



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

EFFECTO DEL USO DE ADITIVOS ALIMENTARIOS
FUNCIONALES EN PECES DE IMPORTANCIA COMERCIAL
(*Seriola rivoliana*, *Argyrosomus regius*, *Atractosteus
tropicus*).

T E S I S

Que para obtener el grado de

Doctor en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales
(Orientación en Acuicultura)

P r e s e n t a

Gloria Gertrudys Asencio Alcudia

La Paz, Baja California Sur, septiembre de 2021.

ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 17 horas del día 24 del Mes de agosto del 2021, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

"Efecto del uso de aditivos alimentarios funcionales en peces de importancia comercial (*Seriola rivoliana*, *Argyrosomus regius*, *Atractosteus tropicus*)"

Presentada por el alumno:


Gloria Gertrudys Asencio Alcudia

Aspirante al Grado de DOCTOR EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACIÓN DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACIÓN EN Acuicultura

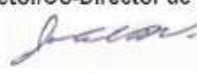
Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

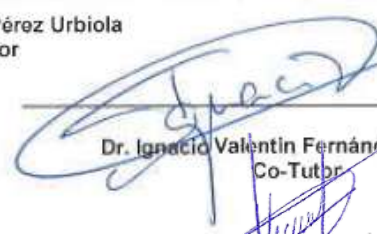

Dr. Dariel Tovar Ramirez
Director/Co-Director de Tesis

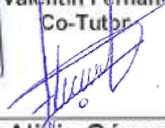

Dr. Carlos Alfonso Alvarez González
Co-Director/Co-Tutor

Enric Gisbert Casas - DNI 38510392C (SIG)
Signat digitalment per Enric Gisbert Casas - DNI 38510392C (SIG)
Data: 2021.08.26 10:25:42 +0200


Dr. Juan Carlos Pérez Urbiola
Co-Tutor

Dr. Enric Gisbert Casas
Co-Tutor


Dr. Ignacio Valentin Fernández Monzón
Co-Tutor


Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro,
Directora de Estudios de Posgrado y
Formación de Recursos Humanos

La Paz, Baja California Sur, a 25 de agosto de 2021.

Los miembros del comité de tesis del (la) estudiante Gloria Gertrudys Asencio Alcudia del Programa de Doctorado en Ciencias en el Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales, revisamos el contenido de la tesis y otorgamos el Vo.Bo. dado que la tesis no representa un plagio de otro documento como lo muestra el reporte de similitud realizado:

- Herramienta antiplagio:
iThenticate
- Filtros utilizados:
Por default
- Porcentajes de similitud:
Máximo 20% para tesis Posgrado
Se muestra captura de pantalla



Otras coincidencias		10%
Biografía estudiantil		
Resumen de Coincidencias		
1	Internet 171 palabras hd1.hardcore.net	1%
2	Internet 171 palabras Copiado el 01-Ene-2021 doaj.org	1%
3	Internet 114 palabras Copiado el 27-Feb-2021 itocplayvr.es	1%
4	Internet 88 palabras Copiado el 11-Nov-2020 dactil.net	<1%
5	Internet 82 palabras Copiado el 21-May-2021 dspace.cibnor.mx/6980	<1%
6	Internet 74 palabras Copiado el 23-Jul-2021 www.diasdeloscomis.blogspot.com	<1%
7	Internet 71 palabras Copiado el 12-Nov-2020 k3oc.pub	<1%
8	Internet 60 palabras Copiado el 25-Oct-2018 www.tesis2.udrpa.br:8080	<1%

Firmas del comité



Dr. Dariel Tovar Ramírez



Dr. Carlos Alfonso Alvarez González



Dr. Juan Carlos Pérez Urbiola



Dr. Ignacio Valentín Fernández Monzón



Dr. Enric Gisbert Casas

Conformación de Comités

Comité Tutorial

Dr. Dariel Tovar Ramírez
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C.
Co-Director de Tesis

Dr. Carlos Alfonso Alvarez González
Universidad Juárez Autónoma De Tabasco
Co-Director de Tesis

Dr. Juan Carlos Pérez Urbiola
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C.
Co-Tutor de Tesis

Dr. Ignacio Valentín Fernández Monzón
Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León
Co-Tutor de Tesis

Dr. Enric Gisbert Casas
Instituto de Investigación y Tecnología Agroalimentaria
Co-Tutor de Tesis

Comité Revisor de Tesis

Dr. Dariel Tovar Ramírez
Dr. Carlos Alfonso Alvarez González
Dr. Juan Carlos Pérez Urbiola
Dr. Ignacio Valentín Fernández Monzón
Dr. Enric Gisbert Casas

Jurado de Examen

Dr. Dariel Tovar Ramírez
Dr. Carlos Alfonso Alvarez González
Dr. Juan Carlos Pérez Urbiola
Dr. Ignacio Valentín Fernández Monzón
Dr. Enric Gisbert Casas

Suplentes

Dra. Laura Teresa Guzmán Villanueva
Dra. Minerva Concepción Maldonado García

Resumen

El desarrollo del cultivo de peces se ha visto mejorado gracias a los estudios el uso de aditivos alimentarios funcionales para estimular la capacidad antioxidante, activar los mecanismos de defensa, mejorar las funciones metabólicas y optimizar los procesos fisiológicos ante los riesgos que conllevan el manejo (estrés), lo que permitirá incrementar el crecimiento y supervivencia de los peces a fin de obtener una mejor producción acuícola y garantizar el bienestar de los organismos. Por esta razón, en este estudio doctoral, se evaluó la adición de triptófano en corvina (*Argyrosomus regius*) y pejelagarto (*Atractosteus tropicus*), así como la adición de vitamina E en el jurel (*Seriola rivoliana*) para ver el efecto de estos aditivos funcionales sobre el crecimiento, estado fisiológico, estrés oxidativo y cambios en la expresión de diversas molecular relacionadas con el sistema inmune. El primer estudio se realizó con juveniles de *S. rivoliana*, donde se evaluó la inclusión de 500 mg/kg de α -tocoferol y su efecto antioxidante y a nivel histológico; donde se obtuvo una mayor actividad enzimática antioxidante de Superóxido dismutasa y Glutación peroxidasa en hígado, así como un menor porcentaje de área de cobertura de melanomacrófagos en órganos linfoides en el tratamiento adicionado con α -tocoferol, lo que demuestra una posible mejor respuesta al estrés en condiciones estándar de cultivo. Por otro lado, se analizó el efecto del triptófano (Trp) al 0 y 1% adicionado al alimento comercial en juveniles de *A. regius* sometidos a pruebas de estrés por confinamiento y simulación de captura. Los resultados indican que los peces alimentados con una suplementación del 1% de Trp mostraron sobreexpresión de múltiples genes asociados al sistema inmune en el intestino, lo que afecta principalmente los mecanismos fisiológicos como la regulación del eje hipotálamo-hipófisis-interrenal y tiroideo, por lo que la suplementación con Trp mejora la resistencia al estrés y mitiga la respuesta aguda al estrés por manejo. Finalmente, se evaluó la suplementación con Trp (0, 0.25, 0.50, 0.75 y 1.25%) en juveniles de pejelagarto (*Atractosteus tropicus*) durante un periodo de 45 días de alimentación, para después ser sometidos a estrés por simulación de transporte y shock térmico. Los resultados mostraron una tendencia de mayor crecimiento para los peces alimentados con la dieta suplementada con 1.25% Trp. Es importante enfatizar los beneficios que tiene el uso de aditivos funcionales como el α -tocoferol y el triptófano en los alimentos balanceados para peces de interés comercial, lo que se ve reflejado en una mejora del sistema inmune, capacidad antioxidante y resistencia al manejo.

Palabras clave: Aditivos funcionales, resistencia al estrés, α -tocoferol, triptófano.

ORCID: 0000-0002-7302-659X

Vo.Bo.



Dr. Dariel Tovar Ramírez
Co-Director de Tesis



Dr. Carlos Alfonso Alvarez González
Co-Director de Tesis

Summary

The development of fish farming has been improved thanks to studies on the use of functional food additives to stimulate antioxidant capacity, activate defense mechanisms, improve metabolic functions, and optimize physiological processes in the face of handling risks (stress), which will increase the growth and survival of fish to obtain better aquaculture production and guarantee the well-being of the organisms. For this reason, in this doctoral study, the addition of tryptophan in meagre (*Argyrosomus regius*) and tropical gar (*Atractosteus tropicus*) was evaluated, as well as the addition of vitamin E in longfin yellowtail (*Seriola rivoliana*) to see the effect of these functional additives on growth, physiological state, oxidative stress and changes in the expression of different molecules related to the immune system. The first study was carried out with *S. rivoliana* juveniles, where the inclusion of 500 mg/kg of α -tocopherol and its antioxidant and histological effect were evaluated; where a higher antioxidant enzymatic activity of Superoxide dismutase and Glutathione peroxidase in liver was obtained, as well as a lower percentage of melanomacrophage coverage area in lymphoid organs in the treatment added with α -tocopherol, which shows a possible better response to stress in standard culture conditions. On the other hand, the effect of tryptophan (Trp) at 0 and 1% added to commercial feed was analyzed in *A. regius* juvenile subjected to confinement stress tests and capture simulation. The results indicate that fish fed 1% Trp supplementation showed overexpression of multiple genes associated with the immune system in the intestine, which mainly affects physiological mechanisms such as the regulation of the hypothalamic-pituitary-pituitary-renal and thyroid axis, so that Trp supplementation improves stress resistance and mitigates the acute response to handling stress. Finally, Trp supplementation (0, 0.25, 0.25, 0.50, 0.75 and 1.25%) was evaluated in *A. tropicus* juvenile during a 45-day feeding period, and then subjected to simulated transport stress and heat shock. The results showed a trend of higher growth for fish fed the diet supplemented with 1.25% Trp. It is important to emphasize the benefits of the use of functional additives such as α -tocopherol and tryptophan in balanced feeds for fish of commercial interest, which is reflected in an improvement of the immune system, antioxidant capacity and resistance to handling.

Keywords: Functional additives, stress resistance, α -tocopherol, tryptophan.

ORCID: 0000-0002-7302-659X

Vo.Bo

Dr. Dariel Tovar Ramírez
Co-Director de Tesis

Dr. Carlos Alfonso Alvarez González
Co-Director de Tesis

Dedicatoria

A mi tierno y amado hijo Ponchito, por ser mi alegría y contagiarme con su bella sonrisa las ganas de vivir y luchar.

A mi hermoso, amado y admirado esposo Alfonso, sin su amor, confianza y apoyo, esto no sería posible, gracias por siempre contagiarme con tu positivismo y mejorar mi vida con sólo ver tu sonrisa.

A mi mami, papi y tía Nury, a mis hermanos Ili, Mi neni, Tere, Gely y Pepe que me ayudaron siempre con palabras de aliento, apoyo y sobre todo sus locuras para bajar la neura.

A mi familia adoptiva, abí, abo, yel, peque, oso, Mimis, Quique e Ian, agradezco a Dios por ponerlos en mi vida y les agradezco a ustedes por hacerme sentir cobijada, querida, por siempre ser tan positivos y apoyarme en todo.

A mis lindos peludos Cachi y Kalón por desvelarse conmigo y hacerme compañía en las noches de desvelo.

A la fuerza de todas las personas que atraviesan enfermedades depresivas y de autoestima, siempre es una lucha constante, pero rodarse de la energía positiva de familiares y amigos hace que la vida siga rodando con conciencia.

Agradecimientos

Agradezco al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. junto con su personal docente, técnico y administrativo por todo su apoyo para la realización de este trabajo.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada 571169, así como también por la beca mixta para mi estancia de investigación.

Agradezco al proyecto de Ciencia Básica 282765 por el financiamiento parcial para conducir estos estudios.

Agradezco al proyecto DIETAPlus de la Junta Nacional Asesora de Cultivos Marinos (JACUMAR) del Gobierno Español, cofinanciado con el Fondo Europeo Marítimo y de Pesca (FEMP) por la financiación de uno de los trabajos realizados en este doctorado.

Agradezco infinitamente a mi Co-Director de Tesis, el Dr. Dariel Tovar Ramírez, por el invaluable conocimiento compartido conmigo, por su enorme paciencia y por siempre ayudarme y confiar en mí y en mi trabajo, pero sobre todo, por el bello ser humano que es y por la paz que siempre transmite y el increíble investigador que admiro y espero llegar a poder ser aunque solo sea un poquitín como él. De igual manera, agradezco enormemente a Almita, por abrirnos las puertas de su hogar a mi hijo y a mí y sobre todo por la hermosa amistad que construimos.

Agradezco al Dr. Carlos Alfonso Alvarez González, por el financiamiento de las investigaciones y sobre todo por el conocimiento y ayuda que me brindó, siempre cuidando los límites, por la confianza en mí y por ser siempre positivo ante las adversidades.

Agradezco infinitamente a mi Comité Tutorial conformado por el Dr. Juan Carlos Pérez Urbiola, el Dr. Enric Gisbert Casas y el Dr. Ignacio Fernández, por todo el conocimiento, correcciones, consejos que me brindaron en pro de formarme como una futura investigadora, por enseñarme a siempre ver más allá de los resultados visibles. Por sus grandes cualidades como seres humanos y por el tiempo y confianza que invirtieron en mí.

Agradezco al personal técnico del CIBNOR S.C., especialmente a la Bióloga Patricia Hinojosa, a la Dra. Martha Reyes Becerril, a María Eulalia Meza Chávez, al M.C. Marcos Quiñones, al Dr. Ernesto Goytortua, al Biól. Pablo Ormart, a Delfino Barajas, a la M.C. Roxana Inohuye y a Jorge Sandoval, por todo su apoyo para la realización de los bioensayos y análisis en el laboratorio, al personal de la subcoordinación de ingeniería, por ayudarme a realizar las piezas que necesité para el diseño de circulación de agua de mis peces y por las reparaciones a los equipos que lo necesitaron, por estar siempre dispuestos a ayudarme.

Agradezco a la Dra. Gracia Gómez Anduro por sus palabras de aliento que nunca faltaron y a su gestión para que esto pudiera llevarse a cabo, a Tania Núñez Valdez, Lic. Osvelia Ibarra, Lic. Leticia González y al Ing. Horacio Sandoval Gómez por toda la ayuda y orientación que me dieron al llevar a cabo los procesos del posgrado y por estar siempre dispuestos a facilitar los trámites.

Agradezco a mis grandes amigos quienes me ayudaron en este camino del doctorado compartiendo sus conocimientos y su tiempo durante el CIB: Andressa, Joan, Isabel, Marce, Fuen, Angel, Asahel, Roberto, Tomás, Javier.

Agradezco a mis amigos de la UJAT por el apoyo también durante los bioensayos: Karen, Emyr, Claudia, Lalo, César y Graci por su ánimo y buenas vibras compartidas.

Contenido

Resumen	i
Summary	ii
Dedicatoria	iii
Agradecimientos	iv
Contenido	vi
Lista de figuras	viii
Lista de tablas	xi
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Cultivo de especies de importancia comercial y regional	3
1.1.1 <i>Jurel</i> , <i>Seriola rivoliana</i>	4
1.1.2 <i>Corvina</i> , <i>Argyrosomus regius</i>	5
1.1.3 <i>Pejelagarto</i> , <i>Atractosteus tropicus</i>	6
1.2 Aditivos alimentarios	8
1.3 Uso de aditivos alimentarios funcionales	8
2. ANTECEDENTES	10
2.1 Vitaminas	10
2.1.1 Vitaminas hidrosolubles	10
2.1.2 Vitaminas liposolubles	10
2.1.3 La vitamina E (<i>α-tocoferol</i>)	11
2.2 Aminoácidos	12
2.2.1 Triptófano	12
2.3 Sistema inmune	13
2.4 Sistema antioxidante	15
2.5 Pruebas de estrés	16
3. JUSTIFICACIÓN	19
4. HIPÓTESIS	20
5. OBJETIVOS	21
5.1 Objetivo general	21
5.2 Objetivos particulares	21
6. MATERIALES Y MÉTODOS	22
6.1 Bioensayo 1.- The antioxidant effect and stress-protective role of <i>α-tocopherol</i> supplementation in compound diet on lymphoid tissues of longfin yellowtail (<i>Seriola rivoliana</i>) juveniles	22
6.1.1 Medidas de crianza, muestreo y crecimiento	22
6.1.2 Evaluación y muestreo de crecimiento	23
6.1.3 Análisis histológicos	23
6.1.4 Actividades enzimáticas antioxidantes	24
6.1.5 Análisis estadístico	24
6.2 Bioensayo 2.- Stressors Due to Handling Impair Gut Immunity in Meagre (<i>Argyrosomus regius</i>): The Compensatory Role of Dietary L-Tryptophan	24
6.2.1 Mantenimiento de peces y dietas experimentales	24
6.2.2 Diseño experimental	25
6.2.3 Extracción de ARN total y síntesis de cDNA	25
6.2.4 qPCR en tiempo real	26

6.2.5 Análisis estadístico	26
6.3 Bioensayo 3.- L-Tryptophan immune modulation in tropical gar (<i>Atractosteus tropicus</i>) under stress by thermal shock and mimic transport to hatcheries.....	27
6.3.1 Obtención de la muestra.....	27
6.3.2 Preparación de alimentos	27
6.3.3 Pruebas de estrés.....	29
6.3.4 Análisis estadísticos.....	30
7. RESULTADOS	31
7.1 Bioensayo 1.- The antioxidant effect and stress-protective role of α -tocopherol supplementation in compound diet on lymphoid tissues of longfin yellowtail (<i>Seriola rivoliana</i>) juveniles	31
7.2 Bioensayo 2.- Stressors Due to Handling Impair Gut Immunity in Meagre (<i>Argyrosomus regius</i>): The Compensatory Role of Dietary L-Tryptophan	35
7.3 Bioensayo 3.- L-Tryptophan immune modulation in tropical gar (<i>Atractosteus tropicus</i>) under stress by thermal shock and mimic transport to hatcheries.....	42
8. DISCUSIÓN	44
8.1 Bioensayo 1.- The antioxidant effect and stress-protective role of α -tocopherol supplementation in compound diet on lymphoid tissues of longfin yellowtail (<i>Seriola rivoliana</i>) juveniles	44
8.2 Bioensayo 2.- Stressors Due to Handling Impair Gut Immunity in Meagre (<i>Argyrosomus regius</i>): The Compensatory Role of Dietary L-Tryptophan	46
8.3 Bioensayo 3.- L-Tryptophan immune modulation in tropical gar (<i>Atractosteus tropicus</i>) under stress by thermal shock and mimic transport to hatcheries.....	51
8.4 Discusión general	51
9. CONCLUSIONES	54
9.1 Perspectivas de futura investigación	54
10. LITERATURA CITADA	55
11. ANEXOS	69
Anexo A: Artículo Publicado.-Stressors Due to Handling Impair Gut Immunity in Meagre (<i>Argyrosomus regius</i>): The Compensatory Role of Dietary L-Tryptophan.....	69
Anexo B: Artículo Sometido.-The antioxidant effect and stress-protective role of α -tocopherol supplementation in compound diet on lymphoid tissues of longfin yellowtail (<i>Seriola rivoliana</i>) juveniles.	83

Lista de figuras

Figura 1. Producción mundial de acuicultura y pesca (FAO, 2020).	1
Figura 2. Contribución mundial regional de pesca y producción acuícola (FAO, 2020).	2
Figura 3. Contribución de la producción acuícola en la producción de organismos acuáticos en distintas regiones del mundo (FAO, 2020).	3
Figura 4. Distribución global de producción de <i>Seriola</i> spp. Fuente FAO 2014. Producción de pesca y acuicultura. Periodo 1950-2012 (Fishstat). Estimado por Miller <i>et al</i> 2011.	4
Figura 5. Juvenil de Jurel, <i>Seriola rivoliana</i> . Asencio-Alcudia, 2021.	4
Figura 6. Distribución de <i>Seriola rivoliana</i> ((AquaMaps, 2019) (Fishbase, 2021)).	5
Figura 7. Corvina <i>Argyrosomus regius</i> (Fishbase, 2021).	5
Figura 8. Distribución de la corvina <i>A. regius</i> (AquaMaps, Fishbase, 2021).	6
Figura 9. Pejelagarto <i>Atractosteus tropicus</i>	7
Figura 10. Distribución pejelagarto <i>Atractosteus tropicus</i> (Fishbase, 2021).	7
Figura 11. Estructura molecular del tocoferol (Etsuo y Kouichi, 2019).	11
Figura 12. Estructura molecular del aminoácido triptófano (PubChem, 2021).	12
Figura 13. Función sincronizada de enzimas antioxidantes SOD, CAT y GPx. (Sáez <i>et al.</i> , 2015)..	16
Figura 14. Diagrama general de la respuesta al estrés en teleosteos (Wendelaar-Bonga., 1997).	17
Figura 15. Sistema de respuesta al estrés en peces (Animal welfare in modern production systems for fish, 2021).	18
Figura 16. Técnica de estrés por shock térmico en juveniles de pejelagarto <i>Atractosteus tropicus</i>	29
Figura 17. Exposición a estrés simulando el transporte en juveniles de pejelagarto <i>Atractosteus tropicus</i>	29
Figura 18. Crecimiento final del jurel alimentado con dos dietas experimentales diferentes durante 50 días de prueba. Parámetros expresados por Peso (gr), Longitud (cm) y Factor de condición (K). Los valores (n = 3 por tratamiento dietético) se expresan como media \pm desviación estándar (p<0.05).	31
Figura 19. Porcentaje de área de cobertura de melanomacrófagos de riñón de cefálico (HK-MMC) y porcentaje de área de cobertura de melanomacrófagos de bazo (Bazo-MMC) en el grupo de control y complementado con 500 mg / kg de tratamiento con α -tocoferol. Los valores (n = 3 por tratamiento dietético) se expresan como media \pm desviación estándar. Los asteriscos muestran diferencias estadísticas entre tratamientos (p < 0.05).	32
Figura 20. Características de los melanomacrófagos con tinción H&E de <i>Seriola rivoliana</i> en: a) Riñón cefálico del grupo Control. b) Riñón cefálico de pez alimentado con dieta suplementada (500 mg / Kg de α -tocoferol). c) Bazo del grupo Control. d) Bazo de peces alimentados con dieta suplementada (500 mg / kg de α -tocoferol). Aumento de 40 \times flechas indican MMC.	33
Figura 21. SOD: actividad superóxido dismutasa (U mg proteína ⁻¹), GPx: actividad glutatión peroxidasa (U mg proteína ⁻¹) y CAT: actividad catalasa (nmol mg proteína ⁻¹). Los valores (n = 3 por tratamiento dietético) se expresan como mediana \pm rango intercuartil. Los asteriscos muestran diferencias estadísticas entre tratamientos (p < 0.05).	34
Figura 22. Niveles de expresión génica en tejido linfóide asociado al intestino (GALT) después de la exposición al aire como factor estresante 1 y 6 h después del estrés. qPCR cuantitativa de marcadores específicos de ARNm de procesos de respuesta inmune innata (proteína del complemento <i>c3</i> , <i>lisozima</i> , <i>cox2</i> , <i>mxp</i> , <i>piscidina</i> , <i>defensina</i> y <i>hepcidina</i>), citocinas inmunes (<i>ifn</i> ,	

il-1b, *tnf1a* e *il-10*) y *gapdh*, normalizados con factor de elongación 1α e hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa (n = 6 por grupo experimental). Asterisco muestra diferencias entre las muestras de control sin estrés (peces en reposo) y las muestras de control después de 1 h de prueba de estrés de exposición al aire sin suplementación de Trp al 1% (Análisis REST), mientras que letras diferentes denotan diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales (ANOVA dos vías). C, alimentación de control; T, alimentación de Trp al 1%; A, factor estresante de la exposición al aire; 1H / 6H, 1/6 h post-estrés.36

Figura 23. Visualización de la expresión génica del tejido linfoide asociado al intestino (GALT) después de la exposición al aire como factor estresante 1 y 6 h después del estrés por medio de análisis de superficie de respuesta. qPCR de marcadores de ARNm específicos de procesos de respuesta inmune innata (proteína del complemento *c3*, lisozima, *cox2*, *mxp*, piscidina, defensina y hepcidina), citocinas inmunes (*ifn*, *il-1b*, *tnf1a* e *il-10*) y *gapdh*, normalizadas con factor de elongación 1α e hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa (n = 6 por grupo experimental). El asterisco muestra diferencias entre las muestras de control sin estrés (peces en reposo) y las muestras de control después de 1 h de prueba de estrés de exposición al aire sin suplementación con 1% de Trp (análisis REST), mientras que letras diferentes denotan diferencias estadísticamente significativas entre grupos (ANOVA dos vías). C, alimentación de control; T, alimentación de Trp al 1%; A, factor estresante de la exposición al aire; 1H / 6H, 1/6 h post-estrés.....37

Figura 24. Niveles de expresión génica en tejido linfoide asociado al intestino (GALT) después del estrés por confinamiento (manipulación de redes) a 1 y 6 h después del estrés. qPCR de marcadores específicos de ARNm de procesos de respuesta inmune innata (proteína del complemento *c3*, lisozima, *cox2*, *mxp*, piscidina, defensina y hepcidina), citocinas inmunes (*ifn*, *il-1b*, *tnf1a* e *il-10*) y *gapdh*, normalizados con factor de alargamiento 1α e hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa (n = 6 por grupo experimental). Asterisco muestra diferencias entre las muestras de control sin estrés (peces en reposo) y las muestras de control después de 1 h de confinamiento de aire / prueba de esfuerzo con redes sin suplementación con 1% de Trp (Análisis REST), mientras que letras diferentes denotan diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales (ANOVA dos vías). C, alimentación de control; T, alimentación de Trp al 1%; N, tensión de compensación; 1H / 6H, 1h / 6h post-estrés.....38

Figura 25. Visualización de la expresión génica del tejido linfoide asociado al intestino (GALT) después del estrés por confinamiento (manipulación de redes) a 1 y 6 h después del estrés por medio de análisis de superficie de respuesta. qPCR de marcadores de ARNm específicos de procesos de respuesta inmune innata (proteína del complemento *c3*, lisozima, *cox2*, *mxp*, piscidina, defensina y hepcidina), citocinas inmunes (*ifn*, *il-1b*, *tnf1a* e *il-10*) y *gapdh*, normalizadas con factor de elongación 1α e hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa (n = 6 por grupo experimental). El asterisco muestra diferencias entre las muestras de control sin estrés (peces en reposo) y las muestras de control después de 1 h de prueba de estrés de exposición al aire sin suplementación con 1% de Trp (análisis REST), mientras que letras diferentes denotan diferencias estadísticamente significativas entre grupos (ANOVA dos vías). C, alimentación de control; T, alimentación de Trp al 1%; N, tensión de compensación; 1H / 6H, 1/6 h post-estrés.....39

Figura 26. Análisis de componentes principales de (A) expresión génica según el conjunto de tratamientos; *gadph*, *cox2*, *ifn1*, *il-1b*, *tnf1a*, *il-10*, *pis*, *def*, *hep*, *c3* complemento, *lys* y *mxp*. (B) Correlación entre la combinación de tratamientos (triptófano, tiempo y estrés). Cada punto representa el promedio del análisis de muestras de tres replicas biológicas en el gráfico. Los

factores F1 y F2 utilizados en este gráfico explican el 73.40% de la varianza total, lo que permite una interpretación segura de la variación.40

Figura 27. Mapa de calor que muestra patrones de expresión en tejido linfoide asociado al intestino (GALT) después de la exposición al aire y las pruebas de estrés de confinamiento / red. Las muestras representadas son de suplementación con 1% de Trp y tratadas con exposición al aire (TA1H y TA6H) o exposición en confinamiento / red (TN1H y TN6H), y Grupos de dieta de control expuestos a cada estrés (CA1H y CA6H para exposición al aire; CN1H y CN6H para redes). Cambios en la expresión de genes de la respuesta inmune innata (proteína del complemento *c3*, lisozima, *cox2*, *mxp*, piscidina, defensina y hepcidina), citocinas inmunes (*ifn*, *il-1b*, *tnf1a* e *il-10*) y *gapdh*, normalizados con el factor de elongación 1a y la hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa, están representados en color: la escala verde indica genes sub expresados y el rojo indica genes sobre expresados.41

Figura 28. Crecimiento en peso (a) y talla (b) en pejelagarto *Atractosteus tropicus*. Los valores (n=9 por tratamiento dietético) se expresan como media \pm desviación estándar ($p < 0.05$).42

Lista de tablas

Tabla 1. Ingredientes y composición proximal de las dietas experimentales. Los valores (n = 3 por tratamiento) se expresan como media \pm desviación estándar ($p < 0,05$). * El contenido de proteína se determinó usando factor de proteína (6.25) NFE: Extracto libre de nitrógeno: % de nutrientes no evaluados. Los valores son medias de tres determinaciones \pm DE. Extracto libre de nitrógeno (NFE) = $1000 - (\text{humedad g kg}^{-1} + \text{proteína bruta g kg}^{-1} + \text{extracto de éter g kg}^{-1} + \text{ceniza g kg}^{-1} + \text{fibra bruta g kg}^{-1})$	23
Tabla 2. Composición proximal de las dietas experimentales. Los valores (n=9 por tratamiento) se expresan como media \pm desviación estándar. *El contenido de proteína se determinó usando factor de proteína (6.25) NLN: Extracto libre de nitrógeno: % de nutrientes no evaluados. Los valores son medias de tres determinaciones \pm DE. Extracto libre de nitrógeno (NFE) = $1000 - (\text{humedad g kg}^{-1} + \text{proteína cruda g kg}^{-1} + \text{extracto de éter g kg}^{-1} + \text{ceniza g kg}^{-1} + \text{fibra bruta g kg}^{-1})$	28
Tabla 3. Concentración de aminoácidos en dietas experimentales en pejelagarto (<i>Atractosteus tropicus</i>).....	28

1. INTRODUCCIÓN

El consumo de peces per cápita ha aumentado un 3.1% en datos registrados en el periodo de 1961 a 2017, sin embargo, los niveles de consumo varían de acuerdo con la región (países desarrollados presentan mayor incremento de consumo contra los países menos desarrollados) y las temporalidades (FAO, 2020). Así mismo, la producción de peces por captura ha tenido fluctuaciones con el paso de los años, enfocándose principalmente en especies marinas, como lo son la anchoveta y el atún, permitiéndole abrir el paso a la actividad acuícola, la cual en 2018 alcanzó una producción global de 82.1 millón de toneladas (Fig. 1), siendo un aproximado de 50 millones de toneladas solo de peces con escama, sin considerar moluscos, algas y crustáceos quienes también tuvieron un incremento significativo.

