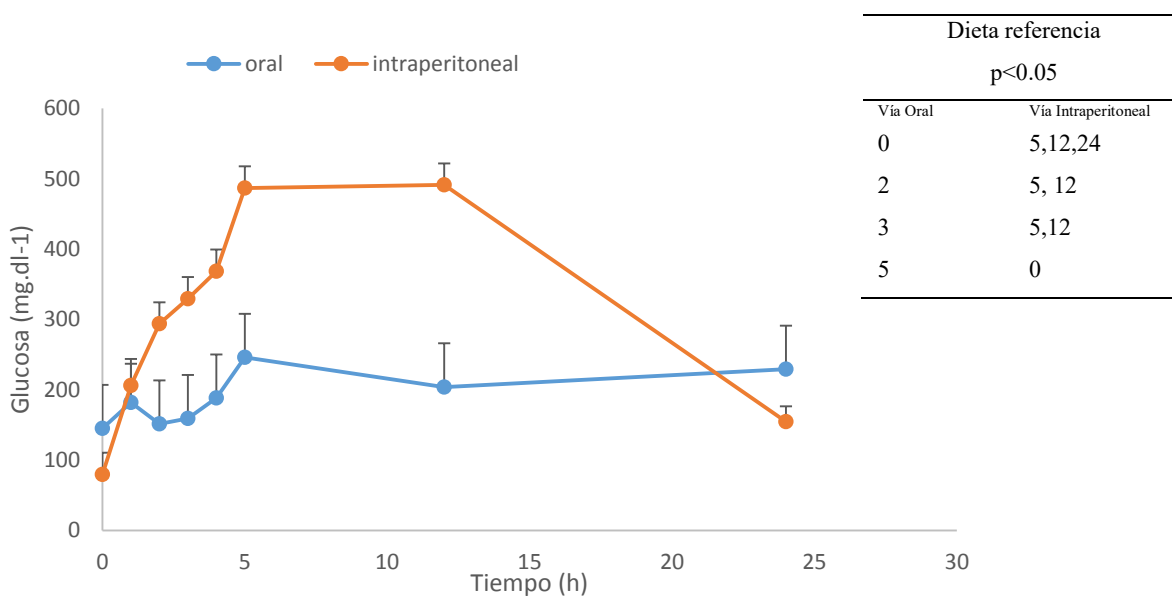


Figura 22. Curva de tolerancia a la glucosa suministrada vía oral y vía intraperitoneal en juveniles silvestres de *E. morio*, aclimatados por 5 semana de un tratamiento sin almidón (REF) En intervalos de tiempo; 0h, 1h, 2h, 3h, 4h, 5h 12h y 24h. Se utilizaron 3 peces y un testigo. ANDEVA de dos vías $p<0.05$.

Al comparar el método vía oral y vía intraperitoneal, se encontró que el tiempo inicial 0h de método vía oral, presentó diferencias con 1h,2h,3h,4h,5h y 12h de la vía intraperitoneal ($p<0.05$). Las mediciones más altas en el tiempo 4h y 5h del método oral presentaron diferencias con el tiempo 0h y 25h del método por vía intraperitoneal ($p<0.05$), lo mismo ocurrió en el tiempo 12h de vía oral comparado con el tiempo final de vía intraperitoneal ($p<0.05$) /Figura 23).

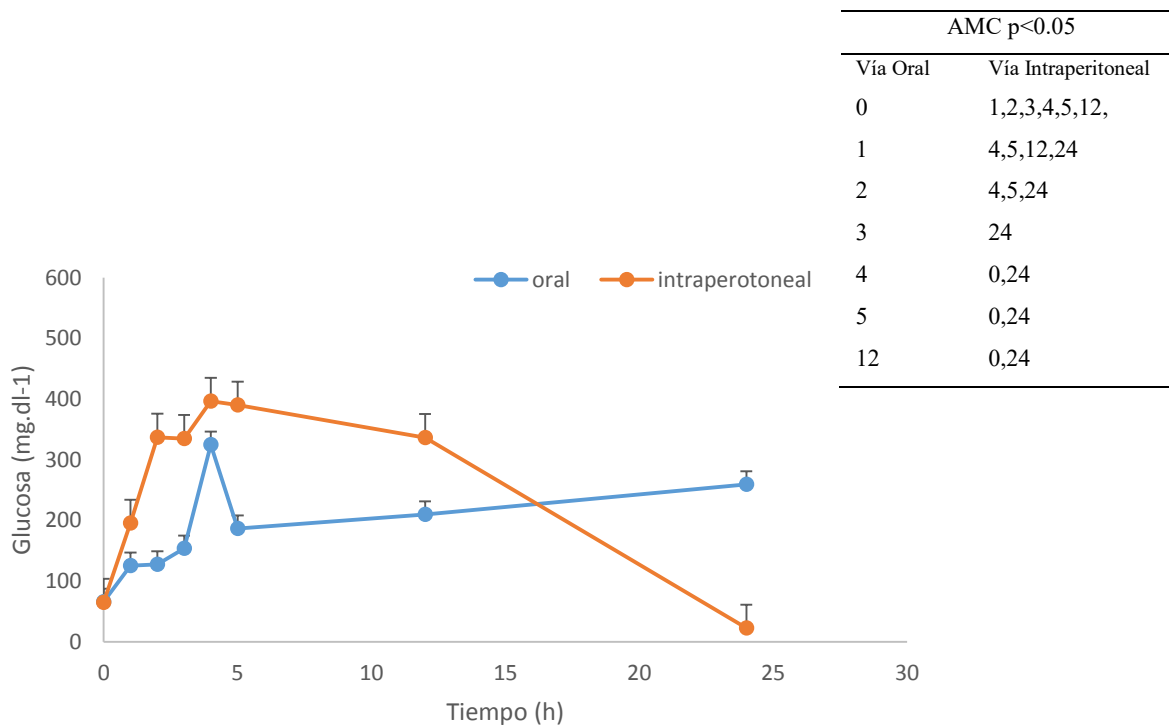


Figura 23. Curva de tolerancia a la glucosa suministrada vía oral y vía intraperitoneal en juveniles silvestres de *E. morio*, aclimatados por 5 semanas con un tratamiento de almidón de maíz (AMC). En intervalos de tiempo; 0h, 1h, 2h, 3h, 4h, 5h 12h y 24h. Se utilizaron 3 peces y un testigo. ANDEVA de dos vías $p<0.05$.

Tabla 18. Resumen de las curvas de tolerancia a la glucosa de *E. morio* en los ensayos Grupal e Individual, en juveniles aclimatados al tratamiento REF (sin almidón) y al tratamiento AMC (con almidón de maíz crudo), con la glucosa administrada vía oral (O) y vía intraperitoneal (IP).

	Tratamiento	Método	Observaciones
Grupal	REF	O	Dos picos de glucosa al tiempo 2h y 12 h el mayor a las 12h ($p>0.05$) T inicial 0h = T final 24 h
	AMC	O	Dos picos de glucosa al tiempo 2h y 12h el mayor a las 2h T inicial 0h = T final 24 h
Individual	REF	O	1 pico máximo a las 5h. No hay diferencias entre los tiempos ($p>0.05$).
	AMC	O	1 pico máximo a las 4h. T inicial 0h, 1h, 2h, 3h y T final 24h \neq pico máximo 4h ($p<0.05$)
	REF	IP	2 picos 5h y 12h T inicial 0h = T final 24 h ($p<0.05$)
	AMC	IP	1 pico máximo 4 h T inicial 0h = T final 24 h ($p<0.5$)

III.4.4. Metabolitos: Glucosa y Glucógeno

Fueron evaluados 10 peces de cada dieta al finalizar el periodo de aclimatación a los dos tratamientos (6 semanas), y antes de iniciar el experimento de suministro de glucosa. Los juveniles silvestres de *E. morio* alimentados con el tratamiento de REF presentaron la concentración de glucosa más bajo (37.9 ± 3.9 mg.dl⁻¹), sin embargo esta diferencia no fue significativa. Sin embargo el glucógeno presentó la mayor concentración en los juveniles de *E. morio* aclimatados al tratamiento AMC (137.2 ± 14.5 mg.g⁻¹) (Tabla 19).

Tabla 19. Glucógeno ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) y Glucosa ($\text{mg}\cdot\text{dl}^{-1}$) en juveniles de *E. morio* aclimatados por 6 semanas a tratamientos sin almidón (REF) y al tratamiento con almidón (AMC). Las dietas contenían 45% proteína, 6% de lípidos y 15 % de carbohidratos.

	AMC	REF
Glucógeno ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$),	137.2 ± 14.5^a	87.4 ± 14.5^b
Glucosa ($\text{mg}\cdot\text{dl}^{-1}$),	51.7 ± 4.1^a	37.9 ± 3.9^a

Kruskal Wallis ($p < 0.05$) \pm E.S. $n=10$

Se evaluó la actividad enzimática de las enzimas que regulan el metabolismo intermediario en el hígado de peces, como se muestra en la tabla la HK-I, la GDH fueron mayores en los juveniles alimentados con AMC, pero estas diferencias no fueron significativas. La GK mostró la misma actividad en los dos tratamientos, sin embargo la PK fue mayor en el tratamiento AMC ($p < 0.05$). En cuanto a la FBPasa la enzima involucrada en la gluconeogénesis la mayor actividad se presentó en el tratamiento REF siendo esta diferencia significativa. La G6P-DH no mostró diferencias entre los dos tratamientos (Tabla 20).

Tabla 20. Enzimas que regulan el metabolismo intermediario, evaluadas en juveniles silvestres aclimatados a un tratamiento con Almidón de Maíz Crudo (AMC) y un tratamiento sin almidón (REF). La actividad enzimática específica es expresada en $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$ de proteína. Las dietas presentan 45% de proteínas, 6% de lípidos y 15 % de carbohidratos o talco en el tratamiento REF.

N=10	AMC (15% carbohidratos)	REF (0% carbohidratos)
<i>Hexocinasa - I</i>	0.4 ± 0.04^a	0.3 ± 0.04^a
<i>Hexocinasa - II</i>	0.1 ± 0.2^a	0.1 ± 0.2^a
<i>Glucosa deshidrogenasa</i>	0.4 ± 0.1^a	0.3 ± 0.1^a
<i>Glucocinasa</i>	0.1 ± 0.03^a	0.1 ± 0.03^a
<i>Fructosa 1,6-bifosfatasa</i>	9.8 ± 0.5^b	11.5 ± 0.5^a
<i>6-Fosfogluconato deshidrogenasa</i>	29.6 ± 3.3^a	25.94 ± 3.1^a
<i>Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa</i>	39.8 ± 4.0^a	30.5 ± 4.0^a
<i>Piruvato Cinasa</i>	7.5 ± 0.9^b	3.7 ± 0.9^a

Promedio \pm ES. Prueba de Kruskal-Wallis $P < 0.05$

III.5. Discusión

III.5.1. Tolerancia de E. morio a la glucosa dietética

El término de tolerancia a la glucosa se refiere a la capacidad de un organismo por retornar a su condición basal después de haber asimilado una carga de concentración de glucosa, de manera oral, venosa o intraperitoneal (Moon, 2000). Cuando el organismo no es capaz de retornar a esta condición basal en las primeras horas (1h y 2 h), y la hiperglucemia se prolonga durante más tiempo, el organismo es considerado intolerante a la glucosa. Dentro de los diferentes ensayos propuestos en este trabajo, independientemente del método (oral o intraperitoneal) y dieta a la que fueron aclimatados los juveniles de *E. morio*, los peces fueron incapaces de retornar a su estado basal de glucosa después de ser suministrada la concentración de glucosa (170 mg.100 g peso húmedo⁻¹), por lo que se considera que *E. morio* es una especie que presenta intolerancia a la glucosa. Al respecto existen diversos trabajos para determinar la utilización de la glucosa a partir de la evaluación de la curva de tolerancia en diferentes especies. En general, se conoce que los peces presentan un nivel de tolerancia a la glucosa que varía entre especies dependiendo principalmente de sus hábitos alimenticios (Furuichi y Yone, 1981; Harmon *et al.*, 1991; Garcia-Riera y Hemre, 1996). Por ejemplo, Furuichi y Yone (1981) determinaron que la tolerancia a la glucosa fue baja en el *Seriola lalandi* seguido del *Pagellus bogaraveo* , y finalmente *Cyprinus carpio* . Este comportamiento sugiere que a diferencia de los mamíferos, los peces presentan niveles de glucosa en plasma más elevados después de recibir una dosis concentrada de glucosa, así como un lento retorno a los niveles basales de glucosa (Peres *et al.* 1999).

III.5.2. Glucosa como indicador de estrés en peces

Curva de tolerancia a la glucosa grupal

Método Vía oral

Durante los ensayos de peces alimentados con los tratamientos REF y AMC, los peces solo fueron anestesiados en el momento de administrar la dosis de glucosa y después colocados en sus tanques a esperar el tiempo para ser evaluados.

De esta forma los peces después de la administración de glucosa vía oral, salieron de la anestesia, y fueron colocados en sus tanques en donde tuvieron un mayor número de eventos que lograron generar la pérdida de la glucosa administrada vía oral. Tales factores fueron la pérdida de la glucosa por regurgitación, el estrés generado por la manipulación, lo cual podría explicar el comportamiento del testigo (con agua) en el cual se presentó un ascenso de los valores de glucosa durante las primeras horas de ser administrada la glucosa. Al respecto, se conoce que los procedimientos experimentales que incluyen la manipulación y la toma de la muestra en peces inducen a un estrés primario en estos animales (Mazeaud *et al.*, 1977). En la prueba realizada aquí, el valor de glucosa alto en las primeras horas estaría relacionado, como se ha mencionado anteriormente, como una respuesta al estrés por la manipulación. Considerando al estrés como una variable que podría meter ruido en los resultados y enmascarar el verdadero efecto de la tolerancia de la glucosa. Los primeros estudios que abordaron el tema del comportamiento de la glucosa en peces, mencionan que los teleósteos son peces muy sensibles a presentar hiperglucemia a causa del estrés. Los autores sugieren que se debe considerar la elección de métodos que disminuyan el estrés durante los ensayos experimentales (métodos de captura, transporte, niveles de oxígeno y manipulación) (Chavin y Young 1969).

III.5.3 Adaptación a la dieta con carbohidratos

Durante los dos ensayos; con el tratamiento REF y el tratamiento AMC, fue posible encontrar dos picos máximos de glucosa por arriba de los valores del testigo, y además en el tiempo final 24h, lograron retornar a valores bajos, donde el tiempo inicial 0h no presentó diferencias significativas al tiempo 24h ($p > 0.05$) para los dos ensayos (Figuras 14 y 15).

Cuando son comparados los resultados de ambos ensayos, es decir, los juveniles aclimatados a los alimentos AMC y REF, en esta prueba grupal (Figura 9), se observa un comportamiento similar entre los dos grupos de peces, 2 picos de valores máximos en tiempo 2h y 12h. Aunque no existen diferencias significativas en los picos máximos entre los dos tratamientos, el primero pico de los juveniles alimentados con AMC es más alto que el primer pico de los juveniles alimentados con REF. Sin embargo, para el segundo pico, en el tratamiento AMC logra descender muy por debajo de su primer pico (119.7 y 88.7 $\text{mg}\cdot\text{dl}^{-1}$), a diferencia del

segundo pico del tratamiento REF que llega a ser más elevado que el primer pico al tiempo 2h (101.6 y 115 mg.dl⁻¹). Este comportamiento podría indicar que los juveniles aclimatados a al tratamiento AMC inicialmente presentaron un pico elevado, pero fueron capaces de estabilizar los niveles de glucosa, logrando su retorno en el tiempo final 24h, siendo más bajo aún que los valores de la curva de los juveniles alimentados con REF (30.2 y 20.1 mg.dl⁻¹). Se ha reportado que los peces alimentados con los tratamientos que contienen carbohidratos pueden mantener adaptación a estas alimentos manteniendo una homeostasis en la concentración de glucosa en plasma y destinando el exceso de glucosa a la producción de lípidos (Harmon *et al.*, 1991). Esta condición de adaptación a los carbohidratos es debido a que la producción de insulina es estimulada por la glucosa administrada. En diferentes peces se ha observado que el nivel de insulina circulatoria se incrementa en el plasma con la carga de glucosa proporcionada a los peces (Furuichi y Yone, 1981, Mazur *et al.*, 1992 y Blasco *et al.*, 2001). Polakof y Panserat (2015), mencionan diversos trabajos realizados sobre la tolerancia a la glucosa en peces carnívoros; estos autores mencionan los trabajos realizados por Capilla *et al* (2013) sobre la capacidad endócrina de los peces para producir insulina.

Curva de tolerancia a la glucosa (prueba individual)

Durante el desarrollo de este experimento se obtuvo un mayor control del estrés generado por el manejo, ya que los peces se mantuvieron en tinas individuales y anestesiados todo el tiempo.

Método vía oral

En esta prueba, los juveniles alimentados con el tratamiento REF presentaron un pico máximo de glucosa al tiempo 5h. Estos peces desde el inicio de la prueba en el tiempo 0h presentaron valores de glucosa elevados (145.0 mg.dl⁻¹). Al administrar la dosis de glucosa, los valores se elevaron hasta alcanzar el pico máximo en el tiempo 5h (24 mg.dl⁻¹). Después, los valores descendieron muy lentamente, y en el tiempo final (24h) los valores de glucosa aún se encontraron elevados (229. 2 mg.dl⁻¹). Estos resultados indican que los peces alimentados con el tratamiento REF mantuvieron un estado hiperglucémico prolongado durante toda la prueba y fueron incapaces de retornar a su estado basal (Figura 17).

Los juveniles alimentados con el tratamiento AMC presentaron de inicio valores de glucosa bajos (65.6 mg.dl^{-1} , Figura 10), y lograron su pico máximo en el tiempo 4h (324.7 mg.dl^{-1}), a diferencia de los juveniles alimentados con el tratamiento REF (Figura 18). En este ensayo, los niveles de glucosa, a pesar de alcanzar valores más elevados, lograron disminuir gradualmente hasta el tiempo final 24h (105.4 mg.dl^{-1}). Aunque la medición final no mostró diferencias significativas con respecto al tiempo 0h, es posible sugerir que los juveniles alimentados con el tratamiento AMC presentaron una mejor tolerancia a la carga de glucosa proporcionada, asociada a un efecto de adaptación a los carbohidratos (Figura 19).

Método vía intraperitoneal

Los valores de glucosa en plasma los juveniles que fueron inyectados vía intraperitoneal fueron más altos que los observados al suministrar la glucosa por vía oral. En el tratamiento REF el valor máximo se encontró en el tiempo 5h (486.6 mg.dl^{-1}) (Figura, 20). Para los juveniles alimentados con AMC, el pico máximo se presentó en el tiempo 4h (396.3 mg.dl^{-1}) (Figura 21) y la tendencia con el tiempo fue a disminuir hasta lograr su valor más bajo a las 24h (22.3 mg.dl^{-1}). Este nivel de glucosa fue menor que el de los peces alimentados con tratamiento REF ($p < 0.05$). Una vez más se pudo comprobar que *E. morio*, adaptado a una dieta que contiene carbohidratos, puede tolerar más la carga de glucosa (Figura 21). Aunque en los dos tratamientos la tendencia a disminuir fue marcada, la hiperglucemia fue más prolongada en la curva de los juveniles alimentados con REF, incluso el valor de la glucosa en el tiempo final 24h no retornó a sus valores iniciales, siendo significativamente mayor al el tiempo final 24h que al inicial 0h ($p < 0.05$) (Figura 22).

Los tratamientos de los juveniles alimentados con AMC, y con el método de administración de la glucosa vía intraperitoneal, es la que mostró la mejor la curva de tolerancia a la glucosa.

III.5.4. Comparación de la curva de tolerancia a la glucosa de *E. morio* con otras especies.

Se ha reportado que existen diferencias importantes en la tolerancia a la glucosa entre especies de diferentes hábitos alimenticios. Por ejemplo, la carpa presenta más tolerancia a la glucosa, mostrando un pico máximo próximo a la primera hora, y una rápida recuperación de los niveles basales dentro de las primeras 5 horas, después de haber sido suministrada la dosis de glucosa (Hertz *et al.*, 1989).

En especies omnívoras y carnívoras, el pico es más alto se presenta posterior a la primera, como resultado de la baja asimilación de la glucosa y la recuperación de los valores basales tarda aproximadamente 72 h. Así ha sido reportado para especies como *Sparus aurata*, que presenta su pico más alto entre las 1-3 horas después de la inyección intraperitoneal, y *Dicentrarchus labrax* que lo presenta entre 3 - 6 horas después (Peres y Gonclaves, 1999).

En la *Perca fluviatilis*, que es un pez omnívoro, presenta el pico más alto en la primera hora después de ser inyectada la glucosa, lo que demostró la facilidad de asimilar la glucosa desde la cavidad peritoneal. Este pez presenta una capacidad de asimilar la glucosa, típica de los omnívoros como la carpa común, que regresa a sus valores basales de 4 a 5 horas después de la inyección (Stone y Allan 2003).

El *E. morio*, en el ensayo donde estuvieron anestesiados, mostró en la prueba individual el pico máximo en el tiempo 5h para los peces alimentados con el tratamiento REF, y a las 4h para los alimentados con el tratamiento AMC, y por el método intraperitoneal, el pico se presentó entre 5-12 h en los peces alimentados con el tratamiento REF y en el tiempo 5 h en los alimentados con el tratamiento AMC. De acuerdo a estos resultados, *E. morio* presenta una curva de tolerancia a la glucosa similar a la de especies carnívoras como *S. aurata* y *D. labrax*.

Vía oral y vía intraperitoneal

La habilidad de un organismo para asimilar la glucosa es absolutamente dependiente del transporte activo. La ruta de asimilación de la glucosa vía intraperitoneal y la glucosa oral, es diferente. La glucosa inyectada en el peritoneo no ha sido asimilada como parte del proceso del transporte activo, a través del epitelio celular del aparato digestivo.

La glucosa introducida vía oral aún tiene que ser transportada hacia el plasma donde será enviada a varias rutas; podría ser almacenada en forma de glucógeno, o incorporada como grasa o proteína (Champe y Harvey 1994), y además puede ser excretada por las branquias (Hemre y Kahrs 1997).

Otra vía del exceso de glucosa es la excreción renal por la orina (glicosuria). La glicosuria ha sido reportada para peces carnívoros (Furuichi et al., 1986). Los índices de glucosa observada en especies herbívoras como la carpa manifiestan su condición apta para utilizar la glucosa, ya que entre las 4 a 8 horas después de haberse suministrado la glucosa, recuperan sus valores basales.