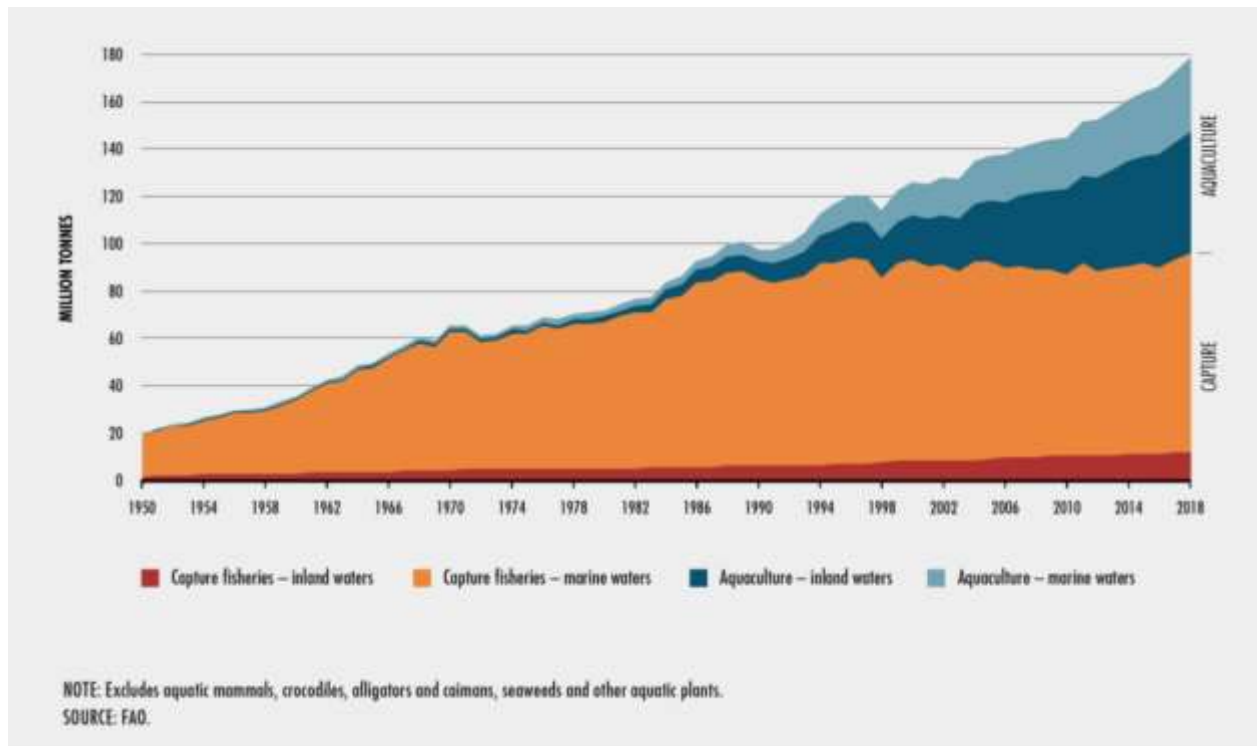


Figura 1. Producción mundial de acuicultura y pesca (FAO, 2020).

Si bien, es entendido que con el paso del tiempo se ha ido diversificando la acuicultura a nivel mundial, la contribución del continente americano ha sido del 15.7% de producción anual, mientras que, en África y Europa, se obtuvo una contribución del 17.9 y 17% respectivamente, a su vez que la acuicultura continental tuvo una producción anual de 51.3 millones de toneladas, siendo principalmente producción de especies dulceacuícolas (Fig. 2).

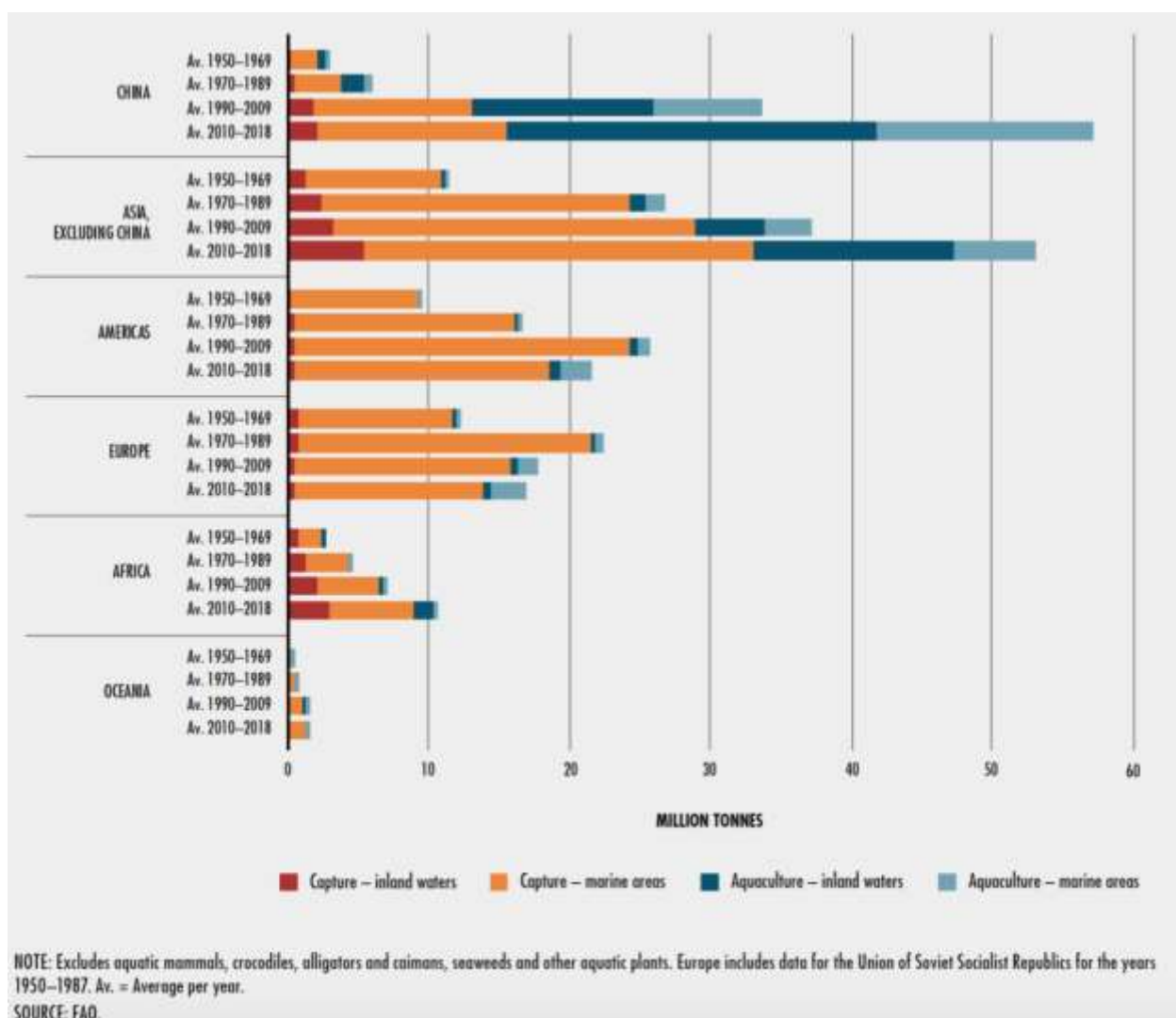


Figura 2. Contribución mundial regional de pesca y producción acuícola (FAO, 2020).

La acuicultura mundial creció un 5.3% por año en el periodo de 2001-2018, para animales acuáticos cultivados, a lo que el 4% corresponde al año 2017 y el 3.2% corresponde al año 2018; a pesar de la reducción en el crecimiento en estos últimos años, comparado con otros sectores agrotecnológicos éste ha sido rápido, ya que a su vez ha habido una mayor diversificación de países productores, añadiéndose países como Indonesia, Bangladesh, Egipto y Ecuador (FAO, 2018), por lo que se deduce que la contribución de la producción acuícola continuará incrementando constantemente a nivel mundial (Fig. 3). Asia seguirá dominando el sector acuícola, teniendo como expectativa un crecimiento por encima del 33% de producción acuícola en Latinoamérica y en donde a nivel mundial se estima que serán cultivados principalmente especies dulceacuícolas.

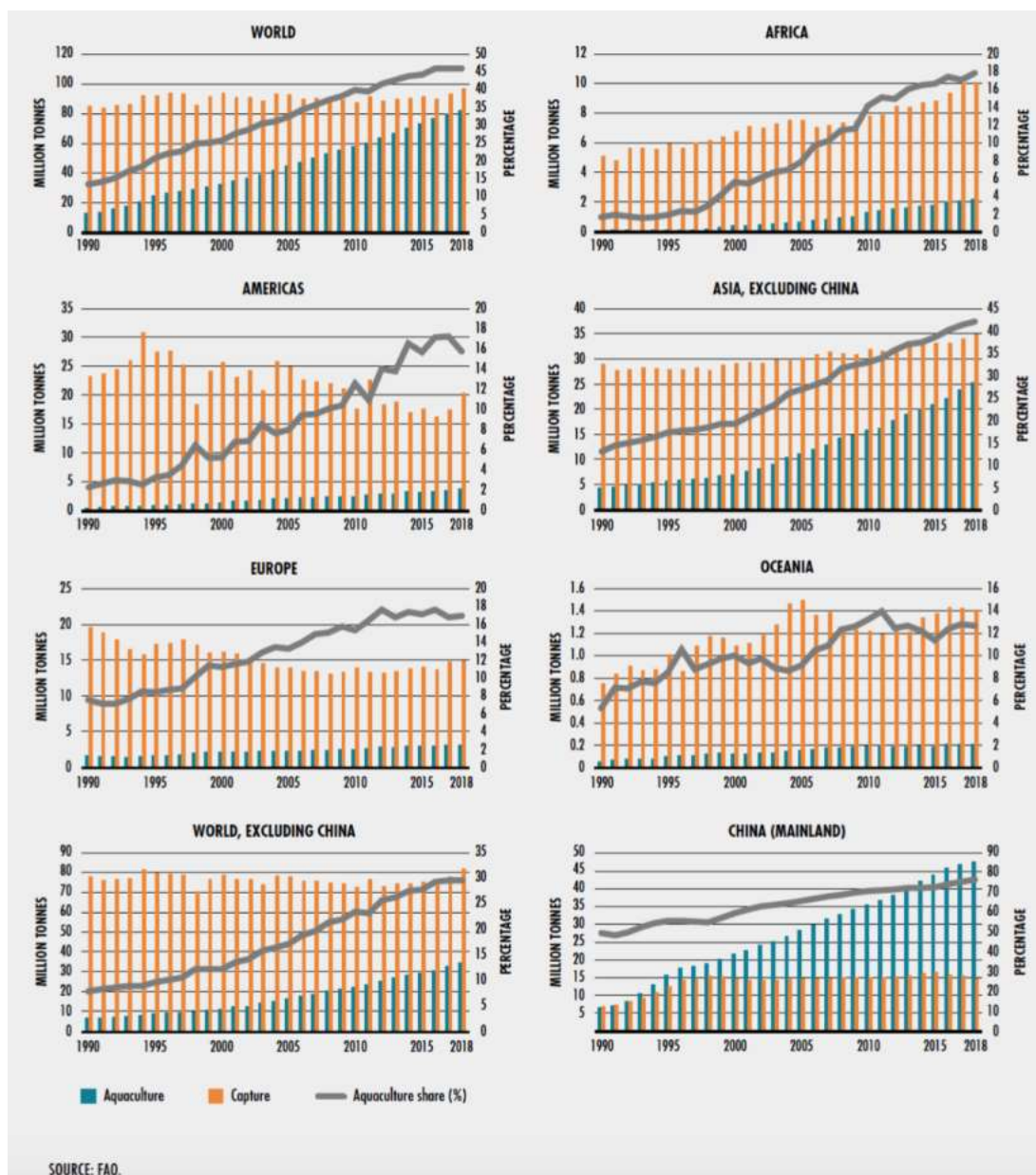


Figura 3. Contribución de la producción acuícola en la producción de organismos acuáticos en distintas regiones del mundo (FAO, 2020).

1.1 Cultivo de especies de importancia comercial y regional

La acuicultura es pieza clave y fundamental para la economía, seguridad nacional y social (FAO, 2020). Representa una alternativa viable para cubrir la demanda de proteína sin alterar el sabor, la calidad y la sanidad de los organismos, provocando el avance científico y tecnológico para la búsqueda de opciones sustentables y eficaces.

En ese sentido, y particularmente en referencia a la producción de proteína de origen animal, la acuicultura busca potencializar el cultivo de peces de interés comercial, que sean de rápido crecimiento, bajos requerimientos nutricionales (de bajo nivel trófico) y sobre todo de fácil

adaptación a condiciones de cautividad como es el caso particular de las siguientes especies, por mencionar algunas, y que son el objeto de estudio de esta tesis doctoral:

1.1.1 Jurel, *Seriola rivoliana*

El género *Seriola* se produce mundialmente desde hace varios años, con especies como *Seriola rivoliana*, *Seriola dumerili*, *Seriola quinqueradiata* y *Seriola lalandi*, siendo Australia, Estados Unidos, China, Corea y Japón los principales productores a nivel mundial (Sicuro y Luzzana, 2016) (Fig.4).



Figura 4. Distribución global de producción de *Seriola* spp. Fuente FAO 2014. Producción de pesca y acuicultura. Periodo 1950-2012 (Fishstat). Estimado por Miller *et al* 2011.

El jurel *Seriola rivoliana*, es un pez marino perteneciente a la familia Carangidae, se alimenta principalmente de peces e invertebrados (Fig. 5). Sus huevos son pelágicos, mientras que al llegar a la adultez se consideran bentopelágicos. Su distribución es circunglobal, asociado principalmente a arrecifes con clima subtropical (Fig. 6), habitando en un rango de profundidad de entre 5 y 245 metros (Fishbase, 2021).



Figura 5. Juvenil de Jurel, *Seriola rivoliana*. Asencio-Alcudia, 2021.

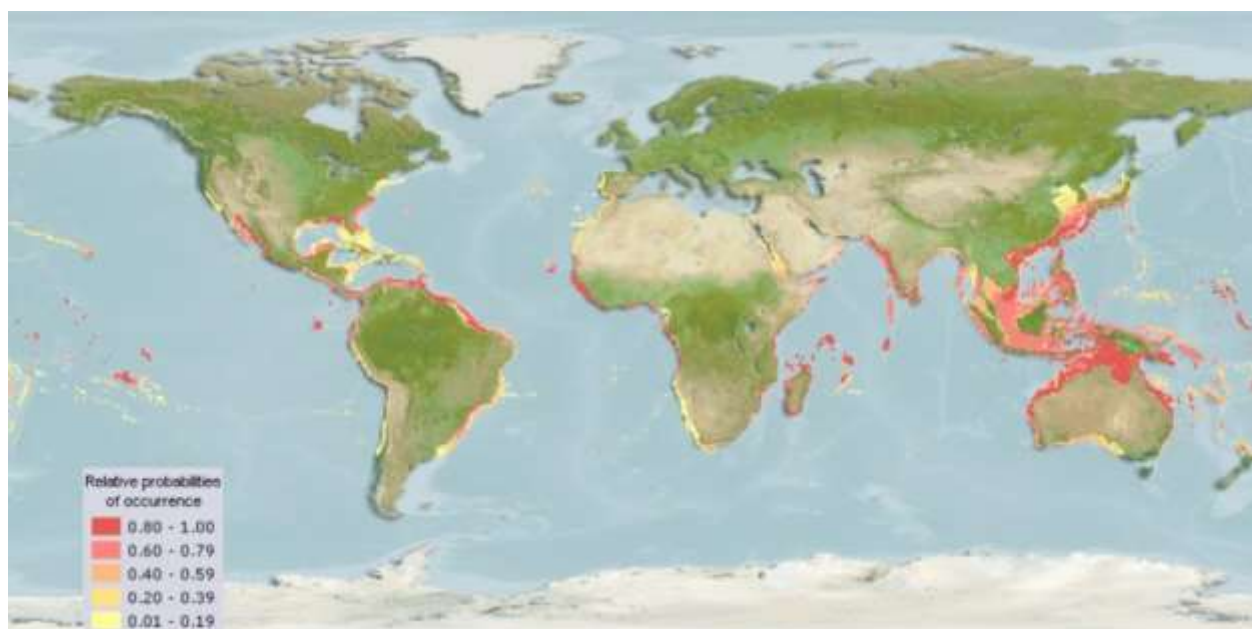


Figura 6. Distribución de *Seriola rivoliana* ((AquaMaps, 2019) (Fishbase, 2021)).

Debido a que se cuenta con escasos estudios sobre su biología, descrita por Mesa-Rodríguez *et al.* (2014) y algunos estudios sobre su larvicultura (Blacio *et al.*, 2003; Laidley y Shields, 2004; Teles *et al.*, 2017; Veyrand, 2021), esta especie se encuentra en estudios para optimizar su cultivo, ya que en países como Estados Unidos, Japón y Australia, es considerada como una especie de acuicultura marina emergente (Roo *et al.*, 2014).

1.1.2 *Corvina*, *Argyrosomus regius*

La corvina *Argyrosomus regius*, pertenece a la familia Sciaenidae, es un pez marino bentopelágico que habita en un rango de profundidad de entre 15 y 300 metros. Se alimenta de peces y crustáceos, considerándose una especie migratoria en respuesta a los cambios de temperatura (Fishbase, 2021) (Fig. 7) y se distribuye principalmente en el Mar Mediterráneo, la costa este del Atlántico y el Mar Negro (Haffray *et al.*, 2012) (Fig. 8).



Figura 7. Corvina *Argyrosomus regius* (Fishbase, 2021).

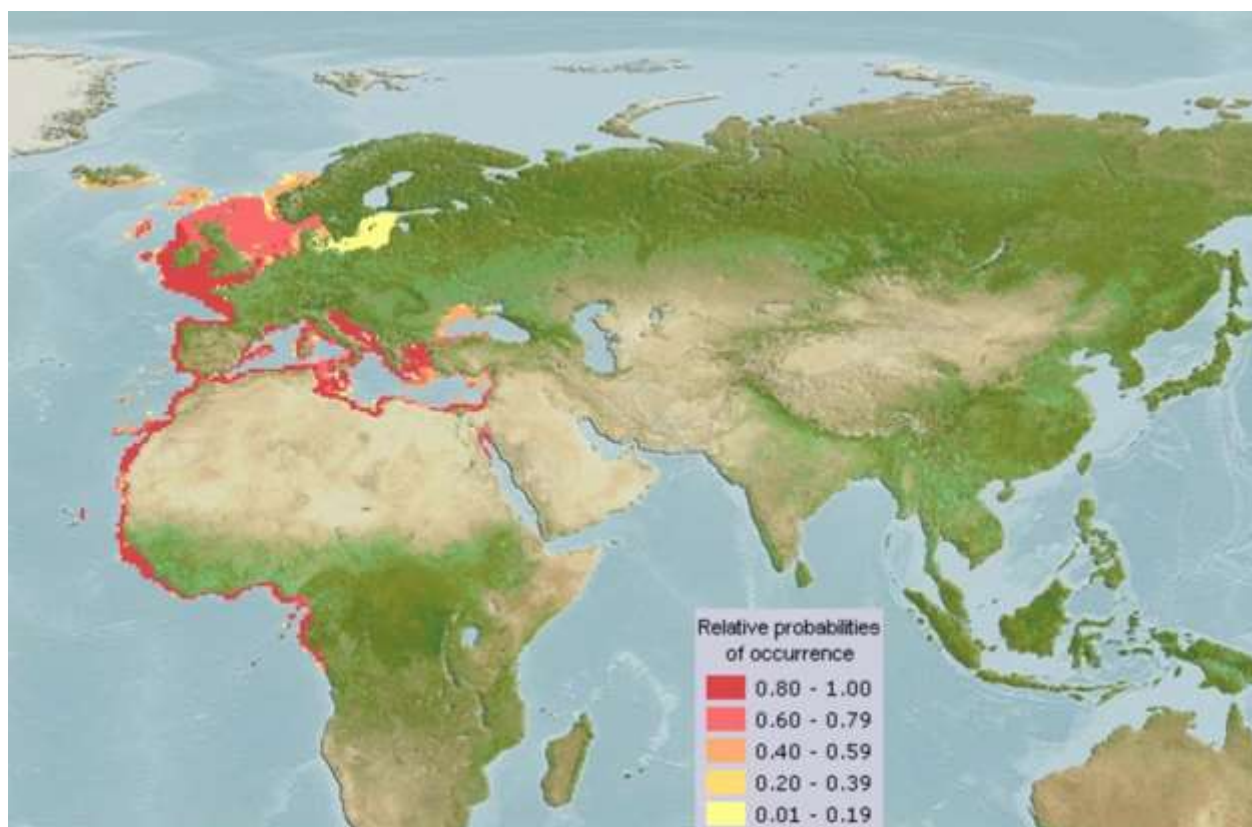


Figura 8. Distribución de la corvina *A. regius* (AquaMaps, Fishbase, 2021).

Ésta es una especie de interés particular para la acuicultura debido a su fácil adaptabilidad al manejo en cautiverio, presentando características biológicas excelentes para diversificar la maricultura (Jiménez *et al.*, 2005) con tasas elevadas de crecimiento, así como también, un buen índice de conversión alimenticia (Calderón *et al.*, 1997; Pastor *et al.*, 2002); y es relativamente nueva en su producción (Scopece, 2019). Sin embargo, se considera al estrés como un detonante de un bajo crecimiento en peces cultivados en estanques a diferencia de los cultivados en jaulas flotantes, por lo que se considera que se requiere un enfoque multidisciplinario para encontrar las causas de las tasas de crecimiento variables (Duncan *et al.*, 2013), como el estudio exhaustivo de su biología, entre otros.

1.1.3 Pejelagarto, *Atractosteus tropicus*

El pejelagarto (Fig. 9) es un pez dulceacuícola demersal de hábitos carnívoros y oportunista que habita en zonas cálidas tropicales, con poca profundidad y bajo movimiento como ríos, lagos y remansos, perteneciente a la familia Lepisosteidae. Se distribuye desde el sur de México hasta Nicaragua (Fig. 10) (Fishbase, 2021).



Figura 9. Pejelagarto *Atractosteus tropicus*.

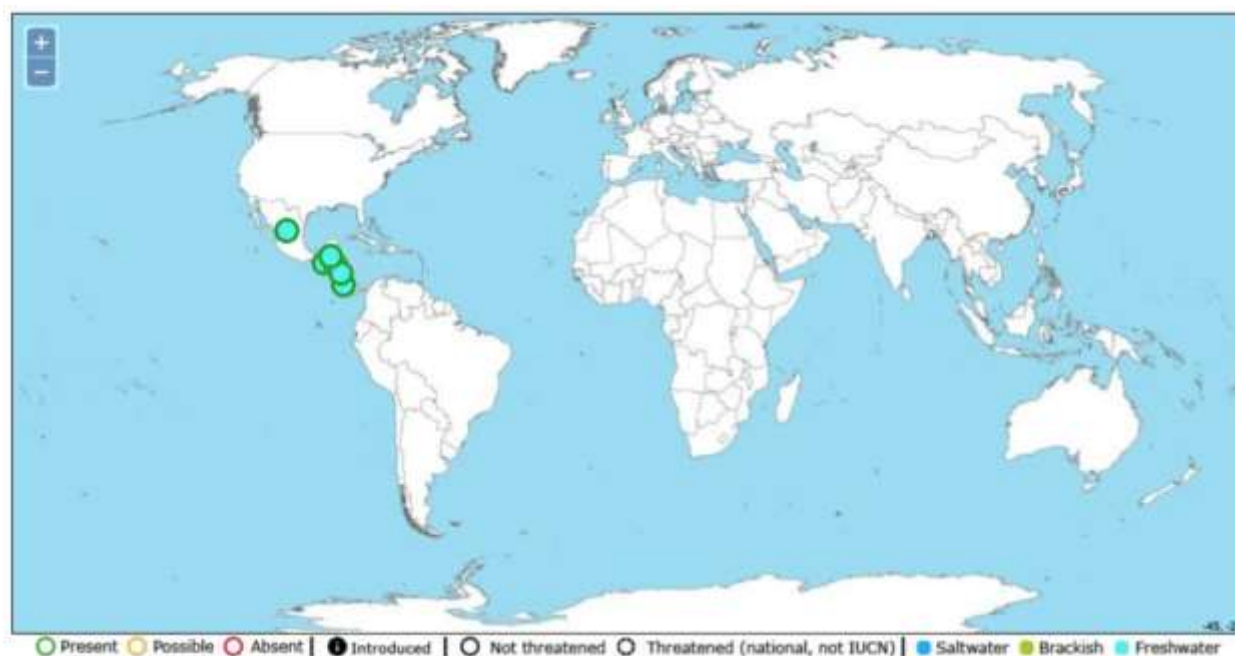


Figura 10. Distribución pejelagarto *Atractosteus tropicus* (Fishbase, 2021).

Actualmente, las poblaciones silvestres de *A. tropicus* se han visto sobreexplotadas por las actividades pesqueras y crecimiento demográfico. Es por esto que se ha buscado establecer su cultivo acuático con el objetivo de satisfacer la demanda de esta fuente de proteína a la población, y aunado a esto, mejorar las condiciones del cultivo de la especie, que favorezcan un mejor rendimiento en cuanto a crecimiento y calidad del producto.

Es por esto, que el estudio sobre la nutrición y la fisiología digestiva en peces de importancia comercial se ha intensificado principalmente con el objetivo de promover una mejor eficiencia en crecimiento, mejores condiciones en el cultivo que permitan aumentar la respuesta a factores de estrés y resistencia a posibles patógenos presentes en el cultivo (Fernández *et al.*, 2015., Firmino *et al.*, 2019., Firmino *et al.*, 2020., Gisbert *et al.* 2021). Bajo este concepto, el desarrollo de alimentos funcionales para especies donde ya se conoce su fisiología digestiva y requerimientos nutricionales, se convierte en una tarea fundamental para que el uso de suplementos o aditivos ayuden a mejorar la salud, el bienestar, mejor aprovechamiento del

alimento, diestas amigables al ambiente, que modulen el microbioma con lo que la liberación de compuestos nitrogenados y fosforados en el ambiente se reducen (Kazoni *et al.*, 2021). Entre éstos aditivos se encuentran: vitaminas, minerales, aminoácidos, prebióticos, probióticos, enzimas, extractos herbales, por mencionar algunos.

1.2 Aditivos alimentarios

Los aditivos alimentarios han sido conceptualizados como ingredientes o componentes no-nutritivos, que son incluidos en las formulaciones y afectan tanto química como físicamente las propiedades de la dieta y a su vez, influyen en el rendimiento de los animales acuáticos o de sus productos (Barrows, 2000), éstos aditivos son comúnmente añadidos a la dieta con el objetivo de influir en la calidad del alimento en las formulaciones comerciales incluyendo aglutinantes de pellets, conservadores (como compuestos antimicrobianos y antioxidantes) y estimulantes de la alimentación (NRC, 2011). De acuerdo a Dawood *et al.*, (2017)., otros aditivos que afectan directamente el rendimiento y la calidad del producto son los probióticos, prebióticos, acidificantes y extractos derivados de plantas y animales (Dawood *et al.* 2015a,b; Ng & Koh 2016), que a su vez promueven el crecimiento y mejoran algunos indicadores no específicos de inmunidad en peces (Yin *et al.*, 2009), estimulación de enzimas digestivas (Jang *et al.*, 2004), y bienestar en general (Ringø *et al.*, 2010), por mencionar algunos.

1.3 Uso de aditivos alimentarios funcionales

Una de las estrategias de mayor interés que se ha optado a nivel mundial, es el uso de alimentos funcionales, los cuales agregan un alto valor nutritivo y a su vez, aportan beneficios a la fisiología del consumidor, además de permitir tener un mayor rendimiento no sólo en la producción de proteína de calidad, sino también en la estimulación del sistema inmune de los peces. Entre los aditivos funcionales se encuentra la suplementación de la vitamina E α -tocoferol y el aminoácido triptófano, que de manera independiente fueron adicionados en los alimentos balanceados para los peces de interés en este trabajo.

Por otro lado, los alimentos funcionales permiten un mayor rendimiento en la producción de proteínas de alta calidad y en la estimulación del sistema inmunológico de los peces. Entre los aditivos alimentarios, las vitaminas son micronutrientes esenciales para el desarrollo y crecimiento de los seres vivos y se utilizan ampliamente en las formulaciones para el cultivo a nivel comercial. En este aspecto, la mayoría de las vitaminas no son sintetizadas *de novo* por los peces, o su síntesis se da a velocidades más bajas, por lo que no cubren los niveles requeridos. Por lo tanto, es necesario incluirlos en la dieta ya que tienen funciones muy específicas y con ello, evitar problemas durante el crecimiento de los organismos ya sea por deficiencia o exceso (Lovell *et al.*, 1984; Gatlin *et al.*, 1986; Frischknecht *et al.*, 1994; Bowater y Burren, 2007). Es así que los peces cultivados son dependientes de los niveles de vitaminas aportadas en la dieta, además, estos micronutrientes tienden a presentar bajas estabildades en el agua, lo que provoca su pérdida y en consecuencia, pueden detectarse malformaciones o problemas en el desarrollo de los peces por su deficiencia (Fernández *et al.*, 2018) entre otras cosas.

El interés por el bienestar animal ha aumentado en la última década debido a preocupaciones éticas y legales, así como su efecto en el rendimiento de crecimiento y calidad del producto

(Ashley, 2007; Noble *et al.*, 2012; Toni *et al.*, 2018). En este contexto, los procedimientos de la acuicultura convencional a menudo implican la manipulación de peces fuera del agua por un período de tiempo relativamente prolongado, y su exposición al aire, lo que provoca estrés, inmunosupresión, malestar general, o incluso la mortalidad. En condiciones estresantes, el sistema inmunológico puede deprimirse acentuando el riesgo de enfermedades infecciosas (Barton, 2002; Kumar *et al.*, 2012; Gisbert *et al.*, 2018; Khansari *et al.*, 2018). En consecuencia, estudios recientes en el campo de la formulación de alimentos acuícolas, han llevado al desarrollo de nuevas estrategias de alimentación, utilizando los llamados "alimentos funcionales", para mejorar la sostenibilidad de la producción de pescado, en lo que respecta al crecimiento, la supervivencia y la salud del animal por reducir el estrés impuesto durante los diferentes procesos de manipulación y/o modulando las funciones inmunes (Olmos-Soto *et al.*, 2015). Con este precepto, diferentes estudios nutricionales han demostrado que la suplementación dietética con aminoácidos esenciales, que a su vez son precursores de otras biomoléculas importantes, es decir, aminos biogénicas, grupos hemo o purina y pirimidina (Nelson y Cox, 2013; Andersen *et al.*, 2016), pueden mejorar las funciones fisiológicas que regulan las vías metabólicas en el organismo, incrementando así la supervivencia, el desarrollo, el crecimiento, la salud, el bienestar, y reproducción en diferentes vertebrados, incluyendo los peces (Li *et al.*, 2009), como es el caso del aminoácido esencial triptófano, que al ser precursor de la serotonina, ha sido objeto de estudio de sus funciones como supresor del estrés en varias especies de peces, pues los estudios han demostrado que la suplementación de triptófano en la dieta promueve una mejora en varios patrones de comportamiento como es la agresividad, el dominio y el comportamiento sexual (Sahu *et al.*, 2020).

2. ANTECEDENTES

Con la finalidad de optimizar el cultivo de especies de importancia en acuicultura, se han desarrollado estudios con el fin de favorecer el cultivo y determinar las bases fisiológicas para garantizar un mejor crecimiento y desarrollo de los organismos acuáticos, como es el uso de la suplementación alimentaria de aditivos funcionales que tienen el efecto de mitigar factores estresantes que suelen ser perjudiciales para la producción de proteína de calidad y que a su vez mejoran la respuesta inmune y antioxidante de los organismos acuáticos.

Uno de los aditivos funcionales utilizados ampliamente en la acuicultura, son las vitaminas, que son micronutrientes esenciales para el desarrollo y crecimiento de los seres vivos, al no sintetizarse por el cuerpo o bien sintetizarse a tasas inferiores; por lo que, es necesario incluirse en la dieta para así evitar cualquier problema durante el crecimiento y fisiología de los organismos por alguna posible deficiencia de éstas. En este aspecto, las vitaminas han sido clasificadas en dos grandes grupos:

2.1 Vitaminas

2.1.1 Vitaminas hidrosolubles

Donde destacamos al ácido ascórbico, que actúa como antioxidante, facilita el transporte de hidrógeno a la célula y participa en la hidroxilación de los aminoácidos como la prolina, fenilalanina, triptófano, lisina y tirosina. En este proceso, destaca la formación de hidroxiprolina (que es un constituyente importante del colágeno), los mucopolisacáridos y el sulfato de condroitina (que juega un papel esencial en las células óseas, en las células del tejido conectivo y en las células de los capilares sanguíneos). Además, el ácido ascórbico, ayuda en la reparación del tejido dañado y se necesita para volver a la forma metabólicamente activa del ácido fólico (Tacon, 1989). Por otro lado, se encuentran las vitaminas del complejo B, entre las que destacan la tiamina (vitamina B1), riboflavina (vitamina B2), piridoxina (vitamina B6), ácido pantoténico (vitamina B5), biotina (vitamina B8), entre otras, y que se encuentran relacionadas principalmente a mejorar el crecimiento, metabolismo y factor de condición (Espe *et al.*, 2020).

2.1.2 Vitaminas liposolubles

Son cuatro las vitaminas de este grupo: la A, D, K y E. La vitamina A, que de acuerdo a Ross *et al.* (2000), juega un papel importante en el proceso de proliferación y diferenciación celular, mejorando el crecimiento y desarrollo normal del sistema esquelético. Por otro lado, la vitamina K, tiene un rol importante en los procesos de coagulación sanguínea, así como también en la regulación de las proteínas encargadas de distintos procesos biológicos entre los cuales se encuentra la calcificación. Por su parte, la vitamina D, encargada de procesos de diferenciación celular y crecimiento, igualmente que del metabolismo del calcio y fósforo (Gisbert *et al.*, 2008). La vitamina E, como uno de los aditivos alimentarios utilizados en la presente tesis doctoral, se detalla a continuación.

2.1.3 La vitamina E (α -tocoferol)

De acuerdo a Etsuo y Kouichi (2019), la vitamina E se refiere a un grupo de ocho compuestos diferentes: α -, β -, γ - y δ -tocoferoles y los cuatro tocotrienoles correspondientes cuya estructura molecular general está caracterizada por un anillo de cromanol con una cadena lateral ubicada en la posición C2.. Las formas α de tocoferol tiene tres grupos metilo en las posiciones C5, C7 y C8 del anillo de cromanol, mientras que las formas β y γ tienen dos y las formas δ tienen un grupo metilo.

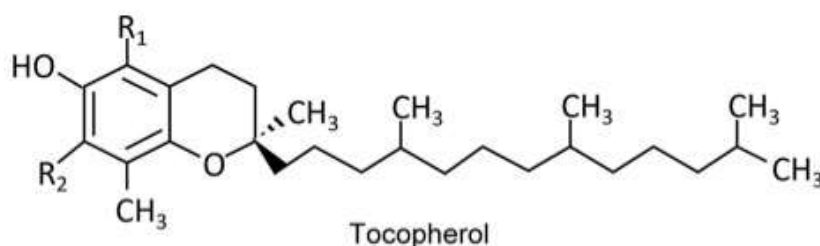


Figura 11. Estructura molecular del tocoferol (Etsuo y Kouichi, 2019).

Pertenciente al grupo de las moléculas liposolubles, los tocopheroles y tocotrienoles tienen una función en la protección de organismos en contra de la oxidación de lípidos, además de tener otras funciones biológicas específicas en peces y otros vertebrados. Por ello, se considera uno de los aditivos nutricionales esenciales. Este antioxidante natural reduce el daño causado por el desequilibrio fisiológico en la formación de radicales libres que producen daño celular (Armenta *et al.*, 2015). De esta forma, los tocopheroles actúan protegiendo de los daños oxidativos que producen los radicales libres a los ácidos grasos insaturados de la membrana celular y subcelular, además de jugar un papel importante en los procesos metabólicos como la respiración celular, la síntesis de ADN y de la coenzima Q, siendo el α -tocoferol la forma vitamínica más activa (Tacon, 1989). Los antioxidantes son compuestos que evitan la oxidación de moléculas, inhibiendo la formación de radicales libres o interrumpiendo su propagación (Watanabe *et al.*, 1970). La función de la vitamina E en la modulación del sistema inmunológico es esencial para eliminar los productos de la oxidación bioquímica y regular la expresión génica, al interactuar directamente en la regulación del ADN en rutas de procesos antiinflamatorios y la expresión génica de enzimas antioxidantes, fortaleciendo las membranas biológicas a través de la protección de los lípidos de la membrana, así como la síntesis de prostaglandinas (Meydani *et al.*, 2001).

De esta manera, la inclusión de antioxidantes naturales en la dieta para peces, ayuda a disminuir los daños causados por la formación de los radicales libres y el desequilibrio del estatus antioxidante (Armenta *et al.*, 2015). El ácido ascórbico y el α -tocoferol han sido utilizados en estudios recientes con salmón (*Oncorhynchus tshawytscha walbaum*) disminuyendo el estrés oxidativo (Welker *et al.*, 2009), además de otros estudios que se han desarrollado con diferentes antioxidantes para medir los niveles de peroxidación lipídica en la tilapia híbrida (*Oreochromis niloticus x Oreochromis aureus*) (Huei *et al.*, 2004), la trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) (Nakano *et al.*, 1999), y el pargo japonés (*Pagrus major*) (Gao *et al.*, 2012) ya que el ácido ascórbico ayuda a regenerar a la vitamina E de su forma ya oxidada (Higdon *et*

al., 2021). En este aspecto, Dantagnan *et al.*, (2013) analizaron la interacción de selenio y vitamina E en dietas para juveniles de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) donde se encontró una disminución significativa en los parámetros de estrés oxidativo.

2.2 Aminoácidos

De acuerdo con Dietzen (2018), los aminoácidos son compuestos orgánicos que, al unirse forman proteínas y son utilizados para cumplir con funciones fisiológicas y metabólicas como el crecimiento, la reproducción, reparación de tejidos, como fuentes de energía, entre otras. Dentro de los aminoácidos se encuentran los aminoácidos condicionales, que como su nombre lo indica, no son esenciales y se condicionan a presencia de estrés o enfermedades como es el caso de arginina, cisteína, glutamina, tirosina, glicina, ornitina, prolina y serina; por otro lado, se encuentran los aminoácidos no esenciales que se refiere a los aminoácidos que el propio organismo produce y que no es necesario su ingesta a través de la dieta como en donde se incluyen los aminoácidos alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, ácido glutámico, glutamina, glicina, prolina, serina y tirosina. A su vez, se encuentran los aminoácidos esenciales, que al no sintetizarse por el cuerpo, se deben adquirir por medio de la alimentación, como es el caso de la fenilalanina, histidina, valina, treonina, leucina, lisina, metionina, isoleusina y el triptófano.

2.2.1 Triptófano

Es un aminoácido no polar, hidrofóbico y aromático, puesto que posee un anillo con dobles enlaces resonantes conjugados, que le otorga a la molécula una gran estabilidad estructural y desprende menos energía en las reacciones en las que participa. Esta cualidad aromática es debido a su grupo R (la cadena lateral específica del aminoácido). Éste trata de un grupo indol, con dos anillos, uno de seis carbonos y otro de 5 carbonos, ambos con enlaces deslocalizados. Su fórmula molecular es $C_{11}H_{12}N_2O_2$ (National Cancer Institute 04).

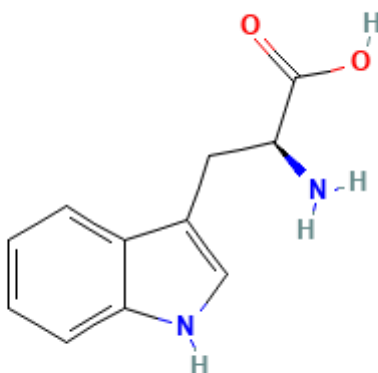


Figura 12. Estructura molecular del aminoácido triptófano (PubChem, 2021).

Se ha demostrado que el triptófano (Trp) es uno de los aditivos funcionales más importantes y eficientes ya que mejora la supervivencia y el crecimiento, al disminuir el comportamiento agresivo, mitigar el estrés por hacinamiento y mejorar la recuperación post-estrés en diferentes especies de peces (Hseu *et al.*, 2003; Höglund *et al.*, 2005; Hoseini *et al.*, 2012; Herrera *et al.*, 2017; Azeredo *et al.*, 2017a). Como Trp es un sustrato para la serotonina y la melatonina, se puede esperar que tenga un papel importante en los estados del comportamiento. Además, también es un sustrato para síntesis de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD); por lo tanto, hay mayores implicaciones para el transporte de electrones y la generación de energía en la célula (Richard *et al.*, 2009). Asimismo, se ha demostrado que este α -aminoácido esencial, tiene importantes impactos en las funciones inmunes controladas por vías específicas, a través de su papel como componente estructural de los factores de transcripción específicos (Mamane *et al.*, 1999). Recientemente, la corvina (*Argyrosomus regius*) alimentada con una dieta suplementada con Trp moduló sus parámetros inmunológicos serológicos después del estrés causado por exposición al aire (González-Silvera *et al.*, 2018). Sin embargo, solo se dispone de información limitada sobre el impacto de Trp sobre el manejo rutinario de animales en la inmunidad de tejidos mucosos, y más específicamente el intestino (Schokker *et al.*, 2015). El estado inmunológico de la mucosa intestinal es clave no solo para el manteniendo equilibrado de la microbiota, sino también para la prevención del crecimiento de patógenos. De esta manera, el Trp modifica muchos genes del sistema inmune que están involucrados en la defensa contra patógenos (Gómez *et al.*, 2013; Ostaff *et al.*, 2013).

2.3 Sistema inmune

Recientemente, se ha estudiado en organismos acuáticos, particularmente en peces, el efecto del manejo inadecuado sobre el estrés y la inmunidad sistémica (Barton, 2002; Kumar *et al.*, 2012). Cabe mencionar que la respuesta fisiológica al estrés es similar entre vertebrados y peces teleosteos donde se ha determinado la presencia de dos rutas metabólicas sobre la respuesta a la estimulación del estrés: el eje cerebro-simpático-célula cromafina, responsable de una liberación rápida de catecolaminas circulantes; y el eje hipotálamo-pituitario-interrenal (HPI), a cargo de la liberación endócrina de la cascada que conduce a respuestas secundarias, lo que induce cambios en metabolitos celulares que finalmente alteran la expresión de genes del sistema inmunológico en peces (Wendelaar-Bonga, 1997; Barton, 2002). Sin embargo, el tejido linfoide asociado al intestino (GALT, por sus siglas en inglés) en los peces es bastante diferente al de los mamíferos (Foey y Picchiatti, 2014). Si bien algunas características generales de la inmunidad de la mucosa del intestino se comparten con otros vertebrados mejor estudiados (Gómez *et al.*, 2013), existen características únicas como una clase de inmunoglobulinas, IgT que reemplaza a la IgE normalmente asociada a la inmunidad de la mucosa en vertebrados superiores (Zhang *et al.*, 2010; Mutoloki *et al.*, 2015). Además, con el estrés crónico aumentan los niveles de cortisol hasta un punto en el que el estrés impacta negativamente sobre las respuestas inmunitarias generales (Richard *et al.*, 2009).

Por otro lado, Kum y Sekkin (2011), mencionan que el sistema de defensa entre mamíferos y peces es similar, este se divide en innato y adaptativo (adquirido), los cuales presentan mecanismos de defensa mediados por células y factores humorales. Estas dos divisiones del sistema inmunológico trabajan juntas para destruir invasores o desencadenar procesos de defensa (Urbinati *et al.*, 2020).

Procesos de respuesta inmune innata: es la primera línea de defensa contra los agentes invasores (Ye *et al.*, 2018), los componentes de este sistema son los tegumentos (la piel y el moco); cabe mencionar que la superficie del cuerpo de los peces presenta una barrera mecánica contra los microorganismos y organismos acuáticos, ya que presentan compuestos antimicrobianos como las lectinas, complemento, lisozima, y péptidos antimicrobiales (Urbina *et al.*, 2020), los componentes celulares los granulocitos, monocitos, macrófagos y células natural Killers y los componentes humorales como el sistema del complemento c3 (c3) es una red compleja de proteínas plasmáticas y séricas asociadas a la membrana que pueden provocar respuestas inmunitarias inflamatorias y citolíticas altamente eficientes y estrictamente reguladas a organismos infecciosos (bacterias, virus, parásitos), tejidos dañados por efectos físicos, químicos, etc (Dunkelberger & Song., 2010). El complemento se considera un efector multifacético y robusto, que une a los sistemas inmunitario innato y adaptativo este vital importancia para la defensa del hospedero y su alcance es cada vez más apreciado a medida que se descubre información adicional sobre los efectos de su activación, es así que el complemento se puede activar a través de tres vías: clásica, lectina y alternativa. De acuerdo con Dunkelberger & Song., (2010), la ruta clásica se activa cuando C1q se une al anticuerpo unido al antígeno, activando C1r y C1s, que se adhieren a C4 y C2. La ruta de la lectina se activa cuando la lectina unida a manosa (MBL) encuentra formas de carbohidratos patógenos conservados, activando la serin-proteasas asociadas a MBL (MASP) y se adhiere nuevamente C4 y C2. Los productos de C4 y C2 forman la convertasa C3 de la ruta clásica y de la lectina, C4bC2a, que bifurca C3 en C3b y C3a. Una segunda molécula de C3b puede asociarse con C4bC2a para formar la convertasa C5 de las vías clásica y de lectina, C4bC2aC3b. La vía alternativa (AP) se activa cuando C3 se somete a hidrólisis espontánea y forma la AP C3 convertasa inicial, C3 (H₂O) Bb, en presencia de los factores B y D, lo que conduce a una escisión adicional de C3 y la formación eventual de la AP C3 convertasa (C3bBb) y AP C5 convertasa (C3bBbC3b). La properdina facilita la activación de AP estabilizando a las AP convertasas. Las tres vías culminan en la formación de las convertasas, que a su vez generan los principales efectores del sistema del complemento: anafilatoxinas (C4a/C3a/C5a), el complejo de ataque a la membrana (MAC) y opsoninas (C3b). Las anafilatoxinas son potentes moléculas proinflamatorias derivadas de la escisión de C4, C3 y C5. El MAC es un conjunto terminal de componentes del complemento C5b a C9, que puede lisar directamente las superficies objetivo. C3b induce la fagocitosis de dianas opsonizadas y también sirve para amplificar la activación del complemento a través del AP.

El sistema de enzimas antimicrobiales: defensina (def), hepcidina (hep), piscidina (pis) consideradas dentro del mecanismo de defensa natural, son proteínas de defensa contra las bacterias; es un mecanismo de defensa previo al desarrollarlo de la respuesta inmune específica; por otro lado, se encuentran los mediadores no específicos como son las interleucinas y el interferón tipo 1 (ifn1), proteína mx (mxp), interleucina 1b (il-1 b), factor de necrosis tumoral 1a (tnf1a) e interleucina 10 (il-10) donde las citoquinas funcionan como mediadores proinflamatorios, inhibiendo el crecimiento de patógenos, y a su vez, ayudan en la resistencia a infecciones virales. En el caso de las interleucinas, éstas regulan el inicio, mantenimiento y amplificación de la respuesta inmune, estimulando a las células T promoviendo la secreción de cortisol, la explosión respiratoria y el factor activador de macrófagos en leucocitos. La lisozima (lys) y ciclooxygenasa (cox2) que promueven la inflamación causando lisis osmótica por medio de las enzimas hidrolasas que modifican la carga

microbiana, lisando la pared celular e inactivando la endotoxina bacteriana y/o componentes virales.

Una de las funciones de las células de defensa del sistema innato es la de promover la conexión con el proceso inmune adquirido, unión que se realizan a través de las células presentadoras de antígeno (células dendríticas y macrófagos) que una vez procesadas, se presentan a los linfocitos T para unirse al sistema de histocompatibilidad clase 2, iniciando la respuesta adquirida mediada por células (Uribe *et al.*, 2020); este sistema de defensa adaptativa, está relacionada con la eliminación del patógeno en una etapa tardía y la producción de memoria inmunológica (Ye *et al.*, 2018).

Por otro lado, el gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (gapdh), se ha demostrado que bajo ciertas condiciones de estrés aumenta su expresión y puede proveer un beneficio de producción de energía y a su vez, mejorar otras rutas metabólicas relacionados al balance de energía como fue demostrado en la lobina europea (*Dicentrarchus labrax*) por Azeredo *et al.* (2017).

A diferencia de los mamíferos, los peces teleósteos tienen un sistema inmune menos diferenciado, ya que no cuenta con ganglios linfáticos ni médula ósea. Sin embargo, al igual que otros vertebrados, cuentan con el tejido linfoide asociado al intestino que actúa como un sistema de defensa y provoca una respuesta inmune (Jostes *et al.*, 1996). Asimismo, el riñón cefálico que funciona como órgano linfoide, actúa en conjunto con el timo y el bazo (Press & Evensen, 1999). Por otra parte, la presencia de los melanomacrófagos, que son depósitos de hemosiderina (melanina y lipofuscinas) pueden estar relacionados a hemorragias severas, por lo que un manejo inadecuado de los peces provoca la liberación de hemoglobina y pigmentos biliares, lo que desencadena un mecanismo de defensa con el incremento en melanomacrófagos en diversos órganos como son el bazo, hígado y riñón cefálico. En este sentido, Korun y Timur (2008), consideran que el aumento de melanomacrófagos es un bioindicador de estrés ambiental, lo que provoca un incremento en la capacidad fagocítica.

2.4 Sistema antioxidante

Los procesos celulares para la producción de energía necesitan O_2 . Sin embargo, el exceso de la producción de éste conlleva un desequilibrio y daño debido a la formación de especies reactivas del oxígeno (ERO) como los radicales libres (superóxido) y el peróxido de hidrógeno, que son generadas durante su oxidación o metabolismo celular (Sánchez-Valle y Méndez-Sánchez, 2013). Para contrarrestar estos daños, se cuenta con el sistema antioxidante, compuesto por enzimas, nutrientes y secuestradores de electrones encargados de reducir o eliminar los ERO's, previniendo así el daño oxidativo (Fig. 13) al evitar la producción excesiva de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, mientras mantiene las concentraciones fisiológicas y acción vasodilatadora de óxido nítrico (NO).

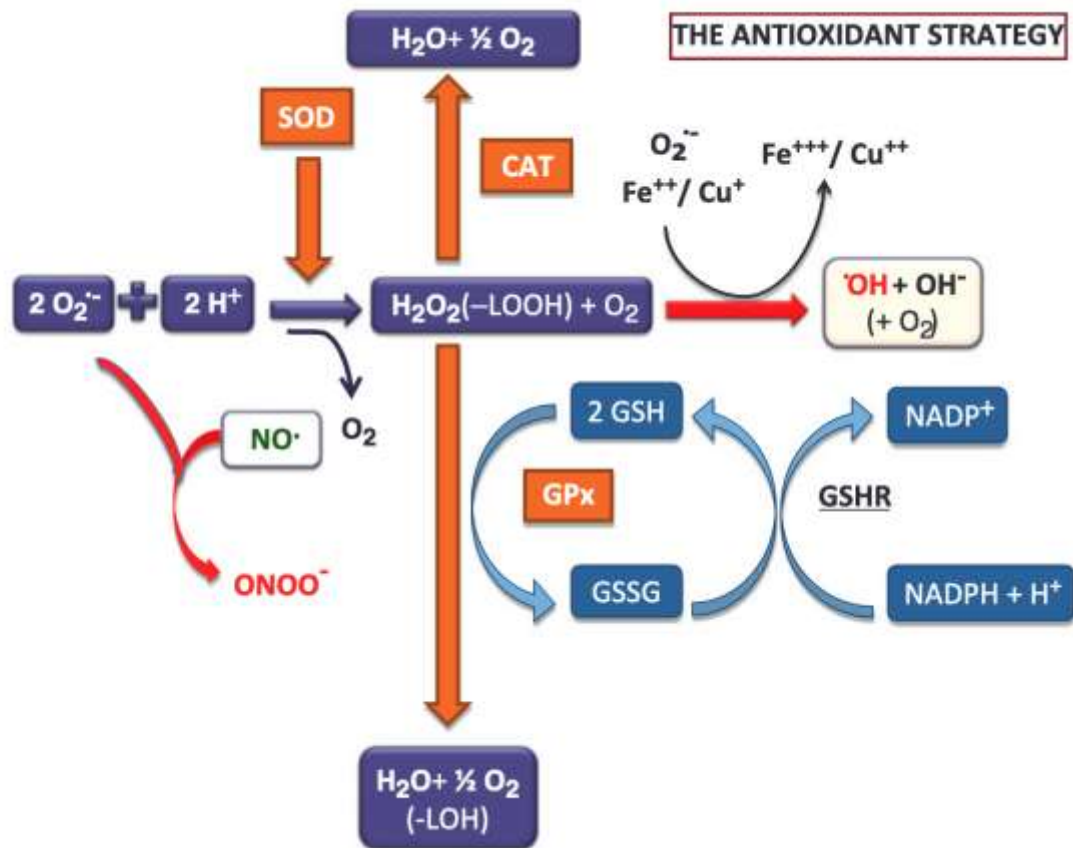


Figura 13. Función sincronizada de enzimas antioxidantes SOD, CAT y GPx. (Sáez *et al.*, 2015)

Dentro de las enzimas antioxidantes, se encuentran la enzima superóxido dismutasa (SOD) que se encarga de catalizar la dismutación del radical superóxido $\text{O}_2^{\bullet -}$ y convertirlo en oxígeno (O_2) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2). La catalasa (CAT) que es una oxidoreductasa, cataliza la descomposición de H_2O_2 en oxígeno y agua antes de salir de la célula, utilizando al grupo hemo (Fe) y el manganeso como cofactor. El glutatión peroxidasa (GPx) que cataliza la oxidación de glutatión o glutatión disulfuro, utilizando al peróxido de hidrógeno y usando como cofactor al selenio, protege las células de la formación de hidroperóxidos lipídicos, y a la membrana celular de la peroxidación lipídica y posterior muerte celular.

2.5 Pruebas de estrés

El estrés se ha definido como una cascada de eventos fisiológicos que ocurre cuando un animal intenta recuperar la homeostasis frente a un factor estresor identificado y los subsiguientes cambios neurales, hormonales, metabólicos, iónicos e inmunológicos (Fig. 14). Se cree que la respuesta aguda al estrés es adaptativa, requiere energía adicional para mantener el funcionamiento de los sistemas biológicos activados por factores estresantes y provoca la desviación de fuentes de energía de otros procesos de la vida para permitir que el individuo se concentre en la supervivencia (de Fátima Pereira *et al.*, 2021). Ya que al percibir el estrés se desata una cascada de respuestas iniciada por el aumento de catecolaminas y cortisol en el torrente sanguíneo a través del eje hipotálamo-hipófisis-interrenal, lo que posteriormente

provoca cambios a nivel osmorregulatorio y celular, hematológicos y/o inmunológicos, que llevan a la respuesta terciaria al estrés donde se percibe baja resistencia a enfermedades, bajo crecimiento, nado y respiración dificultosa, alteración en el comportamiento, etc. (Fig. 15).