E. morio mostró en la prueba individual una capacidad limitada para absorber la glucosa, en ambos procesos experimentales. Cuando la glucosa fue suministrada vía oral y vía intraperitoneal, los valores máximos se encontraron en el tiempo 4h y 5h (Figuras 16 y 17), muy similar a los valores obtenidos para los carnívoros *Sparus aurata* y *Dicentraxtus labrax*. Sin embargo, para *E. morio* fue posible encontrar una rápida recuperación de los valores basales dentro de las 24 horas, a diferencia de los carnívoros *Sparus aurata* y *Dicentraxtus labrax* los cuales presentaron su recuperación después de 72 horas (Peres H. y Gonclaves 1999).

III.5.5. Enzimas que regulan el metabolismo intermediario.

Al comparar los resultados obtenidos con los tratamientos REF y AMC, se observó que con la inclusión de AMC al 15 % en el alimento, hubo cambios significativos en enzimas clave como la PK, que mostró una actividad casi del doble de aquella observada en los juveniles alimentados con los tratamientos REF (7.5 y 3.7 U. mg proteína⁻¹), (Tabla 20). Esta enzima es un indicador de que la glucosa dietética logró ser fosforilada e incorporada a la vía de la

glucólisis para la obtención de energía, y se encontró una menor actividad de la FBPasa en los peces del tratamiento AMC, indicando una menor actividad en la vía gluconeogénica, y con ello un quizás un menor uso de proteína como sustrato energético. Aunque no existieron diferencias significativas en las enzimas que regulan la vía PPP, la 6PG-DH y G6P-DH, fue posible ver una tendencia a tener mayor actividad en los juveniles alimentados con el tratamiento AMC. Esta mayor actividad en enzimas reguladoras del metabolismo intermediario como la PK, 6PG-DH y G6P-DH podrían explicar el aumento de glucosa 6-fosfato disponible para acumular reservas energéticas por medio de la lipogénesis y la gluconeogénesis. Una evidencia que apoya este resultado es la mayor cantidad de glucógeno encontrada en los juveniles alimentados con AMC (137 mg.g⁻¹; p<0.05). En cuanto a la glucosa, los valores no fueron diferentes entre los dos tratamientos, *E. morio* logro regular la glucosa y presentar un estado óptimo con los dos tratamientos (Tabla 20).

Se han realizado diferentes estudios para determinar la actividad de enzimas reguladoras en el metabolismo intermediario en especies tales como *S. salar* (Hemre y Hansen, 1998), *S. aurata* (Fernández *et al.*, 2006; Panserat *et al.*, 2008), *D. labrax* (Henes y Perés, 2011). Estas especies, al ser sometidas a periodos de aclimatación a dietas con carbohidratos, tuvieron un incremento de enzimas reguladores de la glucólisis y de la lipogénesis, y una disminución en enzimas que intervienen en el catabolismo de proteínas.

III.6.-Conclusiones

1. *E. morio* es un carnívoro que presenta baja tolerancia a la glucosa: presentó sus picos de glucosa más altos después de las 2 horas de ser suministrada la glucosa, sin embargo fue capaz de recuperar los niveles de glucosa iniciales a las 24 horas de ser suministrada la glucosa, lo que demuestra que *E. morio* es un pez que tiene los mecanismos reguladores que le permiten asimilar la glucosa dietética y bajar los niveles de glucosa en sangre en un tiempo menor que otras especies de carnívoros como *S. aurata* y *D. labrax*, que presentan un nivel de compensación de glucosa de 72 h.

2. En la prueba individual, *E. morio* mostró una capacidad limitada para absorber la glucosa en ambas condiciones experimentales (glucosa suministrada por vía oral y vía intraperitoneal) donde los valores máximos se encontraron entre las 4h y 5h (Figuras 23 y 24), de manera muy similar a los carnívoros *Sparus aurata* y *Dicentraxtus labrax*.

3. El mejor método para obtener una curva de tolerancia a la glucosa, que permite observar el proceso fisiológico de homeostasis de la glucosa, fue el método donde la glucosa fue suministrada por vía intraperitoneal y cuando los peces se mantuvieron anestesiados durante el tiempo que duró el experimento, de esta forma se evitó la pérdida de glucosa por las branquias (regurgitación) que afectó en la prueba cuando la glucosa fue suministrada vía oral. Además, los peces, al encontrarse anestesiados, no presentaron tanto estrés por la manipulación, que pudiera alterar las mediciones de glucosa.

4. Los peces que fueron alimentados con el tratamiento AMC presentaron una mejor tolerancia a la glucosa que los peces alimentados con el tratamiento REF, que en la prueba donde se suministró glucosa por vía oral, permanecieron hiperglucémicos durante todo el experimento, mientras que aquellos alimentados con el tratamiento AMC donde los niveles de glucosa, a pesar de alcanzar valores más elevados, lograron disminuir gradualmente hasta el tiempo final 24h (105 mg.dl⁻¹). Aunque la medición final no mostró diferencias significativas con respecto al tiempo 0h, es posible sugerir que los juveniles alimentados con el tratamiento AMC tuvieron una mejor tolerancia a la carga de glucosa proporcionada, asociada a un efecto de adaptación a los carbohidratos.

5. La glucosa en plasma no mostró diferencias entre los tratamientos AMC y REF. La PK mostró mayor valor en los juveniles alimentados con el tratamiento AMC, demostrando que la ruta glucolítica se logró activar ; al contrario en los juveniles alimentados con el tratamiento REF, la ruta activa fue la gluconeogenica por lo que los valores de actividad de la FBPasa fueron los mayores en estos peces. Esto demostró la capacidad del mero rojo de mantener la homeostasis en la regulación de la glucosa.

Capítulo IV

Utilización digestiva de almidones de acuerdo a su origen botánico (maíz, trigo o papa) y procesamiento (waxy o gelatinizado) en juveniles silvestres de *E. morio*.

IV.1.Introducción

En el capítulo II de este trabajo se mencionaron las principales propiedades fisicoquímicas dependiente su fuente botánica (papa, trigo y maíz) de los almidones. Se menciona que la microestructura dentro del gránulo esta generada por la presencia de poros en la superficie de los gránulos y la proporción de amilosa:amilopectina que les confieren características particulares en tamaño y forma a los gránulos, que varia según el origen botánico.

Dependiendo de esta naturaleza, el almidón presentará diferencias en la disponibilidad de enlaces α -1, 4glucosídicos para la acción de las carbohidrasas y con ello se reflejara en la cantidad de glucosa disponible para activar las rutas glucolíticas.

En el presente capítulo, se estudiara el efecto de almidones gelatinizados y el efecto de almidon modificado waxy, con mayor cantidad de amilopectina y su influencia en la digestión de las carbohidrasas y sobre la actividad de las enzimas del metabolismo intermediario.

IV.1.1.Procesamiento hidrotérmico en los almidones.

Gelatinización

La gelatinización es un proceso de hidratación de los gránulos de almidón, como estos son insolubles a temperatura ambiente, es necesario un aumento en la temperatura para lograr la hidratación del gránulo. En la gelatinización cambio fisicoquímico ya que hay un cambio en la estructura molecular de las amilosa y la amilopectina. De un estructura semicristalina pasan a una estructura amorfa.

El proceso de gelatinización se ha dividido en tres fases:

- i) Difusión del agua al interior del gránulo y esta absorción origina el rompimiento de los puentes de hidrógeno quedando libre los grupos hidroxilos de las moléculas del almidón que interaccionan con la molécula del agua
- ii) Las moléculas de la amilosa se difunden al medio acuoso logrando una mayor movilidad dentro del gránulo esta difusión de la molécula es reversible (Tester y Debon 2000; citado por Tovar B. 2008).
- iii) Cuando el calentamiento es continuo se desintegran las zonas cristalinas, ahora si el proceso es irreversible por la disociación de las dobles hélices propias de la región cristalina que esta formada por la molécula de amilopectina (Lai y Kokini, 1991; citado por Tovar B., 2008). Fuera de los gránulos la amilosa forma una malla que le confiere la estructura de gel al almidón.

Durante la discusión del capítulo II de este trabajo se abordó que el porcentaje de amilosa:amilopectina, puede influir en el grado de gelatinización de un almidón.

Los almidones con un mayor porcentaje de amilosa presentara un menor grado de gelatinización y con ello se ha reportado un IG menor (), al contrario con los almidones con mayor cantidad de amilopectina, presentan un grado de gelatinización mayor y con esto un IG mas alto. La cuestión en el presente trabajo es evaluar el efecto de almidones con diferentes proporciones de amilosa:amilopectina, por lo que se eligió un almidón de maíz waxy modificado conteniendo 99% de amilopectina y solo 1% de amilosa, estos almidones presentan una mayor cantidad de enlaces glucosídicos que pueden generar una mayor actividad hidrolítica.

IV.1.2. Almidones modificados

El almidón modificado es un almidón que ha sido sometido a procedimientos físicos, químicos o enzimáticos con el objetivo de modificar sus propiedades fisicoquímicas. El almidón modificado tiene prácticamente las mismas aplicaciones que el almidón normal pero algunas características mejoran y por eso es un aditivo alimentario muy utilizado, sobre todo como espesante, aglutinante, emulgente y estabilizador.

Los almidones nativos de diferentes fuentes botánicas, como maíz, papa, trigo, arroz, han sido ampliamente estudiados en relación a su estructura y propiedades fisicoquímicas. Sin embargo, presentan algunas limitaciones como baja resistencia térmica, descomposición térmica y alta tendencia a retrogradar, por lo que no son adecuados para el uso en alimentos. Por tal razón, las modificaciones estructurales, por métodos físicos, químicos y/o enzimáticos, son muy utilizados para obtener las propiedades deseadas para su utilización (Singh, y col., 2007).

La modificación del almidón, involucra la alteración de las características físicas y químicas del almidón nativo, con el fin de desarrollar características deseables para aplicaciones específicas. Se consigue, generalmente, mediante modificaciones químicas, a través de reacciones de derivatización, tales como eterificación, esterificación, reticulación, descomposición (hidrólisis ácida o enzimática y oxidación del almidón) o tratamientos físicos, utilizando calor o humedad (Singh y col., 2007).

Las reacciones por conversión son acompañadas por la interrupción de la estructura cristalina de los polímeros del almidón y de su reducción a moléculas más pequeñas, dentro de estas, se encuentra la hidrólisis ácida (Hoover, 2001). La hidrólisis ácida, interrumpe la estructura del almidón, resultando en cambios a las propiedades funcionales (Wang y Copeland, 2012).

Otro tipo de modificación química es mediante reacciones de sustitución (estabilización), que tienen el objetivo de prevenir la retrogradación del almidón, las cuales incluyen a los almidones fosfatados y succinatados (Robles, 2014)

Para obtener almidón modificado se parte de almidón nativo y se somete a uno o varios procedimientos físicos, químicos o enzimáticos. No todos los almidones nativos son iguales, su composición puede variar en función de la especie vegetal de procedencia y con ella sus propiedades funcionales, por ejemplo la temperatura de gelificación.

En el presente trabajo se estudia el efecto de un almidón modificado Waxy con 99% de amilopectina para evaluar su digestión y asimilación por *E. morio*.

IV.1.3. Metabolismo intermediario en peces

En peces la maquinaria metabólica es muy similar a la de los mamíferos: Las diferencias funcionales radican en la respuesta del organismo y su demanda metabólica a cambios bióticos y abióticos, tales como el control de la temperatura, la osmoregulación, y la oxiregulación, son ejemplos donde la energía juega un papel muy importante en las demandas metabólicas, debido a que los peces están manteniendo constantemente el equilibrio interno con su entorno (Somero, 1997). Por otra parte, los peces, al vivir en el agua, presentan una ventaja importante ya que los desechos nitrogenados son excretados en forma de amonio, lo que le permite tener un mecanismo más simple y de ahorro energético, gracias a esta adaptación fisiológica (Prosser L., 1978).

El metabolismo intermediario es la suma de todas las reacciones enzimáticas que se encuentran intercambiando materia y energía entre la célula y su entorno. Sus principales funciones son: la obtención de energía química de las moléculas combustibles, la conversión de los nutrientes en sillares de construcción o precursores de los componentes de los macronutrientes de la célula, el ensamblaje de estos materiales para formar proteínas, ácidos nucleicos, lípidos y otros componentes celulares, y la formación y degradación de las biomoléculas necesarias para las funciones especializadas de las células (Lehninger, 1997).

El metabolismo intermediario comprende múltiples reacciones de gran complejidad; en este trabajo se estudiaron rutas metabólicas específicas, a través de enzimas clave para comprender el balance en la homeostasis de la glucosa generada por vía endógena y su relación con la producción de glucosa dietética, por medio de la actividad de enzimas como la Glucocinasa (GK EC 2.7.1.2), Hexocinasa I y II (HK-I EC 2.7.1.1), la Piruvato cinasa (PK EC 2.7.1.40), involucradas en la glucólisis, así como la Fructosa 1-6 bifosfatasa (FBPasa EC 3.1.3.11) en la gluconeogénesis, la Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6P-DH EC 1.1.1.49) y la 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PG-DH 1.1.1.44), involucradas estas últimas en la vía de la pentosa fosfato, y la actividad de la Alanino amino transferasa (ALAT 2.6.12) y Aspartato aminotransferasa (ASAT EC 2.6.11) en el catabolismo de proteínas en los juveniles de mero rojo aclimatados a diferentes fuentes de carbohidratos.

Estas enzimas representan, puntos de control clave en los cuales es posible estimar señales

metabólicas sensibles a cambios en las condiciones dietéticas. Newsholme y Crabtree (1986) realizaron estudios comparativos sobre metabolismo intermediario, concluyendo que la actividad máxima de estas enzimas establece la capacidad máxima de flujo a través de las vías en las que participan, por lo que las convierte en importantes indicadores metabólicos.

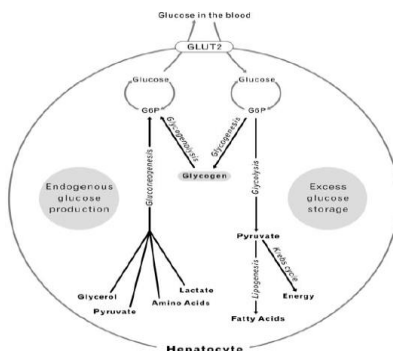


Figura 24. Esquema de los tejidos que presentan sensores de GK y mantienen la homeostasis de la glucosa. Fuente: extraído de Gomis *R., et al.*, (2000).

IV.1.4. Glucólisis

Como se ha mencionado anteriormente, una de las limitaciones en la utilización de los carbohidratos dietéticos en peces es la capacidad de fosforilar a la glucosa. Una vez que ha entrado este nutriente a la célula, se encuentra disponible como sustrato energético en el momento de ser fosforilada por las hexocinasas. Las hexocinasas catalizan la primera reacción de la glucólisis, convirtiendo a la glucosa en glucosa-6-fosfato (Wilson 1995 y 2003; Cárdenas et al., 1998). En los vertebrados han sido identificadas 4 hexocinasas: I, II, III y IV (Wilson 1995). La hexocinasa IV es conocida como glucocinasa (GK) y difiere de las I, II y III por su baja afinidad por la glucosa (Cowey *et al.*, 1981, Panserat *et al.*, 2000).

Glucocinasa (GK ó HK- IV)

Es una enzima fosforilante en la que, a diferencia de otras hexocinasas (I-III), el único sustrato fisiológico relevante es la glucosa. Es una enzima con 50 kD con tres isoformas, GK-I, GK-L₁ y GK-L₂, y está compuesta por 458 a 466 aminoácidos (Veiga-da-Cunha M., 1996). Tiene dos sustratos: la glucosa, y la forma adenosintriofosfato (ATP) Mg ATP². La GK posee una

actividad catalítica de $60-90 \text{ s}^{-1}$, y una baja afinidad por la glucosa ($K_m 5\text{mM}$) (Davies et al., 1999; Bell *et al.*, 2004) La GK se expresa en células productoras de insulina, en células productoras de glucagón, hepatocitos, enterocitos e hipotálamo, y en conjunto estos tejidos forman una red de homeostasis de glucosa generada por la GK. De todas las isoformas, la que se expresa en el hígado es la GK-L₁ y GK-L₂. (Cuesta, 20014)

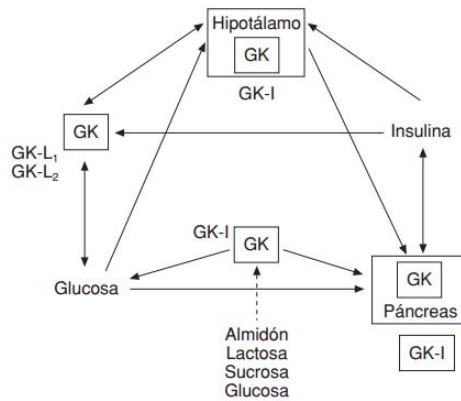


Figura 25 Tejidos que presentan sensores de GK y mantienen a homeostasis de la glucosa. Tomado de (Gomis R., *et al.*, 2000)

La GK no está regulada por sus metabolitos (glucosa 6-fosfato) o cofactores (Pi). La GK es activada por compuestos sulfidrilos, como el glutatión (en concentraciones fisiológicas como 2-6 mM) y es inhibida por el ácido graso palmitol-CoA, e inhibida por competitividad con la glucosa por una proteína reguladora (GKRP) (Van Schaftingen *et al.*, 1997).

La GK cataliza la transferencia de un fosfato desde la ATP a la glucosa para dar lugar a glucosa-6-fosfato en la reacción inicial de la glucólisis, controlando la entrada de la glucosa a la ruta glucolítica. La entrada de la glucosa a esta vía estimula la secreción de insulina, de manera que la GK es un sensor de la concentración de la glucosa en sangre, que activa a las células pancreáticas para producir insulina y glucagón, este último, regulador del almacenamiento de glucógeno en el hígado (Vionnet *et al.*, 1992).

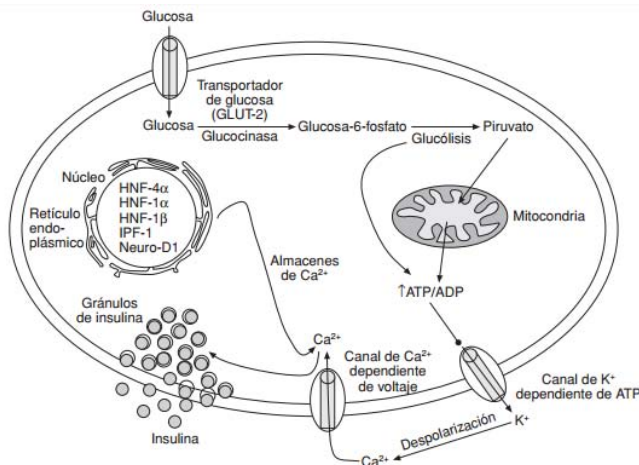


Figura 26. Transporte facilitado de la glucosa al interior de la célula por (GLUT-2), y fosforilación de la glucosa por la GK, para incorporar a la vía de la glucólisis. Mecanismo regulador de la insulina (Cuesta A., 2004).

Hexocinasas I, II y III

Las hexocinasas I, II y III presentan alta afinidad por la hexosas (K_m 0.1 mM) y su reacción está regulada por la aparición de su producto, la G6P; además, estas tres enzimas son de mayor tamaño que la GK (100 kDa). La actividad de la hexocinasas I, II Y III puede ser detectada en el riñón, el cerebro, los linfocitos y bazo. Las investigaciones filogenéticas sugieren que los 100 KDa de las hexocinasas I, II y III, surgieron evolutivamente por la duplicación de una hexocinasa ancestral que contenía 50 KDa (Colowick, 1973). Así surgieron las primeras hexocinasas que presentaban dos dominios N-terminales y la glucocinasa (GK) perdió un dominio N- terminal (Irwin D., 2008). Este estudio demostró que el ancestro de todas las hexocinasas de vertebrados contenía dos dominios y que la glucocinasa perdió el dominio N-terminal. Este estudio también demostró que la HK-I y la HK-II perdieron la actividad de dominio N-terminal (Irwin D., 2008).

Piruvato cinasa (PK)

Esta enzima cataliza la formación de fosfoenolpiruvato a piruvato y ATP. La PK presenta reguladores alostéricos como Mg⁺ y K⁺ para su activación. La reacción de la PK constituye el tercer punto de control de la glucólisis. La PK se encuentra en la mayoría de los organismos, la PK está conformada por una o más subunidades y muchas de estas tienen una regulación alostérica y pueden requerir de cationes monovalentes para su actividad. La PK puede presentar 4 isoformas, la isoforma LPK es la que se encuentra en el hígado (Walton y Cowey, 1981).

IV.1.5. Gluconeogénesis:

Fructosa1-6-bifosfatasa (FBPasa):

Esta enzima se ve involucrada en la gluconeogénesis, que es la vía responsable de generar glucosa de *novo*, a partir de precursores como lactato, aminoácidos, glicerol y fructosa. Los altos requerimientos de proteína en los peces proveen de la cantidad adecuada de sustratos para la obtención de energía. La FBPasa cataliza la reacción que convierte la fructosa1-6-bifosfato a fructosa1-6-fosfato (Walton y Cowey, 1981).

IV.1.6. Vía Pentosas Fosfato:

G6P-DH y 6PG-DH

Estas enzimas pertenecen a la fase oxidativa de la vía de las pentosas fosfato; la G6P-DH utiliza a la glucosa-6-fosfato como sustrato para hidrolizar la reacción y dar como producto la liberación de un NADPH y fosfoglucolactona .

La 6PG-DH es una enzima que descarboxila a 6-fosfogluconato originando ribulosa 5-fosfato, y con ello termina la parte oxidativa de la vía de pentosa fosfato, (Walton y Cowey, 1981).

IV.1.7. Catabolismo de proteínas

ALAT

La Alanino amino transferasa es una enzima que transfiere el grupo amino de la Alanina a un α -ceto-glutarato para dar origen a glutamato y piruvato.

ASAT

Es una enzima aminotransferasa que se encuentra en varios tejidos del organismo de los mamíferos, especialmente en el corazón, el hígado y el tejido muscular. Esta enzima también puede actuar sobre la L-tirosina, L-fenilalanina y L-triptófano. Esta actividad puede ser formada desde la enzima aminoácido aromático transaminasa mediante proteólisis controlada.

Los peces son capaces de sintetizar carbohidratos a partir de vías como el catabolismo de proteínas y la gluconeogénesis, por lo que estos nutrientes son considerados no esenciales para este grupo de vertebrados (Guillaume, 2002).

Diversos autores (Wilson, 1994; Kroghdahl, *et al.*, 2005), mencionan que el requerimiento nutricional de los carbohidratos en peces es muy bajo o casi nulo. Estos organismos podrían ingerir los carbohidratos de ciertos alimentos que consumen y que están presentes en los tejidos de las presas, como el glucógeno. Sin embargo, otros trabajos han demostrado que el nivel óptimo de carbohidratos varía entre especies. Así mismo, se ha encontrado una relación en cuanto a la utilización relativa de los carbohidratos y la complejidad del tipo de azúcar presente en los alimentos (Wilson, 1994).

Los peces son capaces de utilizar carbohidratos complejos, pero su digestión y absorción es lenta, a diferencia de los azúcares simples que son absorbidos rápidamente. Sin embargo, la absorción de azúcares también está relacionada con la cantidad de α -amilasa presente en el tracto digestivo, de manera que especies omnívoras presentan mayor actividad de la α -amilasa que los peces carnívoros (Wilson, 1994).

Los requerimientos de carbohidratos para los peces son bajos. Sin embargo, en la actualidad, los carbohidratos son una fuente importante de suministro de energía y esto los hace ingredientes importantes dentro de los alimentos para organismos acuáticos, debido además, a su bajo costo (Krogdahl, *et al.*, 2005).

IV.2.Hipótesis

*E. morio en el medio natural presenta actividad de la α -amilasa y la α -glucosidasa en intestino y ciegos pilóricos (Castillo 2011). Al alimentar a *E. morio* con almidones modificados con mayor porcentaje de amilopectina y gelatinizados, se espera una mayor disponibilidad de enlaces α -D-(1-4)-glucosídicos que permitirá una mayor acción de las carbohidrasas para aumentar la concentración de glucosa circulante en plasma, que será la señal para la activación de la glucocinasa del hígado (hexocinasa IV). Esto permitirá un incremento de la fosforilación de la glucosa dietética, que podrá ser utilizada dentro del metabolismo intermediario de este órgano. La presencia de la actividad glucocinasa hepática permitirá reclasificar a los juveniles silvestres del mero rojo *E. morio*, de carnívoros estrictos a omnívoros con tendencia a la carnivoría (Van Schaftingen, 1994; Blin y Panserat, 1999).*

IV.3.Objetivos específicos

10. Determinar la actividad de la α -amilasa y la α -glucosidasa en ciegos pilóricos e intestino de juveniles silvestres de *E. morio* alimentados con alimentos que contienen almidones nativos de maíz y papa con diferentes tamaños de gránulo de almidón (maíz 5 a 25 μ m, y papa 15 a 100 μ m).

11. Evaluar la actividad de la α -amilasa y la α -glucosidasa en ciegos pilóricos e intestino de juveniles silvestres de *E. morio* alimentados con alimentos que contienen almidones de maíz y papa en su forma cruda, y gelatinizados.

12. Evaluar la actividad de la α -amilasa y la α -glucosidasa en ciegos pilóricos e intestino de juveniles silvestres de *E. morio* alimentados con alimentos que contienen almidones crudos

de maíz, papa y almidón de maíz waxy con diferentes cantidades de amilopectina (73 %, 78% y 99 % respectivamente).

13. Evaluar la glucosa en sangre y el glucógeno en hígado de juveniles silvestres de *E. morio* alimentados con alimentos que contienen almidones nativos y gelatinizados de maíz, papa y maíz waxy rico en amilopectina (99%).

14. Evaluar si existe actividad de la glucocinasa en juveniles silvestres de *E. morio* alimentados con alimentos que contienen almidones crudos y gelatinizados de maíz crudo, papa y maíz waxy rico en amilopectina (99%).

15. Evaluar la actividad de las enzimas del metabolismo intermediario (PK, G6P-DH, 6PG-DH, FBPasa, GK y la ASAT) en el hígado de juveniles alimentados con alimentos que contienen almidón de maíz y papa (crudo y gelatinizado), y almidón de maíz waxy.

IV.4. Metodología

IV.4.1. Obtención de los organismos.

De las costas adyacentes a Sisal, fueron capturados 200 juveniles silvestres de *E. morio* en una lancha de motor fuera de borda de 40 Hp, utilizando como arte de pesca cordel y anzuelos.

Los juveniles fueron transportados en un Rotoplas de 1000 L a la Unidad Académica Yucatán (UAY), y tuvieron aireación constante durante el viaje.

Al llegar a la UAY fueron colocados en tanques circulares de 1000 L para su aclimatación y disminuir el estrés de la captura, se les proporcionó una dieta de mantenimiento (Tabla 11) y permanecieron en estos tanques durante 15 días.

IV.4.1. Estanques y sistema de circulación:

A los 15 días de ser capturados los peces fueron transportados al sistema experimental. Los peces fueron seleccionados según un rango de peso 100g- 300g. EL sistema experimental es el mismo descrito en la Figura 10.

IV.4.2. Alimentos experimentales

Un tratamiento basal, sin almidón (REF), se comparó con cuatro tratamientos conteniendo 20% de almidones diferentes, en una base no isoenergética, para evitar el desarrollo de hígado graso debido al exceso de proteínas o lípidos (Hutchins et al., 1998). El tamaño de gránulo del almidón de maíz (Buleon et al., 1998) es de 5-25 μm y para el almidón de papa es de 15-100 μm . El contenido de amilopectina de los diferentes almidones fue: almidón de maíz waxy (AMW), 99% y almidón de maíz crudo (AMC) 73%; Almidón de papa crudo (APC) y almidón de papa gelatinizado (APG) 78%. Las fuentes de proteína se seleccionaron como en Silva et al. (2014); Macro ingredientes previamente tamizados (<250 μm) y mezclados con micro-ingredientes durante 15 minutos más 20-30% de agua. La mezcla se extruyó posteriormente a través de un molino de carne (Division maquinaria S.A. de C.V. TOR REY , NL.) y las pinzas se secaron hasta un 10% y se almacenaron a -20°C hasta que se alimentaron. (Tabla 21). El procedimiento para la elaboración de los alimentos fue el mismo descrito en el capítulo II.

Tabla 21. Tratamiento experimental 45% proteínas, 6% lípidos y 20% carbohidratos: Almidón de Papa Crudo (APC y) y Almidón de Papa Gelatinizado (APG) con gránulos grandes (15 – 100 µm y 78% amilopectina), y Almidón de Maíz Crudo (AMC), con gránulos más pequeños (5-25 µm y 73 % de amilopectina).

	Tratamientos				
	AMC	AMW	APC	APG	REF
Harina de pescado ¹	430	430	430	430	430
Harina de camarón ²	50	50	50	50	50
Calamar fresco ³	50	50	50	50	50
Concentrado de proteína de soya ⁴	200	200	200	200	200
Lisina ⁵	12	12	12	12	12
Treonina ⁵	20	20	20	20	20
Leucina ⁵	4	4	4	4	4
Triptofano ⁵	1	1	1	1	1
Almidón de maíz crudo ⁶	200	0	0	0	0
Almidón de maíz waxy ⁷		200			
Almidón de papa cruda ⁶			200		
Almidón de papa Gelatinizado ⁶				200	
Talco ⁸	0	0	0	0	200
Pmezcla de Vitaminas ⁹	15	15	15	15	15
Stay C ¹⁰	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
Humedad	46.6	40.4	40.6	43.5	36.7
<i>Análisis Proximal</i>					
(g/100 g de materia seca)					
Proteína	53.0	53.1	54.1	53.2	58.7
Lípidos	4.6	7.9	5.8	6.2	7.0
Fibra	29.6	25.9	25.9	25.9	1.7
Cenizas	13.9	13.1	14.2	14.7	32.6
Energía calórica (kJ g ⁻¹)	16.7	17.3	16.4	16.3	13.2

¹ Harina de pescado Menhaden Special Selection (APLIGEN S.A de C.V CDMX),² Harina de camarón (Comercial Mexicana Merida Yucatán);. ³ Calamar fresco (Sisal, Yucatán). ⁴ Concentrado de proteína de soya (VIMIFOS, México CDMX). ⁵ Aminoácidos: Lisina, Treonina, Leucina y Triptofano (Future Foods S.A. de C.V. CDMX) ⁶ Almidón de Maíz y Almidón de papa crudos (Gluten y almidones comerciales S.A de C.V, México); ⁷ Waxy Almidón. PAXELL Internacional Qro. Qro. ⁸, Talco (silicato de magnesio) Farmacia Bazar. Merida Yucatán;. ⁹ Vitaminas: acetato de retinol 18000 (IU kg⁻¹ diet); cholecalciferol, 2000 (IU kg⁻¹ diet); acetato de alfa tocoferol, 35; sodium menadione bisulphate, 10; tiamina-HCl, 15; riboflavina, 25; 50; pyridoxina HCl, 5; folic acid 10; cianocobalamina, 0.02; biotina, 1.5; ácido ascórbico, 50; inositol, 400; ¹⁰ ROVIMIX STAY C-35 (Importado por ROCHE VITAMINAS Guadalajara Jal.) Composición: vit A: 1.200.00 IU: vit B1: 4,800 mg: vit. B12: 4,800 mg: vit B6: 4,800 mg: vit D3: 200,00 IU: vit, K3: 2,400 mg: ácido fólico 1,200 mg; biotin: 48 mg; pantotenato de calcio: 12,000 mg: cloruro de colina 108 g; niacina 24, 000 mg; selenio: 100 mg; yodo 10 mg: cobalto: 10 mg : cobre: 3,000 mg: hierro 50,000 mg; magnesio: 20,000 mg; zinc: 30, 000 mg; vehiculo 1,00g; antioxidantes: 25 g

Para cada tratamiento, se distribuyeron de manera aleatoria, 30 peces en los tanques del sistema de recirculación (Figura 10). Los peces fueron alimentados durante 93 días, y se realizaron biometrías mensuales. Los peces fueron alimentados con 4% de la biomasa total del tanque/día.

IV.4.3. Parámetros zootécnicos

Durante el bioensayo se realizaron 4 biometrías: una biometría inicial y 3 biometrías (una por mes). Para las biometrías, los peces fueron anestesiados con una solución de aceite de clavo (2.5 ml/10 l), que fue colocada en el agua del contenedor. Se registró el tiempo de exposición al anestésico. Una vez anestesiados los peces, fueron medidos considerando la Longitud total (Lt.), Longitud furcal (LF, altura (A) y el peso (g) de cada individuo. Los parámetros zootécnicos a evaluar fueron; porcentaje de supervivencia (no de animales vivos al final de experimento/ total de animales X 100), biomasa final (no de animales vivos al final de experimento * peso promedio final), Factor de condición (P/L^3), Coeficiente de crecimiento por día ($((\text{peso final}^{1/3} - \text{peso inicial}^{1/3})/\text{no de días}) * 100$), Coeficiente térmico de crecimiento ($(\text{peso final}^{1/3} - \text{peso inicial}^{1/3})/(\text{temperatura promedio } ^\circ\text{C} * \text{días}) * 100$) (Cho & Bureau, 1998), SGR ($\log \text{peso final} - \log \text{peso inicial} / \text{días}$), Ganancia en Peso=Biomasa final-biomasa inicial en el tiempo de duración del experimento.

Los peces entre cada biometría fueron bañados en un baño de agua dulce durante 10 minutos, seguido de un baño de formol (0.03 ml /10 L agua), como medida profiláctica.

IV.4.3. Disección de los organismos.

Al finalizar el experimento se seleccionaron al azar 10 peces de cada tratamiento. La disección de los individuos se realizó con un corte introduciendo unas tijeras finas por las cloacas y avanzando hacia el centro de los opérculos. Se realizó un segundo corte, desde el costado izquierdo del pez hasta el extremo superior del opérculo y un tercer corte, paralelo al opérculo que une a los dos anteriores permitiendo la separación la zona de tejido muscular, cortando previamente las costillas. En este momento los órganos quedaron descubiertos. El estómago, hígado e intestinos fueron extraídos y pesados. Posteriormente fueron congelados en nitrógeno líquido y luego almacenados a -40°C en un ultracongelador (TOY-REY) hasta la realización del análisis bioquímico.

IV.4.4. Análisis Bioquímicos

Se realizaron las evaluaciones de los hematocrito, presión osmótica, glucosa en plasma y glucógeno en hígado de acuerdo al protocolo descrito en el capítulo 1.

Los órganos fueron congelados y la actividad de las enzimas digestivas así como la actividad de las enzimas del metabolismo intermediario según el protocolo descrito en el capítulo 1.

Tabla 22. Diseño experimental para determinar la utilización digestiva de almidones de acuerdo a su origen botánico (maíz, trigo o papa) y procesamiento (waxy o gelatinizado) en juveniles silvestres de *E. morio*; Factor a evaluar el tamaño de gránulo, porcentaje amilopectina; Respuesta a evaluar; Supervivencia, Biomasa, CTC /CDC, Glucosa en Plasma/Glucógeno en Hígado, Enzimas digestivas:- α -amilasa/ α -glucosidasa, Enzimas metabolismo intermediario:GK, PK;FBPASA, G6P-DH,6PG-DH ASAT.

<i>Fuente de Carbohidrato</i>	<i>Diseño Experimental</i>	<i>Repetición Tratamiento</i>	<i>Factor a Evaluar</i>	<i>Respuesta a Evaluar</i>
AMW AMC APC APG REF	N= 30 ANDEVA DE BLOQUE ANIDADO P < 0.05	3 tanques por tratamientos	Tamaño de gránulo /Porcentaje de amilopectina	Supervivencia, Biomasa CTC/CDC Glucosa en Plasma/Glucógeno en Hígado Enzimas digestivas: α -amilasa/ α -glucosidasa Enzimas metabolismo Intermediario:GK, PK;FBPASA, G6P-DH,6PG-DH ASAT.

IV.4.5. Estadística

El hematocrito, CDC, CTC, Índice Hepatosomático fueron transformados a arco seno; y los valores de la glucosa transformados a logaritmo.

Para CDC y CTD Se verifico la homogenidad con la prueba de Hartley, Cochran y Barlett y se aplicó una prueba de Duncan con un valor de significancia de $p < 0.05$. Para glucosa, glucógeno, actividad enzimática, IHS y Hematocrito se verificó la homogenidad con la prueba de Homogenidad de Leven's Tests. La normalidad se verificó con una prueba de Shapiro-Wilk. Después se aplicó una ANDEVA de bloque con prueba de Bonferroni un valor de significancia de $p < 0.05$. Cuando los datos no fueron homogéneos, se hizo una prueba no-paramétrica Kruskal Wallis con valor de significancia de ($p < 0.05$). Se utilizó el paquete estadístico Statgraphics versión 6.0

IV.5.Resultados

IV.5.1 Parámetros Zootécnicos

La ganancia en peso fue mayor en el tratamiento AMC y en el tratamiento AMW. La menor ganancia en peso fue obtenida en el tratamiento REF. La sobrevivencia de 100% en el tratamiento AMC, el tratamiento que menor sobrevivencia presentó fue el APG con valor de 86.6 %. El factor de condición mostró e mayor valor en la dieta del tratamiento AMW y menor en la dieta que no contenía almidón REF (1.7 y 1.4, respectivamente).La tasa de específica mostró el mismo valor entre los tratamiento (2.0) excepto en el tratamiento APG (1.9) (Tabla 23).

Tabla 23. Parámetros Globales; Biomasa inicial y final, Supervivencia, Ganancia en peso, tasa de crecimiento específico (SGR), Factor de Condición (FC) en los 4 tratamientos experimentales y el grupo control. Almidón Maíz Crudo (AMC), Almidón Maíz Waxy (AMW), Almidón de Papa Crudo (APC), Almidón Papa Gelatinizado (APG), tratamiento sin almidón (REF). Los juveniles silvestres fueron aclimatados a los tratamientos experimentales por 93 días. La ración por alimento fue de 4% de la Biomasa por Tanque. Alimentados dos veces al día.

	Tratamientos				
	AMC	AMW	APC	APG	REF
Biomasa inicial (g)	1081.3	1101.1	1118.1	1056.4	1160.1
Biomasa final (g)	2057.2	1875.2	1811.0	1598.8	1589.4
Ganancia en peso*(g)	979.7	774.1	692.9	542.4	483.4
No de Peces inicial	30	30	30	30	30
No de Peces final	24	28	29	26	28
Sobrevivencia (%)	80	93.3	96.6	86.6	93.3
SGR	2.0	2.0	2.0	1.9	2.0
FC	1.6	1.7	1.6	1.5	1.4

*Ganancia en peso (93 días)

IV.5.2. Parámetros Fisicoquímicos

En cuanto a los parámetros fisicoquímicos, no mostraron variaciones importantes durante el día y la tarde, y se mantuvieron estables durante todo el experimento (Tabla 24).

Tabla 24. Promedio de los parámetros físico químicos registrados durante el período experimental, de los tratamientos AMC, AMW, APC, APG y REF, en la mañana y la tarde. Temperatura (°C), pH, Oxígeno Disuelto (mg/L) y salinidad (ppt). (93 días).

Parámetros	Promedio ± DE	Mínimos	Máximos
Temperatura (°C) am	28.4 ± 1.1	24.1	29.2
Temperatura (°C) pm	27.6 ± 0.9	25.4	29.6
Salinidad (ppt)	37.4 ± 0.1	36.2	37.8
OD (mg/L) am	5.9 ± 0.3	4.9	6.5
OD (mg/L) pm	5.7 ± 0.3	4.9	6.9
pH am	8.0 ± 0.3	7.9	8.2
pH pm	8.1 ± 0.3	7.7	8.3

Valores promedio ± desviación estándar a lo largo del periodo de aclimatación. OD, oxígeno disuelto.

IV.5.3. Coeficiente diario de Crecimiento y Coeficiente térmico de Crecimiento

Los valores mas altos del coeficiente diario de crecimiento se encontró en el tratamiento AMC (1.2), seguido del tratamiento AMW (1.11), en comparación con los otros tratamientos fueron ambos significativamente mayores, pero las diferencias no fueron significativas entre ellos . El valor significativamente menor se obtuvo con el tratamiento que no contenía almidón REF (0.76).

El coeficiente térmico de crecimiento mostró que el tratamiento REF , presentó el valor más bajo (0.026). Los valores más altos fueron encontrados en los tratamientos AMC y AMW (0.04 y 0.03, respectivamente) (Tabla 25)

Tabla 25. Coeficiente diario de Crecimiento (CDC) y Coeficiente térmico de Crecimiento (CTC) de los juveniles silvestres aclimatados a los tratamientos almidón; Almidón de Maíz Crudo (AMC), Almidón de Maíz Waxy (AMW), Almidón de Papa Crudo (APC), Almidón de Papa Gelatinizado (APG) y al tratamiento de Referencia sin almidón (REF). Todas los tratamientos experimentales isoproteínicas; 47.26% proteína, 5.5% lípidos y 20 % carbohidratos. Juveniles alimentados por 93 días.

	AMC	AMW	APC	APG	REF
CDC % día ⁻¹	1.2 ± 0.11 ^a	1.11 ± 0.11 ^a	0.94 ± 0.11 ^b	1.02 ± 0.11 ^{ab}	0.77 ± 0.11 ^b
CTC % día ⁻¹	0.040 ± 0.004 ^a	0.038 ± 0.004 ^a	0.032 ± 0.004 ^{ab}	0.034 ± 0.004 ^{ab}	0.026 ± 0.004 ^b

Promedio ± ES; Prueba de Duncan (p< 0.05).

IV.5.4. Glucosa, glucógeno y hematocrito

El hematocrito no presentó diferencias significativas, pero el menor valor se encontró en el tratamiento que no contenía carbohidratos, los valores entre los tratamientos experimentales, mostraron valores muy similares (ANDEVA de bloque ANIDADA $p < 0.05$). El glucógeno mostró el valor más alto en AMW (198.1 ± 85.42 mg g^{-1} hígado), y la menor cantidad fue registrada en APC (75.34 ± 22.27 mg g^{-1} hígado). La glucosa mostró el valor más bajo en el tratamiento APC (41.64 ± 13.52 dl ml^{-1}), el mayor valor se encontró en los peces alimentados con REF.

Tabla 26. Glucosa en Plasma (mg. dL^{-1}), Glucógeno en hígado (mg. g^{-1}), Hematocrito (%), Índice Hepatosomático (IHS %), en los tratamientos experimentales y el grupo control. Almidón Maíz Crudo (AMC), Almidón Maíz Waxy (AMW), Almidón de Papa Crudo (APC), Almidón Papa Gelatinizado (APG), tratamiento sin almidón (REF). Los juveniles silvestres fueron aclimatados a los tratamientos experimentales por 93 días. La ración por alimento fue de 0.4% de la Biomasa por Tanque. Alimentados dos veces al día.

	Almidones Nativos		Almidones modificados		
	AMC	APC	AMW	APG	REF
Glucosa en Plasma (m dL^{-1})	43 ± 5^a	42 ± 5^a	44 ± 5^a	44 ± 5^a	47 ± 5^a
Glucógeno (mg g^{-1} hígado)	102 ± 14^b	75 ± 14^b	214 ± 14^a	96 ± 14^b	125 ± 14^b
¹ Hematocrito (%)	51 ± 2^a	50 ± 2^a	50 ± 2^a	51 ± 2^a	44 ± 2^a
² IHS (%)	2.1 ± 0.3^a	1.4 ± 0.3^a	2.1 ± 0.3^a	2.2 ± 0.3^a	1.3 ± 0.3^a

¹Hematocrito = $\times 100$. ²IHS = (peso hígado/peso total) $\times 100$. Promedio \pm error estándar (\pm ES) (Bunferroni

test, $p < 0.05$). ES

IV.5.5. Enzimas digestivas

Los resultados encontrados en la actividad de la α -amilasa en este experimento no mostraron diferencias significativas entre los tratamientos, una vez más la mayor actividad de la α -amilasa se presenta en los ciegos pilóricos. A pesar de no existir diferencias entre los tratamientos, la actividad en el tratamiento REF mostró los valores más bajos (1797 ± 317 U.mg⁻¹ de proteína). El tratamiento APC presentó la actividad más alta (3102 ± 442 U. mg⁻¹ de proteína). Los resultados para la glucosidasa no presentaron diferencias significativas, sin embargo la mayor actividad de esta enzima fue encontrada en los ciegos pilóricos en todos los tratamientos a excepción de AMC que la presentó en los intestinos (791 ± 113 U.mg⁻¹ de proteína) y que además fue la mayor actividad registrada.

Tabla 27.- Actividad específica de la α -amilasa (U.mg proteína⁻¹), y la α -glucosidasa (mU.mg de proteína⁻¹) en los tratamientos experimentales y el grupo control. Almidón Maíz Crudo (AMC), Almidón Maíz Waxy (AMW), Almidón de Papa Crudo (APC), Almidón Papa Gelatinizado (APG), Dietas in almidón (REF). Los juveniles silvestres fueron aclimatados con los experimentales por 93 días. La ración por alimento fue de 0.4% de la Biomasa por Tanque. Alimentados dos veces al día.

	AMC	APC	AMW	APG	REF
α-Amilasa					
<i>Ciegos pilóricos</i>	2,572 ± 531 ^a	3,102 ± 442 ^a	2,404 ± 481 ^a	2,994 ± 460 ^a	1,797 ± 317 ^a
<i>Intestino</i>	435 ± 149 ^a	568 ± 129 ^a	379 ± 134 ^a	410 ± 134 ^a	276 ± 134 ^a
α-Glucosidasa					
<i>Ciegos Pilóricos</i>	425 ± 158 ^a	854 ± 152 ^a	698 ± 165 ^a	467 ± 165 ^a	784 ± 173 ^a
<i>Intestino</i>	791 ± 113 ^a	327 ± 94 ^a	387 ± 102 ^a	444 ± 102 ^a	342 ± 102 ^a

Promedios \pm SE para cada parámetro (n=10). Prueba no paramétrica de Kruskal Wallis P< 0.05).