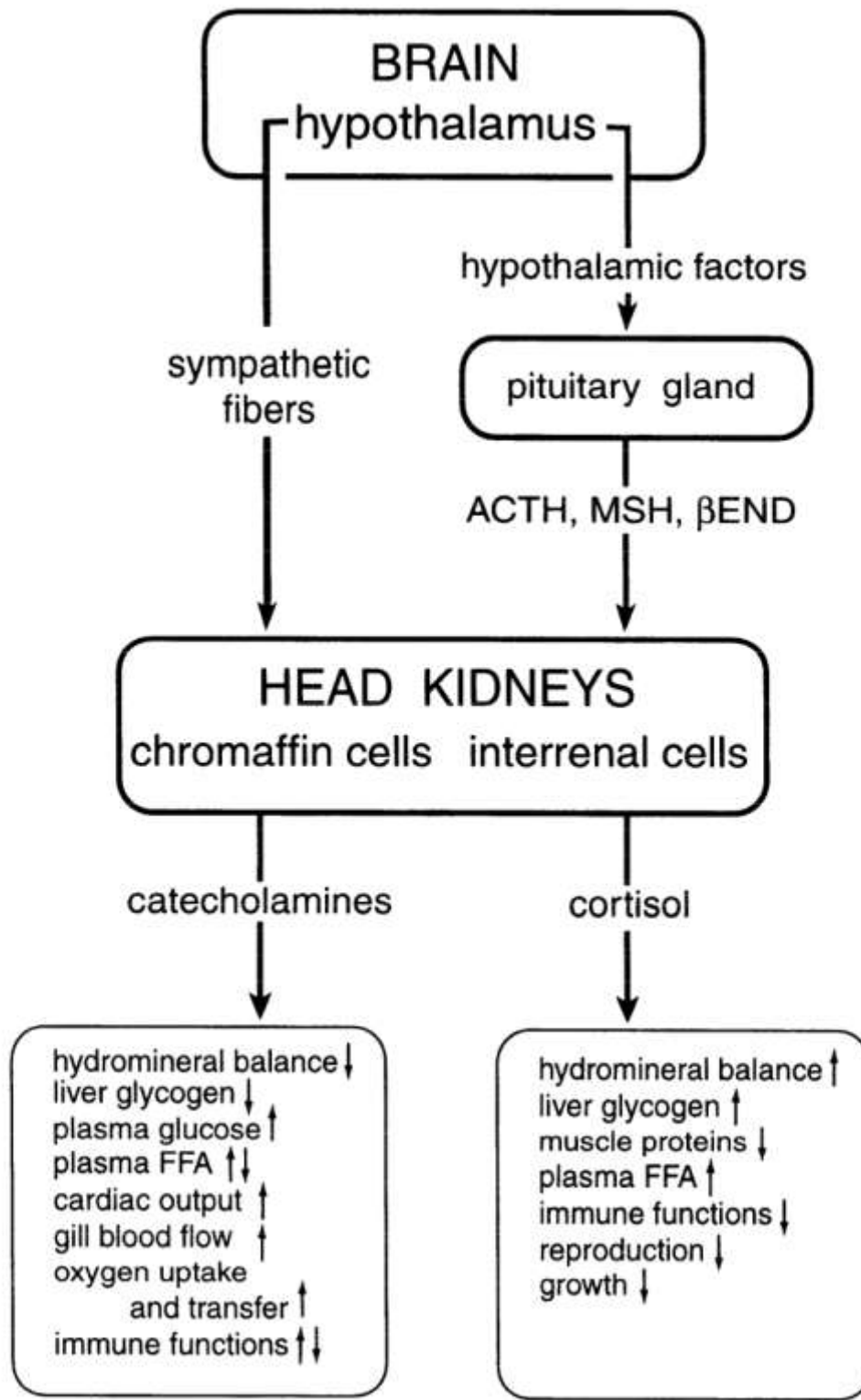


Figura 14. Diagrama general de la respuesta al estrés en teleosteos (Wendelaar-Bonga., 1997).

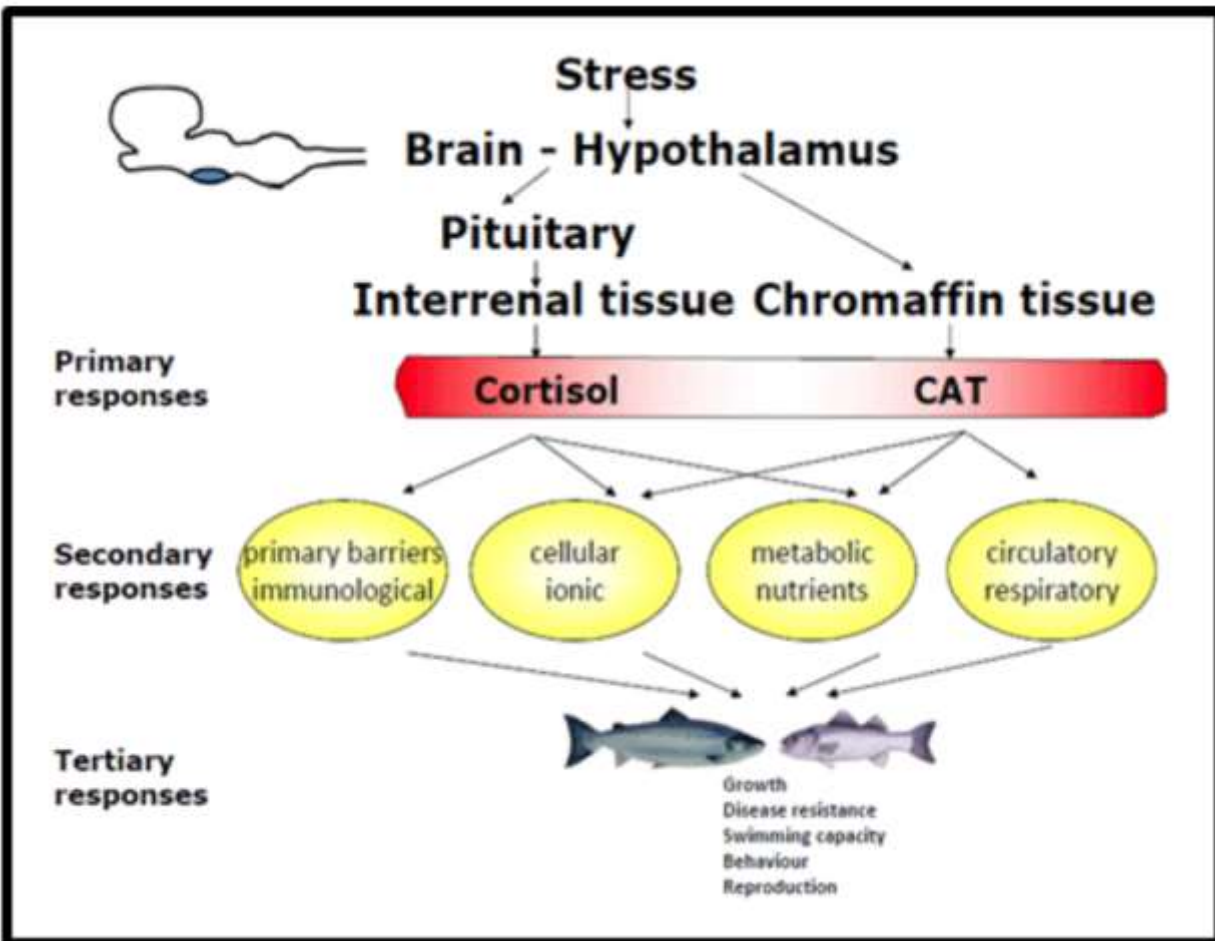


Figura 15. Sistema de respuesta al estrés en peces (Animal welfare in modern production systems for fish, 2021).

En este contexto, resulta imprescindible reducir el impacto del estrés a través de suplementos dietéticos (Shimon y Avtalion, 2021). Por tanto, la finalidad de este estudio fue evaluar el efecto de factores estresantes (exposición al aire y confinamiento/simulación de captura) en tres especies de peces de importancia comercial utilizando la suplementación de la vitamina E (α -tocoferol) en el jurel y el aminoácido triptófano (Trp) en corvina y pejelagarto sobre la capacidad antioxidante y respuesta del sistema inmune.

3. JUSTIFICACIÓN

La acuicultura es la actividad de producción de alimento de mayor crecimiento a nivel mundial, por lo que los sistemas de producción han sido intensificados, lo que podría repercutir en la aparición de enfermedades asociados al hacinamiento durante su cultivo, lo que a su vez puede provocar grandes pérdidas económicas. Es así que se ha optado por el desarrollo de alimentos funcionales, los cuales son suplementados con diferentes biomoléculas como los aminoácidos y vitaminas, entre otros aditivos. De esta forma, el uso de estos aditivos funcionales como el α -tocoferol permite mejorar la respuesta del sistema inmune ante el estrés oxidativo y la liberación de radicales libres ocasionados durante un manejo inadecuado de los peces.

De esta manera, se ha generado un gran interés por estudiar los efectos de la suplementación de diversas biomoléculas funcionales en los alimentos balanceados que son administrados a especies de importancia comercial en la acuicultura como es el caso del jurel (*Seriola rivoliana*), que se encuentra en estudio para la optimización de su cultivo industrial a nivel mundial. Por otro lado, otra especie con alta demanda en el sector comercial europeo es la corvina (*Argyrosomus regius*), por lo que se continúa en desarrollo la implementación de nuevas estrategias que permitan un mejor rendimiento de proteína, sobrevivencia y salud en el medio de cultivo. Lo mismo ocurre con el cultivo del pejelagarto (*Atractosteus tropicus*) que representa una importancia comercial regional en el sureste mexicano, y que además ya se cuenta con estudios básicos sobre su fisiología y su cultivo. Dicho lo anterior, es de vital importancia continuar con la implementación de aditivos funcionales en el alimento, como el α -tocoferol y el triptófano, con el fin de mejorar la salud y contrarrestar los posibles efectos del estrés inducido por diferentes prácticas de manejo durante el cultivo.

4. HIPÓTESIS

La adición de aditivos funcionales como el α -tocoferol y el triptófano mejoran la respuesta en condiciones de estrés de las especies en estudio (*S. rivoliana*, *A. regius* y *A. tropicus*), lo que eficientiza su producción, aumenta su capacidad inmunológica y respuesta ante el estrés ocasionado durante su cultivo. Lo anterior ha sido demostrado en otras especies donde estos compuestos son especie-dependientes, lo que permite cubrir el requerimiento de dichos aditivos en estas especies.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de aditivos funcionales alimentarios en peces de importancia comercial, sobre la capacidad antioxidante y respuesta del sistema inmune, estimulados por estresores comunes en prácticas acuícolas.

5.2 Objetivos particulares

1. Evaluar el efecto de la inclusión en el alimento de 500mg/kg del antioxidante α -tocoferol sobre el crecimiento, los niveles de melanomacrófagos y la actividad de enzimas antioxidantes durante el cultivo de juveniles de *Seriola rivoliana*.
2. Evaluar el efecto en la inclusión de triptófano al 1% en el alimento sobre los niveles de expresión de genes relacionados al sistema inmune de la corvina (*Argyrosomus regius*) expuesto a condiciones de estrés (exposición al aire y persecución).
3. Analizar el efecto de dietas suplementadas con 0%, 0.25%, 0.50%, 0.75% y 1.25% de triptófano, sobre el crecimiento de juveniles de *Atractosteus tropicus* expuesto a pruebas de estrés mediante la simulación de transporte a piscifactoría (disturbio mecánico 115 rpm) y estrés por shock térmico (18° C).

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Bioensayo 1.- The antioxidant effect and stress-protective role of α -tocopherol supplementation in compound diet on lymphoid tissues of longfin yellowtail (*Seriola rivoliana*) juveniles

6.1.1 Medidas de crianza, muestreo y crecimiento

Treinta días después de la eclosión, los juveniles de *Seriola rivoliana* (3.17 ± 0.17 g) fueron donados por la empresa Rancheros del Mar S.A. de C.V. Los peces fueron aclimatados durante una semana en el Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste SC (La Paz, Baja California Sur). El bioensayo consistió en dos tratamientos: dieta experimental suplementada con 500 mg Kg α -tocoferol⁻¹ y la dieta control (sin suplementación de α -tocoferol). El experimento se realizó por triplicado, donde cada tina de 100 L de capacidad contuvo 20 juveniles. Cada tanque estaba conectado a un sistema de circulación abierto, para lo cual se realizaron recambios de agua del 100% de las tinas cada semana. Durante el experimento, se evaluó diariamente los siguientes parámetros de calidad del agua: oxígeno disuelto ($6,0 \pm 1,0$ mg L⁻¹), temperatura (24 ± 1 °C) y la salinidad (37 ± 1 ppm). Los peces se mantuvieron bajo fotoperiodo natural (12 h de luz: 12 h de oscuridad).

A lo largo del experimento, los peces fueron alimentados 45 días con la dieta comercial Marine Mx Fish Skretting, la cual fue finamente molida (80 μ m) y posteriormente se mezcló con agua (400 mL Kg⁻¹ de dieta seca) y se añadieron los 500 mg de α -tocoferol por Kg de dieta (Ref T3376 Sigma- Aldrich, St. Louis, EE.UU.). La dieta control consistió en la misma dieta comercial que se volvió a granular sin suplementación de α -tocoferol a 2 mm de diámetro y se secó a 40 °C durante 24 h. La composición proximal de las dietas se muestra en (Tabla 1). La proteína se calculó según el método de Kjeldahl; los lípidos totales según Folch *et al* (1965); El porcentaje de humedad se calculó después de un calentamiento a 105°C y el contenido de cenizas después de la incineración (550°C) por diferencia de peso entre ellos. Ambas dietas (control y suplementada) se almacenaron a 4° C hasta su uso. La tasa de alimentación de los peces se estableció en un 5% del peso corporal por día y se ajustó a medida que los animales crecían mediante la realización de biometría quincenales. Esta investigación cumplió con los Lineamientos del Consejo de la Unión Europea (2010/63/EU) y el Gobierno de México (NOM-062—ZOO-1999) para la producción, cuidado y uso de animales de experimentación, y con los lineamientos ARRIVE.

Tabla 1. Ingredientes y composición proximal de las dietas experimentales. Los valores (n = 3 por tratamiento) se expresan como media \pm desviación estándar ($p < 0,05$). * El contenido de proteína se determinó usando factor de proteína (6.25) NFE: Extracto libre de nitrógeno: % de nutrientes no evaluados. Los valores son medias de tres determinaciones \pm DE. Extracto libre de nitrógeno (NFE) = $1000 - (\text{humedad g kg}^{-1} + \text{proteína bruta g kg}^{-1} + \text{extracto de éter g kg}^{-1} + \text{ceniza g kg}^{-1} + \text{fibra bruta g kg}^{-1})$.

Treatment	Proteins* %	Lipids %	Humidity %	ash %	NFE* %	α -tocopherol mg/100gr
Control	47.85	16.01	10.1	10.38	15.66	9.945
500mg/kg α -tocopherol	46.72	14.83	12.66	10.29	15.5	50.348

6.1.2 Evaluación y muestreo de crecimiento

Cada quince días se calculó el crecimiento (longitud total y peso corporal húmedo) y el consumo diario de alimento. Con los datos de crecimiento se calculó el Índice de Condición de Fulton (K de Fulton) para ambos tratamientos. Para cada medida biométrica, los peces fueron previamente anestesiados con 8 mL L⁻¹ de 2-Fenoxietanol (56753 Sigma-Aldrich, Missouri, United States). Al final del experimento (45 días), tres peces por tina fueron sacrificados por una dosis del anestésico, diseccionados (n=3 por tratamiento dietético) y con ello, se obtuvieron las muestras de tejido de hígado, bazo y riñón de la cabeza, se seleccionaron al azar para su posterior análisis.

6.1.3 Análisis histológicos

Para los análisis histológicos tres peces por tina fueron sacrificados con una sobredosis de 2-fenoxietanol, para obtener las muestras de riñón cefálico y bazo de cada pez se fijaron en solución de Davidson. Los tejidos fijados se deshidrataron en concentraciones ascendentes de etanol de 70% a 100%, luego se incrustaron individualmente en bloques de parafina y se seccionaron en secciones sagitales en serie (5 μ m), utilizando un micrótopo rotatorio. Los portaobjetos se tiñeron con hematoxilina-eosina (H&E) (Humason, 1979), para realizar las observaciones de melanomacrófagos (MMC). Las secciones de tejido se montaron permanentemente en resina sintética (Entellan, Merck Millipore). Las secciones se examinaron al azar con un microscopio óptico y se digitalizaron a alta resolución (600 dpi; 20 \times) y se procesaron tres imágenes seleccionadas al azar con el software Image-Pro Premier v.9.0 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, EE.UU.). El porcentaje de cobertura para MMC en el riñón y el bazo de la cabeza del juvenil de *Seriola rivoliana* se realizó por la acumulación de pigmentos resultantes del daño celular. En todos los casos, el método estandarizado de análisis de imágenes de Rodríguez-Jaramillo *et al.* (2008), fueron adoptados:

$$\text{HK-MMC (\%)} = \text{MMCA/TIA} \times 100 \quad (1)$$

$$\text{Spleen-MMC (\%)} = \text{MMCA/TIA} \times 100 \quad (2)$$

Donde MMCA, melanomacrfagos área (en μm^2), y TIA es el área total de la imagen (μm^2), HK-MMC melanomacrófagos en el riñón cefálico y bazo-MMC melanomacrófagos en el bazo.

6.1.4 Actividades enzimáticas antioxidantes

Los segmentos de tejido (bazo e hígado) se homogeneizaron usando Ultraturax en 5 volúmenes (w / v) de agua destilada fría (4 °C) y se centrifugaron a 16,000 g por 15 minutos a 4 °C . El sobrenadante se recuperó y se almacenó a -80 °C hasta su uso. Los niveles de glutatión peroxidasa (GPx) de hígado y bazo se determinaron cinéticamente usando el kit de ensayo de actividad celular de glutatión peroxidasa (Sigma-Aldrich, MI, EE.UU.). Las actividades de la enzima catalasa hepática y del bazo (CAT) se determinaron utilizando el kit cinético específico (Cayman Chem., Ann Arbor, MI, EE.UU.). Se utilizó el kit de ensayo de superóxido dismutasa (SOD) (Sigma-Aldrich Corp., MI, EE.UU.) para examinar las actividades en el bazo y el hígado. Las actividades de las enzimas antioxidantes se normalizaron con el contenido de proteínas solubles utilizando la técnica de Bradford (1975).

6.1.5 Análisis estadístico

Para verificar la distribución normal de peso, crecimiento e índice de Fulton se utilizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov y para los análisis histológicos se dispuso la prueba de Shapiro-Wilk. Como los datos cumplen con estos supuestos de la estadística paramétrica, se realizó un análisis de prueba de Student-T y Wilcoxon para determinar la existencia de diferencias entre tratamientos (P <0.05). Para todos los análisis se utilizó el software Graph Pad Prism 9 (La Jolla, CA, EE. UU.).

6.2 Bioensayo 2.- Stressors Due to Handling Impair Gut Immunity in Meagre (*Argyrosomus regius*): The Compensatory Role of Dietary L-Tryptophan

6.2.1 Mantenimiento de peces y dietas experimentales

Los peces utilizados en este ensayo (n= 150) se obtuvieron de la Estación piloto de piscicultura en Olhão (EPPO) del Instituto Portugués de la Atmósfera y el Mar (EPPO-IPMA, Olhão, Portugal) y mantenido en cuatro tanques de recirculación de agua de mar (600 L; 25 peces cada uno) en el IFAPA Centro Agua del Pino (Cartaya, España).

El peso corporal (BW) de los peces fue 105.0 ± 2.6 g (media \pm desviación estándar). La temperatura del agua se mantuvo a 19.0 ± 1.0 ° C con un caudal de $2 \text{ m}^3 \text{ h}^{-1}$ y 33 PSU. El fotoperiodo fue natural (N37 ° 13'4.31"), y los peces fueron alimentados con una dieta comercial (L4-Alterná, Skretting, Burgos, España; 47% de proteínas, 20% de lípidos, 7% de ceniza, 4% de celulosa, 1% de fósforo total y 18 MJ kg^{-1} energía) a una tasa de alimentación del 1% de peso corporal por día⁻¹. Se aclimataron los peces a las condiciones experimentales durante 21 días antes del inicio de la prueba.

Para el estudio, la misma dieta comercial que se utilizó durante el proceso de aclimatación se usó para la alimentación durante la fase del estudio. En particular, los pellets se molieron finamente y luego se mezcla con agua (400 ml kg^{-1} pienso seco) y Trp (Ref. T0254; Sigma-Aldrich, St. Louis, EE. UU.) para lograr una concentración final del 1% en peso seco. Luego, la mezcla se granuló en 2 mm de diámetro y se cortó en tiras de 20-25 cm longitud donde se secaron a 60°C durante 24 h, para posteriormente cortar en gránulos de 2 a 3 mm de tamaño. Al mismo tiempo, la mitad del alimento comercial se volvió a granular sin la suplementación de Trp, y este lote de pienso se utilizó como dieta de control. Ambas dietas, control (C) y experimental (T) se almacenaron a 4°C hasta su uso.

6.2.2 Diseño experimental

Los peces fueron alimentados durante 7 días (dos tanques por tratamiento) antes de evaluar el impacto del estrés por manejo sobre la inmunidad local del intestino. Se utilizaron los dos tipos de factores estresantes anteriormente descritos por González-Silvera *et al* (2018). Un tratamiento de estrés por exposición al aire (A), en el que todos los peces de cada tanque experimental fueron capturados con la red y se mantuvieron fuera del agua durante 3 minutos, y luego se regresaron a sus respectivos tanques experimentales; y un tratamiento de estrés por confinamiento/simulación de captura (N), en el que los niveles de agua en los tanques experimentales se redujeron (hasta 20 cm) y luego, los peces fueron perseguidos con una red (sin exposición al aire) durante 3 min. Este procedimiento se repitió cada 10 min durante 1 h. Al finalizar ambos tratamientos (A y N), los peces fueron sacrificados y se recolectaron muestras de intestino a la 1 y 6 h post-estrés (1H y 6H). Para evaluar si los factores estresantes tuvieron un impacto en la función inmunológica intestinal local en corvina, y para establecer una línea de base para estudios comparativos se colectaron muestras de cada grupo experimental (C y T = control y dietas con triptófano, respectivamente), las cuales fueron tomadas antes de los episodios de estrés (B = línea de base).

Para fines de muestreo de tejidos, los peces de ambos tratamientos fueron sacrificados en los diferentes puntos de muestreo (B, 1H y 6H) con una sobredosis de anestésico ($> 1 \text{ ml L}^{-1}$ 2-fenoxietanol, Sigma, EE. UU.). Los peces ($n= 6$ por punto de muestreo y condición experimental) fueron disectados para obtener su sistema digestivo y una porción del intestino anterior (aprox. 1 cm de longitud). Cada porción del intestino incluía mucosa, submucosa y fibras musculares, ya que la fina capa muscular no se pudo eliminar de las muestras intestinales. Luego, las muestras de tejido se fijaron a 4°C durante 24 h en RNAlater[®] (Invitrogen, Waltham, EE. UU.) y congelado a -80°C hasta el análisis (Extracción de ARN).

El experimento cumplió con las directrices del Consejo de la Unión Europea (2010/63/UE) y Gobierno de España (RD1201/2005; RD53/2013 y ley 32/2007) para el uso de animales de laboratorio. Todos los protocolos experimentales fueron aprobados por el Comité de Ética de la IFAPA (Sevilla, España).

6.2.3 Extracción de ARN total y síntesis de cDNA

El ARN total del intestino anterior se extrajo utilizando el kit Mini RNeasy (Qiagen, Hilden, Alemania) según instrucciones del fabricante. La concentración y pureza del ARN se determinó

por espectrofotometría (NanoDrop2000, Thermo Fisher Scientific, Madrid, España) midiendo la absorbancia en $\lambda = 260$ y 280 nm. La integridad del ARN extraído fue verificada con visualización de las bandas de ARN ribosómico 28S y 18S por separación electroforética en un gel de agarosa al 1,2%. Para la síntesis de cDNA, el ARN se transcribió de forma inversa en $20 \mu\text{l}$ por volumen de reacción con $2 \mu\text{g}$ de ARN total usando SuperScript™ Sistema de síntesis de primera cadena para RT-PCR (Invitrogen, Waltham, EE. UU.) Con oligo (dT) ($0,5 \mu\text{g} \mu\text{l}^{-1}$), primers hexámeros aleatorios ($50 \text{ ng} \mu\text{l}^{-1}$) y 10 mmol L^{-1} de mezcla de dNTP, tampón RT $10 \times$ [200 mmol L^{-1} de Tris-HCl (pH = 8.4), 500 mmol L^{-1} de KCl], 25 mmol L^{-1} MgCl_2 , $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ DTT, RNaseOUT ($40 \text{ U} \mu\text{l}^{-1}$), y SuperScript™ II RT, seguido de tratamiento con ARNase H. El cDNA resultante se diluyó 1:20 en agua tratada con DEPC, y las diluciones preparadas se utilizaron para el análisis de la expresión génica.

6.2.4 qPCR en tiempo real

Las reacciones de qPCR se realizaron para los seis individuos por tratamiento por duplicado en un CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, Madrid, España). Cada reacción ($20 \mu\text{l}$) contenía $10 \mu\text{l}$ de SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix (Life Technologies, Carlsbad, California, EE. UU.), $0,50 \mu\text{l}$ primer sentido, $0,50 \mu\text{l}$ de primer antisentido, $2 \mu\text{l}$ de muestra de cDNA, y $7 \mu\text{l}$ de agua libre de ARNasa/DNasa. El protocolo de la qPCR en tiempo real comenzó con 95°C durante 3 min, seguido de 40 ciclos de 15 s 95°C seguido de 30 s a la temperatura específica de anileamiento para cada par de primers, seguido por 30 s a 72°C con un paso final de curva de fusión para establecer la curva estándar para cada amplicón. Se calculó la expresión relativa utilizando el software CFX Manager 3.0 (Bio-Rad, Madrid, España), con factor de elongación 1 alfa ($\text{EF}1\alpha$) e hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa (HPRT) como controles endógenos, mientras que las muestras basales (pre-estrés) de los grupos de control y Trp fueron utilizados para normalizar la cuantificación relativa dentro de cada grupo de dieta experimental. Todas las muestras se procesaron por duplicado con un control negativo (sin enzima RT) incluido para confirmar ausencia de contaminación por ADN genómico y un adicional control negativo en cada placa que no contiene cDNA.

6.2.5 Análisis estadístico

Para determinar las diferencias entre la expresión génica de las dietas experimentales y el tiempo de exposición al estrés, se verificaron todos los datos para normalidad (prueba de Kolmogorov) y homocedasticidad (prueba de Levene), y analizado por ANOVA bidireccional usando Tukey como prueba post hoc, con un nivel de significancia de 0.05 utilizando el software estadístico Statistica 7 (StatSoft, Inc., EE. UU.). Estos resultados fueron evaluados utilizando un análisis de respuesta de superficie para una visualización más clara. Un heatmap para visualizar diferentes patrones en la expresión genética. también se realizó mediante GraphPad Prism versión 7 (Software GraphPad, La Jolla, California, EE. UU.). Con el fin de evaluar si ambos factores estresantes probados tuvieron un impacto en inmunidad intestinal en peces alimentados con la dieta C, niveles de expresión génica en muestras de intestino de peces antes del estrés (CB) y muestras tomadas 1 h después de ambos tratamientos de estrés (CA1H y CN1H) se compararon mediante el software de expresión relativa análisis de la herramienta (REST) 2009 (v2.0.13). Finalmente, se realizó un análisis de componentes (PCA) para discriminar

genes expresión e identificar los tratamientos asociados con 1% Trp suplementación y factores estresantes, así como para minimizar la influencia de variaciones interindividuales.

6.3 Bioensayo 3.- L-Tryptophan immune modulation in tropical gar (*Atractosteus tropicus*) under stress by thermal shock and mimic transport to hatcheries

6.3.1 Obtención de la muestra

Los juveniles de pejelagarto *Atractosteus tropicus* (21.4 ± 5.23 g), fueron obtenidos de un lote de reproductores del Laboratorio de Aprovechamiento de Recursos Acuáticos (LAFIRA) de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco en la División Académica De Ciencias Biológicas., Una vez aclimatados los peces, se inició el bioensayo que duró 45 días en donde se realizaron biometrías cada 15 días para monitorear el crecimiento.

El protocolo de alimentación se estableció proveyéndoles el 5% de acuerdo a la biomasa total, y ajustándola periódicamente conforme los peces crecían. Las biometrías se realizaron cada 15 días durante los 45 días que duró el ensayo nutricional. Al término de éste, los peces fueron previamente anestesiados con aceite de clavo al 1% para obtener las muestras de tejidos para sus análisis posteriores.

El bioensayo constó de cinco tratamientos (dosis de suplementación de triptófano al alimento: 0%, 0.25%, 0.50%, 0.75% y 1.25%) con tres réplicas por tratamiento, para lo cual se mantuvieron 15 juveniles por tina, con capacidad de 100 L, bajo un sistema de recirculación. A su vez, los parámetros de calidad del agua fueron monitoreados diariamente, temperatura 26 ± 1 °C con fotoperiodo natural.

6.3.2 Preparación de alimentos

Para la preparación de los alimentos experimentales, se tamizaron las harinas y utilizó el protocolo de acuerdo al procedimiento de Sepúlveda-Quiróz y colaboradores (2020) (Tabla 2) , en donde se suplementaron los alimentos con los porcentajes 0% para el control, 0.25%, 0.50%, 0.75% y 1.25% de triptófano.

Adicionalmente, se colectaron muestras de alimento para verificar las concentraciones finales de triptófano en las dietas experimentales, lo cual se realizó en el laboratorio de la Facultad de Ciencias Marinas de la UABC, México (Tabla 3).

Tabla 2. Composición proximal de las dietas experimentales. Los valores (n=9 por tratamiento) se expresan como media \pm desviación estándar. *El contenido de proteína se determinó usando factor de proteína (6.25) NLN: Extracto libre de nitrógeno: % de nutrientes no evaluados. Los valores son medias de tres determinaciones \pm DE. Extracto libre de nitrógeno (NFE) = 1000-(humedad g kg⁻¹ + proteína cruda g kg⁻¹ + extracto de éter g kg⁻¹ + ceniza g kg⁻¹ + fibra bruta g kg⁻¹).

Composición proximal (g kg⁻¹)	
Proteína cruda	43.99 \pm 1.57
Extracto etéreo	15.01 \pm 0.93
Fibra	1.53 \pm 0.04
Ceniza	3.51 \pm 0.05
ELN	56.00

Tabla 3. Concentración de aminoácidos en dietas experimentales en pejelagarto (*Atractosteus tropicus*).

Amino acid	Treatments				
	TABASCO 0 %	TABASCO 0.25 %	TABASCO 0.5 %	TABASCO 0.75 %	TABASCO 1.25 %
<i>Essential amino acids</i>					
HIS	1.2	1.2	1.1	1.1	1.1
ARG	3.9	3.9	3.8	4.0	3.8
THR	1.5	1.4	1.5	1.4	1.5
VAL	1.6	1.8	1.8	1.8	1.8
MET	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
LYS	2.8	2.7	2.6	2.6	2.7
ILE	1.4	1.4	1.3	1.3	1.3
LEU	3.1	3.1	3.0	3.1	3.0
PHE	1.7	1.7	1.6	1.6	1.6
TRP	1.1	1.2	1.4	1.5	1.6
subtotal	19.2	19.4	19.3	19.4	19.4
<i>Non-essential amino acids</i>					
ASP	2.2	2.2	2.2	2.2	2.1
SER	1.9	1.9	1.9	1.9	1.9
GLU	5.7	5.7	5.7	5.6	5.6
GLY	5.7	5.6	5.5	5.8	5.4
ALA	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
PRO	0.4	0.3	0.5	0.3	0.4
HYP	0.3	0.3	0.4	0.3	0.4
CYS	nd	nd	nd	nd	nd
TYR	1.2	1.2	1.3	1.3	1.5
subtotal	20.4	20.3	20.4	20.2	20.3

6.3.3 Pruebas de estrés

Se realizó el primer muestreo previo al estrés que representó el tiempo 0 (pre exposición al estrés), para una vez finalizado el ensayo nutricional se realizó una prueba de estrés por choque térmico con una exposición a 18 °C durante dos horas (90 min sin aceite de clavo y los últimos 30 minutos con aceite de clavo al 0.15%) en un estanque de 20 litros a 9 peces por tratamiento y se procedió al muestreo (Figura 23).

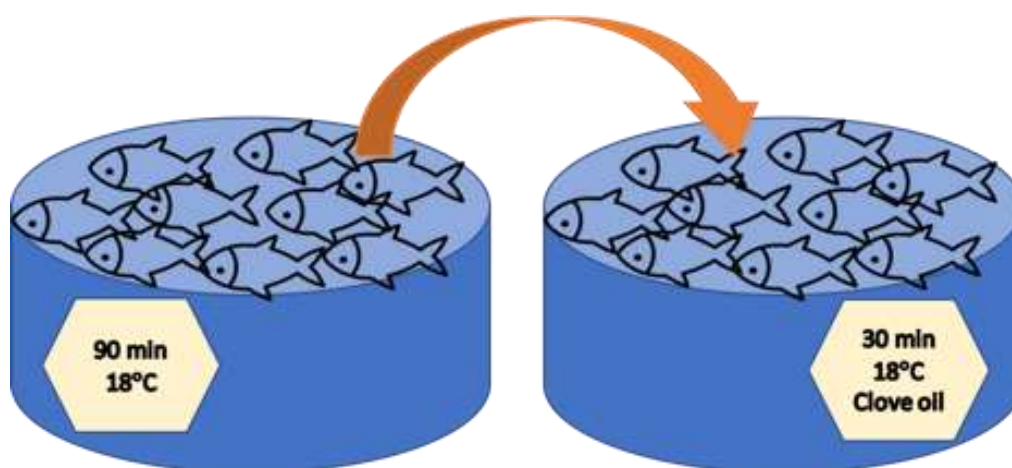


Figura 16. Técnica de estrés por shock térmico en juveniles de pejelagarto *Atractosteus tropicus*.

Por otro lado, se realizó la prueba de estrés por disturbio mecánico/simulación de transporte a 120 revoluciones por minuto en una incubadora orbital Shel Lab Si4 (Sheldon Manufacturing Inc.) durante dos horas a temperatura ambiente 32 °C en todos los tratamientos y se procedió al muestreo (Figura 24).

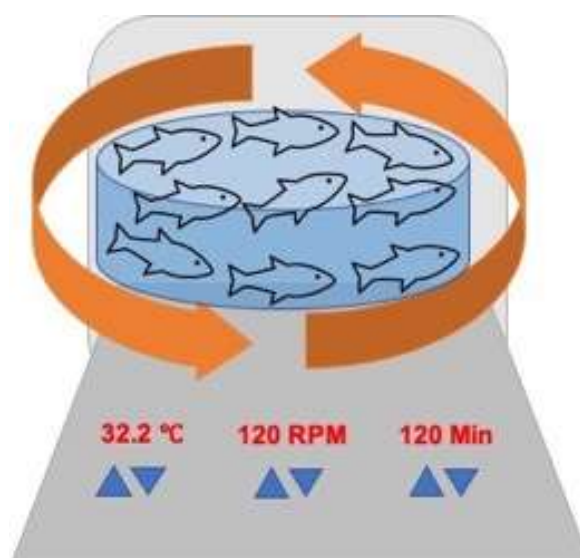


Figura 17. Exposición a estrés simulando el transporte en juveniles de pejelagarto *Atractosteus tropicus*.

6.3.4 Análisis estadísticos

Para la evaluación del crecimiento, se realizaron las pruebas de normalidad y homoscedasticidad con las pruebas de Kolmogorov-Smirnov y Levene, respectivamente; como los datos si cumplieron estos supuestos de la estadística paramétrica, se realizó un análisis de varianza de una vía para determinar la existencia de diferencias entre tratamientos ($P < 0.05$) para cada criterio de calidad y la prueba a posteriori de Tukey. Los análisis estadísticos se realizaron con el software Graph Pad Prism 9 (La Jolla, CA, EE. UU).

7. RESULTADOS

7.1 Bioensayo 1.- The antioxidant effect and stress-protective role of α -tocopherol supplementation in compound diet on lymphoid tissues of longfin yellowtail (*Seriola rivoliana*) juveniles

Las dietas de control y experimental probadas tenían isonitrógeno similares (15,66-15,5%), contenido de extracto de éter (16,01-14,83%) y contenido de ceniza 10,38-10,29% respectivamente, (Tabla 1). El crecimiento de los peces y el factor de condición de Fulton (K) no mostraron diferencias significativas entre ambos tratamientos (Dieta suplementada con vit E y control). Sin embargo, se puede resaltar que la K de ambos tratamientos mostraron valores muy buenos durante el experimento con valores de 1.4 y 1.5 para los peces alimentados con la dieta suplementada con 500 mg kg de α -tocoferol⁻¹ y la dieta de control, respectivamente (Fig. 13).

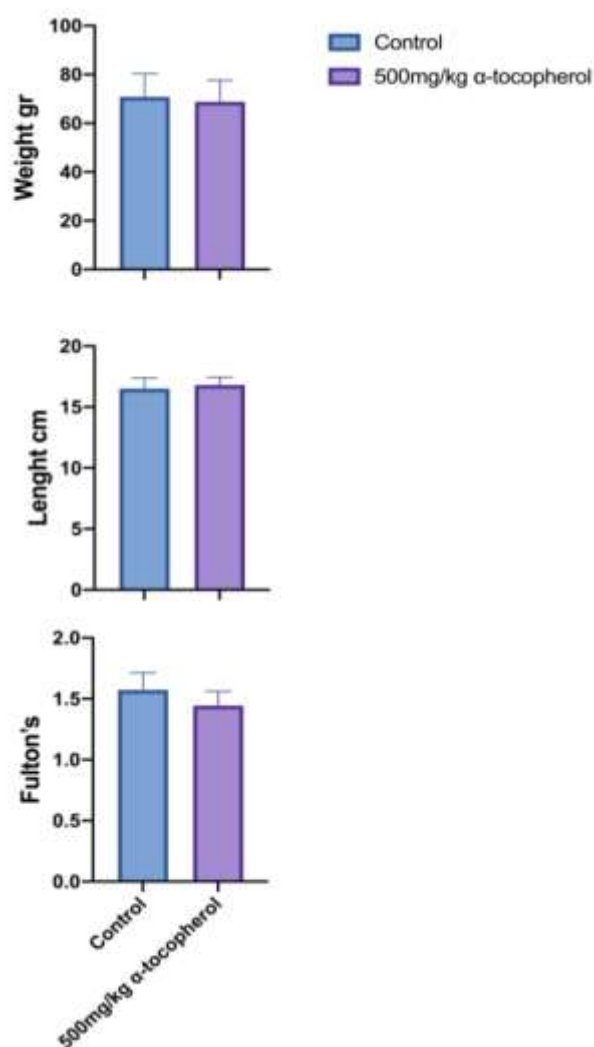


Figura 18. Crecimiento final del jurel alimentado con dos dietas experimentales diferentes durante 50 días de prueba. Parámetros expresados por Peso (gr), Longitud (cm) y Factor de condición (K). Los valores (n = 3 por tratamiento dietético) se expresan como media \pm desviación estándar ($p < 0.05$).

El bazo estaba rodeado por una cápsula que presentaba un epitelio cúbico simple y tejido conectivo delgado, de donde emergían trabéculas irregulares que se extendían hacia el parénquima. En *S. rivoliana*, el parénquima esplénico estaba compuesto por una red de células reticulares alimentadas por sinusoides vasculares. Las MMC de los organismos de control y tratados se observaron sostenidas por colágeno rodeado de elipsoides, estructuras generalmente redondeadas con un centro capilar y revestidas con un epitelio cuboide simple. El riñón de *S. rivoliana* es un órgano mixto que comprende elementos hematopoyéticos, reticuloendoteliales, endocrinos y excretorios cuya arquitectura celular básica es similar a otro teleosteo. Las MMC se distinguen histológicamente dentro del tejido por presentar macrófagos con pigmentos distintos como melanina, hemosiderina y lipofuscinas.

El porcentaje de cobertura de MMC en los juveniles de *Seriola rivoliana* del riñón cefálico fue estadísticamente mayor ($p < 0.05$) para los peces alimentados con la dieta control (4,1%) en comparación con los peces alimentados con la dieta suplementada con la Vit E (1.9%). Mientras tanto, el área de cobertura de MMC en el bazo para los peces alimentados con la dieta control (2.8%) fue estadísticamente mayor ($p < 0.05$) en comparación con los peces alimentados con dieta suplementada con α -tocoferol (1.2%) (Figuras 14 y 15).

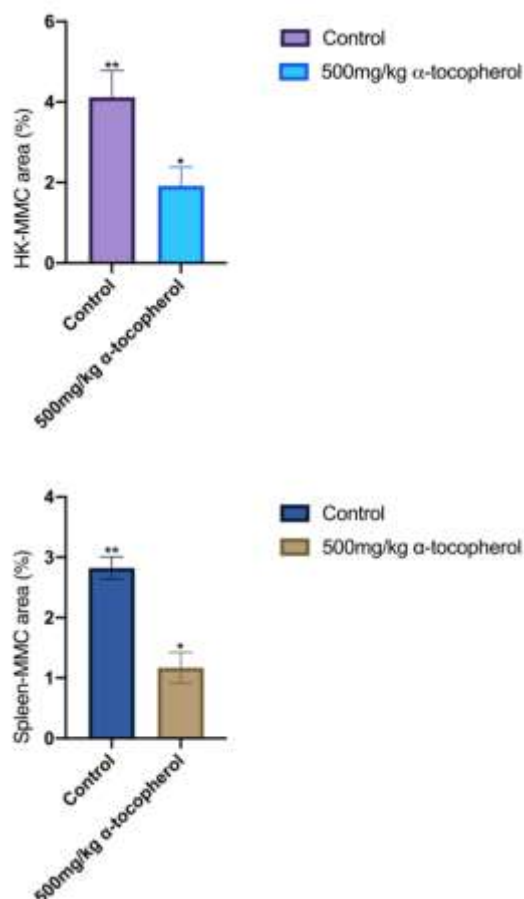
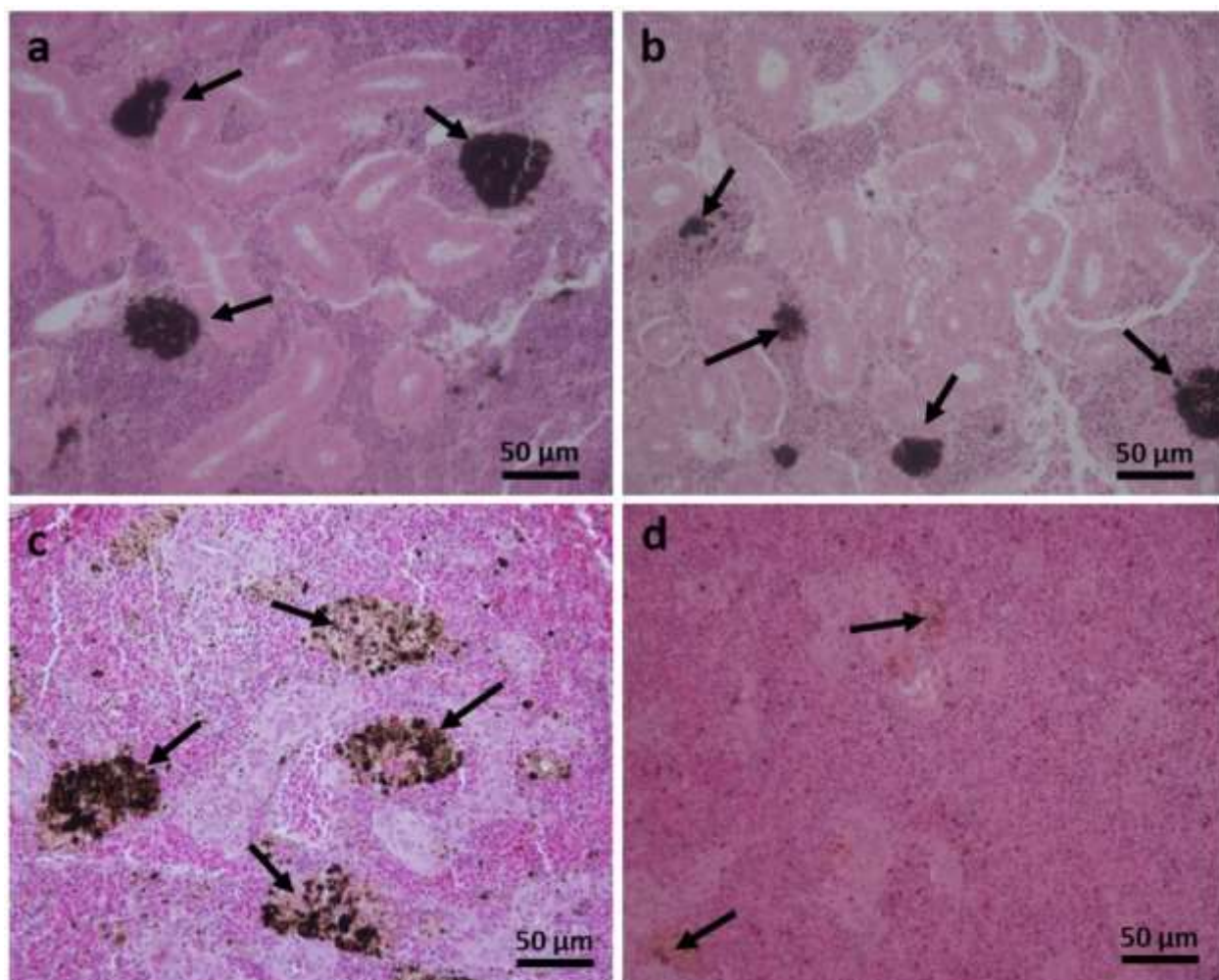


Figura 19. Porcentaje de área de cobertura de melanomacrófagos de riñón de cefálico (HK-MMC) y porcentaje de área de cobertura de melanomacrófagos de bazo (Bazo-MMC) en el grupo de control y complementado con 500 mg / kg de tratamiento con α -tocoferol. Los valores ($n = 3$ por tratamiento dietético) se expresan como media \pm desviación estándar. Los asteriscos muestran diferencias estadísticas entre tratamientos ($p < 0.05$).



Control

500 mg/kg α -tocopherol

Figura 20. Características de los melanomacrófagos con tinción H&E de *Seriola rivoliana* en: a) Riñón cefálico del grupo Control. b) Riñón cefálico de pez alimentado con dieta suplementada (500 mg / Kg de α -tocoferol). c) Bazo del grupo Control. d) Bazo de peces alimentados con dieta suplementada (500 mg / kg de α -tocoferol). Aumento de 40 \times flechas indican MMC.

La actividad de la enzima superóxido dismutasa ($\text{U mg proteína}^{-1}$) no mostró diferencias significativas entre los tratamientos para ninguno de los tejidos, aunque se observa un valor mayor en el riñón cefálico en los peces alimentados con la dieta suplementada con $500 \text{ mg Kg } \alpha\text{-tocoferol}^{-1}$. La actividad de la catalasa ($\text{nmol mg de proteína}^{-1}$) no mostró diferencias significativas entre los grupos experimentales para ninguno de los tejidos. Por otro lado, la actividad glutatión peroxidasa ($\text{U mg proteína}^{-1}$) mostró una mayor actividad ($p < 0.05$) en el riñón cefálico para peces alimentados con tratamiento suplementado con $500 \text{ mg Kg de } \alpha\text{-tocoferol}^{-1}$. En el bazo, la actividad GPx fue estadísticamente diferente para los peces alimentados con la dieta control ($p < 0.05$) en comparación con los peces alimentados con la dieta suplementada con el α -tocoferol (Fig. 16).

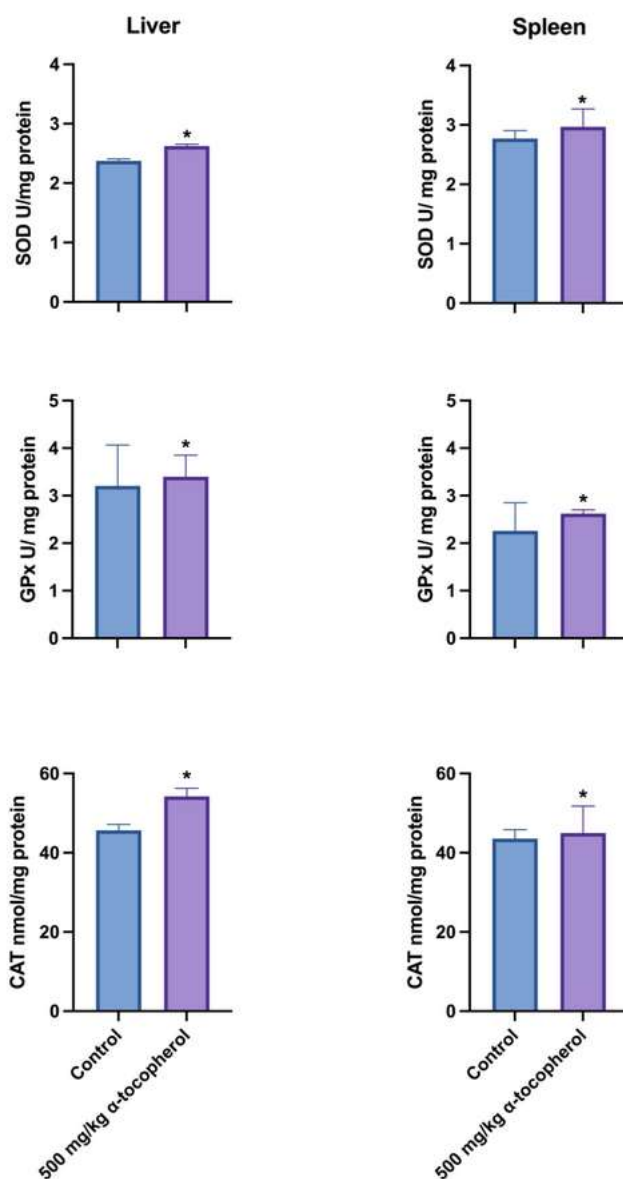


Figura 21. SOD: actividad superóxido dismutasa ($\text{U mg proteína}^{-1}$), GPx: actividad glutatión peroxidasa ($\text{U mg proteína}^{-1}$) y CAT: actividad catalasa ($\text{nmol mg proteína}^{-1}$). Los valores ($n = 3$ por tratamiento dietético) se expresan como mediana \pm rango intercuartil. Los asteriscos muestran diferencias estadísticas entre tratamientos ($p < 0.05$).

7.2 Bioensayo 2.- Stressors Due to Handling Impair Gut Immunity in Meagre (*Argyrosomus regius*): The Compensatory Role of Dietary L-Tryptophan

En el presente estudio, la expresión génica de varios genes clave del sistema inmunológico innato y humoral se evaluó en los juveniles de *A. regius* alimentados con dietas C y T antes y después de la exposición al aire (A) y factores estresantes de confinamiento/compensación (N). Respecto al estrés por exposición al aire, se detectó una regulación positiva en la expresión génica (asteriscos) entre las muestras de intestino tomadas antes del episodio de estrés y 1 hps para los genes *c3*, *lys*, *cox2*, *il-10*, *def* y *hep* en peces alimentados con la dieta C (análisis REST, $p < 0.05$). Respecto a los resultados de peces alimentados con la dieta T, varios genes (*lys*, *cox2*, *def* y *hep*) no mostró diferencias estadísticas ($p > 0.05$) en los patrones de expresión génica cuando los peces estaban estresados por la exposición al aire. Sin embargo, *gapdh*, complemento *c3*, *ifn1*, *mxp*, *tnf1a* e *il-10* mostraron la máxima expresión debido a la exposición al aire ($p < 0.05$) a 1 hps (TA1H) y la expresión más baja a las 6 hps (TA6H) en peces alimentados con la suplementación con 1% de Trp, mientras que *il-1b* y *pis* mostraron la expresión más alta con la exposición al aire ($p < 0.05$) a las 6 hps (TA6H) cuando los peces fueron alimentados con la dieta Trp (Figuras 17, 18).

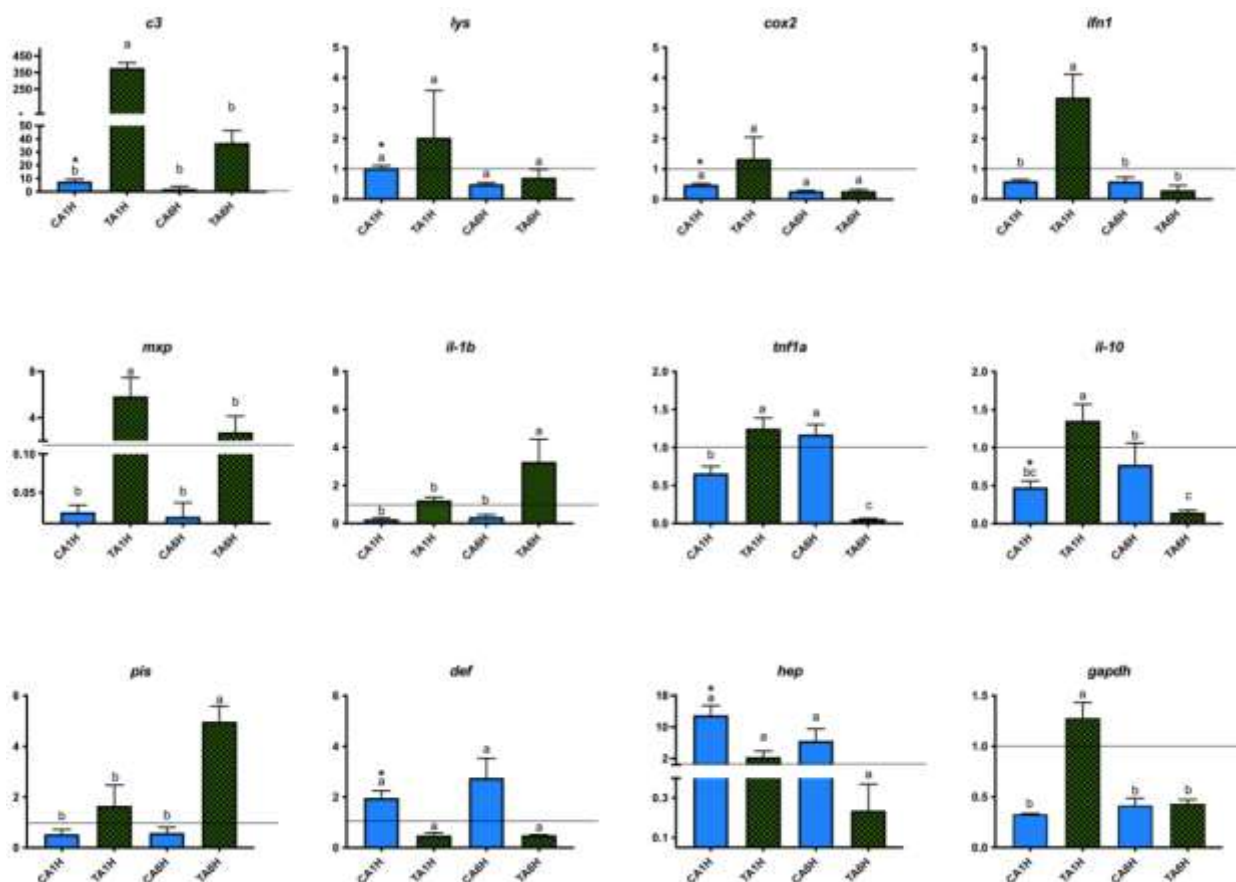


Figura 22. Niveles de expresión génica en tejido linfóide asociado al intestino (GALT) después de la exposición al aire como factor estresante 1 y 6 h después del estrés. qPCR cuantitativa de marcadores específicos de ARNm de procesos de respuesta inmune innata (proteína del complemento *c3*, lisozima, *cox2*, *mxp*, piscidina, defensina y hepcidina), citocinas inmunes (*ifn*, *il-1b*, *tnf1a* e *il-10*) y *gapdh*, normalizados con factor de elongación 1 α e hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa (n = 6 por grupo experimental). Asterisco muestra diferencias entre las muestras de control sin estrés (peces en reposo) y las muestras de control después de 1 h de prueba de estrés de exposición al aire sin suplementación de Trp al 1% (Análisis REST), mientras que letras diferentes denotan diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales (ANOVA dos vías). C, alimentación de control; T, alimentación de Trp al 1%; A, factor estresante de la exposición al aire; 1H / 6H, 1/6 h post-estrés.

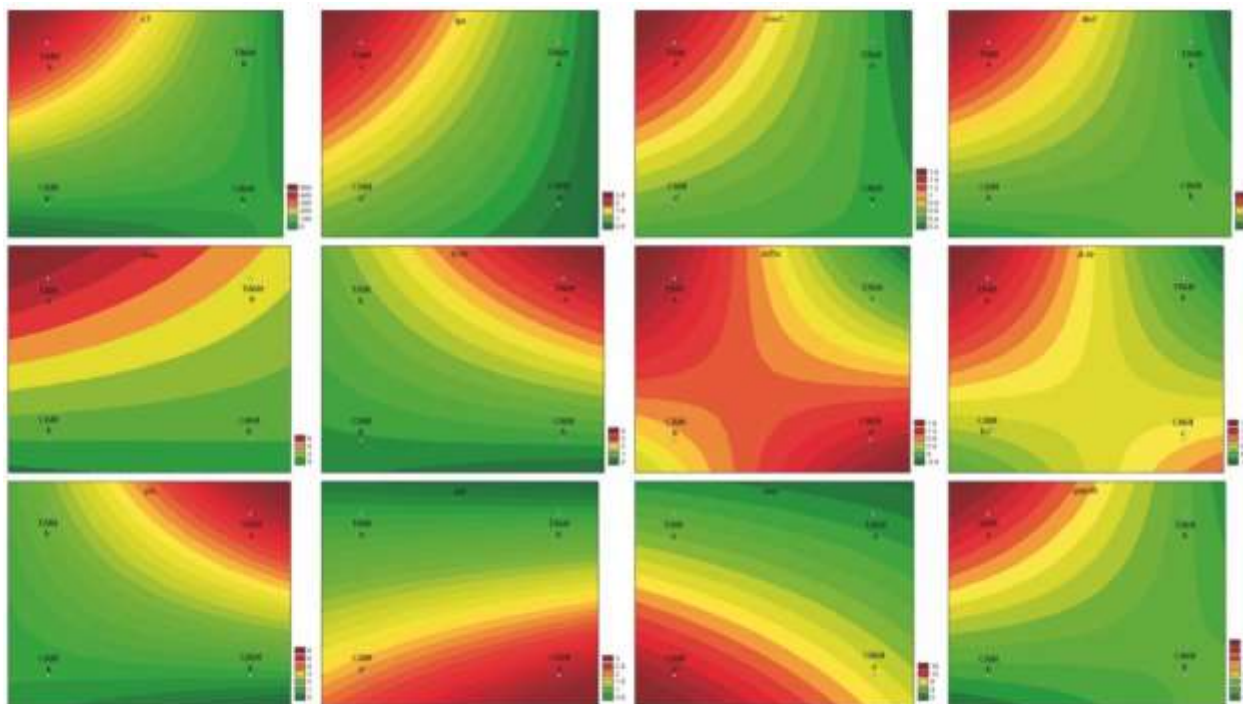


Figura 23. Visualización de la expresión génica del tejido linfoide asociado al intestino (GALT) después de la exposición al aire como factor estresante 1 y 6 h después del estrés por medio de análisis de superficie de respuesta. qPCR de marcadores de ARNm específicos de procesos de respuesta inmune innata (proteína del complemento *c3*, lisozima, *cox2*, *mxp*, piscidina, defensina y hepcidina), citocinas inmunes (*ifn*, *il-1b*, *tnf1a* e *il-10*) y *gapdh*, normalizadas con factor de elongación 1a e hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa (n = 6 por grupo experimental). El asterisco muestra diferencias entre las muestras de control sin estrés (peces en reposo) y las muestras de control después de 1 h de prueba de estrés de exposición al aire sin suplementación con 1% de Trp (análisis REST), mientras que letras diferentes denotan diferencias estadísticamente significativas entre grupos (ANOVA dos vías). C, alimentación de control; T, alimentación de Trp al 1%; A, factor estresante de la exposición al aire; 1H / 6H, 1/6 h post-estrés.