IV.5.6. Enzimas Regulatoras del Metabolismo Intermediario

La actividad enzimática de la GK mostró el valor significativamente más alto en la dieta AMC ($32.2. \pm 7.9 \text{ U mg}^{-1}$ de proteína) ($p < 0.05$) en los otros tratamientos la actividad no presentó diferencias significativas. La HK-I presentó el valor más alto en los juveniles alimentados con AMC (Tabla 28)

La mayor actividad de la HK-II se presentó en los juveniles alimentados con la AMC ($16.5 \pm 3.43 \text{ U mg}^{-1}$ de proteína) siendo la diferencia significativa (Tabla 28).

La PK presentó el valor más alto en el tratamiento AMC ($55.9 \pm 7.4 \text{ U mg}^{-1}$ proteína) y fue significativamente mayor con respecto a APC, APG y REF sin embargo no presentó diferencias con respecto a AMW ($50.9 \pm 4.9 \text{ U mg}^{-1}$ proteína) (Tabla 28).

La 6PG-DH fue mayor en AMC ($71.1 \pm 7.6 \text{ U mg}^{-1}$ proteína), con respecto a REF que no contenía almidón ($3.7 \pm 0.37 \text{ U mg}^{-1}$ proteína), (Tabla 28).

La G6P-DH no presentó diferencias significativas con respecto al control. Sin embargo presentó los valores más en AMC ($40.0 \pm 5.5 \text{ U mg}^{-1}$ proteína), en los tratamientos AMW, APC, APG no se presentaron diferencias significativas (Tabla 28).

La FBPasa presentó el mayor valor en REF, la que no contenía almidón, $111.6 \pm 8.8 \text{ U mg}^{-1}$ proteína), ($p < 0.05$). La menor actividad de esta enzima de la glucogénesis se encontró en la en AMG, ($66.0 \pm 5.8 \text{ U mg}^{-1}$ proteína), (Tabla 28).

La ALAT presentó la mayor actividad en los juveniles alimentados en REF, le tratamiento testigo que no contenía fuente de almidón ($50.64 \pm 33.1 \text{ U/l}$) (Tabla 28).

Tabla 28. Actividad Enzimática específica (U mg⁻¹ proteína) del metabolismo intermediario en el hígado de *E. morio*: Almidón de Maíz Crudo (AMC), Almidón de Maíz Waxy (AMW), Almidón de Papa Crudo (APC), Almidón de Papa Gelatinizado (APG) y tratamiento de Referencia sin almidón (REF). Todas los tratamietnos experimentales isoproteínicas; 47.26% proteína, 5.5% lípidos y 20 % carbohidratos. Juveniles alimentados por 93 días Promedios y Error Estándar (\pm ES) para cada parámetro (n=10). ANDEVA de bloque anidada (Prueba Tukey $p < 0.05$). Prueba no paramétrica de Kruskal Wallis $p < 0.05$.

	AMC	APC	AMW	APG	REF
<i>Hexocinasa-I</i>	23.4 \pm 2.7 ^a	2.1 \pm 2.7 ^{ab}	8.0 \pm 2.7 ^{ab}	1.6 \pm 2.7 ^b	0.9 \pm 2.7 ^b
<i>Hexocinasa-II</i>	16.5 \pm 10.3 ^{ab}	1.8 \pm 10.3 ^{abc}	0.7 \pm 10.3 ^c	42.2 \pm 10.3 ^{bc}	19.3 \pm 10.3 ^a
<i>Glucosa deshidrogenasa</i>	10.8 \pm 2.1 ^a	0.6 \pm 2.1 ^b	0.6 \pm 2.1 ^b	4.0 \pm 2.1 ^b	4.0 \pm 2.1 ^b
<i>Glucocinasa</i>	4.2 \pm 0.9 ^{ab}	0.5 \pm 0.9 ^b	5.2 \pm 0.9 ^a	3.4 \pm 0.9 ^{ab}	- \pm -
<i>Piruvato cinasa</i>	56.0 \pm 7.4 ^a	18.7 \pm 6.5 ^a	50.9 \pm 4.9 ^a	9.1 \pm 1.7 ^a	16.9 \pm 3.9 ^a
<i>Fructosa-1,6-bisfosfatasa</i>	80.1 \pm 7.0 ^b	109.4 \pm 7.0 ^{ab}	80.6 \pm 7.0 ^b	66.0 \pm 5.8 ^c	111.6 \pm 8.8 ^a
<i>Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa</i>	40.0 \pm 5.5 ^a	25.9 \pm 3.7 ^{ab}	25.1 \pm 2.1 ^b	26.7 \pm 3.3 ^{ab}	27.1 \pm 2.8 ^{ab}
<i>6-Fosfogluconato deshidrogenasa</i>	71.1 \pm 7.6 ^a	57.0 \pm 4.9 ^{ab}	61.1 \pm 5.6 ^{ab}	45.3 \pm 5.02 ^{ab}	3.7 \pm 0.37 ^c
<i>Alanina aminotransferasa</i>	10.5 \pm 6.2 ^{ab}	8.1 \pm 7.9 ^{ab}	3.0 \pm 1.4 ^b	14.0 \pm 9.4 ^{ab}	51.0 \pm 33.1 ^a

IV.6. Discusión

Los peces alimentados durante 93 días con el tratamiento AMC presentaron una ganancia en peso mayor que los peces del tratamiento AMW (979.7 g y 774.1 g) (Tabla 23). El almidón de maíz una vez más resultó ser el mejor asimilado por esta especie, como en experimento anterior, se demostró que la microestructura del almidón y la proporción de amilosa: amilopectina le proporciona a este alimento las condiciones que permitió a *E. morio* tener una digestión más lenta.

En cuanto a las enzimas digestivas α -amilasa y α -glucosidasa, no se detectaron diferencias entre los peces de los diversos tratamientos (Tabla 27), aunque la mayor actividad se detectó en los ciegos pilóricos. Al respecto, Castillo (2011) encontró acinos celulares del páncreas alrededor de los ciegos pilóricos entre la grasa mesenterial del *E. morio*. Lo que indica que es en la región de los ciegos pilóricos donde se da la mayor liberación de los zimógenos para la digestión de los carbohidratos, además *E. morio* es una especie que presenta numerosos ciegos pilóricos (25) en esta región terminando el duodeno (Castillo, 2011), que le permite una mayor superficie de absorción y un tránsito lento de la digestión permitiendo la acción de las carbohidrasas como la, α -amilasa, la cual rompe la molécula de almidón en disacáridos como la maltosa que continua su paso hacia el intestino distal donde sucede la segunda de las α -glucosidasa para finalmente tener la molécula de la glucosa y sucede la absorción por la celular epiteliales de cepillo hacia el torrente sanguíneo (Hidalgo y Alliot, 2003).

Estudios realizados sobre requerimientos nutricionales de peces carnívoros han determinado que el nivel de inclusión de carbohidratos en los alimentos debe ser de alrededor de 20 - 30% (Wilson, 1994, Tranulis 1994; Panserat 2000, Metón 2007, Fernández *et al* 2007; Leung *et al.*, 2011; Viegas, 2012). En el presente experimento *E. morio* fue alimentado por primera vez con un nivel de 20% de carbohidratos, logrando mantener los niveles glucémicos y el hematocrito estables con todos los tratamientos. Según Wood *et al.* (1982) la capacidad tampón de la sangre no disminuye en los peces cuando están en buenas condiciones de salud; los peces de nuestro experimento se mantuvieron en condiciones estables en todos los tratamientos (Tabla 22).

Los estudios de Furuichi y Yone (1982) concluyen que los peces pueden generar cantidades de insulina parecidas a los mamíferos, pero que presentan menor cantidad de receptores en la membrana, tras realizar experimentos donde suministraron insulina exógena, y a pesar de ello se mantuvieron los estados de baja tolerancia a la glucosa y niveles altos de glucosa plasmática. Sin embargo, la capacidad de un organismo para regular la glucosa radica principalmente en su habilidad de fosforilar la glucosa dietética para incorporarla al metabolismo intermediario, en esta regulación la presencia de la GK es la que determina la homeostasis de la glucosa (Gomis *et al.*, 2000). En el presente estudio con *E. morio*, la ingesta de los tratamientos con 20% de carbohidratos durante 93 días produjo una glucemia relativamente estable, lo que puede sugerir que *E. morio* presenta la maquinaria enzimática que le permite regular la homeostasis de la glucosa, y que esta condición se encuentra involucrada con los aspectos metabólicos a través de la fosforilación y la vía glucolítica. En especies carnívoras similares como *Salmo salar*, *H. hipoglossus*, *O. myctis*, *S. sarba* y *S. aurata* y *D. labrax*, se ha demostrado que la actividad GK tiene un papel fundamental en la regulación de la glucosa (Tranulis 1994; Panserat 2000, Metón 2007; Fernández *et al* 2007; Leung *et al.*, 2011; Viegas, 2012).

El glucógeno hepático se incrementó significativamente en los peces alimentados con el tratamiento AMW, que contenía el mayor porcentaje de amilopectina (99%), sin embargo, el IHS no presentó cambios (Tabla 26). Una tendencia similar ha sido reportada en *Salmo salar* alimentado con alimentos conteniendo almidón de papa al 15 y 30%, observándose un aumento de glucógeno en hígado y triglicéridos en sangre cuanto mayor fue el nivel de inclusión del carbohidrato (Hemre *et al.*, 2001).

En el presente trabajo, a pesar de que el tratamiento con mayor porcentaje de amilopectina produjo la mayor cantidad de glucógeno, fue con el tratamiento de AMC que se obtuvo la mayor ganancia en peso y los valores de CDC y CTD más altos (Tabla 25). Aunque no existieron diferencias significativas entre los juveniles alimentados con AMW, el CDC y CTC, el crecimiento fue mayor con AMC, con respecto al alimento que contenía almidón de papa, y el alimento de REF. Estas evidencias sugieren que el AMC presentó la mejor asimilación. Quizás la ventaja del AMC radica en el tamaño del gránulo, que comparado con el almidón de papa, es de mucho menor tamaño (5-30 μm). El almidón de papa presenta un

gránulo de almidón de ~100 μm , lo que genera una mayor área de superficie de contacto, lo que produce una velocidad de hidrólisis enzimática más baja (Tester *et al.*, 2004). Además, a diferencia del gránulo de la papa, la microestructura del gránulo de maíz, presenta poros y canales, por donde se difunde la enzima α -amilasa generando también una digestión desde el interior del grano hacia afuera facilitando la hidrólisis del gránulo del almidón (Zhang *et al.*, 2006). Los gránulos del almidón de papa, no presentan estas estructuras, la digestión se da en la superficie del gránulo donde la α -amilasa se encuentra más susceptible a tener interacciones con lípidos, proteínas y otros componentes de la superficie del gránulo que pueda interferir en la velocidad de hidrólisis de la α -amilasa (Colonna *et al.*, 1992). En contraparte, el AMC contenía gránulos de menor tamaño y logró inducir en los peces la actividad de la HK-I y la HK-II, y liberar G-6P.

Los peces alimentados con el tratamiento AMW, que contenía 99% de amilopectina, obtuvieron los valores de glucógeno significativamente más alto con respecto a los peces alimentados con los otros tratamientos (Tabla 26). Los resultados sugieren que el almidón de maíz fue el más utilizado por *E. morio*. Wilson (1994) señaló que gránulos de almidón de tamaño más pequeño son absorbidos rápidamente, generando hiperglucemia, contrariamente a lo que ocurre cuando los gránulos son más grandes y la digestión es más lenta. En el presente experimento, los valores de glucosa fueron estables en todos los tratamientos, quizás este pez, por ser un carnívoro y presentar menos cantidad de α -amilasa (Castillo, 2003), al ser alimentado con gránulos de menor tamaño, la carga de enzimas carbohidrasas puede ser estimulada para potencializar la actividad hidrolítica, lo que le permite generar la glucosa necesaria para activar las rutas glucolíticas, a diferencia de gránulos muy grandes, que reducen la velocidad de hidrólisis, como al almidón de papa, y los peces alimentados con este se vieron limitados en su capacidad de digerirlo, por lo tanto no fue posible generar un incremento en la activación de las vías glucolíticas, y por ende, la formación de glucógeno estuvo limitada en los peces de los peces alimentados con los tratamientos APC y APG, que tuvieron los niveles de glucógeno más bajos (Tabla 26).

Diversos trabajos realizados en especies carnívoras sugieren que los peces, independientemente de sus hábitos alimenticios, presentan una cierta adaptabilidad a los cambios en su dieta, al incorporar carbohidratos para disminuir la inclusión de proteína. Por

ejemplo, en *Morone spp.* alimentada con 12 ó 40% de glucosa, maltosa o dextrina. Cuando fue alimentada con glucosa (12%) mejoró la glucemia en 4h, mientras que cuando se le alimentó con maltosa y dextrina, alcanzó su equilibrio hasta 8h. Cuando se utilizó 40% de glucosa, se mantuvo prolongada hiperglucemia (Hutchins *et al.*, 1998). *Sparus sarba* fue alimentado con 2 y 20% de dextrina durante 4 semanas, y tanto IHS y la expresión de mRNA de GK y G6P-DH aumentaron para adaptarse a alto nivel de dextrina, por lo que aumentó el contenido de glucógeno en hígado (Leung *et al.*, 2012). *Oreochromis niloticus* mostró un aumento de IHS con un valor de 2.44 y aumentó de peso cuando se alimentó con un alimento que contenía 36% de almidón precocido, en comparación con un alimento con 20% (Amirkolaie *et al.*, 2005).

Enzimas reguladoras del metabolismo intermediario

Los resultados más claros de la utilización de los carbohidratos se registraron en la actividad en las enzimas, que son punto control en la incorporación de la glucosa plasmática a la ruta glucolítica.

Como se sabe, las hexocinasas son enzimas que fosforilan a la glucosa para incorporarla a la ruta glucolítica. Estas enzimas presentan diferente afinidad por la glucosa, naturaleza que les permite tener una función particular en la fosforilación, que depende de la concentración de la glucosa.

HK-I es la que presenta alta afinidad a la glucosa (K_m 0.1mM), y su velocidad está regulada por la aparición del producto la G6P, y al encontrar una concentración elevada de glucosa rápidamente llega a saturarse. En nuestro experimento se registró la mayor actividad de la HK-I en AMC ($p < 0.05$), sin embargo, también presenta una alta actividad en la HK-II (Tabla 28).

La GK es la enzima que regula la homeostasis de la glucosa en el organismo. Esta enzima, a diferencia de las otras hexocinasas, presenta una baja afinidad por la glucosa (K_m 5mM), no está regulada por la G6P, y solo actúa cuando la concentración de glucosa en plasma es alta y se han saturado las HK-I y HK-II. En nuestro experimento la GK con mayor actividad se encontró con AMW (5.2 U.mg⁻¹ de proteína), tratamiento que se obtuvo la mayor

concentración de glucógeno en los peces (Tabla 26). La PK, otra enzima que es un punto de control en la glucólisis, presentó su mayor actividad con AMC seguida de AMW ($p>0.5$). Al mismo tiempo, en los peces alimentados con REF que no contenía almidón no se detectó actividad de GK, y los valores de las HK-I y HK-II fueron bajos (Tabla 28).

Al existir una actividad alta de las enzimas de la glucólisis, es plausible pensar que los peces de las dietas AMC y AMW produjeran suficiente G6P, sustrato que fue utilizado por rutas de almacenamiento de energía como la glucogenogénesis y la vía de las pentosas fosfato. Esta última genera el poder reductor para producir lípidos y ribulosa 5-fosfato para el crecimiento. Las enzimas G6P-DH y 6PG-DH presentaron la mayor actividad (40.0 y 71.1 U.mg⁻¹ de proteína; $p<0.05$) en los peces de AMC, mientras que la actividad de estas enzimas se encontró deprimida en los peces de REF ($p<0.05$). Estos resultados sugieren que *E. morio* fue capaz de tomar la G6P de la glucólisis y destinarla al crecimiento, y el almacenamiento de energía en forma de glucógeno. Al respecto, Walton y Cowey, 1982, encontraron que en *O. mykiss* al ser alimentada con almidón de maíz crudo aumentó la actividad de enzimas de la vía de las pentosas G6P-DH y 6PG-DH, lo que favoreció la fuente de NADPH para la síntesis de lípidos. Otro trabajo fue realizado en *Oreochromis niloticus* en donde se mostró un aumento del IHS y de peso, cuando fueron alimentados con un alimento que contenía 36% de almidón precocido, en comparación con uno que contenía 20% (Amirkolaie *et al.*, 2005).

Se ha reportado que peces *Oreochromis niloticus* (Walton y Cowey, 1982), y *Sparus auratus* (Baanante *et al.*, 1991), (Shimeno *et al.*, 1993 y 1996), (Meton *et al.*, 2003) fueron capaces de cambiar el metabolismo y adaptarse a los cambios en la composición de la dieta; Los serranidos *Epinephelus sp.* (Chen y Chen, 1986) y *Epinephelus malabaricus* (Chen y Tsai 1994) asimilan carbohidratos, lo que permite el equilibrio de energía y la disminución de la necesidad proteínas en la dieta. El metabolismo intermediario se ve afectado por las fuentes de carbohidratos en tres niveles: en la glucólisis, en la gluconeogénesis y en la vía de la pentosa fosfato. El tratamiento con AMC impacto la actividad de enzimas glucolíticas (HK-I, HK-II, GK y PK), logrando el mayor CDT y CDC (Tabla 25).

La gluconeogénesis es la vía que los peces utilizan preferencialmente para obtener energía, y a diferencia de los mamíferos, los peces utilizan los sustratos como aminoácido para la

obtención de precursores energéticos. La enzima reguladora de la gluconeogénesis es la FBPasa, esta enzima es la encargada de producir glucosa de *novo*, a partir de precursores como lactato, aminoácidos, glicerol y fructosa, y es un indicador importante para conocer si los peces están tomando sustratos provenientes de las proteínas como fuentes energéticas. En los peces alimentados con el tratamiento REF la FBPasa mostraron los valores más altos (111.6 U mg⁻¹ proteína; p<0.05) (Tabla 28). La FBPasa estuvo más activa con REF en ausencia de carbohidratos dietético. Por el contrario, los peces alimentados con AMC y AMW mostraron una disminución en la FBPasa, debido a que la glucólisis estaba activa.

En el presente trabajo *E. morio* alimentado con el alimento REF no se activó dicha ruta por lo que no existió acumulación de glucógeno, ni cambios significativos en el crecimiento (Tabla 25). En cuanto a la glucólisis los peces alimentados con REF y la APC, presentaron actividad baja de la GK, lo que sugiere una mala utilización de la glucosa (Tabla 28). En Además con la ausencia de almidón en el alimento REF, se obtuvo un IHS bajo de ~ 1.2, debido a la ausencia de grasa en el hígado, y la 6PG-DH fue reprimida como una reducción de la lipogénesis.

Blin y Panserat (1999) encontraron que la presencia de HK-I, II y IV en *C. carpio*, *S. aurata*, *O. mykiss*, estos autores sugieren que la regulación de glucosa depende de la capacidad de estas enzimas para fosforilar la glucosa dietética, y que la baja tolerancia a la glucosa en estas especies es debida a la baja fosforilación de la glucosa como consecuencia de la ausencia de HK-IV (GK) (Nagayama y Ohshima, 1974; Walton y Cowey, 1982; Nagayama *et al.*, 1973; Cowey *et al.*, 1977).

Fernández *et al.* (2007) han utilizado el almidón de maíz para evaluar a la *S. aurata* utilizaron tres niveles de inclusión de almidón en el alimento (5, 18 y 26%) y obtuvieron una alta correlación entre las actividades PK G6P-DH y 6PG-DH, PFK-1. Enes (2008) reportó que la dextrina, maltosa y glucosa lograron generar hiperglucemia 6 h después de la alimentación, pero que al utilizar almidón, la hiperglucemia no fue evidente. Esta condición sugiere que en peces intolerantes a los carbohidratos, como *E. morio*, es posible utilizar la glucosa dietética sin presentar hiperglucemia, si la fuente de carbohidratos presenta cierta resistencia a la hidrólisis y es mejor utilizada cuando la glucosa entra al torrente sanguíneo para ser

fosforilada por las hexocinasas. En el presente experimento se comprobó una vez mas que el AMC, presenta características necesarias para poder ser digerido por la acción de las carbohidrasas, pero no suficiente para generar hiperglucemia manteniendo los niveles de glucosa estables con un 20 % de inclusión, además el AMC y AMW son dos almidones que pueden ser utilizados como sustratos de energía, disminuyendo la catálisis de proteínas como fuente energética (via principal de peces para obtener glucosa), y favoreciendo la activación de las rutas glucolíticas, logrando activar enzimas como 6PG-DH y G6P-DH en vía de las pentosa fosfato, implicadas en la síntesis de ácidos grasos y en la formación de precursores del crecimiento como la ribulosa 5-fosfato.

IV.7.-Conclusiones

1. El almidón de maíz una vez más logró el mejor crecimiento es posible concluir que la microestructura del almidón de maíz, el tamaño de gránulo mas pequeño y la proporción de amilosa: amilopectina proporciona las condiciones que favorecen la digestión más lenta en el *E. morio*, que permiten la acción de las enzimas diestivas para hacer mas eficiente la liberación de glucosa.
2. El los peces alimentados con el almidón con mayor porcentaje de amilopectina AMW (99%) almacenaron mayor cantidad de glucógeno como reserva energética, y presentaron también una mayor actividad de GK, este almidón logró activar la ruta glucolitica para la producción de G6P en *E. morio*.
3. El tratamiento testigo presentó mayor actividad en la ruta gluconeogénica y catabolismo de proteínas, y por lo que es concluyente que la ausencia del almidón en el tratamiento REF mantiene activas las rutas bioquímicas que los peces naturalmente usan para obtener la fuente del G6P, para generar ATP.
4. Al incorporar los almidones de maíz estos lograron disminuir las vías que utilizan a las proteínas como sustratos energéticos de manera que el almidón resulto un sustrato alternativo para generar G6P activando la rutas de las enzimas de la vías pentosa fosfato destinarla a crecimiento y almacenamiento en forma de glucógeno.
5. En el presente experimento se comprobó una vez más que los almidones de maíz, presentan características necesarias para poder ser digeridos por la acción de las carbohidrasas, manteniendo los niveles de glucosa estables con un 20 % de inclusión.

Capítulo Efecto del ayuno y realimentación en el metabolismo intermediario en los juveniles del mero rojo *E. morio*.

V.1.Introducción

V.1.1.Adaptaciones metabólicas de los peces al ayuno.