El estrés por confinamiento utilizando la red resultó en un alto nivel de expresión génica (asteriscos) en los genes *lys*, *ifn1*, *tnf1a*, *il-10*, *pis*, *def* y *hep* en peces alimentados con la dieta C (Figura 19; Análisis REST, $p < 0,05$). Por su parte, los resultados de la expresión génica de peces alimentados con la dieta T y expuestos al estrés de confinamiento/red, mostraron la mayor expresión a 1 hps ($p < 0,05$), mientras los valores de expresión más bajos se detectaron en los tratamientos TN1H y TN6H, respectivamente para *gapdh*, complemento *c3*, *cox2* y *mxp*. Por otro lado, la expresión génica de *lys*, *ifn1*, *tnf1a*, *il-10*, *pis* y *hep* fue elevada cuando la corvina estuvo expuesta al estrés de confinamiento/simulación de captura, pero solo con la dieta control a 1 hps (CN1H), mientras que para el grupo CN6H (6 hps) mostró una baja expresión de *il-1b* y una alta expresión para *def* (Figura 20).

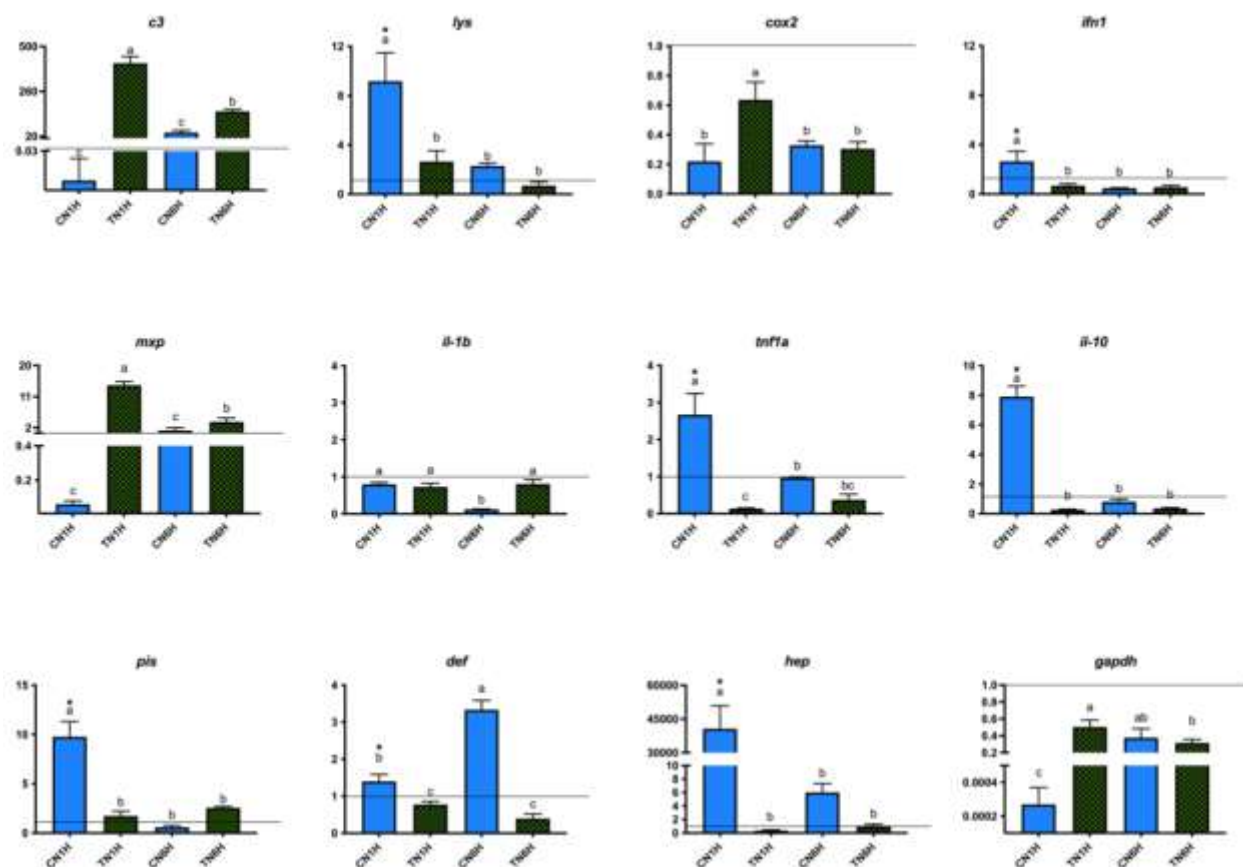


Figura 24. Niveles de expresión génica en tejido linfoide asociado al intestino (GALT) después del estrés por confinamiento (manipulación de redes) a 1 y 6 h después del estrés. qPCR de marcadores específicos de ARNm de procesos de respuesta inmune innata (proteína del complemento *c3*, lisozima, *cox2*, *mxp*, piscidina, defensina y hepcidina), citocinas inmunes (*ifn*, *il-1b*, *tnf1a* e *il-10*) y *gapdh*, normalizados con factor de alargamiento 1a e hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa (n = 6 por grupo experimental). Asterisco muestra diferencias entre las muestras de control sin estrés (peces en reposo) y las muestras de control después de 1 h de confinamiento de aire / prueba de esfuerzo con redes sin suplementación con 1% de Trp (Análisis REST), mientras que letras diferentes denotan diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales (ANOVA dos vías). C, alimentación de control; T, alimentación de Trp al 1%; N, tensión de compensación; 1H / 6H, 1h / 6h post-estrés.

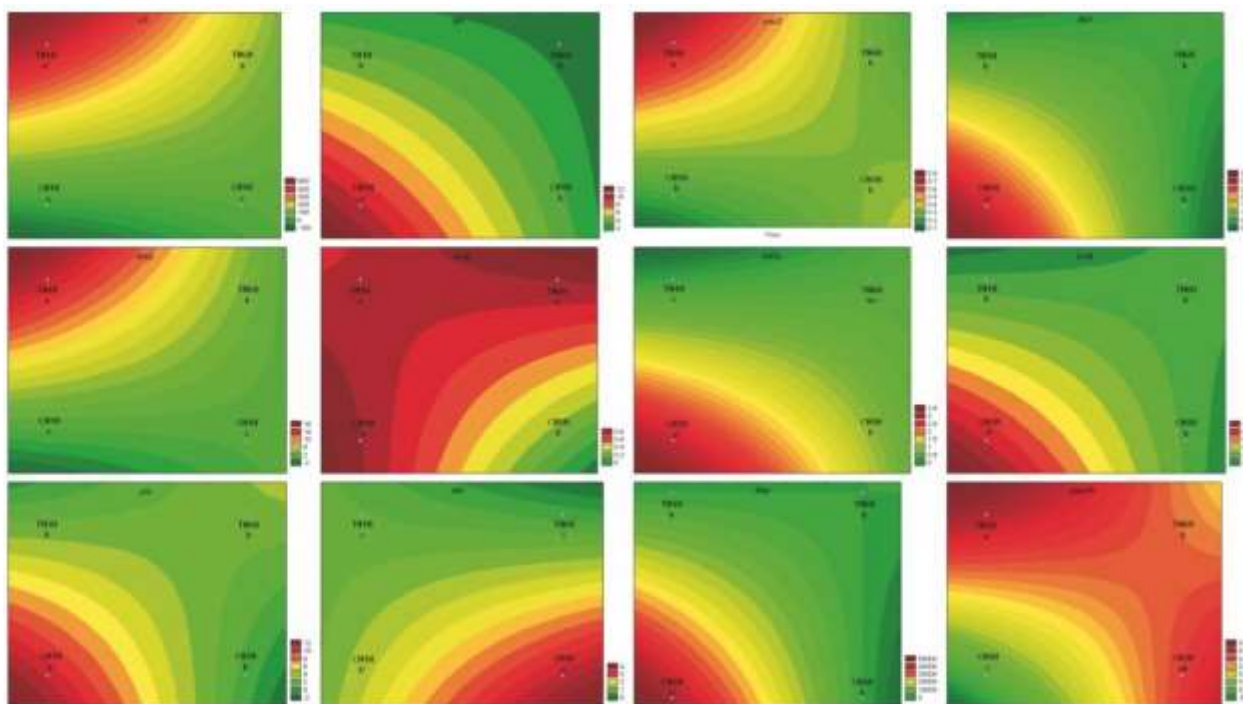


Figura 25. Visualización de la expresión génica del tejido linfoide asociado al intestino (GALT) después del estrés por confinamiento (manipulación de redes) a 1 y 6 h después del estrés por medio de análisis de superficie de respuesta. qPCR de marcadores de ARNm específicos de procesos de respuesta inmune innata (proteína del complemento *c3*, lisozima, *cox2*, *mxp*, *piscidina*, *defensina* y *hepcidina*), citocinas inmunes (*ifn*, *il-1b*, *tnf1a* e *il-10*) y *gapdh*, normalizadas con factor de elongación 1a e hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa (n = 6 por grupo experimental). El asterisco muestra diferencias entre las muestras de control sin estrés (peces en reposo) y las muestras de control después de 1 h de prueba de estrés de exposición al aire sin suplementación con 1% de Trp (análisis REST), mientras que letras diferentes denotan diferencias estadísticamente significativas entre grupos (ANOVA dos vías). C, alimentación de control; T, alimentación de Trp al 1%; N, tensión de compensación; 1H / 6H, 1/6 h post-estrés.

Los resultados de la PCA (Figura 21A) mostraron dos diferentes grupos de genes (*cox2*, complemento *c3*, *mxp* y *gapdh*) que estaban completamente separados del segundo grupo (*tnf1a*, *il-10*, *pis*, *hep* y *lys*), mientras que otros genes como *ifn1*, *il-1b* y *def* no explican en ningún sentido la relación entre ningún grupo dietético para cualquier de los tratamientos. Los resultados de PCA indicaron que los primeros cinco componentes explican hasta el 99.5% de la varianza acumulada; así, los genes que mejor explican la asociación con los tratamientos fueron el *gapdh* (44.6%), *cox2* (28.7%), *ifn1* (15.4%), *il-1b* (8.6%) y *tnf1a* (2.0%). Por otro lado, PCA entre los tratamientos también mostraron dos grupos: el primer grupo que incluía la prueba CA1H, TA6H, TN6H, CA6H y CN6H, que se separaron del segundo grupo (TN1H y TA1H). Finalmente, los peces del tratamiento CN1H se separaron totalmente de ambos grupos (Figura 21B). Según este análisis, los tratamientos que incluían el 1% de Trp (dieta T) del segundo grupo tenía un mayor número de genes sobreexpresados (*tnf1a*, *il-10*, *pis*, *hep* y *lys*), y éstos no mostraron ninguna relación con esos genes del primer grupo (*gapdh*, *cox2*, complemento *c3* y *mxp*). Adicionalmente, los peces alimentados con la dieta C y expuestos a estrés por confinamiento/redes (CN1H) tuvieron una mayor expresión de genes para el segundo grupo

(*tnf1a*, *il-10*, *pis*, *hep* y *lys*). Finalmente, heatmap mostró claramente un patrón de sobreexpresión génica en las corvinas alimentadas con la dieta Trp y expuestas al aire por 1 h; por el contrario, la expresión génica disminuyó en redes/exposición de confinamiento después de 1 y 6 hps (Figura 22).

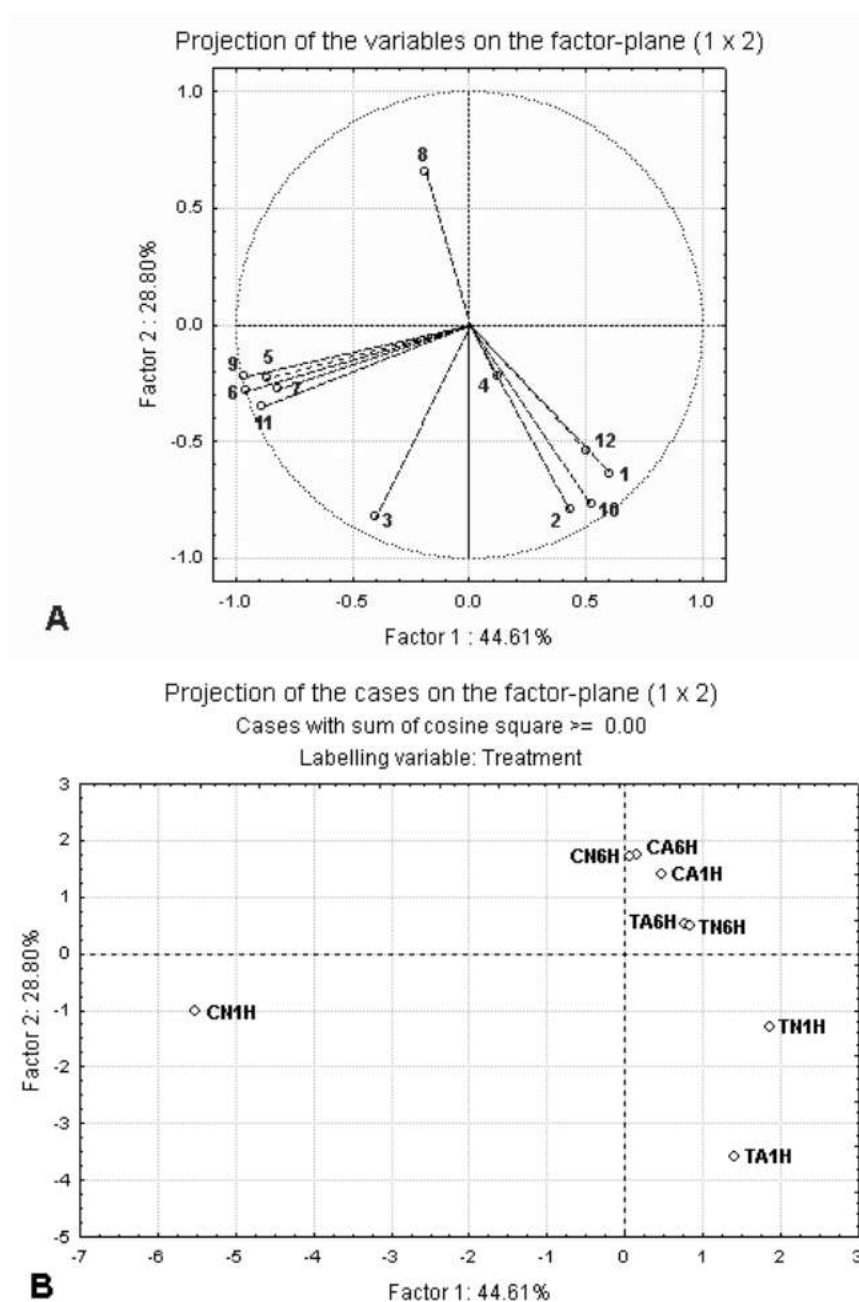


Figura 26. Análisis de componentes principales de (A) expresión génica según el conjunto de tratamientos; *gadph*, *cox2*, *ifn1*, *il-1b*, *tnf1a*, *il-10*, *pis*, *def*, *hep*, *c3* complemento, *lys* y *mxp*. (B) Correlación entre la combinación de tratamientos (triptófano, tiempo y estrés). Cada punto representa el promedio del análisis de muestras de tres replicas biológicas en el gráfico. Los factores F1 y F2 utilizados en este gráfico explican el 73.40% de la varianza total, lo que permite una interpretación segura de la variación.

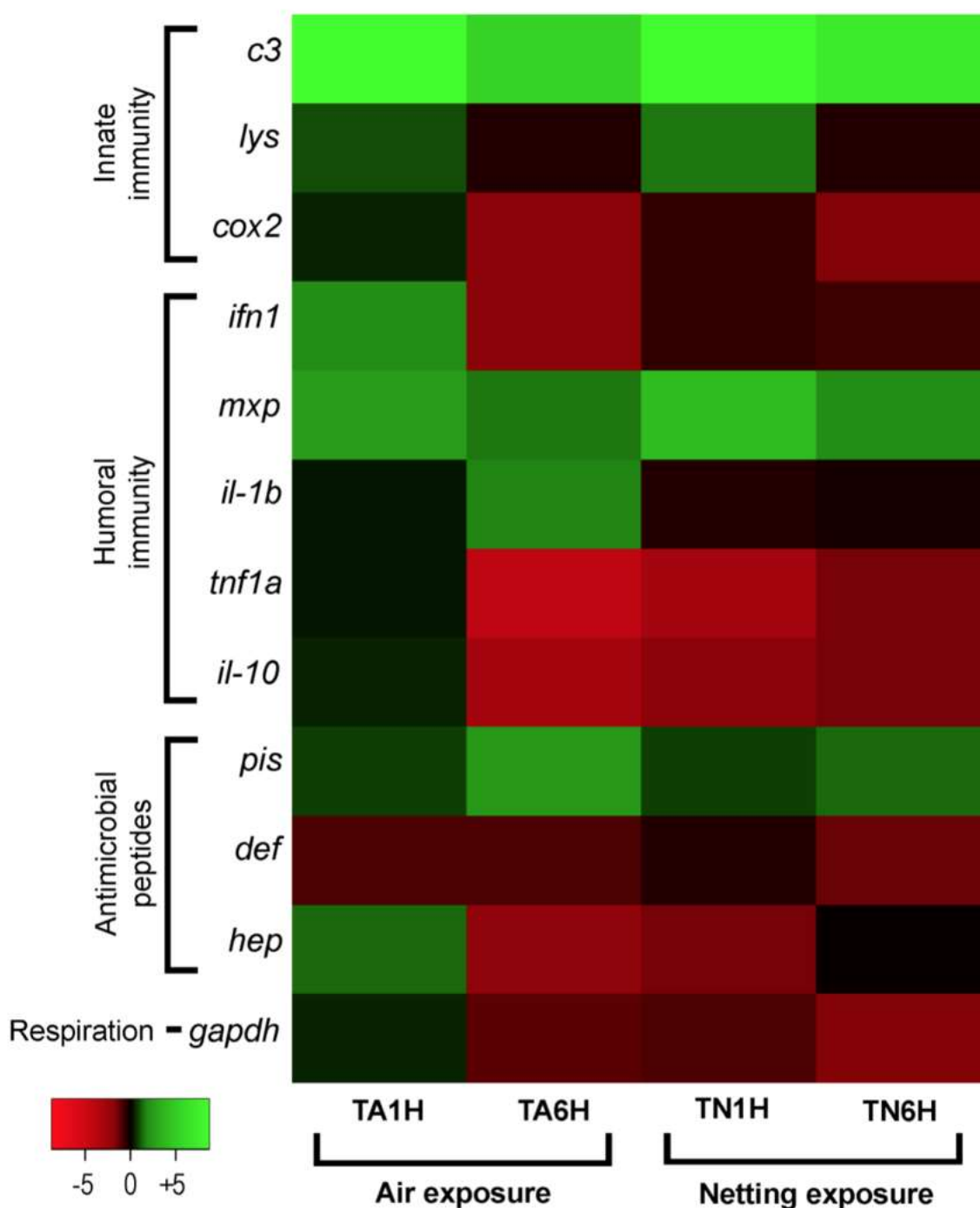


Figura 27. Mapa de calor que muestra patrones de expresión en tejido linfoide asociado al intestino (GALT) después de la exposición al aire y las pruebas de estrés de confinamiento / red. Las muestras representadas son de suplementación con 1% de Trp y tratadas con exposición al aire (TA1H y TA6H) o exposición en confinamiento / red (TN1H y TN6H), y Grupos de dieta de control expuestos a cada estrés (CA1H y CA6H para exposición al aire; CN1H y CN6H para redes). Cambios en la expresión de genes de la respuesta inmune innata (proteína del complemento *c3*, lisozima, *cox2*, *mxp*, piscidina, defensina y hepcidina), citocinas inmunes (*ifn*, *il-1b*, *tnf1a* e *il-10*) y *gapdh*, normalizados con el factor de elongación 1a y la hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa, están representados en color: la escala verde indica genes sub expresados y el rojo indica genes sobre expresados.

7.3 Bioensayo 3.- L-Tryptophan immune modulation in tropical gar (*Atractosteus tropicus*) under stress by thermal shock and mimic transport to hatcheries.

De acuerdo con los datos obtenidos en el ensayo de suplementación de triptófano, se pudo observar al día 45 del bioensayo que no se muestran diferencias significativas en cuanto a peso entre los tratamientos, aunque se observa una tendencia a mayor peso para los tratamientos de 0.25% y 1.25% de suplementación del aminoácido triptófano. Por otro lado, en cuanto a longitud, el tratamiento con suplementación del 0.25% marca una mayor tendencia en crecimiento en talla a diferencia del resto de los tratamientos que obtuvieron menor crecimiento (Fig. 25). Una vez finalizado el ensayo nutricional, se procedió a los análisis de estrés por simulación de transporte y simulación de shock térmico, pero las muestras se encuentran en espera de su procesamiento.

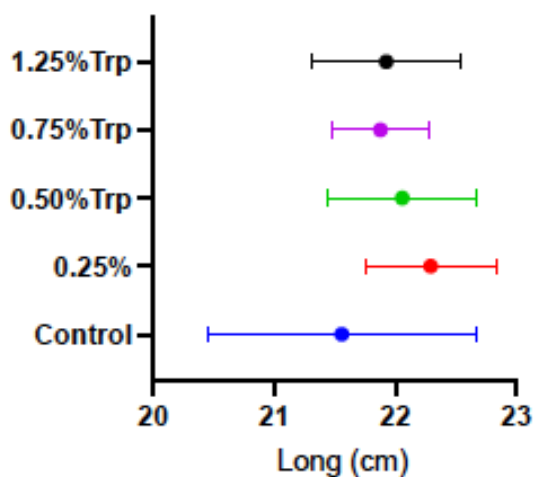
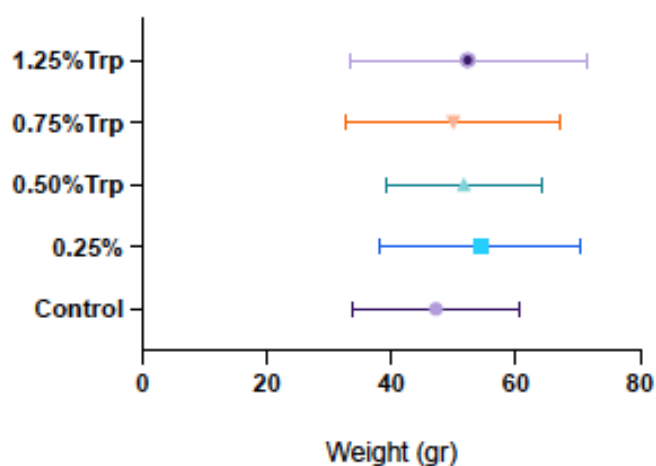


Figura 28. Crecimiento en peso (a) y talla (b) en pejelagarto *Atractosteus tropicus*. Los valores (n=9 por tratamiento dietético) se expresan como media \pm desviación estándar ($p < 0.05$).

Un aspecto que debemos resaltar es que este experimento fue realizado al inicio de la pandemia SARS-COV2 en marzo del 2020, por lo que se logró concluir antes del cierre de las instalaciones a nivel nacional. desafortunadamente, no ha sido posible realizar el procesamiento de las muestras para determinar los efectos a nivel fisiológico y de estrés oxidativo, antes y después de las pruebas de estrés por manejo.

8. DISCUSIÓN

8.1 Bioensayo 1.- The antioxidant effect and stress-protective role of α -tocopherol supplementation in compound diet on lymphoid tissues of longfin yellowtail (*Seriola rivoliana*) juveniles

La vitamina E juega un papel importante como antioxidante y previene daños en los tejidos. Se considera uno de los principales antioxidantes biológicos ya que reduce la acumulación de radicales superóxido y protege las células al donar hidrógeno del grupo fenólico en el anillo cromanol, eliminando radicales peroxilo (Jiang, 2014). El metabolismo de la vitamina E es uno de los más complejos entre las vitaminas liposolubles (Fernández *et al.*, 2018). Su transporte se realiza sin metabolizar a través de los diversos órganos para luego metabolizarse a través del ciclo a través del ciclo de CYP4F2 / CYP3A4 dependiente de ω -hidroxilación seguido de cinco ciclos de β -oxidación (Combs y McClung., 2017). En el intestino, los tocoferoles se hidrolizan junto con la grasa de la dieta y se secretan en quilomicrones, triacilglicerol, colesterol y fosfolípidos (Jiang *et al.*, 2001; Traber *et al.*, 2007; Rigotti, 2007). Los quilomicrones formados con vitamina E son transportados hacia el sistema linfático hasta el tejido periférico, a través del proceso receptor-mediador de lipoproteínas (Traber *et al.*, 1985) y los remanentes son tomados por el hígado incorporando el α -tocoferol en las lipoproteínas a través de los enlaces a la proteína de transferencia de α -tocoferol (α -TTP) junto con el transportador de casete de unión a ATP (Manor y Morley, 2007).

La deficiencia de vitamina E induce el daño oxidativo en muchos tejidos, como el riñón cefálico y el bazo en los peces. Además, varios estudios asocian estos daños a la disminución del anión anti-superóxido y la capacidad anti-radicales hidroxilo, provocando daño oxidativo quizás debido a la reducción de la capacidad de captación de radicales en los peces (Pan *et al.*, 2016). En nuestro estudio, el porcentaje de área de cobertura de melanomacrófagos de riñón cefálico y bazo (HK-MMC y Baso-MMC) en peces alimentados con la dieta de control, fue mayor que en peces alimentados con dieta suplementada con 500 mg kg de α -tocoferol⁻¹. El incremento de agregados de macrófagos se asocia con lesiones inflamatorias crónicas en los tejidos (Agius y Roberts, 2003), que pueden verse disminuidas cuando las membranas celulares y los organelos se protegen con compuestos antioxidantes como la vitamina E. En los peces, la MMC se ha utilizado como biomarcadores del estrés ambiental y es un componente esencial de la respuesta inmune humoral (Evans *et al.*, 2016). Los melanomacrófagos son células similares a macrófagos que contienen diferentes pigmentos, como lipofuscina, melanina y hemosiderina (Agius y Roberts, 2003). Los centros de melanomacrófagos (MMC) son agregados de estas células que se observan en teleósteos superiores como los salmónidos. Estos agregados se encuentran distribuidos aleatoria e irregularmente en órganos, principalmente órganos hematopoyéticos en el riñón cefálico y bazo (Agius, 1980) y, a veces, en el hígado (Agius y Roberts, 2003), donde su concentración aumenta con la edad, el estrés y la contaminación del agua (Wolke, 1992).

La suplementación dietética con 500 mg Kg de α -tocoferol⁻¹ en los juveniles de *S. rivoliana* proporciona una mayor capacidad para lidiar con el desgaste ocasionado durante el desarrollo y cuando los organismos están expuestos a diversos tipos de estrés (Evans y Nowak, 2016), así como una mayor inmunocompetencia contra los parásitos y agentes infecciosos, lo que ayuda a

mejorar el mecanismo de defensa contra el estrés en la larvicultura y la engorda de los peces. En muchas ocasiones, los parásitos y la contaminación ambiental se consideran una causa de aumento de la deposición MMC en los peces; estos factores de estrés tienen un efecto hemolítico como hemosiderina que se derivan del catabolismo de la hemoglobina en las células rojas de la sangre (Thilakaratne *et al.*, 2007). Agius y Agbede (1984), informaron que comúnmente se observan los glóbulos rojos degradados en el bazo de la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*), lenguado (*Pleuronectes platesa*), anguilas (*Anguilla anguilla*) y tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*), cuando el alimento no contiene vit E; sin embargo, la degradación de los glóbulos rojos o la hemosiderina no fue detectada en el riñón cefálico (Wolke, 1992; Agius y Roberts, 2003).

Se han realizado muchos estudios en diversas especies para evaluar el sistema antioxidante, y se demostró que este sistema es altamente eficiente para prevenir o reparar los efectos de ROS (Birnie-Gauvin *et al.*, 2017; Prego-Faraldo *et al.*, 2017; Biller y Takahashi, 2018; Ji *et al.*, 2018). El sistema enzimático representado por SOD, CAT y glutatión-peroxidasa GPx y GR se ha detectado en la mayoría de las especies de peces y crustáceos investigados hasta la fecha (Birnie-Gauvin *et al.*, 2017). Además, la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa (GPx) son componentes importantes del sistema de defensa antioxidante, además que juegan un papel vital en la atenuación de la toxicidad potencial de los radicales libres (Martínez-Alvarez *et al.*, 2005). En el presente estudio, los peces alimentados con la dieta control (no suplementada con α -tocoferol) disminuyen la actividad de SOD y GPx en el hígado de *S. rivoliana*, lo que podría estar relacionado con las capacidades de anión anti-superoxido (ASA) y radical anti-hidroxi (AHR), lo que sugiere que la capacidad antioxidante (eliminación de O_2 y OH^\cdot) se ve afectada por la deficiencia de α -tocoferol en este tejido. Resultados similares se obtuvieron en la carpa herbívora (*Ctenopharyngodon idella*) donde se detectó una disminución de las actividades enzimáticas antioxidantes, tales como la catalasa, lo que se relaciona con la disminución de los niveles de ARNm de las enzimas del sistema inmune en los órganos encargados de sintetizarlas cuando los peces son retaldos con *Aeromonas hydrophila* (Pan *et al.*, 2016). En nuestro estudio, los peces alimentados con las dietas suplementadas con α -tocoferol mostraron una alta actividad GPx en el hígado mientras que los peces alimentados con la dieta de control tenía una mayor actividad GPx en el bazo. Estos altos valores en la actividad GPx pueden indicar algún tipo de daño en los tejido debido a la liberación de peróxido de hidrógeno ($H_2 O_2$) producido por los ROS no radicales en la matriz mitocondrial durante el proceso de reducción de O_2 ; sin embargo, el bazo puede ser el más afectado en los peces del tratamiento de control, lo que es causado por la falta de un agente anti-oxidante tal como la vitamina E. La alta actividad de GPx se ha relacionado con la inhibición del sistema antioxidante por la presencia de patógenos o estrés en los sistemas de cultivo (Liu, 2007). El peróxido de hidrógeno puede ser parcialmente eliminado por acción de las enzimas CAT y GPx (Hoseinifar *et al.*, 2020).

En conclusión, es necesario continuar la evaluación de los requerimientos de α -tocoferol en el jurel para comprender mejor los mecanismos de acción en las rutas metabólicas para prevenir el estrés oxidativo ocasionado por el manejo de los peces durante su cultivo. Este estudio mostró que la suplementación de α -tocoferol en la dieta mejora las actividades de las enzimas antioxidantes y modifica el área de cobertura de los MMC en el riñón cefálico y el bazo en juveniles. Sin embargo, es necesario realizar un estudio de desafío (hacinamiento, exposición al

aire, alta densidad de población, desafíos bacterianos, entre otros) para comprender el papel fisiológico de la suplementación con α -tocoferol en las rutas metabólicas bajo condiciones de estrés en *S. rivoliana*.

8.2 Bioensayo 2.- Stressors Due to Handling Impair Gut Immunity in Meagre (*Argyrosomus regius*): The Compensatory Role of Dietary L-Tryptophan

Durante las diversas actividades acuícolas a nivel comercial (protocolos de gestión, protocolos de vacunación, hacinamiento y transporte, entre otros), los peces están expuestos a varios factores estresantes que amenazan su bienestar, la supervivencia y la calidad de al momento de la cosecha, por lo cual los productores desean aliviar el estrés durante el cultivo (Galt *et al.*, 2018). En este aspecto, la reducción del estrés es una prioridad para mejorar el nivel fisiológico de respuesta de los peces durante su manipulación. Como una consecuencia del efecto de los estresores, ya sean abióticos (hipoxia, temperatura, choque osmótico, etc.) o biótico (depredación, patógenos, manipulación y transporte por parte de los acuicultores, entre otros), el estrés se manifiesta como una respuesta fisiológica en dos etapas. Las respuestas primarias y secundarias que inician con la liberación de factores endocrinos durante la fase primaria de respuesta, lo que conduce a las respuestas secundarias al estrés. Las vías neuroendocrinas englobadas por los ejes HPI y la cromafina alteran la química sanguínea de manera profunda por la liberación de corticosteroides (Barton, 2002). Esta liberación tiene un efecto inmediato en todos los aspectos del funcionamiento de los órganos a través de receptores hormonales y sistemas de mensajería secundaria, algunos de los cuales involucran factores específicos de transcripción genética. En este estudio, nos centramos en la respuesta del intestino anterior a dos tipos diferentes factores estresantes abióticos: exposición al aire y simulación de captura (redes/confinamiento). En este sentido, se ha demostrado que los factores estresantes de un estudio similar resultaron en un aumento en los niveles plasmáticos de cortisol en el grupo de peces suplementados con Trp (Fernández-Alacid *et al.*, 2019). En nuestro estudio, se investigó la cascada de expresión génica que sigue a la respuesta primaria al estrés en el intestino para comprender si la adición de L-triptófano en la dieta podría aliviar el impacto del manejo de factores estresantes sobre la inmunidad intestinal local. En consecuencia, un intestino sano permite aliviar algunos de los efectos de los estresores, lo que debe tener beneficios concomitantes para la salud de los peces. Los resultados del presente estudio revelaron que los factores estresantes afectan la inmunidad intestinal local, lo que se manifiesta por cambios en el patrón de expresión génica. En particular, la corvina alimentada con la dieta C y estresado por la exposición al aire durante 3 minutos mostraron cambios significativos en la expresión de varios genes implicados en la respuesta inmune innata (*c3*, *lys* y *cox2*), procesos de respuesta inmune humoral (*il10*) y péptidos antimicrobianos (*def* y *hep*). Además, se destaca que la corvina alimentada con la dieta C mediante confinamiento y redes durante 1 h resultó en cambios significativos en *lys*, *ifn1*, *tnf1a*, *pis*, *def* y *hep*. Estas diferencias en el tipo y número de genes expresados diferencialmente entre ambos factores de estrés pueden deberse a su tiempo de exposición (3 min vs 60 min con respecto a la exposición al aire y el confinamiento/redes, respectivamente). Por ejemplo, varios estudios han demostrado que el factor de transcripción inducible por hipoxia 1, juega un papel importante en las respuestas adaptativas a la hipoxia (Semeza, 1998), también es un mediador de las funciones inmunes (Hellwig-Bürgel *et al.*, 2005; Palazón *et al.*, 2014). Esta hipótesis puede ser apoyado por el hecho de que *cox2* fue diferencialmente expresado en peces estresados por la exposición al aire, lo que concuerda con

algunos estudios en vertebrados superiores (Hellwig-Bürgel *et al.*, 2005). Sin embargo, los mecanismos por los cuales los diferentes factores estresantes relacionados con el manejo de los peces afectan la expresión de los genes del sistema inmunitario intestinal local no fueron un objetivo del presente estudio; por lo tanto, este estudio no proporcionar resultados concluyentes sobre este tema y se sugiere realizar investigaciones adicionales que permitan entender estos mecanismos de acción.

En otro orden de ideas, el triptófano es el único precursor de la serotonina, cuya función como neurotransmisor juega un papel clave en la reducción del estrés y agresión, actuando a través del eje HPI para controlar respuestas osmorreguladoras, hematológicas, inmunológicas y de comportamiento (Wen *et al.*, 2014). Varios estudios han demostrado que la suplementación del alimento con pequeñas cantidades de Trp reduce el estrés en varias especies cultivadas y mejora su respuesta inmune (Andersen *et al.*, 2016). Los resultados obtenidos en el presente estudio mostraron que alimentar corvina con una dieta suplementada con 1% de Trp por 7 días muestran una regulación positiva de la expresión génica una hora después de la prueba de estrés (1 hps) en el grupo de peces estresados por exposición al aire para la mayoría de los genes evaluados en el intestino como *c3*, *lys* y *cox2* (sistema inmune innato respuesta), *ifn1*, *mxp* e *il-10* (sistema inmunológico humoral), *pis* (péptidos antimicrobianos) y *gapdh* (respiratorio mitocondrial). Por otro lado, la prueba de esfuerzo de confinamiento/red exhibió su efecto principal en los peces alimentados con la dieta suplementada con Trp particularmente en la expresión de genes *c3* y *mxp*. Como se sugirió anteriormente, estos resultados indican que diferentes factores estresantes pueden tener diferentes efectos en la inmunidad local del intestino (Hellwig-Bürgel *et al.*, 2005; Palazón *et al.*, 2014), así como demostrar los efectos positivos de la suplementación con 1% de Trp. Estos resultados al utilizar el Trp se deben en parte a que se proporciona como aminoácido libre donde, después de su absorción, la enzima triptófano hidroxilasa la convierte en serotonina. La serotonina está involucrada en la modulación del sistema endocrino y los niveles de cortisol sérico (Lim *et al.*, 2013; O'Mahony *et al.*, 2015). Se ha estimado que, en vertebrados superiores, el 95% de la serotonina se encuentra en el tracto gastrointestinal (Kim y Camilleri, 2000). Aunque en este estudio no se midió la serotonina en nuestros peces, se sabe que los niveles más altos de cortisol en peces expuesto a ambos factores de estrés (Fernández-Alacid *et al.*, 2019) validan nuestros resultados donde los peces alimentados con Trp mejoran su resistencia al manejo. En nuestro estudio, los peces alimentados con 1% de Trp al y tratados con la prueba de estrés por exposición al aire, mostraron una regulación positiva de los genes involucrado en respuestas innatas (*c3*, *lys* y *cox2*) y humorales (*ifn1*, *mxp*, e *il-10*). Sin embargo, la respuesta de expresión génica no fue tan claro para los peces expuestos a la prueba de confinamiento/red, lo que puede deberse a diferentes respuestas fisiológicas al comparar los tipos de estresores (breve hipoxia versus perseguirlos con una red) (Hellwig- Bürgel *et al.*, 2005; Palazón *et al.*, 2014). En este contexto, la importancia de los genes antes mencionados (*cox2*, *ifn1*, *il-1b*, *tnf1a*, y *gapdh*) en la respuesta al estrés en corvina alimentada con el 1% de Trp fue corroborada por los resultados de PCA, donde el 73% de la varianza total observada fue explicada con los genes antes mencionados. Considerando el resultado antes mencionado, la exposición al aire y la persecución (confinamiento/redes) pueden afectar la homeostasis biológica de la Trp sérico (circulante), debido a su participación en la síntesis de serotonina (Lim *et al.*, 2013), y consecuentemente, estos factores estresantes pueden inducir cambios en respuestas metabólicas, hematológicas, hidrominerales y estructurales (Barton e Iwama, 1991). En las condiciones experimentales

actuales, los peces alimentados con la dieta C podrían tener niveles elevados de corticosteroides circulantes (Fernández-Alacid *et al.*, 2019), que pueden reducir la inmunocompetencia al influir en el número de linfocitos y capacidad de producción de anticuerpos, que funcionan como la memoria en sistemas inmunes adaptativos contra patógenos y los cambios del ambiente (Hoseini *et al.*, 2012). Los resultados actuales revelaron que una suplementación dietética adecuada de Trp generó una regulación positiva del sistema de genes de la inmunidad innata y humoral, que estimularían los tejidos linfoides asociados al intestino (GALT) y activar el sistema inmunológico, proporcionando protección al huésped contra posibles invasiones de patógenos, como ha sido ampliamente documentado en otras especies de peces (Dinan y Cryan, 2012; Lazado y Caipang, 2014; O'Mahony *et al.*, 2015). De acuerdo con los resultados actuales, un estudio realizado en lubina europea (*Dicentrarchus labrax*) alimentada con dietas suplementadas con 0.5% de Trp y desafiado con una inyección intraperitoneal de *Photobacterium damsela subsp. piscicida* demostró que genes relacionados con el sistema inmunológico se regularon positivamente en el intestino (Azeredo *et al.*, 2017b).

El efecto antes mencionado no se pudo corroborar en *A. regius* ya que no se llevó a cabo ningún desafío bacteriano en este estudio; sin embargo, nuestros datos sobre la inmunidad intestinal local respaldan la hipótesis de un efecto positivo de este aminoácido en el estado general e inmunidad de nuestros peces. Por su parte, las corvinas alimentadas con la dieta comercial suplementada con 1% de Trp mostraron una regulación positiva de c3 en ambas pruebas de estrés. Además, las funciones inmunes innatas evaluadas por la expresión de lys solo aumentó en los peces expuestos al aire después de 1 hps (TA1H), mientras que para el estrés de confinamiento/red, la expresión de lys no fue modificada por la adición de Trp en la dieta. Otro aspecto por resaltar es la expresión de la proteína del complemento c3 que funciona hacia la eliminación de cuerpos extraños como partículas virales y bacterianas por opsonización y la inducción de lisis bacteriana, por lo tanto, permite que los cuerpos extraños específicos sean destruidos por los fagocitos (Rooijackers y van Strijp, 2007). El complemento C3 también participa en reacciones inflamatorias (Raftos *et al.*, 2003) y funciona como un modificador de la inmunidad adquirida (Sunyer *et al.*, 1998; Lange y Magnadóttir, 2003; Ricklin *et al.*, 2010). En otro orden de ideas, la lisozima juega un papel importante en el funcionamiento como enzima lítica hidrolizando el componente peptidoglicano de las paredes de las células bacterianas (Davis y Weiser, 2011), lo que limita infecciones bacterianas y activación adicional del complemento sistema y fagocítico (Paulsen *et al.*, 2003); es así como, estos dos efectores innatos trabajan juntos para eliminar las infecciones o reducir el estrés ocasionado por el manejo. Dado que la lisozima es menos específica en su acción, al no estar influenciada por la inmunidad adquirida, de la misma manera que el sistema del complemento (Claire *et al.*, 2002), tiene sentido que este efector molecular está más estrictamente controlado para prevenir daños no deseados sobre la microbiota comensal del intestino (Gao *et al.*, 2018).

En la prueba de estrés por exposición al aire, los peces alimentados con 1% de Trp tuvieron una regulación positiva de la expresión génica a la hora post estrés (TA1H) de c3, lys y cox2, aunque para la prueba de confinamiento/red, hubo una baja regulación de la expresión para cox2. La prostaglandina endoperóxido H sintasa, o COX2, funciona en la oxigenación de una amplia gama de ácidos y ésteres grasos (Vecchio *et al.*, 2010), que conduce a la inducción de inflamación a través de la producción de prostaglandinas (Dyall, 2017). La contrastante respuesta en la expresión de cox2 con las dos exposiciones de estrés en los tratamientos también pueden estar

relacionados con vías alternativas de genes de señalización a través de factores de transcripción como la hipoxia inducible factor 1 alfa (*HIF1a*) y *HIF1B* (Pelster y Egg, 2018). En cuanto a los procesos de respuesta inmune humoral, nuestro estudio demostró que la suplementación de una dieta comercial con 1% Trp aumentó la expresión de *ifn1*, *mxp*, *tnf1a* e *il-10* una hora después de la prueba de estrés (hps) cuando los peces fueron sometidos a la prueba de exposición al aire, mientras que su expresión disminuyó a las 6 hps. Por el contrario, la prueba de esfuerzo de confinamiento/redes solo resultó en una sobrerregulación de *mxp* 1 hps. Estos resultados concuerdan con un estudio en barramundi (*Lates calcarifer*) alimentado con una dieta suplementada con 1% de Trp donde había una alta actividad de lisozima y una sobrerregulación de la expresión de *mxp* después de un desafío con el virus de la necrosis nerviosa (NNV) (Chi *et al.*, 2018). Estos resultados pueden explicarse por la participación de factores reguladores de interferón (IRF) en la regulación de las proteínas mencionadas anteriormente. Los IRF son un grupo de factores de transcripción cuya síntesis requiere Trp (Mamane *et al.*, 1999), los cuales contienen una característica de repetición de cinco residuos de triptófano en un dominio de unión al ADN. A través de este dominio de unión al ADN, los miembros de la familia IRF se unen a un motivo de ADN similar, denominado IFN elemento de respuesta estimulada (ISRE). De ello, se deduce que cuando el Trp sérica libre aumenta con un suplemento dietético, puede esperarse un aumento en la síntesis de IRF con una subexpresión de genes del sistema inmune como *ifn1* y *mxp*. Entre los efectores moleculares examinados en este estudio, el interferón de tipo I (*ifn1*) puede estimular los efectores celulares como las células asesinas naturales y macrófagos (Kvamme *et al.*, 2013). Además, *ifn1* regula positivamente la proteína antiviral *mxp*, cuya codificación puede estar regulada por la presencia de ISREs (Das *et al.*, 2008). El aumento de la expresión de *ifn1* en las corvinas sometidas a la prueba de estrés por exposición al aire 1 hps (TA1H) podría explicarse por los resultados antes mencionados. Sin embargo, la prueba de confinamiento/red no evidenció este mismo patrón de expresión, como en el caso de *cox2*, y puede estar relacionado con diferencias en señalización transcripcional.

La expresión de *il-1b* aumentó a las 6 hps para los peces alimentados al 1% Trp en la prueba de exposición al aire (TA6H); sin embargo, al considerar la prueba de confinamiento/red, este gen tuvo la menor expresión a la 1 y 6 hps (TN1H y TN6H, respectivamente) para *ifn1*, *il-1b*, *tnf1a* e *il-10*. Dados estos resultados, parece ser que la prueba de confinamiento/red no es tan agresiva como un factor de estrés comparada con la prueba de exposición al aire. Entre las citocinas estudiadas en esta investigación, la interleucina-1B (*il-1b*) influye en la función del eje HPI estimulando la secreción de cortisol (Engelsma *et al.*, 2002; Holland y Lambris, 2002). Además, *tnfa* es una importante citocina proinflamatoria producida por una variedad de linfocitos que promueve la apoptosis y la actividad respiratoria de macrófagos, y puede promover la respuesta antiviral a través de la estimulación *il-1b* (Qin *et al.*, 2001). Es posible que en nuestro estudio estas las citocinas proinflamatorias respondieron de diferente manera a cada prueba de estrés debido a la retroalimentación o influencia de otras citocinas no analizadas en este estudio. En general, la expresión génica de las citocinas proinflamatorias examinadas parece mostrar una tendencia positiva por la adición de 1% de Trp en la dieta; sin embargo, es necesario realizar más investigaciones para dilucidar este aspecto.

Con respecto a las citocinas, Trp puede funcionar como el primer paso para la señalización de la proliferación de células T, y esto puede estar funcionando en parte debido a las ISREs

mencionadas previamente (Jenkins *et al.*, 2016). Una vez activadas, las diferentes células T producen citoquinas adicionales que tienen una variedad de efectos en una amplia gama de funciones inmunes, algunas de las cuales se relacionan más reacciones anti-inflamatorias que proinflamatorias. La interleucina 10 funcional para modular las respuestas inflamatorias. En este estudio, bajo la influencia de la exposición al aire, la expresión de *il-10* se incrementó a la hora post estrés (TA1H) en los peces alimentados con el suplemento de Trp al 1%, mientras que para el mismo tratamiento dietético con Trp en la prueba de confinamiento/red a la 1 y 6 hrs (TN1H y TN6H), se detectó una subexpresión de *il-10*, lo que podría indicar un posible efecto positivo de Trp en la condición intestinal. Por lo general, la expresión de *il-10* se asocia con una respuesta antiinflamatoria. Con el suplemento dietético de Trp al 1% y al aplicar la prueba de estrés por confinamiento/red, *il-10* se subexpresó lo que es indica una respuesta proinflamatoria más robusta. Aunque bajo tales condiciones en las que *il-10* está subregulada puede haber una sobreexpresión de citosinas inflamatorias y la activación de células asesinas que podrían ser una fuente de daño tisular no deseado, lo que ha sido detectado en *D. labrax* alimentada con 0,52% de Trp (Azeredo *et al.*, 2017c).

En el intestino, los péptidos antimicrobianos se expresan continuamente para mantener el equilibrio entre el comensal versus bacterias potencialmente patógenas (Ostaff *et al.*, 2013). Lo anterior es logrado a través de lo que probablemente son controles estrictos sobre su expresión para evitar daños no deseados en el microbioma del huésped. En este estudio, la expresión de *pis* fue sobrerregulada a las 6 hrs en los peces alimentados con Trp y sometidos a estrés por exposición al aire (TA6H), y esta misma tendencia se observó 1 hrs (TA1H), aunque no fue estadísticamente diferente. Por el contrario, la expresión de *pis* no se ve afectada en los peces alimentados con Trp y cuando los peces fueron expuestos a la prueba de confinamiento/redes. Además, la expresión *hep* y *def* en peces alimentados con Trp al 1% y sometidos a la prueba de exposición al aire mostraron una ligera reducción de la expresión en ambos tiempos muestreados (1 y 6 hrs), aunque no se encontraron diferencias estadísticas debido a una alta variabilidad interindividual. Para los peces expuestos al estrés por confinamiento/red y alimentados con la dieta suplementada con el 1% de Trp, se encontró una subexpresión de *def* en ambos tiempos de muestreo (1 y 6 hrs). Las alteraciones de la expresión de AMP puede ser una causa de desequilibrio del microbioma del huésped (Ostaff *et al.*, 2013), si bien la modificación en la expresión de AMPs fue diferente y dependiendo del gen analizado y el tipo de estresor aplicado, no se pueden sacar conclusiones específicas sobre un efecto específico y se necesitan realizar más estudios. Las diferentes señales estresoras son diferentes para *pis* en comparación con *hep* y *def* una hora post estrés, y dependiendo del tipo de estresor (exposición al aire versus confinamiento/redes). Los péptidos antimicrobianos, como las proteínas defensina, piscidina y hepcidina, son importantes moléculas efectoras del sistema inmunológico innato (Campoverde *et al.*, 2017), que se cree funcionan por mecanismos líticos (Campagna *et al.*, 2007; Noga *et al.*, 2009; Smith *et al.*, 2010). Dependiente de la clase de AMPs, se puede observar diferencias en la eficiencia contra patógenos virales, fúngicos o bacterianos (Lauth *et al.*, 2005; Falco *et al.*, 2008; Casadei *et al.*, 2009; Masso-Silva y Diamond, 2014; Campoverde *et al.*, 2017). En este mismo aspecto, se ha demostrado que el triptófano modifica diversos patrones moleculares asociados (PAMP) al aumentar específicamente su expresión en ensayos experimentales (Casadei *et al.*, 2009; Campoverde *et al.*, 2017). Por su parte, la Piscidina también tiene la capacidad de modular la expresión de genes proinflamatorios e inmuno-asociados (Lin *et al.*, 2016; Yang *et al.*, 2016). La capacidad de *pis* para modular la expresión de

genes inmunes proinflamatorios puede explicar los diferentes patrones de expresión vistos entre *pis* y los otros dos AMPs analizados en este estudio, o la baja regulación de los AMPs dependiendo de las condiciones de estrés por la exposición al aire, lo que, a su vez puede estar relacionado con la sobreexpresión de *il-10*. La expresión de AMPs bajo múltiples controles regulatorios probablemente ayuda a prevenir la disbiosis del intestino, ocasionado por la lisis de huéspedes benéficos del microbioma (Ostaff *et al.*, 2013).

Finalmente, cabe mencionar que bajo la prueba de confinamiento/red, la adición de *Trp* aumentó la expresión de *gapdh*. Este aumento en la expresión de *gapdh* podría proporcionar un beneficio para la producción de energía y, por lo tanto, mejoras en todos los demás eventos metabólicos relacionados con el equilibrio energético del animal; esto ha sido demostrado in vitro utilizando células intestinales cultivadas de la lubina europea *D. labrax* complementados con *Trp* (Azeredo *et al.*, 2017c). Este incremento en la expresión de *gapdh* fue observada en corvina como respuesta de ambos estresores después de 1 hps en peces alimentados con la dieta *Trp* en comparación al grupo de control. Este gen se consideró inicialmente como un gen de referencia en nuestros análisis, pero al comprobar su nivel de expresión, se encontró que era diferencialmente regulado en función del factor estresante considerado, lo que puede atribuirse a la función de esta enzima en la respiración celular. La transferencia de electrones durante la respiración celular requiere NAD^+ como un portador de electrones; y en este aspecto, el *Trp* es un precursor metabólico y un requisito para síntesis de NAD^+ . Por lo tanto, la disponibilidad de *Trp* puede ser limitante en la transferencia de electrones y el funcionamiento de la respiración celular. Con más disponibilidad de *Trp* en la dieta, existe la posibilidad de un aumento en la síntesis de NAD^+ (Richard *et al.*, 2009), aliviando este paso limitante de la respiración celular. El incremento de la respiración celular se haría evidente por un aumento de la producción de las enzimas clave en esta ruta metabólica. Teniendo en cuenta estos resultados, se debe poner especial atención cuando se utiliza *gapdh* como gen de referencia en estudios en los que los peces pueden estar expuestos a condiciones potencialmente estresantes.

8.3 Bioensayo 3.- L-Tryptophan immune modulation in tropical gar (*Atractosteus tropicus*) under stress by thermal shock and mimic transport to hatcheries

Las prácticas acuícolas exponen a los peces a diversos factores estresantes, ya sean intrínsecos o extrínsecos, que afectan el crecimiento, supervivencia, el rendimiento y la producción. Factores como la exposición crónica al aire tiene efectos perjudiciales en los organismos acuáticos, lo que provoca diversos mecanismos de protección y respuestas inmunitarias (Wendelaar Bonga, 1997), lo que puede afectar el metabolismo y varios procesos celulares, incluida la inmunidad (Tort, 2011). Por esta razón, el uso de aditivos funcionales en los alimentos balanceados es una de las estrategias de prevención para atenuar o reducir los impactos dañinos que pueden tener las malas prácticas acuícolas y así disminuir posibles pérdidas en la producción. En el caso particular de esta disertación, se evaluó el uso de la vitamina α -tocoferol en dietas para el jurel y el aminoácido triptófano en alimentos para la corvina y el pejelagarto.

8.4 Discusión general

En el estudio con jurel se puede destacar el efecto benéfico de la suplementación con 500mg/kg de α -tocoferol contra la dieta control, donde las enzimas antioxidantes regulan la producción de

radicales libres, lo que evita la peroxidación lipídica y mantiene la estructura y función de las membranas celulares (Nimse y Pal., 2015). Lo anterior se puede inferir por el incremento de la actividad de las enzimas antioxidantes, SOD, CAT y GPx tanto en el hígado como en bazo en los peces alimentados con la dieta suplementada con vitamina E. La dinámica de la regulación activa en la eliminación de radicales libres por estas enzimas se lleva a cabo por un proceso de óxido-reducción (de Fátima *et al.*, 2021) donde la SOD, es la primera enzima encargada de eliminar los radicales libres del oxígeno, convirtiéndolos en oxígeno y peróxido de hidrógeno.

Posteriormente, la enzima CAT cataliza la descomposición de peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno, mientras que la enzima GPx convierte el peróxido de hidrógeno en agua y los hidroperóxidos de ácidos grasos resultantes de esta reacción se convierten en alcoholes no tóxicos (Nimse y Pal, 2015). Al contrario, cuando hay estrés oxidativo, los radicales libres atacan todas las clases de biomoléculas, principalmente a los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) de las membranas celulares (Rao y Agarwal, 1999). Si bien la relación entre los daños histológicos, procesos de inflamación y la actividad antioxidante necesitan ser corroboradas con otros análisis, se puede indicar que la suplementación de 500mg/kg de α -tocoferol en juveniles de jurel disminuyó el porcentaje de área de cobertura de melanomacrófagos de riñón cefálico y bazo (HK-MMC y Bazo-MMC), además de aumentar la actividad de las enzimas antioxidantes (Capítulo 1). De esta forma, la suplementación con la vitamina E disminuye el daño celular ocasionado por la liberación de radicales libres, además de la activación del sistema inmunológico innato de los peces como mecanismos de defensa y factores humorales (Secombes y Wang, 2012); sin embargo, este aspecto no fue corroborado en este estudio.

Ambos procesos, metabólicamente demandan energía, lo que impone una sobrecarga para la producción de energía a nivel celular, aunado a las respuestas generales al estrés (Mommensen *et al.*, 1999), por lo que teniendo en cuenta los niveles de lípidos en la dieta y los de ácidos grasos polinsaturados, estos resultados sugieren que las dietas deben aumentar su contenido en vitamina E para reducir el estrés oxidativo en órganos como el hígado ya que una cantidad adecuada de compuestos antioxidantes como la vitamina E puede mantener el equilibrio redox celular, evitando el daño oxidativo.