El ayuno se considera un fenómeno que ocurre cuando un animal disminuye las posibilidades de adquirir alimento, esta restricción alimenticia puede ser por déficit de la calidad de la alimento o también en términos de cantidad de alimento (Rodríguez L. 2012).

En el medio natural la restricción del alimento es una presión ambiental que puede consistir en fluctuaciones ambientales continuas (sequías, inundaciones, huracanes, sobrepesca), que alteran la disponibilidad del alimento (Wang *et al.*, 2006) o en algunas veces este ayuno está relacionado con los estados reproductivos, como la migración o el cuidado parietal (Mackenzie *et al.*, 1998; Urbinati *et al.*, 2003).

Según Wang (2006), los peces presentan respuestas fisiológicas y metabólicas ante los periodos de ayuno, que se resumen de la siguiente manera:

“Fase corta que consiste en un ayuno de 24 horas, donde el pez incrementa el esfuerzo por la búsqueda del alimento.

Fase de transición, en la que el pez reduce gradualmente el nado y por lo tanto el gasto energético.

Fase de adaptación, el pez reduce su actividad metabólica hasta encontrar alimento”.

De manera que los peces pueden presentar adaptaciones metabólicas como respuesta a periodos de ayuno, asociados a comportamientos reproductivos, migratorios o a cambios en la disponibilidad del alimento (Hochachka, 1995). Estas adaptaciones varían dependiendo de la edad, estado reproductivo, hábito alimenticio y tamaño de los peces (Méndez y Wieser,

1993). Se sabe que estas adaptaciones evolutivas a periodos de ayuno en algunas especies pueden consistir en meses e incluso años de restricción alimenticia (Shimeno *et al.*, 1990; Olivereau y Olivereau, 1997).

Uno de los aspectos más relevantes de estas adaptaciones al ayuno prolongado son las pautas de alimentación que tienen las especies; peces herbívoros y detritívoros ingieren alimento en forma continua y las carnívoras lo hacen con menos continuidad, lo que genera una mejor adaptación a periodos de ayuno (Bond, 1996).

Las adaptaciones a periodos de ayuno, y la recuperación de las especies después de esta restricción alimentaria se basan en la capacidad del pez de modificar el metabolismo intermediario de carbohidratos, lípidos y proteínas con el objetivo de generar un estado compensatorio que le permita continuar con sus funciones vitales (Walton y Cowey, 1982; Bastrop *et al.*, 1991).

Con respecto a la movilización de las reservas de glucógeno en peces, se consideran dos estados fisiológicos que los dividen en dos categorías: 1) peces que utilizan el glucógeno durante las primeras fases del ayuno (7-10 días), movilizándolo rápidamente sus reservas energéticas, b) peces adaptados a periodos de ayuno prolongado, caracterizado por el aumento en el catabolismo de proteína y lípidos, manteniendo los niveles de glucógeno como prioridad para el mantenimiento de los tejidos según Farbridge y Leatherland (1992). En la primera categoría se encuentran especies como *C. carpio*, *R. rutulis* y *O. mykiss*. En la segunda categoría tenemos especies que presentan conducta migratoria como el salmón *O. nerka* y la anguila *A. anguilla*.

Los lípidos son la reserva energética más vulnerable a los periodos de ayuno; es la primera reserva que será utilizada, después el glucógeno hepático y muscular es el siguiente, y finalmente, las proteínas (Barcellos *et al.*, 2010). Estos procesos conducen a cambios en la disminución del tamaño de órganos gastrointestinales reduciendo la tasa metabólica basal en los organismos (Turano, 2008).

Existen cambios a nivel hormonal que regulan las diferentes vías metabólicas implicadas en la obtención de energía, la glucólisis y la gluconeogénesis. Estas hormonas son el glucagón y

la insulina (McKee y McKee, 2003). Se ha demostrado que entre las adaptaciones para mantener al organismo en homeostasis en un periodo de ayuno prolongado, la cantidad de glucosa se mantiene estable, a expensas del gasto de reservas como lípidos y glucógeno (Shimeno *et al.*, 1990). Si el ayuno es severo, los aminoácidos participan como sustrato para formación de glucosa a través de la vía gluconeogénica (Blascp *et al.*, 1992; Soengas *et al.*, 1996). Sin embargo, existe una gran variedad de mecanismos que la especie presentan acerca del uso de sus reservas; en muchas especies, es el glucógeno el primero en ser utilizado, pero otras especies preservan su reserva de glucógeno utilizando las proteínas y lípidos como fuentes energéticas (Péres-Jiménez *et al.*, 2007).

V.1.2.Cambios metabólicos en los peces durante la realimentación después de un periodo de ayuno.

La recuperación energética después de un periodo prolongado de ayuno depende de muchos factores, como las condiciones ambientales, el tiempo de ayuno, hábitos alimenticios de las especies y sus adaptaciones fisiológicas como respuesta a los cambios en la alimentación (Navarro y Gutierrez, 1995). Sin embargo, existen especies que tras un periodo de ayuno no pueden recuperarse y mueren. En la mayoría de los peces se ha observado una total recuperación metabólica después de periodos cortos de ayuno (Black y Love, 1986; Soengas *et al.*, 1996; Metón *et al.* 2003; Morales *et al.*, 2004).

Los peces tienen la capacidad de recuperar su funciones metabólicas después de periodos de ayuno, e incluso lograr incrementar una mejor respuesta de crecimiento durante su realimentación, esta condición se conoce como crecimiento compensatorio, y consiste en el desarrollo acelerado de los peces cuando tienen una disponibilidad favorable de alimento (Ali *et al.*, 2003; Cho *et al.*, 2006).

El crecimiento compensatorio después del periodo de ayuno se ha demostrado en varias especies de peces como *Later calcarifer*, *Aristichthys nobilis*, *Carassius auratus*, *Sparus aurata*, *Stripped bass* que fueron alimentadas después de varios periodos de ayuno, y que presentaron hiperfagia y crecimiento compensatorio (Ali *et al.*, 2003; Santiago *et al.* 2004; Cui *et al.*, 2006; Eroldogan *et al.*, 2006; Turano *et al.* 2008.).

El *E. morio*, en el medio natural, presenta patrones de migración relacionados con la disponibilidad del alimento y periodos reproductivos (Brulé, 1986). Castillo (2011) encontró en juveniles de *E. morio* valores de glucógeno más elevados durante la época de lluvias (208.8 mg/g), relacionado con la mayor disponibilidad de crustáceos, que son presas preferenciales de este pez. *E. morio*, en época de nortes, presentó menor valor en el glucógeno y glucosa en plasma (Castillo, 2011). Brulé (1988) demostró que los análisis de contenidos estomacales realizados en peces durante lluvias, presentaron abundancia de las presas preferenciales de *E. morio*, lo que disminuyó durante la época de nortes.

Sin embargo, y a pesar de lo anterior, existen muchas controversias sobre la capacidad de los peces carnívoros para asimilar y utilizar los carbohidratos como fuente energética, y en consecuencia, son necesarios estudios para conocer el verdadero estado fisiológico de las sustituciones en su alimentación, así como también es necesario tener conocimiento sobre la capacidad de cambiar el perfil metabólico y de adaptación a nuevas fuentes energéticas con la presencia de actividad enzimática de la GK.

V.2.Hipótesis

Se sabe que muchas especies de peces carnívoros después de un periodo prolongado de ayuno pueden recuperar sus condiciones metabólicas normales (Black y Love, 1986; Soengas et al., 1996; Metón et al 2003; Morales et al., 2004), e incluso presentar una mejor respuesta al crecimiento cuando son realimentados (Bastrop et al., 1991; Walton y Cowey, 1982). Por lo que se espera que E. morio, al ser un pez carnívoro que presenta movimientos estacionales por reproducción y búsqueda de alimento, pueda tolerar un periodo prologado de ayuno manteniendo en equilibrio su organismo a través adaptaciones compensatorias en su metabolismo intermediario, movilizandó sus reservas energéticas en forma de glucógeno para mantenimiento de la glucosa que proporciona energía, y que después en los días de realimentación E. morio logre recuperar sus reservas energéticas.

V.3.Objetivo específico

a) Evaluar los cambios en la actividad de las enzimas (GK, PK, FBPassa, G6P-DH, 6PG-DH, ASAT y ALAT) del metabolismo intermediario en juveniles de *E. morio* alimentados con el tratamiento que presente la mejor fuente de carbohidrato, expuestos a un periodo de ayuno y a diferentes días de realimentación.

V.4.Metodología

V.4.1.Obtención de los organismos

Utilizando una lancha con motor fuera de borda 70 Hp y con anzuelo fueron capturados los juveniles en las costas adyacentes a Sisal. Los peces fueron transportados en un tinaco Rotoplas de 500 L con una bomba para aireación (marca), hacia la UAY (Unidad Académica Yucatán).

V.4.2. Diseño experimental

Para determinar el efecto del ayuno y realimentación en el metabolismo intermediario del *E morio*, se colocaron 12 peces en los 15 tanques del sistema de circulación cerrado (Tabla 29 y 30).

Alimentación.

Durante 20 días fueron alimentados con el tratamiento experimental (Tabla 26). Al día 20 de alimentados fueron sacrificados 15 peces de cada uno de los tanques, quedando 11 peces por tanque. El procedimiento de la disección, obtención de la muestra de sangre y almacenamiento de los órganos fue el mismo que en los experimentos anteriores.

Ayuno

Después de 20 días del periodo de alimentación los 11 peces por tanque fueron sometidos a 20 días de ayuno. En el día 40 del experimento, se sacrificaron 15 peces, uno de cada tanque. El procedimiento de la disección, obtención de la muestra de sangre y almacenamiento de los órganos fue el mismo que en los experimentos anteriores.

Realimentación

Para evaluar el efecto de la realimentación en el metabolismo intermediario de *E. morio*, se realizó un sorteo para definir los tanques que pertenecían a cada periodo de ayuno, ya que se consideraron 3 réplicas para cada periodo de realimentación (1, 4, 6, 12 y 20 días). En cada periodo de realimentación fueron sacrificados 10 peces, elegidos al azar, de los tanques (3 réplicas). El procedimiento de la disección, obtención de la muestra de sangre y almacenamiento de los órganos fue el mismo que en los experimentos anteriores.

Tabla 29. Distribución de tanques y periodo de realimentación

Día de realimentación	Tanque	N
1	3,6,10	10
4	4,8,15	10
6	12,2,5	10
12	1,7,11	10
20	14,13,9	10

Tabla 30. Diseño Experimental de Alimentación, Ayuno y Realimentación de los juveniles silvestres de *E. morio*, aclimatados a un tratamiento con 20% de carbohidrato (almidón de maíz).

<i>Periodo</i>	<i>Diseño experimental</i>	<i>Repetición Tratamiento</i>	<i>Respuesta a Evaluar</i>
Alimentación (20 días)	N= 15 N=15	1 pez por tanque	<ul style="list-style-type: none"> • Glucosa en Plasma • Glucógeno en hígado • Hematocrito
Ayuno (20 días)	ANDEVA una vía P<0.05		<ul style="list-style-type: none"> • Índice hepatosomático • Presión osmótica • Enzimas reguladoras Met. Intermediario
Realimentación (1,4,6,12,20 días)	N=10 ANDEVA de Bloque Anidada p < 0.05	3 tanques/tratamiento	

V.4.3. Composición de alimentos del tratamiento experimental

Para el tratamiento experimental se utilizó un alimento de almidón de maíz nativo (AMC) con las mejores fuentes de proteínas seleccionadas previamente en un experimento de digestibilidad aparente y digestibilidad *in vitro* diseñadas especialmente para la especie *E. morio* (Silva *et al.*, 2014). Este tratamiento contiene 47.26% de proteína, 5.5% de lípidos y 20% carbohidratos

Tabla 31. Composición de alimentos en el Tratamiento Experimental de Almidón de Maíz Crudo 20%, lípidos 5.5% y proteínas 47.2 %, de los juveniles en el experimento de ayuno y realimentación.

INGREDIENTE	(%)
<i>H. Menhaden</i> ¹	42.8
<i>H. Camarón</i> ²	5
<i>Calamar fresco</i> ³	5
<i>Proteína de soya</i> ⁴	20
<i>Treonina</i> ⁵	1.95
<i>Triptofano</i> ⁵	0.07
<i>Lisina</i> ⁵	1.23
<i>Leucina</i> ⁵	0.44
<i>Grenetina</i> ⁶	2
<i>Almidón de maíz crudo</i> ⁷	20
<i>Vitaminas</i> ⁸	1.5
<i>Stay c</i> ⁹	0.03
<i>Análisis Proximal</i> (g/100 g de materia seca)	
<i>Humedad</i>	5.97%;
<i>Proteína</i>	57.18%
<i>Lípidos</i>	6.9%;
<i>Fibra</i>	2.9%
<i>Cenizas</i>	13.91%
<i>Extracto libre de nitrógeno</i>	14.8%.
<i>Energía calórica (kJ g⁻¹)</i>	15 kJ/g

¹ Harina de pescado Menhaden Special Selection (APLIGEN S.A de C.V CDMX),² Harina de camarón (Comercial Mexicana Merida Yucatán); ³ Calamar fresco (Sisal, Yucatán). ⁴ Concentrado de proteína de soya (VIMIFOS, México CDMX). ⁵ Aminoácidos: Lisina, Treonina, Leucina y Triptofano (Future Foods S.A. de C.V. CDMX) ⁶ Grenetina ; ⁷ Almidón de Maíz y Almidón de papa crudos (Gluten y almidones comerciales S.A de C.V, México); ⁸ Vitaminas: acetato de retinol 18000 (IU kg⁻¹ diet); colecalciferol, 2000 (IU kg⁻¹ diet); acetato de alfa tocoferol, 35; sodium menadione bisulphate, 10; tiamina-HCl, 15; riboflavina, 25; 50; pyridoxina HCl, 5; folic acid 10; cianocobalamina, 0.02; biotina, 1.5; ácido ascórbico, 50; inositol, 400; ⁹ ROVIMIX STAY C-35 (Importado por ROCHE VITAMINAS Guadalajara Jal.) Composición: vit A: 1.200.00 IU; vit B1: 4,800 mg; vit. B12: 4,800 mg; vit B6: 4,800 mg; vit D3: 200,00 IU; vit. K3: 2,400 mg; ácido fólico 1,200 mg; biotin: 48 mg; pantotenato de calcio: 12,000 mg; cloruro de colina 108 g; niacina 24,000 mg; selenio: 100 mg; yodo 10 mg; cobalto: 10 mg ; cobre: 3,000 mg; hierro 50,000 mg; magnesio: 20,000 mg; zinc: 30,000 mg; vehículo 1,00g; antioxidantes: 25 g

V.4.4.-Parámetros físico-químicos

En los experimentos se registraron diariamente los parámetros para evaluar la calidad de agua. Por la mañana y por la tarde se realizaron las mediciones de temperatura, oxígeno disuelto, pH y salinidad (multiparámetros de la marca Hach®, modelo HQ40d).

V.4.5.- Metabolitos: Glucosa y glucógeno

Durante cada muestro se sacrificaron 15 peces, se determinó la glucosa en plasma, el glucógeno en hígado, presión osmótica, índice Hepatosomático y hematocrito.

V.4.6.-Estadística

El Hematocrito, Índice Hepatosomático (IHS) fueron transformados a arco seno; y los valores de la glucosa transformados a logaritmo.

Para glucosa, glucógeno, actividad enzimática, IHS y Hematocrito se verificó la homogeneidad con la prueba de homogeneidad de Leven's Tests. La normalidad se verificó con una prueba de Shapiro-Wilk.

Para Comparar Alimentación y Ayuno se utilizó una ANDEVA simple con prueba de Tukey

Para comparar los periodos de realimentación se aplicó una ANDEVA de bloque anidada con prueba de Tukey con un valor de significancia de $p < 0.05$. Cuando los datos no fueron homogéneos se hizo una prueba no-paramétrica Kruskal Wallis con valor de significancia de ($p < 0.05$). Se utilizó el paquete estadístico Statgraphics versión 6.0

V.5.-Resultados

V.5.1.-Glucosa y Glucógeno en periodo de ayuno realimentación en E. morio.

Entre el periodo de alimentación y ayuno los peces no presentaron diferencias significativas en la glucosa. En el periodo de realimentación, el nivel más bajo de glucosa se encontró en los juveniles con 6 días de realimentación (23.6 dl ml^{-1}), el valor más alto fue registrado en los juveniles con 1 día de realimentación (67.1 dl ml^{-1}) (Tabla 32).

Sin embargo el glucógeno fue encontrado en mayor concentración durante los periodos de alimentación y a los 20 días de realimentación (94.4 y $116.8 \text{ mg g}^{-1}\text{hígado}$), estas diferencias fueron significativas ($p < 0.05$) (Tabla 33).

Entre el periodo de alimentación y el de ayuno existieron diferencias significativas en la concentración siendo menor durante el periodo de ayuno (94.4 y $73.6 \text{ mg g}^{-1}\text{hígado}$; respectivamente). Durante los días de realimentación se encontró la menor concentración de glucógeno en el día 1 ($p < 0.05$), y rápidamente se recuperó al día 4, a partir de este día las diferencias no fueron significativas ($p > 0.05$) (Tabla 33).

V.5.2.-Hematocrito e Índice hepatosomático en periodo de ayuno realimentación en E. morio.

El hematocrito mostró diferencias significativas únicamente entre los peces del periodo de alimentación y el de ayuno ($p < 0.05$) (Tabla 32), mientras que durante los días de realimentación, el hematocrito no varió significativamente ($p > 0.05$) (Tabla 33). El IHS fue mayor en el periodo de alimentación (1.38) que en el de ayuno (0.50). El IHS en el periodo de realimentación, las diferencia fue significativa, encontrándose el menor valor en los peces con el primer día de realimentación (0.76), y fue ascendiendo hasta encontrar el valor más alto (2.62) en el día 20 de realimentación (Tabla 33).

Tabla 32. Glucosa en Plasma (mg.dL-1), Glucógeno en hígado (mg.g-1), Hematocrito (%) se compararon con una prueba de ANDEVA 1 VIA Tukey y el Índice Hepatosomático (IHS %) con una no paramétrica de Mann- Whitney en juveniles silvestres de *E. morio* en 20 días de alimentación con una tratamiento que contiene 20% de AMC, y 20 días de ayuno.

Periodo	Glucosa (dl ml ⁻¹)	Hematocrito (%)	IHS (%)	Glucógeno (mg g ⁻¹ hígado)
Alimentación (20 días)	68.15 ± 7.4 ^a	34.8 ± 0.45 ^b	1.38 ± 0.62 ^a	94.39 ± 8 ^a
Ayuno (20 días)	50.93 ± 7.19 ^a	36.56 ± 0.42 ^a	0.50 ± 0.10 ^b	73.6 ± 8 ^b

Promedio ± ES.

Tabla 33. Glucosa en Plasma (mg.dL-1), Glucógeno en hígado (mg.g-1), Hematocrito (%), índice hepato somático en diferentes días de realimentación (1, 4, 6, 12, 20) se compararon con una prueba de ANDEVA ANIDADA y el Índice Hepatosomático (IHS %) con una no paramétrica de Kruskal-wallis en juveniles silvestres de *E. morio* en 20 días de alimentación con una tratamiento que contiene 20% de AMC, y 20 días de ayuno.

Realimentación (días)	Glucosa (dl ml ⁻¹)	Hematocrito (%)	IHS (%)	Glucógeno (mg g ⁻¹ hígado)
1	67.07 ± 5.2 ^a n=15	34.58 ± 0.83 ^a n=15	0.76 ± 0.10 ^c n=15	70.01 ± 8 ^b n=10
4	50.93 ± 5.4 ^a n=15	34.34 ± 8.83 ^a n=15	1.40 ± 0.10 ^c n=15	90.19 ± 8 ^{ab} n=10
6	23.56 ± 5.9 ^b n=12	36.29 ± 0.89 ^a n=13	1.70 ± 0.10 ^{bc} n=15	107.02 ± 8 ^a n=10
12	25.16 ± 5.6 ^b n=13	36.85 ± 1.15 ^a n=8	2.06 ± 0.10 ^b n=15	105.17 ± 8 ^a n=10
20	41.11 ± 6.4 ^{ab} n=12	35.00 ± 1.08 ^a n=10	2.62 ± 0.10 ^a n=15	116.8 ± 8 ^a n=10

Promedio ± ES

V.5.3. Enzimas reguladoras del metabolismo intermediario en periodo de ayuno realimentación en E. morio.

Los peces en el ayuno y la alimentación mostraron diferencias significativas en la actividad de HK-I y al GK. La actividad de los peces de HK-I fue mayor durante el periodo de alimentación, mientras que la actividad de la GK fue mayor en los peces que estuvieron en el periodo de ayuno (Tabla 34). La actividad de GK fue significativamente menor en los peces del 4° día de realimentación ($0.50 \text{ U mg}^{-1} \text{ proteína}$) que en los peces del día 12, cuando se obtuvo la mayor actividad ($2.60 \text{ U mg}^{-1} \text{ proteína}$). Los peces entre el periodo de alimentación y ayuno mostraron diferencias significativas en la actividad de la PK; el valor mayor se encontró en los peces que tuvieron el periodo de alimentación ($37.9 \text{ U mg}^{-1} \text{ proteína}$) ($p < 0.05$) (Tabla 28). Durante los días de realimentación, la mayor actividad de la PK se incrementó significativamente en los peces del día 20 ($59.2 \text{ U mg}^{-1} \text{ proteína}$) ($p < 0.05$). En cuanto a la enzima FBPasa, la mayor actividad fue encontrada en los peces del día 1 de realimentación y esta diferencia fue significativa ($84.4 \text{ U mg}^{-1} \text{ proteína}$) (Tabla 35). Los peces del día 20 de realimentación mostraron los valores más altos en la actividad de G6P-DH y la 6PG-DH, enzimas involucradas en la ruta de la vía de las pentosa fosfato ($p < 0.05$) (Tabla 35). Los peces del día 1 realimentación mostraron mayor actividad en la ASAT y ALAT enzimas del catabolismo de proteínas ($p < 0.05$) (Tabla 35).

Tabla 34. Actividad enzimática de las enzimas reguladoras del metabolismo intermediario en juveniles de *E. morio*, alimentados con una tratamiento con AMC con un nivel de 20% durante 20 días; y juveniles en periodo de 20 días de ayuno. Análisis estadístico HK-1 y GK con una ANDEVA 1 Vía Tukey ($p < 0.05$) y HK-2, GDH, PK, FBPasa, G-6PDH, 6-PGDH, ALAT y ASAT fueron analizadas con No paramétrica Mann-Whitney ($p < 0.05$)

Actividad U mg protein ⁻¹	Alimentación 20 Días			Ayuno 20 Días		
<i>Hexocinasa - 1</i>	3.7	±	1.0 ^a	1.0	±	0.14 ^b
<i>Hexocinasa-2</i>	0.78	±	0.14 ^a	0.55	±	0.14 ^a
<i>Glucosa deshidrogenasa</i>	2.1	±	0.6 ^a	0.52	±	0.6 ^a
<i>Glucocinasa</i>	2.09	±	0.77 ^a	0.28	±	0.77 ^b
<i>Piruvato Cinasa</i>	37.9	±	1.8 ^a	12.6	±	1.8 ^b
<i>Fructosa 1,6-bifosfatasa</i>	65.81	±	8.2 ^a	34.27	±	8.2 ^b
<i>Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa</i>	56.1	±	7.3 ^a	63.7	±	7.3 ^a
<i>6-Fosfogluconato deshidrogenas</i>	20.91	±	2.4 ^b	32.67	±	2.4 ^a
<i>ALAT (U/I)</i>	13.99	±	3 ^a	15.27	±	3 ^a
<i>ASAT (U/I)</i>	65.8	±	7.8 ^b	101.7	±	7.8 ^a

PROMEDIO ± ES. N=10

Tabla 35. Actividad enzimática de las enzimas reguladoras del metabolismo intermediario en juveniles de *E. morio*, realimentados con una tratamiento con AMC con un nivel de 20% durante diferentes periodos de realimentación (1, 2, 4, 6, 12, 20). Análisis estadístico con ANDEVA Tukey ($p < 0.05$) y HK-2, ALAT y ASAT HK1, GDH, PK, FBPassa, G-6PDH, 6-PGDH, fueron analizadas con No paramétrica Kruskal-Wallis test $p < 0.05$.

	PERIODO DE REALIMENTACIÓN									
	1		4		6		12		20	
<i>Hexocinasa - I</i>	2.2	± 1.7 ^b	1.5	± 0.42 ^b	2.4	± 0.6 ^a	2.3	± 0.99 ^a	1.3	± 1.47 ^{ab}
<i>Hexocinasa - II</i>	0.46	± 0.1 ^a	0.47	± 0.35 ^a	1.24	± 0.25 ^a	1.17	± 0.46 ^b	0.40	± 1.18 ^b
<i>Glucosa deshidrogenasa</i>	2.43	± 0.37 ^a	1.6	± 0.37 ^a	2.2	± 0.37 ^a	1.94	± 0.38 ^a	0.36	± 0.38 ^a
<i>Glucocinasa</i>	0.72	± 0.3 ^{ab}	0.50	± 0.3 ^b	0.88	± 0.3 ^{ab}	2.60	± 0.3 ^a	1.8	± 0.3 ^{ab}
<i>Piruvato Cinasa</i>	25.8	± 3.6 ^b	35.5	± 3.6 ^{ab}	19.5	± 3.6 ^b	35.8	± 3.6 ^{ab}	59.2	± 3.6 ^a
<i>Fructosa 1,6-bifosfatasa</i>	84.3	± 6.9 ^a	75.4	± 6.9 ^a	23.4	± 6.9 ^b	43.4	± 28.6 ^{9ab}	79.2	± 6.9 ^a
<i>Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa</i>	54.4	± 6.0 ^b	42.4	± 6.0 ^b	35.36	± 6.0 ^b	54.7	± 6.0 ^b	113.	± 6.0 ^a
<i>6-Fosfoguconato deshidrogenasa</i>	12.3	± 2.1 ^b	20.9	± 2.1 ^{ab}	13.65	± 2.1 ^b	22.2	± 2.1 ^b	46.8	± 2.1 ^a
<i>ALAT (U/l)</i>	39.9	± 4 ^a	8.2	± 4 ^{ac}	10.8	± 4 ^b	6.99	± 5 ^c	7.77	± 4 ^{ac}
<i>ASAT (U/l)</i>	120.	± 6 ^a	53.5	± 6 ^b	45.0	± 6 ^b	57.3	± 6 ^b	64.9	± 6 ^b

Se registró la imagen de tractos difestivos en diferentes días de realimentación, en donde se puede apreciar como el color del hígado cambio de color rojo hacia un color blauecino en el último día de realimentación (día 20). El color blanco es indicativo de presencia de glucógeno (com. Pers, Bannante I.). En general se aprecio mayor contenido de grasa mesenterial entre los ciegos pilóricos y el intestino.

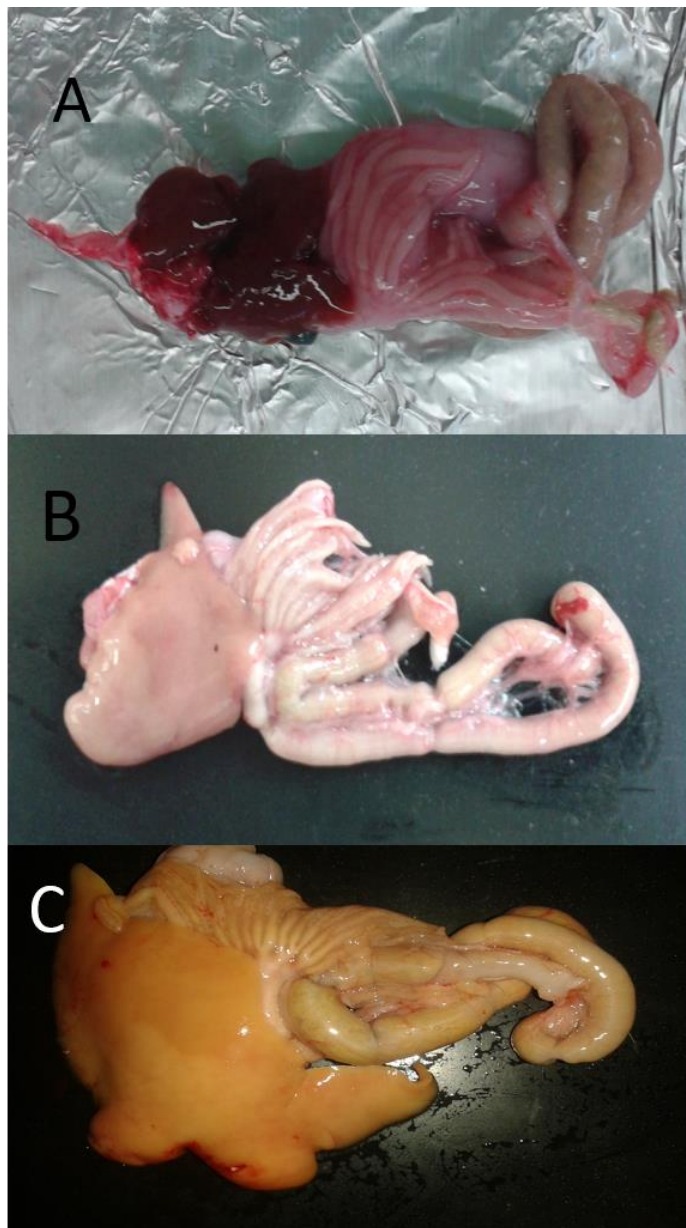


Figura 27. Tracto digestivo de *E. morio*: A) peces con 20 días de ayuno, B) peces con 12 días de alimentación, C) peces con 20 días de realimentación.

V.6.-Discusión

V.6.1- Efecto del ayuno en el metabolismo intermediario de juveniles de *E. morio*.

En el presente experimento al comparar el periodo de alimentación con el periodo de ayuno, los resultados mostraron una disminución en la reservas energéticas de los peces durante el periodo de ayuno, los valores del glucógeno fueron significativamente más bajos en el ayuno con respecto al periodo de alimentación (73.6 y 94.4 mg. g⁻¹), resultado que se vio reflejado en la disminución del IHS, y la disminución de la glucosa en plasma (Tabla 32). *E. morio* es una especie que respondió al ayuno prolongado consumiendo sus reservas energéticas en el hígado. Al respecto, Segner y Braunbeck (1988) en juveniles de *Cyprinus carpio*, encontraron la reducción de niveles de glucógeno y lípidos hepáticos en peces con 30 días de ayuno. Estos últimos autores encontraron además un incremento en la glucógeno fosforilasa en peces en ayuno prolongado (14 días). Los autores sugieren que la reducción de glucógeno y lípidos en condiciones de ayuno estuvo asociada al incremento de proteínas hepáticas.

En el presente trabajo, en el periodo de restricción alimentaria (ayuno), la glucosa presentó un valor más bajo con respecto al periodo de alimentación, pero no significativo; quizás la tendencia de *E. morio* ante el ayuno, fue a mantener los niveles de glucosa en plasma, lo que podría sugerir una importante actividad gluconeogénica en el periodo de ayuno.

En el periodo de alimentación se detectó una mayor actividad en las enzimas que fosforilan la glucosa dietética, sin embargo, en el periodo de ayuno la actividad disminuyó siendo significativamente menor en la HK-I y la GK (Tabla 34). La PK, enzima involucrada en la glucolisis, fue significativamente menor en el periodo de ayuno. Cowey y Walton (1986) mencionan que la restricción alimentaria y la realimentación producen diversas modificaciones en el metabolismo intermediario, dirigidas a mantener la homeostasis del organismo.

Al evaluar enzimas del catabolismo de proteínas en *E. morio*, se encontró una mayor actividad de la ALAT y la ASAT en los peces que estaban en ayuno. Es posible sugerir que dichas actividades incrementaron para resolver la demanda energética para poder vivir (Tabla 34),

utilizando la energía a partir de proteínas para la obtención de ATP, logrando una disminución en la masa corporal de los peces, como respuesta fisiológica al periodo de ayuno.

Shimeno *et al.* (1990), encontraron un aumento en aminoácidos libres asociado al incremento en la actividad de la ASAT y de la ALAT, con una actividad constante de la glucosa-6-fosfatasa (G6PT). Por otro lado, en la trucha arcoíris, un pez típico carnívoro, tuvo un incremento en la actividad de la GDH y ALAT en condiciones de ayuno (Sánchez *et al.*, 1998 citado por Rodríguez, 2012).

Sin embargo, la FBPasa, enzima reguladora de la ruta gluconeogénica, disminuyó en el periodo de ayuno en el *E. morio*. Es posible sugerir que durante el periodo de ayuno la glucosa 6-fosfato necesaria para la producción de ATP podría estar siendo producida por la acción de otras enzimas, como la glucógeno fosforilasa, sobre el glucógeno de reserva, ya que durante el periodo de ayuno fue clara la disminución del glucógeno en el tejido hepático y la disminución del IHS (Tabla 27). Metón *et al.* (2003) reportaron un patrón similar en juveniles de *S. aurata*, al someterlos a un periodo de 18 días de ayuno. Se observó un bajo IHS, una disminución de la PK, G6P-DH y de la 6PG-DH, pero a diferencia de *E. morio*, la especie *S. aurata* presentó un aumento en la FBPasa. Sin embargo, los niveles de glucosa en plasma de *E. morio*, tanto en condiciones de alimentación como de ayuno, no fueron significativamente diferentes, lo que podría explicarse precisamente por un mecanismo regulador en estos peces, muy marcado a partir del incremento de enzimas del catabolismo de proteínas como ALAT y la ASAT, que fueron en aumento durante el ayuno. Metón *et al.* (2003) encontraron valores similares de glucosa en plasma de *S. aurata* en ayuno y en periodo de alimentación. Caseras *et al.* (2002) mencionan que los niveles de glucosa en sangre pueden permanecer relativamente constantes en organismos que tengan una adaptación metabólica, disminuyendo sus enzimas hepáticas destinadas a la glucólisis y reguladoras de vías de las pentosa fosfato, y simultáneamente un incremento en las enzimas gluconeogénicas y del catabolismo de proteínas, vías que son además las principales rutas para obtener energía en peces carnívoros a partir de aminoácidos, lactato y glicerol (French *et al.*, 1981; Cowey y Walton 1986).

V.6.2.- Metabolismo intermediario de juveniles de *E. morio* en realimentación.

Los cambios más significativos en el periodo de realimentación se presentaron con el incremento del nivel de glucógeno y del IHS. Se encontró la menor concentración de glucógeno en el día 1, presentando una evidente recuperación al día 4, hasta alcanzar el valor más alto en el día 20 (Tabla 33).

Los carbohidratos que son almacenados en el hígado en forma de glucógeno representan del 1 al 6% del peso total del hígado, aunque especies herbívoras como la carpa puede almacenar hasta el 10%. El glucógeno es rápidamente convertido en glucosa y transportado a las células donde es requerido. Navarro y Gutiérrez (1995) mencionan que existen muchos factores que no permiten determinar pequeñas variaciones en el glucógeno en tiempos cortos, ya que la cantidad de glucógeno en hígado puede variar de una especie a otra, y de un individuo a otro. Se ha observado que en condiciones de ayuno, el glucógeno es generalmente el primer sustrato en ser utilizado en diferentes especies de peces. Sin embargo, algunas especies como el salmón en su ambiente natural, después de periodos de ayuno como consecuencia de la migración, muestran poca utilización del glucógeno. Otro caso similar es el de la carpa (*C. carpio*) que como se ha mencionado anteriormente, presenta una gran acumulación de glucógeno como reserva, y durante largos periodos de ayuno (12 meses) logra mantener el 6% de glucógeno en el hígado. Este comportamiento se puede explicar porque esta especie presenta un mecanismo compensatorio de glucosa, derivado del incremento de la actividad gluconeogénica, que utiliza sustratos diferentes a los carbohidratos para obtener los precursores energéticos como son los aminoácidos, de manera que es posible la formación nuevamente de glucógeno a partir de la producción de glucosa-6 fosfato (Navarro y Gutiérrez, 1995). En el caso del *E. morio*, fue posible observar con 20 días de ayuno, la disminución de glucógeno y una recuperación gradual al paso de los días de realimentación, por lo que *E. morio*, es una especie que, a diferencia del salmón y la carpa, utiliza al glucógeno como sustrato energético durante el ayuno, dejando como segunda opción las ruta gluconeogénica. Otra evidencia que apoya esta idea es que *E. morio* durante el periodo de ayuno disminuyó la actividad de la FBPasa (Tabla 34).

La recuperación del glucógeno en hígado estuvo relacionado con el incremento en el IHS durante los días de realimentación. Los resultados sugieren que *E. morio*, en los primeros días de realimentación, obtuvo la glucosa necesaria para recuperar sus reservas energéticas en forma de glucógeno, por vía gluconeogénica, ya que la enzima FBPasa, presentó la mayor actividad en el día 1 de realimentación (84.4, U mg⁻¹ proteína), así como la ASAT y la ALAT presentaron también mayor actividad en el día 1 de realimentación (p<0.05) (Tabla 35). Estos resultados sugieren que *E. morio* tiene una tendencia a preferir la vía gluconeogénica para recuperarse después de un periodo prolongado de ayuno, es decir, que la glucosa-6 fosfato endógena (G6P), en los primeros días de realimentación, proviene de fuentes gluconeogénicas y es destinada a compensar el glucógeno en hígado perdido durante el ayuno.

Nieto (2012) menciona que en peces existen diferentes mecanismos de recuperación del glucógeno durante los días de realimentación. En la carpa, Shimeno et al., (1990) reportan que los niveles de glucógeno en el periodo de realimentación (7 días), fueron más elevados (205%) que los valores de glucógeno en la fase de preayuno. En nuestro experimento, se observó que *E. morio* tuvo valores más elevados de glucógeno desde el día 6 de realimentación, presentando el nivel más alto en el día 20 (116.8 mg.g⁻¹), que en el día 20 de alimentación (preayuno) (73.6 mg.g⁻¹) (Tabla 33). En el *Rhamdia hilarii* se encontró un patrón de recuperación similar en peces alimentados previamente con una alimento rico en carbohidratos, y después sometidos a un periodo prolongado de ayuno, Después de 48 horas de ser realimentados, presentaron una rápida incorporación de glucosa en forma de glucógeno en hígado (Machado et al., (1988). Sin embargo, especies como *S. salar* mostraron que la concentración del glucógeno no fue diferente al de los peces control, después de ser realimentados durante 14 días (Soengas et al., 1996). Por otra parte, en *Rutilus rutilus* se reporta una disminución drástica del glucógeno en el ayuno, que alcanzó un estado estacionario del 30% del glucógeno del control a las 4 semanas de ayuno, para después tener una rápida recuperación en el periodo de realimentación, presentando una estrategia adaptativa de rápido almacenamiento de energía proveniente de la dieta (Méndez y Wieser, 1993).

Metón et al. (2003) reportan para *S. aurata*, un mecanismo donde hay disminución del glucógeno y de la actividad de enzimas como a GK, PK, PFK-1, 6PD-DH, G6P-DH, un

incremento de la FBPasa-1 durante el periodo de ayuno, y rápida recuperación del glucógeno y de la actividad de la PFK-1 a las 8 horas, y a 2 días de iniciar la realimentación. Los autores argumentan que existe una actividad acoplada en los primeros días de recuperación, la cual se manifiesta con el incremento de la actividad de la PFK-1 y la FBPasa, es decir, que este pez logra mantener la glucosa 6 fosfato para recuperar el glucógeno en hígado por medio de las dos vías: la glucolítica y la gluconeogénica. La actividad de la GK, PK, 6PG-DH y G6P-DH, se incrementan cuando ocurre un tiempo más prolongado de realimentación.

En nuestro trabajo se encontró la mayor actividad de la FBPasa en el primer día de realimentación; este resultado sugiere que *E. morio* tiene preferencia por la vía gluconeogénica para recuperarse después del periodo prolongado de ayuno, y que la incorporación de las enzimas glucolíticas fue gradual en un tiempo prolongado de realimentación. La PK mostró su valor más alto en el día 20 (59.2 U mg⁻¹ proteína) (p<0.05), mientras que la mayor actividad registrada de la GK (2.60 U mg⁻¹ proteína) se observó en el día 12 de realimentación (Tabla 35). Estos resultados sugieren que al encontrarse restaurada la fuente de glucosa 6 –fosfato, se incrementa la actividad de las enzimas de la vía de pentosas: la G6P-DH y la 6PG-DH, que mostraron los niveles más altos en el día 20 de realimentación (p<0.05) (Tabla 28).

V.7.-Conclusiones

1. *E. morio* es un pez que, en un periodo de ayuno prolongado, toma al glucógeno como fuente de glucosa para mantener la homeostasis metabólica, ya que en este periodo de, hubo disminución en las reservas energéticas, donde los niveles de glucógeno fueron significativamente más bajos con respecto al periodo de alimentación.
2. En el periodo de ayuno no hay una disminución significativa de la glucosa en plasma, lo que indica que *E. morio* presenta mecanismos de adaptación metabólica que le permiten mantener los niveles de glucosa, aun en un periodo de restricción alimentaria.
3. El mecanismo compensatorio de *E. morio* fue deprimir la actividad de las enzimas glucolíticas y aumentar la de las enzimas del catabolismo de proteínas ASAT y ALAT, que fueron las que tuvieron mayor actividad en el periodo de ayuno ($p < 0.5$).
4. *E. morio* es un pez capaz de recuperar sus reservas energéticas y adaptar su metabolismo durante los días de realimentación. Uno de los mecanismos fue que *E. morio* el primer día de realimentación se restablece e incrementa la actividad de la FBPasa, para obtener glucosa 6 -fosfato a partir de la gluconeogénesis. La recuperación de las enzimas glucolíticas fue gradual, para el día 12 de realimentación se presentó la mayor actividad de la GK y en el día 20 se activaron la PK, y las enzimas de la ruta de las pentosas fosfato (G6P-DH y 6PG-DH) que producen intermediarios hacia el crecimiento como la ribulosa 5-fosfato y poder reductor para en la producción de NADH destinados a la formación de lípidos.

VI.-Conclusiones generales

La plasticidad en la composición de presas que presenta *E. morio* en el medio natural, se reflejó en la capacidad de este pez de adaptarse a alimentos como el almidón por lo que es posible tener las siguientes conclusiones al final de este trabajo.

1. *E. morio* es un pez capaz de tolerar 20 % de inclusión de carbohidratos y mantener sus niveles de glucosa estable, la glucosa proveniente de los alimentos logró activar la ruta glucolíticas y disminuir las rutas gluconeogénicas.

2. La curva de tolerancia a la glucosa de *E. morio* en peces aclimatados a un tratamiento con almidón de maíz crudo presentó tiempos de recuperación de la glucosa dentro de 24 hrs lo que indica que *E. morio* presenta los mecanismos enzimáticos para lograr la homeostasis en la glucosa circundante.

3. El almidón que mejor fue asimilado fue el de maíz crudo y el de maíz waxy, ya que los peces alimentados con estos tratamientos lograron crecer más y acumular energía en forma de glucógeno, este almidón presentó las características que le permitieron al mero digerir en un tiempo más lento el almidón lo cual favoreció una mejor asimilación del carbohidrato. Este experimento sugiere que el almidón de maíz waxy con un 99% de amilopectina, y con mayor disponibilidad de enlaces α -1, 4glucosídicos, logró acumular mayor cantidad de glucógeno como reserva energética y los peces alimentados con este almidón también activaron la ruta de la vía de las pentosa fosfato, donde se forma el poder reductor en forma de NADH para la producción de lípidos y también proporciona precursores de síntesis de proteínas como la ribulosa 5-fosfato.

4. Este trabajo sugiere que *E. morio* puede ser considerado un pez omnívoro que es capaz de adaptarse a alimentos que contienen carbohidratos y utilizarlos como vías alternas de obtención de energía. En peces sometidos a periodos de ayuno, fue posible observar que *E. morio* logra mantener su condiciones fisiológicas estables con niveles de glucosa constantes utilizando enzimas que intervienen en el catabolismo de proteínas y gluconeogénicas para obtener glucosa, también utiliza el glucógeno como sustrato energético en periodos de restricción alimentaria. Se demostró que en periodo de realimentación con un tratamiento que

contenia almidon las enzimas del metabolismo intermediario de las vías glucolíticas se restablecieron al ser alimentados con este tratamiento, disminuyendo las enzimas de las rutas gluconeogénicas.

5. Este trabajo demuestra que es posible la utilización de almidones para la elaboración de alimentos, sustituyendo un porcentaje de las proteínas por carbohidratos en la elaboración de los alimentos que cubran los requerimientos energéticos que *E. morio* necesita para crecer, ya que este experimento fue utilizado en individuos juveniles, en periodos donde fue posible evaluar el crecimiento como indicador de asimilación de los alimentos.

VII.-Referencias

Efecto de los carbohidratos dietéticos sobre el metabolismo intermediario del mero rojo *Epinephelus morio*

Aknes, A. (1995) Growth, feed efficiency and slaughter quality of salmón, *Salmo salar* L., given feed with different ratio of carbohydrate and protein. *Aquaculture. Nutr.*, 1, 241–248.

Alliot, E.; Pastoureaud, A; Trelu, J. (1977). Evolution of enzymatic activities in the digestive system during the sea-bass larval life (*Dicentrarchus labrax*). Variations of proteinograms and of zymograms]. 3. Meet on Mariculture of the Working Group of the International Council for the Exploration of the Sea, Brest (France), 10 May 1977 *M sur la Mariculture, Brest (France)*, 10-13

Amirkolaie, AK., Leenhouders, I., Verreth, JA., Schrama, JW. (2005) Type of dietary fibre soluble vs insoluble influences digestion, faeces characteristics and faecal waste production in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aqua. Res.* 60:1157-1166.

Arreguín-Sánchez FJ, JC Seijo, D Fuentes y M Solís-Ramírez (1987). Estado de conocimiento de los recursos pesqueros de la Plataforma de Yucatán y región adyacente. *Contribuciones de Investigación Pesquera. Documento técnico 4: 1-41.* Secretaría de Pesca, Instituto Nacional de la Pesca, Centro Regional de Investigaciones Pesquera, Yucalpetén.

Arreguín-Sánchez, F., M. Contreras, V. Moreno, R. Valdés y R. Burgos. 1997. La pesquería de mero (*Epinephelus morio*) de la Sonda de Campeche, México. En: D. Flores-Hernández, P. Sánchez-Gil, J.C. Seijo y F. Arreguín-Sánchez (Eds.) *Análisis y Diagnóstico de los Recursos Pesqueros Críticos del Golfo de México.* Universidad Autónoma de Campeche. EPOMEX, Serie Científica, 7: 307-332. Baldwin, C. y G. Johnson. 1993. Phylogeny of the Epinephelinae (Teleostei: Serranidae). *Bull. Mar. Sci.* 52: 240-283.

Bannante, I V., *et al.*, (1991) Regulation of fish glycolysis-gluconeogenesis: role of fructose 2,6P2 and PFK-2. *Comp. Biochem. Physiol.* 100B 11-17.

Baanante, I. (2007) Effects of diets with distinct protein-to-carbohydrate ratios on nutrient digestibility, growth performance, body composition and liver intermediary enzyme activities in gilthead sea bream (*Sparus aurata*, L.) fingerlings. JEMBE 343,1–10.

Bautista *et al.*, (1988). Glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Dicentrarchus labrax* liver: kinetic mechanism and kinetics of NADPH inhibition, *Biochim. Biophys. Acta* 967 (1988), pp. 354.363.

Bergmeyer, (1974) H.U. Bergmeyer, *Methods of Enzymatic Analysis* vol. 4, Academic Press (1974), pp. 1704.1708.

Bergot F., (1979) Effects of dietary carbohydrates and of their mode of distribution on glycaemia in rainbow trout. *Camp. Biochem. Physiol.* 64A, 543-547.

Bergot, F. (1993) *In* Kaushik,S., Luquet, P. (Eds), Digestibility of native starches of various botanical origins by RT (*Onchorhynchus mykiss*). Institut National de la Recherche Agronomique, Paris, France
<http://search.proquest.com/docview/16802781?accountid=27530>

Bernfeld, P., (1955). Sur une method de dosages des amylases. In *Methods in Enzymology*.

Blasco J., I. Marimón, I. Viaplana and J. Fernández-Borrás (2001). Fate of plasma glucose in tissues of Brown trout in vivo: effects of fasting and glucose loading. *Fish Physiology and Biochemistry* 24: 247-258

Blasco, J., Fernandez-Borras, J., Marimon, I., and Requena, A. (1996). Plasma glucose kinetics and tissue uptake in brown trout in vivo: Effect of an intravascular glucose load. *J. Comp. Physiol. B* **165**, 534–541.

Blin C., y Panserat S., et al., (1999). Teleost liver hexokinase- and glucokinase-like enzymes: partial cDNAcloning and phylogenetic studies in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), common carp (*Cyprinus carpio*) and gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Fish Physiology and Biochemistry* **21**: 93–102, 1999

Bonamusa L, García P., Fernández F., Baanante I., (1992) Nutritional effects on key glycolytic–gluconeogenic enzyme activities and metabolite levels in the liver of the teleost fish *Sparus aurata*. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 1, 113–125.

Boonyaratpalin, M., (1997) Nutrient requirements of marine food fish cultured in Southeast Asia. *Aquaculture* No. 151, pag. 283.

Borrebaek B, Christophersen B (2000) Hepatic glucose phosphorylatingactivities in perch (*Perca fluviatilis*) after different dietary treatments. *Comp Biochem Physiol*125B:387–393

Bradford, (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976), pp. 248.254.

Briton J.C., y B. Morton, 1989. *Shore Ecology of the Gulf of México*, University to Texas Press. Austin, 387p.

Brulé y Rodriguez Canche (1993.) Foods habits of juvenile red groupers, *Epinephelus morio* (Valenciennes 1828) from Campeche Bank, Yucatan, Mexico. *Bull. Nar. Sci.* 52: 772-779.

Brulé, T. and Rodriguez Canche, LG. (1993) Foods habits of juvenile red groupers, *Epinephelus morio* (Valenciennes, 1828) from Campeche Bank, Yucatan, Mexico. Bull. Mar. Sci. 52:772-779.

Brulé, T. y C. Deniel. 1994. Exposé synoptique des données biologiques sur le mérou rouge *Epinephelus morio* (Valenciennes, 1828) du Golfe du México. FAO Synopsis sur les pêches No.155. Rome, 1994
Brulé, T. Déniel, C. Colás-Marrufo, T. and Sánchez-Crespo, M. 1999. Grouper Reproduction in the Southern Gulf of Mexico. Transactions of the American Fisheries Society, 128:3, 385–402. doi:10.1577/1548-8659(1999)128.0.CO.

Brulé T., y Déniel C. (1996). Biological Research on the red Grouper (*Epinephelus morio*) from the Southern Gulf of Mexico. CINVESTAV, México, Yucatán.

Buddington, R.K. and Hilton, J.W., 1987. Intestinal adaptations of rainbow trout to changes in dietary carbohydrate. Am. J. Physiol., 253 (Gastrointest. Liver Physiol., 16): G489-G496.

Buleon. A., Colonna, P., Planchot, V. and Ball, S. (1998) Starch granules: structure and biosíntesis. International. J. Biol. Macromol. 23: 85-112

Burgos y Defeo., (2000); INP 2000, 2004; Giménez- Hurtado, 2005; Burgos-Rosas y Pérez-Pérez, 2006).

Capilla, E., Gutiérrez, J., Navarro, I., 2013. Pancreatic hormones in trout: insulin and glucagon. In:Polakof, S., Moon, T.W. (Eds.), Trout: From Physiology to Conservation. Nova Publishers, Inc., New York, pp. 241–268.

Cárdenas L. M., A. Cornish-Bowden and T. Ureta(1998). Evolution and regulatory role of the hexokinases. *Biochimica et Biophysica Acta* 1401 1998 242–264

Carranza-Edwards, A., L. Rosales-Hoz and S. Santiago-Pérez, 1996. A reconnaissance study of carbonates in Mexican beach sands. *Sedimentary Geology*, 101:261-268.

Caseras A., Metón I, F. Fernandez, Bannante I., (2000), Glucokinase gene expression is nutritionally regulated in liver of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Biochimica et Biophysica Acta* 1493 (2000) 135^141

Castillo A., Alvarez, Sanchez, Suárez, Cuzon y Gaxiola. (2011) Season Variation of metabolites, Hematocrit and Activity of Digestive Enzyme in Juvenile Wild red grouper *Epinephelus morio*. Pags 62. Ed L. Elizabeth Cruz S., Denis Ricque M., Mireya Tapia ., MataG Nieto L., David A. Villarreal C., Julián Gamboa D., y Luis Hernández H. Avances en nutrición acuícola XI Memorias del Décimo primer Simposio Internacional Acuícola. 23 -25 Noviembre 2011. San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México. Universidad autónoma de nuevo león, Monterrey, Nuevo León, México. P 125. Champe y Harvey 1994).

Cgatey C. B., Brown D. A., Adron J. W. y Shanks A. M. (1974) The effect of dietary protein content on certain cell components and enzymes in the liver of plaice. *Mar. Biol.* 28, 207-213.

Clark J., McNaughton J. & Stark J.R. (1984) Metabolism in marine fish. Carbohydrate digestion in Dover sole (*Solea solea* L.). *Comparative Biochemistry and Physiology* 77B, 821-827.

Coleman, F. Koenig, C. and Collins, L. (1996). Reproductive styles of shallow-water groupers (Pisces: Serranidae) in the eastern Gulf of Mexico and the consequences of fishing spawning aggregations. *Environmental Biology of Fishes*, 47, 129–141.

Coleman, F.C. y S.L. Williams. (2002). Overexploiting marine ecosystem engineers: potential consequences for biodiversity. *Trends in Ecology and Evolution*; 17: 40-4.

Conde-Sieira, M., Soengas, J.L., Valente, L.M.P. (2015) Potential capacity of *Senegalensis solea* to use carbohydrates: metabolic responses to hypo and hyper-glycaemia. *Aquaculture* 438: 59-67.

Cowey C. B., Adron J. W., Brown D. A. y Shanks A. M. (1975) The metabolism of glucose by plaice and the effect of dietary energy source on protein utilisation in plaice. *Br. J. Nutr.* 33, 219-231.

Cowey C. B., De la Higuera, M. y Adron J. W. (1977). The effect of dietary composition and of insulin on gluconeogenesis in rainbow trout. *Br. d. Nutr.* 38, 385-395.

Cowey C. B., Knox D., Walton M. J. y Adron J. W. (1977) The regulation of gluconeogenesis by diet and insulin in rainbow trout. *Br. J. Nutr.* 38, 463-470.

Cowey C. B., Cooked D. J., Matty A. J. y Adron J. W. (1981) Effect of quantity and quality of dietary protein on certain enzyme activities in rainbow trout. *J. Nutr.* 111,336-345.

Cowey C. B. *et al.*, (1989). Intermedary metabolism, En: Halver, J.E. (Ed.), Fish Nutrition, 2nd ed. Academic press. London, pp. 259-329.

Chakrabarti, I., Gani, M.A., Chaki, K.K., Sur, R. & Misra, K.K. (1995) Digestive enzymes in 11 freshwater teleost fish species in relation to food habit and niche segregation. *Comp. Biochem. Physiol. A*, 122, 167–177.

Chavin W, y Young J. (1969). Factor in the determination of normal serum glucose levels of goldfish, *Casassius auratus*. *Comp. Biochem*, 1970, Vol. 33 pp 629 to 653.

Chen, H. Y. and Tsai, J. C. (1994). Optimal dietary protein level for the growth of juvenile grouper, *Epinephelus malabaricus*, fed semipurified diets. *Aquaculture* 119: 265-271.

Chen, T. F. and Chen, L. L. (1986). The experiment for the development of artificial diet for the grouper *Epinephelus salmonides*. In: J. L. Chuang and S. Y. Shiau (Editors) *Research and Development of Aquatic Animal Feed in Taiwan*, Vol. 1. Fisheries Society of Taiwan, Keelung, Taiwan, pp. 95-100.

Chen, C. R. (2000). Historical development of aquaculture in Taiwan. *China Fisheries Monthly* 569:13-30.

Chen, T.F. and Chen, L.L. (1986) The experiment for the development of artificial diet for the grouper *Epinephelus salmonides*. In: J.L. Chuang and S.Y. Shiau Eds. *Res. Develop. Aqua. Animal feed in Taiwan*, vol. 1. Fish. Soc, Keelung, Taiwan, pp 95-100.

Chuanpeng, Z., Xianping G., Jin, N., Heizhao, L., Zhong, H., and Xiaohong, T., (2015) Effect of dietary carbohydrate levels on growth performance, body composition, intestinal and hepatic enzyme activities, and growth hormone gene expression of

juvenile golden pompano, *Trachinotus ovatus*. *Aquaculture* 437: 390-397.

Daisley, C. (1973) Routine haematological methods from use with fish blood. *J. Fish. Biol.* 5:771-778.

Darias M.J., Zambonino-Infante J.L., Hugot K., Cahu C.L. y Mazurais D. (2008) Gene expression patterns during the larval development of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) by microarray analysis. *Marine Biotechnology* (New York, NY) Vol 10, pag 416-428.

De los Santos, Ferreira A., Castillo A., Cuzón G., Gaxiola (2011). Distribución de energía de los juveniles silvestres del mero rojo *Epinephelus morio*, alimentados con diferentes fuentes de carbohidratos. Pág. 51 Ed L. Elizabeth Cruz S., Denis Ricque M., Mireya Tapia ., Mata Nieto L., David A. Villarreal C., Julián Gamboa D., y Luis Hernández H. Avances en nutrición acuícola XI Memorias del Décimo primer Simposio Internacional Acuícola. 23 -25 Noviembre 2011. San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México. Universidad autónoma de nuevo león, Monterrey, Nuevo León, México. P 125.

Demai L.S. A., Garin D., Brichong G., Mure M. y Peres G. (1974) Neoglycogenese partir de la glycine C chez la tanche *Tinca vulgaris* au cours de l'asphyxie. *Comp. Biochem. Physiol.* 47A, 1023-1033.

Divakaran, S., Brown, C.L., Ostrowski, C.A., 2001. Comparative digestive enzyme ontogeny in two marine larval fishes: Pacific threadfin (*Polydactylus sexlineatus*) and blue trevally (*Caranx melampygus*). *Fish Physiol. Biochem.* 24, 225–241.

Doi, T., D. Mendizabal y M. Contreras (1981). Análisis preliminar de la población de mero *Epinephelus morio* (Valenciennes, 1928) en el Banco de Campeche, Ciencia Pesquera, INP 1: 1-15.

Douglas, S.E., Mandla, S., Gallant, J.W., (2000). Molecular analysis of the amylase gene and its expression during development in the winterfounder, *Pleuronectes americanus*. *Aquaculture* 190, 247–260.

Dubois, N., Kap, L.A., Lilies, J.C., Hamilton, P.A and Smith, F. (1965) Colorimetric method for determination of sugars of related substances. *Analytic Chemistry* 28: 350-356.

Ebeling, P., Koivisto, V.A., Koivisto, V., (1998). Insulin independent glucose transport regulates insulin sensitivity. *FEBS Lett.* 436, 301_303. Renaud y Moon 1980).

Enes P, Panserat S, Kaushik S and A. Oliva-Teles.(2006). Effect of normal and waxy maize starch on growth, food utilization and hepatic glucose metabolism in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. *Comp. Biochem Physiol.* Vol 143 (1): 89-96

Enes P, Panserat S, Kaushik S and Oliva-Teles A. (2006) Effect of normal and waxy maize starch on growth, food utilization and hepatic glucose metabolism in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. *Comp. Biochem Physiol.* 143:89-96.

Enes, P., Panserat, S., Kaushik, S., Oliva-Teles, A. (2008) Growth performance and metabolic utilization of diets with native and waxy maize starch by gilthead sea bream (*Sparus aurata*) juveniles. *Aquaculture* 274, 101-108.

Enes P, Panserat S, Kaushik S, Oliva-Teles A.(2011) Dietary Carbohydrate Utilization by European Sea Bass (*Dicentrarchus labrax* L.) and Gilthead Sea Bream (*Sparus aurata* L.) Juveniles. *Reviews in Fisheries Science*;19: 201-215.

Enes, P., García, M., Guerrero, A., Couto A., Pousaoud-Ferreira., M.A. Gallardo and Oliva-Teles. (2015) Utilization of dietary starch by juvenile white sea bream *Diplodus sargus* at different feeding frequencies. *Aquaculture Nutrition* 10.1111.12227.

Escribano, R., V. Marín, P. Hidalgo & G. Olivares. 2002. Physical-biological interactions in the pelagic ecosystem of the nearshore zone of the northern Humboldt Current System. In: J.C. Castilla & J. Largier (eds.). *Proceedings of the International Symposium on Linkages and Dynamics of Coastal Systems*. Ediciones Universidad Católica de Chile, Santiago, pp. 145-175.

Failler P. (2007) Future prospects for fish and fishery products. 4. Fish consumption in the European Union in 2015 and 2030. Part 1. European overview. *FAO Fisheries Circular* No 972/4, Part1 Rome, FAO 2007 204p.

Falfan E., Ordonez U., Ornelas M. (2008). Abundancia y Distribución de Larvas del Complejo Lutjanidae – Serranidae en la Plataforma de Yucatán. 58th Gulf and Caribbean Fisheries Institute. CINVESTAV. Pág. 161 – 167

Farbridge, K.J y J.F. Leatherland (1992). Temporal changes in plasma thyroid hormone, growth hormone and free fatty acid concentrations, and hepatic 5' monodeiodinase activity, lipid and protein content during chronic fasting and re-feeding in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish. Physiol. Biochem.* 10:245-257.

Fernandez I., Moyano F., *et al.*, (2002). Caracterización de la actividad α -amilasa en algunos espáridos mediterráneos. *Bol. Inst. Esp. Oceanogr.* 18 (1-4). 2002: 109-114.

Fernandez, F.(2006). Effects of diets with distinct protein-to-carbohydrate ratios on nutrient digestibility, growth performance, body composition and liver intermediary enzyme activities in gilthead sea bream (*Sparus aurata*, L.) fingerlings. *Journal of Experimental marine Biology and Ecology* 343 (2007) 1-10.

Fernández, F. Miquel., A. Córdoba M., Metón I., Caseras A. (2007). Effects of diets with distinct protein-to-carbohydrate ratio on nutrient digestibility, growth performance, body composition and liver intermediary enzyme activities in gilthead sea bream (*Sparus aurata*, L.) fingerlings. *JEMBE* 343,10.

Fernández, F., Miquel, A.G., Cordoba, M., Varas, M., Meton, I., (2007). Effects of diets with distinct protein-to-carbohydrate ratios on nutrient digestibility, growth performance, body composition and liver intermediary enzyme activities in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) fingerlings. *J. Exp. Mar. Biol.* 343, 1-10.

French, D. (1984). Organization of starch granules. In: *Starch: chemistry and technology*, 2nd ed. Whistler, R.L. BeMiller, J.N. and Paschall, E.F (eds). Academic Press, Orlando, Fl. U.S.A.

Furuichi, M. and Y. Yone (1981). Change of blood sugar and plasma insulin levels of fishes in glucose tolerante test. *Bulletin Japan Society Scientific Fisheries* 47:761-764.

Gallant, D. J., Bouchet, B., and Baldwin, P.M. (1997). Microscopy of starch: evidence of a new level of granule organization. *Carbohydrate Polymers.* 32: 177-191.

García-Riera, M.P. & Hemre, G.-I. (1996) Glucose tolerance in turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquacult.Nutr.*, 2, 117–120.

Gamboa A. (2011). Efecto de la fitasa en dietas basadas en proteína vegetal en la fisiología digestiva, el crecimiento y la supervivencia de *Farfantepenaeus duorarum*. Tesis para obtener el título de Maestro en Ciencias UNAM. Pas 34.

Geurden I., Aramendi M., Zambonino-Infante J. & Panserat S. (2007) Early feeding of carnivorous rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with a hyperglucidic diet Turing a short period: effect on dietary glucose utilization in juveniles. *American Journal of Physiology* 292.

Gimenez E., Anderes B., Moreno V. Y Burgos R 2001. Aspectos de la conducta alimentaria del mero (*Epinephelus morio*) del Banco de Campeche. INP: SAGARPA. México. Ciencia Pesquera No. 15.

Gosline, W. 1966. The limits of the Family Serranidae, with notes on other lower percoids. *Proc. Cal. Acad. Sci.* 33: 91-112.

Harmon, J.S., Eilertson, C.D., Sheridan, M.A., Plisetskaya, E.M., 1991. Insulin suppression is associated with hypersomatostatinemia and hyperglucagonemia in glucose injected rainbow trout. *Am. J. Physiol.* 261, R609–R613.

Heemstra, P. & J. Randall. 1993. FAO species catalogue. Groupers of the world (Family Serranidae, Subfamily Epinephelinae). An annotated and illustrated catalogue of the grouper, rockcod, hin, coral grouper and lyretail species known to date. FAO Fish. Synop. Rome. 382

Helfman S., Collete B., Facey D., Bowen B., 2009. The diversity of fishes. Biology, Evolution and Ecology. 2ª edición. Wiley Black Well

Hemre y Hansen (1998). Utilization of different dietary starch sources and tolerance to glucose loading in Atlantic salmon *Salmo salar* L, during parr smolt transformation Aquaculture 161 p.p. 145-157 .

Hemre GI, Mommsen Tp, Krogdahl A. (2002). Carbohydrates in fish nutrition: effects on growth, glucose metabolism and hepatic enzyme. Aquac Nutri. 8:175-195

Hemre, G. I. and Kahrs, F. (1997). 14C-glucose injection in Atlantic cod, *Gadus morhua*, metabolic responses and excretion via the gill membrane. Aquacult. Nutr. 3, 3-8.

Hemre, G.I., Lie, O., Lied, E. and Lambertsen, G., (1989) Starch as an energy source in feed for cod (*Gadus morhua*): digestibility and retention. Aquaculture 80, 261–270.

Hemre, G.I., Mommsen, T.P., Krogdahl, A., (2001) Carbohydrates in fish nutrition: effects on growth, glucose metabolism and hepatic enzymes. Aquac. Nutr. 7,1-20.

Hennig, W. 1966. Phylogenetic systematics. Univ. Illinois, Urbana, Illinois. 263 p

Hertz Y., Z. Madar, B. Hopher, A. Gertler (1989). Glucose metabolism in the common carp (*Cyprinus carpio* L.): the effects of cobalt and chromium *Aquaculture*, Volume 76, Issue 3, Pages 255-267

Hertz Y., Z. Madar, B. Hopher, A. Gertler (1989). Glucose metabolism in the common carp (*Cyprinus carpio* L.): the effects of cobalt and chromium *Aquaculture*, Volume 76, Issue 3, Pages 255-267 Krogdahl *et al.*, 2005;

Hertz, Y., Epstein, N., Abraham, M., Madar, Z., Hopher, B. et al. (1989) Effects of metformin on plasma insulin, glucose metabolism and protein synthesis in the common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Aquaculture* 80:175-187.

Hilton, J W., Plisetskaya, EM., Leatherland, JF. (1987) Does oral 3,5,3'-triiodothyronine affect dietary glucose utilization and plasma insulin levels in RT (*Salmo gairdneri*)? *J. Fish Physiol. Biochem.* 4:113-120.

Hochachka P. W. (1961) Glucose and acetate metabolism in fish. *Can. J. Biochem. Physiol.* 39, 1937-1941.

Hochachka P. W. (1969) Intermediary metabolism in fishes. In *Fish Physiology* (Edited by Hoar W. G. & Randall D. J.), Vol. I, pp. 351-390. Academic Press, New York.

Hochachka P. W. y Haves F. R. (1962). The effect of temperature acclimation on pathways of glucose metabolism in the trout. *Can. J. Zool.* 40, 261-270.

Hochachka P. W. y Lewis J. K. (1970) Enzyme variants in thermal acclimation trout liver citrate synthase. *J. Biol. Chem.* 245, 6567-6573.

Hochachka P., y Mommsen T.P. (1995). *Metabolic biochemistry and molecular biology of fishes*, 4. Elsevier science P.O 211, 1000 A.E. Amsterdam. p.p. 33-56.

Hoover, R. (2001). Composition, molecular structure, and physicochemical properties of tuber and root starches: a review. *Carbohydrate polymers* 45, 253-267.

Hunter Jr. 1981. Feeding ecology and predation of marine fish larvae. En: Lasker R (ed) *Marine fish larvae: Morphology, ecology and relation to fisheries*: 34-77. Washington SeaGrant Program, Seattle Interamericana. 4a. Edic. 795 pp.

Hutchins C.G. S.D. Rawles, D.M. Gatlin III. (1998) Effects of dietary carbohydrate kind and level on growth, body composition and glycemic response of juvenile sunshine bass (*Morone chrysops* Y=M. *saxatilis*). *Aquaculture* 161 1998. 187–199

Iberty, A., Buleon, A., Tran, V., y Pérez, s. (1991). Recent advances in knowlwgde of Storch structure. *Starch/Stärke* 43: 375-384.

Ingham L. & Arma C. (1977) Intestinal absorption of amino acids in trout. *J. Comp. Physiol.* 117B, 323-335.

Ingra I P. (1970) Uridine diphosphate glucose-glycogen glucosyl transferase from trout liver. *Int. J. Biochem.* 1, 263 272.

Jane, y Leas (1994). Anthology of strach granule morphology scanning electron microscopy. *Starch /Atarke* 46 p.p 121-129

Johnson, G. 1975. The procurrent spur: an undescribed perciform caudal character and its phylogenetic implications. *Occ. Pap. Cal. Acad. Sci.* 121: 1-23.

Kendall, A. 1984. Serranidae: Development and Relationships, p. 499-510. *In* H. Moser *et al.* (eds.) Ontogeny and systematics of fishes. American Society Herpetologist & Ichthyologist. Los Angeles, California.

Kirchner, S., Seixas, P., Kaushik, S. and Panserat, S. (2005) Effects of low protein intake on extra-hepatic gluconeogenic enzyme expression and peripheral glucose phosphorylation in RT (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp. Biochem. Physiol. B.* 140, 333-340.

Krasnov A, Teerijoki H, Molsa H (2001) Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatic glucose transporter. *Biochim Biophys Acta* 1520:174–178

Kristofersson D, Anderson JL. Is there a relationship between fisheries and farming? Interdependence of fisheries, animal production and aquaculture. *Marine Policy* 2006; 30: 721-725.

Krogdahl, A, Hemre, DI, Mommsen, TP. (2005) Carbohydrates in fish nutrition: digestión and absorption in postlarval stages. *Aqua. Nut.* 11:103-122.

Legate N.J., A. Bonen, and T.W. Moon (2001). Glucose Tolerance and Peripheral Glucose Utilization in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*), American Eel (*Anguilla rostrata*), and Black Bullhead Catfish (*Ameiurus melas*) *General and Comparative Endocrinology* **122**, 48–59

Lai L. y Kokini (1991). Physicochemical changes and methodological properties of starch during extrusion (a review). *Biotechnology Progress.* 7 (3):251-266

Lehninger A, Nelson DL, Cox M. (1997) “Principles of Biochemistry”, Worth Publishers, 2º edición.

Leipper 1954; Merino, 1992). Marine meteorology of the Gulf of Mexico. J. Geophys Res., 75, 637-657

Leung L. y N. Woo, (2011) Influence of dietary carbohydrate level on endocrine status and hepatic carbohydrate metabolism in the marine fish *Sparus sarba*. Fish Physiology and Biochemistry 38(2):543-554 · June 2012 with 61 Reads Impact Factor: 1.62 · DOI: 10.1007/s10695-011-9534-8 Source: PubMed

Leung, L. y Woo, NYS. (2012) Influence of dietary carbohydrate level on endocrine status and hepatic carbohydrate metabolism in the marine fish *Sparus sarba*. Fish Physiol. Biochem. 38:543-554.

Lin, H. T., Chang C. C. and Tseng, W. Y. (1981). Preliminary study on the compounded feed for *Epinephelus amblycephalus*. Collection of thesis, Department of Aquaculture, National Taiwan College of Marine Science and Technology, Keelung, Taiwan.

Longhurst, A. (Ed.). 1981. Analysis of marine ecosystems. Academic, London. 741 p.

López-Olmeda J.F., Egea-Álvarez M, Sánchez-Vázquez (2009). Glucose tolerance in fish: Is the daily feeding time important? . Physiology & Behavior 96 (2009) 631–636

López-Rocha J.A. y F. Arreguín-Sánchez. (2007). Patrón temporal de movimientos del mero *Epinephelus morio* en la Plataforma Continental del norte de la Península de Yucatán, México. *Proceedings of the 60th Gulf and Caribbean Fisheries Institute*. 60:327-334.

López-Rocha J.A. y F. Arreguín-Sánchez. (2008). Spatial distribution of red grouper *Epinephelus morio* (Serranidae) Catchability on the Campeche Bank of Mexico. *J. Appl. Ichthyol* 24: 282-289.

Mai (1977). Centre National pour l'Exploitation des Oceans, Paris (France) Publ.by: CNEXO, Brest (France). Oct 1977. p. 85-91, (no. 4).

Maitland, P. 1990. *Biology of fresh waters*. Edit. Chapman and Hall, 2a. edic. 276 pp.

Mazeud F. (1973) *Recherches sur la regulation des acides gras libres plasmatiques et de la glycemie chez les poissons*. Ph.D. Thesis, Paris

Mazeud, M., Mazeud F. y E. Donaldson (1997). Primary and Secondary Effects of Stress in Fish: Some New Data with a General Review *Journal: Transactions of the American Fisheries Society* Volume 106, Issue 3, pages 201-21

Mazeud, M., Mazeud F. y E. Donaldson (1997). Primary and Secondary Effects of Stress in Fish: Some New Data with a General Review *Journal: Transactions of the American Fisheries Society* Volume 106, Issue 3, pages 201-21

Mazur, C.N., Higgs, D.A., Plisetskaya, E.M., March, B.E., 1992. Utilization of dietary starch and glucose tolerance in juvenile Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) of different strains in seawater. *Fish Physiol. Biochem.* 10, 303–313.

Méndez, G. y W. Wiesler. 1993. Metabolic responses to food deprivation and refeeding in juveniles of *Rutilus rutilus* (Teleostei: Cyprinidae). *Environ. Biol. Fishes.* 36(1):73-81.

Metón I. (1999) Effect of diet composition and ration size on key enzyme activities of glycolysis-gluconeogenesis, the pentose phosphate pathway and amino acid metabolism in liver of gilthead sea bream (*Sparus auratus*). *British J. Nutr.* 82:223-232.

Metón I, Fernández F, Baanante IV (2003) Short and long term effects of refeeding on key enzyme activities in glycolysis-gluconeogenesis in the liver of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 225:99–107.

Metón I, Fernández F, Baanante IV (2003) Short- and longterm effects of refeeding on key enzyme activities in glycolysis-gluconeogenesis in the liver of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 225:99–107

Metro Manila Shiau, S. Y. and Lan C. W. (1996). Optimal dietary protein level and protein to energy ratio for growth of grouper (*Epinephelus malabaricus*). *Aquaculture* 145: 259-266.

Mithieux, G. (1997). New knowledge regarding glucose-6-phosphatase gene and protein and their roles in the regulation of glucose metabolism. *Eur. J. Endocrinol.* 136, 137–145

Moe, M.A. 1969). Biology of the red grouper *Epinephelus morio* (Valenciennes) from the eastern Gulf of Mexico. Fla. Dep. Nat. Resour. Mar. Res. Lab. Prof. Pap. Ser. 10. 95 pp.

Mommsen, T.P., Plisetskaya, E.M., 1991. Insulin in fish and agnathans: history, structure and metabolic regulation. *Rev. Aquat. Sci.* 4, 225–259.

Moon T., (2001). Glucose intolerance in teleost fish: fact or fiction? Review Comparative Biochemistry and Physiology Part B 129 Ž2001. 243-249.

Morales, A.E., García-Rejón, L., De la Higuera, M., 1990. Influence of handling and/or anaesthesia on stress response in rainbow trout. Effects on liver primary metabolism. Comp. Biochem. Physiol., A 95, 87–93

Moyano FJ, Díaz M, Alarcón F, Sarasquete M (1996) Characterization of digestive enzyme activity during larval development of gilthead seabream (*Sparus aurata*). Fish Physiology Biochemistry 15: 121-130.

Murat J. C., Parent J. P. y Balas D. (1972) Quelques donnues sur l'activite de la glycogene phosphorylase de teleosteens. *J. Physiol., Paris* 65, 458.

Murat J. C., Parent J. P. y Sereaty A. (1973) latude del'activite de la glycogenephosphorylase de la carpe. *Experientia* 29, 36.

Nagayama F, Ohshima H, Takeushi T (1973) Activities of hexokinase and glucose dehydrogenase in fish liver. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 39:1349.

Nagayama F. and Oshima H. (1974) Studies on the enzyme system of carbohydrates metabolism in fish.1. Properties of liver hexokinase. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 40:285-290.

Nakai T., Si-iiba T.y Saito T. (1970) Seasonal variations in the metabolic activities of tissue constituents of some fishes. III. On the activity of energy metabolizing enzymes in the muscle and liver of kokanee salmon. *Bull. Fac. Fish. Hokkaido Univ.* 21,234-239.

Nwayttna, L., Einsereich, R. y Schiwarz, F. (2007). Effect of wet-incubation of dietary plant feedstuffs with phytases on growth and mineral digestibility by common carp (*Cyprinus carpio* L), I:10 10 16/j Aquaculture 2007.04.020.

Nelson D. y Cox M. (2009). Lenhinger Principles of biochemistry. 5ª edición. Edit. Limusa.
Newsholme E. A. y Crabtree B. (1970) The role of fructose-1-6-diphosphatase in the regulation of glycolysis in skeletal muscle. *FEBS Lett.* 7, 195-198.

Newsholme E. A. y Start C. (1973) *Regulation in Metabolism*. 349pp. Wiley, New York. 3:411 p.

Novoa M., Capilla E., Rojas P. Baró J, Gutierrz J, Navarro I, (2004) Glucagon and insulin response to dietary carbohydrate in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Gen Comp Endocrinol.* 2004 Oct;139 (1):48-54

Palmert T. N. y Ryan B. E. (1972) Studies on oral glucose intolerance in fish. *J. Fish. Biol.* 4, 311-319

Panserat S., Médale, F., Blin, C., Brèque, J., Vachot, C., Plagnes-Juan, E., Gomes, E., Krishnamoorthy, R., Kaushik, S., (2000). Hepatic glucokinase is induced by dietary carbohydrates in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), gilthead seabream (*Sparus aurata*), and common carp (*Cyprinus carpio*), *American Journal Physiology* 278:1164-1170.

Panserat, S., Médale, F., Blin, C. *et al.*, (2000). Hepatic glucokinase is induced by dietary carbohydrates in rainbow trout, gilthead seabream and common carp. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 278, R1164-R1170.

Panserat, S., M'edale, F., Br'eque, J., Plagnes-Juan, E., Kaushik, S., (2000). Lack of significant long-term effect of dietary carbohydrates on glucose-6-phosphatase expression in liver of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*... J. Nutr. Biochem. 11, 22-29.

Panserat, S., Plagnes-Juan, E., Kaushik, S. (2001) Nutritional regulation and tissue specificity of gene expression for proteins involved in hepatic glucose metabolism in RT (*Oncorhynchus mykiss*). J. Exp. Biol. 204, 2351-2360.

Panserat, S., Plagnes-Juan, E., Kaushik, S., (2002) Gluconeogenic enzyme gene expression is decreased by dietary carbohydrates in common carp (*Cyprinus carpio*) and gilthead seabream (*Sparus aurata*). BBA-Gene Struct. Expr. 1579, 35-42.

Papatryphon E., E., Capilla, I. Navarro and JH. Soares Jr. (2001). Early insulin and glucagon response associated with food intake in a teleost, the striped bass (*Morone saxatilis*). Fish Physiology and Biochemistry 24(1):31-39

Papoutsoglou y Lyndon (2006) Digestive enzymes of *Anarhichas minor* and the effect of diet composition on their performance. Journal of Fish Biology (2006) 69, 446-460.

Parrizas, M., Planas, J., Plisetskaya, E. M. and Gutierrez, J. (1994). Insulin binding and receptor tyrosine kinase activity in skeletal muscle of carnivorous and omnivorous fish. *Am. J. Physiol.* **266**, R1944-R1950.

Peres H. and Gonclaves (1999). Glucose tolerance in gilthead seabream *Sparus aurata* and European seabass, *Dicentrarchus labrax* Aquaculture.179. 415-426.

Peres, H., Oliva-Teles, A., (2002) Utilization of raw and gelatinized starch by European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. Aquaculture 205, 287-299.

Perez. E., Lares, M., y Gonzalez, Z.M(1997) . Characterization of Storch isolet from White and dark sorghum.

Pfeffer, E., Beckmann-Toussaint, J., Henrichfreise, B., Jansen, H.D., (1991). Effect of extrusion on efficiency of utilization of maize starch by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture 96, 293–303. Pilkis S, Granner DK (1992) Molecular physiology of the regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis. Annu Rev Physiol 54:885–909.

Polakof, S., Skiba-Cassy, S. and Panserat, S. (2009). Glucose homeostasis is impaired by a paradoxical interaction between metformin and insulin in carnivorous rainbow trout. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 297, 1769-1776.

Polakof S, Mommsen TP, and Soengas J. (2011) Glucosensing and glucose homeostasis: From fish to mammals. Comparative Biochemistry and Physiology - Part B: Biochemistry & Molecular Biology 2011; 160: 123-149.

Polakof, S., Skiba-Cassy, S., Kaushik, S., Seilez, I. *et al.* (2012) Glucose and lipid metabolism in the pancreas of RT is regulated at the molecular level by nutritional status and carbohydrate intake. Comp. Biochem. Physiol. B 182:507-516.

Polakok S. y S.Panserat (2015). How Tom Moon's research highlighted the question of glucose tolerance in carnivorous fish Comparative Biochemistry and Physiology, Part B .

Printz RL, Magnuson MA, Granner DK (1993). Mammalian glucokinase. Annu Rev Nutr 13:463–496.

Prosser L., 1978. Comparative Animal Physiology. Edit. Saunders College Publishing, 3a.edic. 966 pp.

Robyt, J. F. y W. J. Whelan. (1972). Reducing value methods for maltodextrins: I. Chain-length dependence of alkaline 3,5-dinitrosalicylate and chain-length independence of alkaline copper. *Anal. Biochem.* 45: 510-516.

Robles Gutiérrez, C. G. (2014). Caracterización del almidón de yuca fosfatado por medio de extrusión termoplástica para su uso en la encapsulación de D-Limoneno" (Doctoral dissertation).

Sà, L.R., Ferreira P.O. and Oliva-Teles A. (2008) Effect of dietary starch source (normal vs waxy) and protein levels on the performance of white seabream *Diplodus sargus* (Linnaeus) juveniles *Aquaculture Research*, 39, 1069-1076.

Sadovy Y. (2000). Regional survey for fry/fingerlings supply and current practices for grouper mariculture: evaluating current status and long-term prospects for grouper mariculture in South East Asia. En: S. Pierre, S. Gaillard, N. Prévot-D'Alvise, J. Aubert, O. Rostaing-Capaillon, D. Leung-Tack y J. Grillasca. (Eds.) *Grouper aquaculture: Asian success and Mediterranean trials. Aquatic Conservation: Marine and freshwater ecosystems*, 18:297-308.

Sánchez-riviera, m. M., García Suárez, Partial characterization of banana starches oxidized by different levels of sodium hypochlorite. *Carbohydrate polymers* 62:50-56.

Shiau, S.Y. and Lan C.W. (1996) Optimal dietary protein level and protein to energy ratio for growth of grouper (*Epinephelus malabaricus*). *Aquaculture* 145: 259-266.

Shimano H, Horton JD, Hammer RE, Shimomura I, Brown MS, Goldstein JL. (1996). Overproduction of cholesterol and fatty acids causes massive liver enlargement in transgenic mice expressing truncated SREBP-1a. *J Clin Invest.* 1996;98:1575–1584

Shimeno, S., Ming, D.C., Takeda, M., (1993) Metabolic response to dietary carbohydrate to lipid ratios in *Oreochromis niloticus*. Nippon Suisan Gakkaishi 59, 827–833.

Shimeno, S., Hosokawa, H., Takeda, M., (1996) Metabolic response of juvenile yellowtail to dietary carbohydrate to lipid ratios. Fish. Sci. 62, 945–949.

Singh, N., Singh, J., Kaur, L., Sodhi, N. S., y Gill, B. S. (2003). Morphological, thermal and rheological properties of starches from different botanical sources". Food Chemistry 81, 219-231

Silva A., Santiago L., Guerrero, Cuzón y Gaxiola, (2011) Digestibilidad aparente de ingredientes de origen animal y vegetal en juveniles silvestres de *Epinephelus morio* pág 64. Ed E. Cruz., D. Ricque., M Tapia, MG Nieto., DA. Villarreal, C.J, Gamboa. y L Hernández. Av. Nutr Acuicola Mem XI Simp Intl Acuicola. 23-25 nov 2011, San Nicolás de los Garza, NL, México. UANL, Monterrey, NL, México. p 125.

Silva A.F., Escalante K., Alvarez-González C.A, Guerrero-1 Olazarán, M4., Cuzon G. and Gaxiola G (2014). Testing Protein Digestibility in Red Grouper 11 *Epinephelus Morio* using *In Vitro* and *In Vivo* Methods. *The Israeli Journal of Aquaculture - Bamidgeh, IJA_66.2014.1069, 10 p.*

Smith, P.E. and S.L. Richardson. 1979. Standard techniques for pelagic fishes eggs and larvae surveys. FAO Fisheries Technical Papers 175. (Chullarsoon y Martosubroto, 1986).

Spannhof, J and Plantikow, H. (1983) Studies on carbohydrate digestion in RT. Aquaculture 30:95-108.

Spannhof, L., Plantikow, H., (1983). Studies on carbohydrate digestion in rainbow trout. *Aquaculture* 30, 95–108.

Srichuwong y Mishina., (2005). Starches from different botanical sources I: Contribution of amilopectina fine structure to thermal properties and enzyme digestibility. *Carbohydrats polymers*. 69:529-538.

Srichuwong, y Jane (2007). Physicochemical properties of Storch affected by molecular composition and structures: a review- *Food Science and Biotechnology*. 16: 234

Stone DAJ (2003) Dietary carbohydrate utilization by fish. *RevFish Sci* 11:337–369.

Sundby, A., Hemre, G.I., Borrebaek, B., Christophersen, B., Blom, A.K., (1991). Insulin and glucagon family peptides in relation to activities of hepatic hexokinase and other enzymes in fed and starved Atlantic salmon (*Salmo salar*) and cod (*Gadus morhua*). *Comp. Biochem. Physiol.* 100B, 467– 470.

Tacon AGJ, Metian M. (2008) Global overview on the use of fishmeal and fish oil in industrially compounded aqua feeds: Trends and future prospects. *Aquaculture* 2008; 285:146-158.

Tarr H. L. A. (1972) Enzymes and systems of intermediary metabolism. In *Fish Nutrition* (Edited by HAt, VER J. E.), pp. 255 326. Academic DEMAi~L A. (1978) Quelques particularities du metabolism glucidique des poissons. *Oceanis* 4, 353-365.

Tester y Debon S J.J. (2000).Annealling of starch a review *Int. J. Biological Macromol* 27: 1-12.

Thompson, R. y J.L. Munro 1978. Aspects of the biology and ecology of Caribbean reef fishes: Serranidae (hinds and groupers). *Journal of Fish Biology*, 12:115-146. *Fisericie*.

Tovar B. T. (2008), Caracterización morfológica y térmica del almidón de maíz (*Zea mays* L.) Obtenido por diferentes métodos de aislamiento. Tesis de Lic. en química de alimentos. Universidad Autónoma de Edo. Hidalgo. 25 29 p.

Tranulis MA, Dregni O, Christophersen B, Krogdahl A, Borrebaek B (1996) A glucokinase-like enzyme in the liver of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Comp Biochem Physiol* 114B:35–39.

Tung, PH. and Shiau, SY. (1993) Carbohydrate utilization vs body size in Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Comp. Biochem. Physiol. A* 104, 3:585-588.

Van Schaftingen, E. (1994) Short-term regulation of glucokinase. *Diabetologia* 37:S43-S47.

Viegas I, Rito J, Jarak I, Leston S, Carvalho RA, Metón I, Pardal MA, Baanante IV, Jones JG. (2012) Hepatic glycogen synthesis in farmed European seabass (*Dicentrarchus labrax* L.) is dominated by indirect pathway fluxes. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology*; 163: 22-29.

Viegas I., Albuquerque R., Carvalho, M.A. Pardal y J. G. Jones (2012). Advances and Applications of Tracer Measurements of Carbohydrate Metabolism in Fish. *Veterinary Medicine and Science*. DOI: 10.5772/54053

Viegas, I., Rito, J., Jarak I., Leston, S., Caballero-Solares A., Meton, I., Pardal M., Baanante, I., and Jones, J. (2015) Contribution of dietary starch to hepatic and systemic carbohydrate fluxes in European seabass (*Dicentrarchus labrax* L.). *British Journal of Nutrition* 113: 1345-1354.

Vionnet, N., Stoffel, M., Takeda, J., Yasuda, K., Bell, G. I., Zouali, H., Lesage, S., Velho, G., Iris, F., Passa, P., Froguel, P., Cohen, D. (1992). Nonsense mutation in the glucokinase gene causes early-onset non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Nature, Lond.* 356: 721–722.

Walton M. y Cowey C., (1981). Distribution and some kinetic properties of serine catabolizing enzymes in rainbow trout *Salmo gairdneri*. *Comp. Biochem. Physiol.* 68B:147-150

Walton, M.J., Cowey, C.B., (1982) Aspects of intermediary metabolism in salmonid fish. *Comp. Biochem. Physiol.* B 73: 59–79.

Wilson, (1994) R.P. Wilson, Utilization of dietary carbohydrate by fish, *Aquaculture* 124 (1994), pp.67.80.

Wilson JE. (2003). Isozymes of mammalian hexokinase: structure, subcellular localization and metabolic function. *J Exp Biol*; 206:2049–2057

Wood, CM, McDonald, DG, McMahon, BR. (1982) The influence of experimental anemia on blood acid-base regulation *in vivo* and *in vitro* in the starry flounder (*Platichthys stellatus*) and RT (*Salmo gairdneri*). *J Exp Biol.* 96: 221-237.

Wright, J. R., O'Hali, W., Yuang, H., Han, X. and Bonen, A. (1998). Glut4 deficiency and severe peripheral resistance to insulin in the teleost fish tilapia. *Gen. Comp. Endocrinol.* 111,20–27.

Zar, J. H. (1996). *Biostatistical analysis*. Third edition. Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey, USA.