Por otro lado, el estrés conduce a una cascada de respuestas como reacciones metabólicas, hormonales, inmunológicas y bioquímicas que tienen como objetivo la búsqueda de la homeostasis del individuo ante situaciones que pongan en peligro su equilibrio (de Fátima *et al.*, 2021). En el estudio de juveniles de corvina alimentadas con dietas suplementadas con triptófano al 1%, se muestra un claro efecto en la expresión genómica de diversas enzimas de la respuesta inmune innata, procesos de respuesta inmune humoral, péptidos antimicrobianos y un marcador de respiración mitocondrial. El Trp participa en la modulación del eje HPI y cromafina, que tienen una influencia vital en las funciones fisiológicas relacionadas con la producción de muchos tipos de moléculas de señalización que se dividen en dos tipos: aquellas que retienen el anillo de indol como serotonina, melatonina e indol-piruvato o, las que rompen el anillo de indol para formar quinurenina, siendo ésta el precursor de las moléculas de señalización que son el primer paso en la síntesis de novo de NAD⁺ (Fiore y Murray., 2021), donde el triptófano juega un papel importante en la red de señalización del sistema inmunológico.

La eliminación de los factores de estrés ya sean abióticos (hipoxia, temperatura, shock osmótico, etcétera) o bióticos (depredación, patógenos, manejo y transporte, entre otros) en las prácticas acuícolas es casi imposible. Por lo tanto, atenuar la respuesta fisiológica resulta ser necesario en esta actividad productiva. En este estudio, los peces sometidos a estrés por exposición al aire nos permitieron obtener un claro panorama en cuanto a las afectaciones que pueden impactar directamente la inmunidad local del intestino: sobre expresión de los genes del sistema inmune innato (*c3*, *lys* y *cox2*), procesos de respuesta del sistema inmune humoral (*il10*) y péptidos antimicrobianos (*def* y *hep*) en juveniles de corvina. Sin embargo, los peces sometidos a confinamiento no mostraron un claro patrón de respuesta inmune, atribuyéndose que diferentes estresores pueden generar diferentes efectos en la inmunidad local del intestino (Hellwig-Bürgel *et al.*, 2005; Palazón *et al.*, 2014). Por consiguiente, se continúa en la búsqueda de aditivos funcionales que protejan a los peces, lo cual ha sido demostrado en varias especies como *Labeo rohita* (Gupta *et al.*, 2021), con la cual se observaron diversas respuestas inmunomodulatorias favorables para sobrevivir al estrés y la infección generalizada por *Aeromonas hydrophila* al suplementar su alimento con aditivos funcionales como estrategia para una acuicultura sustentable y con mejores panoramas en la salud.

Por otro lado, en el bioensayo de pejelagarto (*A. tropicus*), sólo se alcanzó a medir variables de crecimiento en talla y peso, y si bien no se obtuvieron diferencias significativas, se ve una tendencia hacia el tratamiento suplementado con 0.25% de triptófano, lo que corresponde con los datos obtenidos en mejoras del crecimiento en especies como la tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) en un estudio elaborado por Quintero-Pardo y Cardoso-Giaquinto (2015). Estos autores analizaron requerimientos de triptófano en la dieta en diversos niveles, donde en el 0.84% y 0.82% se obtuvieron mejores resultados de crecimiento, ganancia en peso y balance del consumo de raciones, dándonos una proyección no sólo al efecto inmunomodulador y regulación del estrés por manejo, sino también directamente relacionado al crecimiento.

En general, para lograr una mayor comprensión de los mecanismos moleculares de las diversas opciones de suplementación dietética con el objetivo de ser inmunoestimulantes y mitigadoras de la oxidación, se sugiere el uso de técnicas analíticas más profundas y herramientas de detección de alto rendimiento como la transcriptómica, nutrigenómica y metabolómica.

9. CONCLUSIONES

La vitamina E (α -tocoferol) protege a los órganos linfoides contra daños por radicales libres en juveniles de jurel (*Seriola rivoliana*), evitando la formación de MMC.

El análisis de enzimas antioxidantes e histología nos brinda conocimientos básicos sobre la función protectora de la vitamina E en concentración de 500mg/kg de α -tocoferol en juveniles de jurel (*Seriola rivoliana*).

El aminoácido triptófano al 1%, tiene un notorio efecto en las funciones fisiológicas analizadas en la expresión de genes del tejido linfóide asociado al intestino (GALT) en juveniles de corvina (*Argyrosomus regius*).

El estrés por exposición al aire tiene un efecto más agresivo en la modulación de genes del sistema inmune en juveniles de corvina (*Argyrosomus regius*) a diferencia del estrés por confinamiento en peces suplementados con 1% de triptófano en el alimento.

El aminoácido triptófano al 0.25%, nos indica una tendencia a un mayor crecimiento en peso y talla para juveniles de pejelagarto (*Atractosteus tropicus*).

El uso de aditivos alimentarios funcionales como α -tocoferol y triptófano, promueve una mejora en protección celular y tiene una influencia vital en las funciones fisiológicas de los organismos acuáticos estudiados en esta tesis.

9.1 Perspectivas de futura investigación

- Analizar la expresión génica de marcadores involucrados en el sistema antioxidante e inmune para determinar el rol de protección que juega el α -tocoferol en juveniles de jurel (*Seriola rivoliana*).
- Analizar el mecanismo de adaptación al estrés por manejo acuícola en diversos tiempos de exposición, mediante análisis de concentraciones de cortisol y glucosa en la sangre en peces suplementados con triptófano al 1%.
- Realizar los análisis enzimáticos digestivos y antioxidantes, así como su respectiva expresión de genes relacionados al sistema inmune, para identificar la dosis que ayude a contrarrestar daños por el posible estrés provocado en juveniles de pejelagarto (*Atractosteus tropicus*).
- Proporcionar evidencias más claras sobre el papel que juegan estos aditivos en la fisiología de los peces de importancia local y comercial, y así proponerlos como mejoras en la rentabilidad de un cultivo comercial.

10. LITERATURA CITADA

Agius C, Agbede SA (1984) An electron microscopical study on the genesis of lipofuscin, melanin and haemosiderin in the haemopoetic tissues of fish. *J. Fish. Biol.* 24: 471-188. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1984.tb04818.x>

Agius C, Roberts J, (2003) Melano-macrophage centers and their role in fish pathology. *J Fish Path* 26,499–509. Doi 10.1046/j.1365-2761.2003.00485.x

Andersen, S. M., Waagbø, R., and Espe, M. (2016). Functional amino acids in fish nutrition, health and welfare. *Front. Biosci.* 8, 143–169. doi: 10.2741/757

Animal welfare in modern production systems for fish, 2021. Proyecto. Disponible en: <https://www.slu.se/en/departments/animal-environment-health/research/research-project/animal-welfare-in-modern-production-systems-for-fish/>

Armenta-López GE, Sumaya-Martínez Mt, Spanopoulos-Hernández M, Balois-Morales R, Sánchez-Herrera M, Jiménez-Ruiz E (2015) Inclusion of natural antioxidant compounds in fish feeds to counteract oxidative stress. *Revista Bio Ciencias* 3(2):68-78

Ashley, P. J. (2007). Fish welfare: current issues in aquaculture. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 104, 199–235. doi: 10.1016/j.applanim.2006.09.001

Azeredo, R., Machado, M., Afonso, A., Fierro-Castro, C., Reyes-López, F. E., Tort, L., et al. (2017a). Neuroendocrine and immune responses undertake different fates following tryptophan or methionine dietary treatment: tales from a teleost model. *Front. Immunol.* 8:1226. doi: 10.3389/fimmu.2017.01226

Azeredo, R., Machado, M., Guardiola, F. A., Cerezuela, R., Afonso, A., Peres, H., et al. (2017c). Local immune response of two mucosal surfaces of the European seabass, *Dicentrarchus labrax*, fed tryptophan- or methionine-supplemented diets. *Fish Shellfish Immunol.* 70, 76–86. doi: 10.1016/j.fsi.2017.09.016

Azeredo, R., Serra, C. R., Oliva-Teles, A., and Costas, B. (2017b). Amino acids as modulators of the European seabass, *Dicentrarchus labrax*, innate immune response: an in vitro approach. *Sci. Rep.* 7:18009. doi: 10.1038/s41598-017-18345-3

Barrows FT (2000). Feed additives. In: Stickney RP (ed.) *Encyclopedia of Aquaculture*, pp. 335–340. John Wiley and Sons, Hoboken, NJ.

Barton, B. A. (2002). Stress in fishes: a diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. *Integr. Comp. Biol.* 42, 517–525. doi: 10.1093/icb/42.3.517

Barton, B. A., and Iwama, G. K. (1991). Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Annu. Rev. Fish Dis.* 1, 3–26. doi: 10.1016/0959-8030(91)90019-G

Biller JD, Takahashi LS (2018) Oxidative stress and fish immune system: phagocytosis and leukocyte respiratory burst activity. *An. Acad. Bras. Ciênc.* vol.90, n.4, pp.3403-3414. Fisheries Science & Aquaculture. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201820170730>

Birnie-Gauvin K, Costantini D, Cooke SJ, Willmore WG (2017) A comparative and evolutionary approach to oxidative stress in fish: A review. *Fish Fish.* 2017; 18: 928– 942. <https://doi.org/10.1111/faf.12215>

Blacio, E., J. Darquea & S. Rodríguez. 2003. Avances en cultivo de huayaípe, *Seriola rivoliana*, en las instalaciones del Cenaim. *Mundo Acuícola*, 9: 21-24.

Bowater, R.O. and Burren, B. 2007. Lateral muscle myopathy associated with vitamin E deficiency in farmed barramundi, *Lates calcarifer* (Bloch). *Journal of Fish Diseases* 30:117-121.

Calderón JA, Esteban JC, Carrascosa MA, Ruiz PL, Valera F (1997). Rearing and growth in captivity of a lot of meagre reproducers (*Argyrosomus regius* (A)). VI Congreso Nacional de Acuicultura, Cartagena, Murcia, Spain. Universidad de Murcia, IEO y MAPA. Act., pp. 365-370.

Campagna, S., Saint, N., Molle, G., and Aumelas, A. (2007). Structure and mechanism of action of the antimicrobial peptide piscidin. *Biochemist* 46, 1771–1778. doi: 10.1021/bi0620297

Campoverde, C., Milne, D. J., Estévez, A., Duncan, N., Secombes, C. J., and Andree, K. B. (2017). Ontogeny and modulation after PAMPs stimulation of β -defensin, hepcidin, and piscidin antimicrobial peptides in meagre (*Argyrosomus regius*). *Fish Shellfish Immunol.* 69, 200–210. doi: 10.1016/j.fsi.2017.08.026

Casadei, E., Wang, T., Zou, J., Gonzalez Vecino, J. L., Wadsworth, S., and Secombes, C. J. (2009). Characterization of three novel β -defensin antimicrobial peptides in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Mol. Immunol.* 46, 3358– 3366. doi: 10.1016/j.molimm.2009.07.018

Claire M. H. Holland John D. Lambris (2002) The complement system in teleosts. *Fish & Shellfish Immunology* 12, 399–420; doi:10.1006/fsim.2001.0408

Chi, C.-C., Shiu, Y.-L., Lin, H.-L., and Lui, C.-H. (2018). Immune response and disease resistance of barramundi, *Lates calcarifer* (Bloch), offered diets supplemented with replete levels of tryptophan or whey. *J. World Aquacult. Soc.* 49, 127–140. doi: 10.1111/jwas.12432

Dantagnan, P., Hernández, A., González, K., Rodríguez, U. and Bórques A. 2013. Interacción Se/vitamina E en dietas para juveniles de trucha arcoíris: efectos sobre el estrés oxidativo. Resúmenes del IV Congreso Nacional de Acuicultura de Chile.

Das, A., Mohapatra, A., and Sahoo, P. K. (2008). Cloning and characterization of antimicrobial peptide, hepcidin in medium carp, *Puntius sarana*. *Int. J. Pept. Res. Ther.* 21, 139–147. doi: 10.1007/s10989-014-9438-4

Davis, K. M., and Weiser, J. N. (2011). Modifications to the peptidoglycan backbone help bacteria to establish infection. *Infect. Immun.* 79, 562–570. doi: 10.1128/IAI.00651-10

Dawood MAO, Koshio S, Ishikawa M, Yokoyama S (2015a) Interaction effects of dietary supplementation of heat-killed *Lactobacillus plantarum* and β -glucan on growth performance, digestibility and immune response of juvenile red sea bream, *Pagrus major*. *Fish & Shellfish Immunology* 45: 33–42.

Dawood MAO, Koshio S, Ishikawa M, Yokoyama S (2015b) Effects of partial substitution of fish meal by soybean meal with or without heat-killed *Lactobacillus plantarum* (LP20) on growth performance, digestibility, and immune response of amberjack, *Seriola dumerili* juveniles. *BioMed Research International* 2015: Article ID 514196.

Dawood, M. A. O., Koshio, S., & Esteban, M. Á. (2017). *Beneficial roles of feed additives as immunostimulants in aquaculture: a review. Reviews in Aquaculture.* doi:10.1111/raq.12209

de Fátima Pereira de Faria, C., dos Reis Martinez, C.B., Takahashi, L.S. *et al.* Modulation of the innate immune response, antioxidant system and oxidative stress during acute and chronic stress in pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *Fish Physiol Biochem* 47, 895–905 (2021). <https://doi.org/10.1007/s10695-021-00940-x>

Dietzen DJ. 2018. Amino acids, peptides, and proteins. In: Rifai N, ed. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*. 6th ed. St Louis, MO: Elsevier; chap 28

Dinan, T. G., and Cryan, J. F. (2012). Regulation of the stress response by the gut microbiota: implications for psychoneuroendocrinology. *Psychoneuroendocrinology* 37, 1369–1378. doi: 10.1016/j.psyneuen.2012.03.007

Duncan, N. J., Estévez, A., Fernández-Palacios, H., Gairin, I., Hernández-Cruz, C. M., Roo, J., ... & Vallés, R. (2013). Aquaculture production of meagre (*Argyrosomus regius*): hatchery techniques, ongrowing and market. In *Advances in aquaculture hatchery technology* (pp. 519-541). Woodhead Publishing.

Dunkelberger, J., Song, WC. Complement and its role in innate and adaptive immune responses. *Cell Res* 20, 34–50 (2010). <https://doi.org/10.1038/cr.2009.139>

Dyall, S. C. (2017). Interplay between n-3 and n-6 long-chain polyunsaturated fatty acids and the endocannabinoid system in brain protection and repair. *Lipids* 52, 885–900. doi: 10.1007/s11745-017-4292-8

Engelsma, M. Y., Huising, M. O., van Muiswinkel, W. B., Flik, G., Kwang, J., Savelkoul, H. F., et al. (2002). Neuroendocrine-immune interactions in fish: a role for interleukin-1. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 87, 467–479. doi: 10.1016/S0165-2427(02)00077-6

Espe M., Vikeså V., Thomsen T.H., Adam A.C., Saito T., Skjaerven K.H. (2020) Atlantic salmon fed a nutrient package of surplus methionine, vitamin B12, folic acid and vitamin B6 improved

growth and reduced the relative liver size, but when in excess growth reduced. *Aquaculture Nutrition*. 20 (2020), pp. 477-489.

Etsuo Niki and Kouichi Abe, CHAPTER 1: Vitamin E: Structure, Properties and Functions, in *Vitamin E: Chemistry and Nutritional Benefits*, 2019, pp. 1-11 DOI: 10.1039/9781788016216-00001. ISBN: 978-1-78801-621-6

Evans D, Nowak B (2016) Effect of ranching time on melanomacrophage centres in anterior kidney and spleen of southern bluefin tuna, *Thunnus maccoyii*, *Fish Shellfish Immunol*. 59 358–364, <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.11.014>

Falco, A., Chico, V., Marroqui, L., Perez, L., Coll, J. M., and Estepa, A. (2008). Expression and antiviral activity of a β -defensin-like peptide identified in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) EST sequences. *Mol. Immunol*. 45, 757–765. doi: 10.1016/j.molimm.2007.06.358

FAO. 2018. *El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2020. La sostenibilidad en acción*. Roma.

FAO. 2020. *El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2020. La sostenibilidad en acción*. Roma. <https://doi.org/10.4060/ca9229es>

Fernández-Alacid, L., Sanahua, I., Ordoñez-Grande, B., Sánchez-Nuñoa, S., Herrera, M., and Ibarz, A. (2019). Skin mucus metabolites and cortisol in meagre fed acute stress attenuating diets: correlations between plasma and mucus. *Aquaculture* 499, 185–194. doi: 10.1016/j.aquaculture.2018.09.039

Fernández I, Gavaia P, Darias M.J, Gisbert E (2018) Fat-soluble vitamins in fish: A transcriptional tissue-specific crosstalk that remains to be unveiled and characterized. In *Emerging Issues in Fish Larvae Research*; Yúfera, M., Ed.; Springer International Publishing: Cham, Switzerland, pp. 159–208

Fernández, I., López-Joven, C., Andree, K. B., Roque, A., & Gisbert, E. (2015). Vitamin A supplementation enhances Senegalese sole (*Solea senegalensis*) early juvenile's immunocompetence: New insights on potential underlying pathways. *Fish & shellfish immunology*, 46(2), 703-709.

Fiore, A., & Murray, P. J. (2021). Tryptophan and indole metabolism in immune regulation. *Current Opinion in Immunology*, 70, 7-14.

Firmino, J., Furones, M. D., Andree, K. B., Sarasquete, C., Ortiz-Delgado, J. B., Asencio-Alcudia, G., & Gisbert, E. (2019). Contrasting outcomes of *Vibrio harveyi* pathogenicity in gilthead seabream, *Sparus aurata* and European seabass, *Dicentrarchus labrax*. *Aquaculture*, 511, 734-740.

Firmino, J. P., Vallejos-Vidal, E., Sarasquete, C., Ortiz-Delgado, J. B., Balasch, J. C., Tort, L., ... & Gisbert, E. (2020). Unveiling the effect of dietary essential oils supplementation in *Sparus aurata*

gills and its efficiency against the infestation by *Sparicotyle chrysophrii*. *Scientific reports*, 10(1), 1-23.

Fishbase.org 2021.
<https://www.fishbase.de/Summary/SpeciesSummary.php?ID=1007&AT=longfin+yellowtail>

Fishbase.org 2021
<https://www.fishbase.de/Summary/SpeciesSummary.php?ID=418&AT=meagre>

Fishbase.org 2021
<https://www.fishbase.de/Summary/SpeciesSummary.php?ID=7326&AT=tropical+gar>

Foey, A., Picchiatti, S. (2014) Immune defences of teleost fish. In: Aquaculture Nutrition. Gut health, probiotics and prebiotics. Merrifield, D, Ringo, E. (eds.), Wiley Blackwell, Oxford, UK, pp. 14-52.

Frischknecht R, Wahli T, Meier W, (1994) Comparison of pathological changes due to deficiency of vitamin C, vitamin E and combinations of vitamins C and E in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *J. Fish Dis.*, 17, 31–45

Galt, N. J., Froehlich, J. M., McCormick, S. D., and Biga, P. R. (2018). A comparative evaluation of crowding stress on muscle HSP90 and myostatin expression in salmonids. *Aquaculture* 483, 141–148. doi: 10.1016/j.aquaculture.2017.10.019

Gao J, Koshio S, Ishiwaka M, Yokoyama S, Mamauag E (2012) Effects of dietary oxidized fish oil with vitamin E supplementation on growth performance and reduction of lipid peroxidation in tissues and blood of red seabream *Pagrus major*. *Aquaculture* 356: 73-79

Gao, J., Xu, K., Lui, H., Bai, M., Peng, C., Li, T., et al. (2018). Impact of the gut microbiota on intestinal immunity mediated by tryptophan metabolism. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 8, 1–22. doi: 10.3389/fcimb.2018.00013

Gatlin DM, Poe WE, Wilson RP, Ainsworth AJ, Bowser PR, (1986) Effects of stocking density and vitamin C status on vitamin E-adequate and vitamin E deficient fingerling channel catfish. *Aquaculture*, 56, 187–195

Gisbert, E., Fernández, I., y A. Estévez. 2008. Nutrición y Morfogénesis: Efecto de la Dieta sobre la Calidad Larvaria en Peces. 46-78 pp. Editores: L. Elizabeth Cruz Suárez, Denis Ricque Marie, Mireya Tapia Salazar, Martha G. Nieto López, David A. Villarreal Cavazos, Juan Pablo Lazo y Ma. Teresa Viana. Avances en Nutrición Acuícola IX. IX Simposio Internacional de Nutrición Acuícola. 24-27 Noviembre. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, México.

Gisbert, E., Fournier, V., Solovyev, M., Skalli, A., and Andree, K. B. (2018). Diets containing shrimp protein hydrolysates provided protection to European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) affected by a *Vibrio pelagius* natural infection outbreak. *Aquaculture* 495, 136–143. doi: 10.1016/j.aquaculture.2018.04.051

Gisbert, E., Ibarz, A., Firmino, J. P., Fernández-Alacid, L., Salomón, R., Vallejos-Vidal, E., ... & Andree, K. B. (2021). Porcine Protein Hydrolysates (PEPTEIVA®) Promote Growth and Enhance Systemic Immunity in Gilthead Sea Bream (*Sparus aurata*). *Animals*, *11*(7), 2122.

Gómez, D., Oriol-Sunyer, J., and Salinas, I. (2013). The mucosal immune system of fish: the evolution of tolerating commensals while fighting pathogens. *Fish Shellfish Immunol.* *35*, 1729–1739. doi: 10.1016/j.fsi.2013.09.032

González-Silvera, D., Herrera, M., Giráldez, I., and Esteban, M. (2018). Effects of the dietary tryptophan and aspartate on the immune response of meagre (*Argyrosomus regius*) after stress. *Fishes* *3*, 1–13. doi: 10.3390/fishes3010006

Gupta, A., Gupta, S. K., Priyam, M., Siddik, M. A., Kumar, N., Mishra, P. K., ... & Pattanayak, A. (2021). Immunomodulation by dietary supplements: A preventive health strategy for sustainable aquaculture of tropical freshwater fish, *Labeo rohita* (Hamilton, 1822). *Reviews in Aquaculture*.

Haffray, P., Malha, R., Sidi, M. O. T., Prista, N., Hassan, M., Castelnaud, G., ... & Bonhomme, F. (2012). Very high genetic fragmentation in a large marine fish, the meagre *Argyrosomus regius* (Sciaenidae, Perciformes): impact of reproductive migration, oceanographic barriers and ecological factors. *Aquatic Living Resources*, *25*(2), 173-183.

Hellwig-Bürgel, T., Stiehl, D. P., Wagner, A. E., Metzen, E., and Jelkmann, W. (2005). Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1): a novel transcription factor in immune reactions. *J. Interf. Cytokine Res.* *25*, 297–310. doi: 10.1089/ jir.2005.25.297

Herrera, M., Herves, M. A., Giráldez, I., Skar, K., Mogren, H., Mortensen, A., et al. (2017). Effects of amino acid supplementations on metabolic and physiological parameters in Atlantic cod (*Gadus morhua*) under stress. *Fish Physiol. Biochem.* *43*, 591–602. doi: 10.1007/s10695-016-0314-3

Higdon, J., Drake, V.J., Traber, M.G., Delage, B. Centro de información de micronutrientes. 2021. Disponible en <https://lpi.oregonstate.edu/es/mic/vitaminas/vitamina-E#interaccion-nutrientes>

Höglund, E., Bakke, M. J., Øverli, Ø., Winberg, S., and Nilsson, G. E. (2005). Suppression of aggressive behaviour in juvenile Atlantic cod (*Gadus morhua*) by L-tryptophan supplementation. *Aquaculture* *249*, 525–531. doi: 10.1016/j. aquaculture.2005.04.028

Holland, M. C. H., and Lambris, J. D. (2002). The complement system in teleosts. *Fish Shellfish Immunol.* *12*, 399–420. doi: 10.1006/fsim.2001.0408

Hoseini, S. M., Hosseini, S. A., and Soudagar, M. (2012). Dietary tryptophan changes serum stress markers, enzyme activity, and ions concentration of wild common carp *Cyprinus carpio* exposed to ambient copper. *Fish Physiol. Biochem.* *38*, 1419–1426. doi: 10.1007/s10695-012-9629-x

Hoseinifar, S. H., Sun, Y. Z., Zhou, Z., Van Doan, H., Davies, S. J., & Harikrishnan, R. (2020). Boosting immune function and disease bio-control through environment-friendly and sustainable approaches in finfish aquaculture: herbal therapy scenarios. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*, 28(3), 303-321.

Hseu, J. R., Lu, F. I., Su, H. M., Wang, L. S., Tsai, C. L., and Hwang, P. P. (2003). Effect of exogenous tryptophan on cannibalism, survival and growth in juvenile grouper, *Epinephelus coioides*. *Aquaculture* 218, 251–263. doi: 10.1016/S0044-8486(02)00503-3

Huei C, Huang S (2004) Effect of dietary vitamin E on growth, tissue lipid peroxidation and liver glutathione level of juvenile hybrid tilapia, *O niloticus* x *O. Aureus*, fed oxidized oil. *Aquaculture* 237: 381-389.

Jang, I.S., Ko, Y.H., Yang, H.Y., Ha, J. S., Kim, J.Y., Kim, J.Y., Kang, S.Y., Yoo, D.H., Nam, D.S., Kim, D.H, Lee, C.Y., 2004. Influence of essential oil components on growth performance and the functional activity of the pancreas and small intestine in broiler chickens. *Asian–Australasian J Anim Sci.* 17, 394–400.

Jenkins, T. A., Nguyen, J. C., Polglaze, K. E., and Bertrand, P. P. (2016). Influence of tryptophan and serotonin on mood and cognition with a possible role of the gut-brain axis. *Nutrients* 8, 1–15. doi: 10.3390/nu8010056

Ji, R., Li, Y., Li, X., Xiang, X., Li, Y., Zhu, S., ... & Ai, Q. (2018). Effects of dietary tea polyphenols on growth, biochemical and antioxidant responses, fatty acid composition and expression of lipid metabolism related genes of large yellow croaker (*Larimichthys crocea*). *Aquaculture Research*, 49(3), 1210-1218.

Jiang, Q, Christen,S, Shigenaga MK, AmesBN (2001) gamma-Tocopherol, the major form of vitamin E in the US diet, deserves more attention. *Am. J. Clin. Nutr.* 74:714-722

Jiang Q (2014) Natural forms of vitamin E: metabolism, antioxidant, and anti-inflammatory activities and their role in disease prevention and therapy. *Free Radic Biol Med*72:76–90

Jiménez, M. T., Alconchel, J. I., Sánchez, R., Cárdenas, S., Pastor, E., & Grau, A. (2005). Review of sciaenid culture around the world, with a special focus on the meagre *Argyrosomus regius* (Asso, 1801). *Boletín-Instituto Español de Oceanografía (España)*.

Jostes, R. F. (1996). Genetic, cytogenetic, and carcinogenic effects of radon: a review. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, 340(2-3), 125-139.

Kasozi, N., Abraham, B., Kaiser, H., & Wilhelmi, B. (2021). The complex microbiome in aquaponics: significance of the bacterial ecosystem. *Annals of Microbiology*, 71(1), 1-13.

Khansari, A. R., Balasch, J. C., Vallejos-Vidal, E., Parra, D., Reyes-López, F. E., and Tort, L. (2018). Comparative immune- and stress-related transcript response induced by air exposure and *Vibrio*

anguillarum bacteria in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and gilthead seabream (*Sparus aurata*) mucosal surfaces. *Front. Immunol.* 9:856. doi: 10.3389/fimmu.2018.00856

Kim, D.-Y., and Camilleri, M. (2000). Serotonin: a mediator of the brain-gut connection. *Am. J. Gastroenterol.* 95: 2698–2709. doi: 10.1111/j.1572-0241.2000.03177.x

Korun, J., & Timur, G. (2008). Marine vibrios associated with diseased sea bass (*Dicentrarchus labrax*) in Turkey. *Journal of Fisheries Sciences. com*, 2(1), 66-76.

Kumar, B., Manuja, A., and Aich, P. (2012). Stress and its impact on farm animals. *Front. Biosci. E4*, 1759–1767. doi: 10.2741/e496

Kum, C., & Sekkin, S. (2011). The immune system drugs in fish: immune function, immunoassay, drugs. *Recent advances in fish farms*, 169-210.

Kvamme, B. O., Gadan, K., Finne-Fridell, F., Niklasson, L., Sundh, H., Sundell, K., et al. (2013). Modulation of innate immune responses in Atlantic salmon by chronic hypoxia-induced stress. *Fish Shellfish Immunol.* 34, 55–65. doi: 10.1016/j.fsi.2012.10.006

Laidley, C.W., Shields, R.J., Ostrowski, A.O., 2004. Amberjack culture, progress ay Pceanic Institute. *Glob. Aquac. Advocate* 7, 42-43.

Lange, S., and Magnadóttir, B. (2003). Spontaneous haemolytic activity of Atlantic halibut (*Hippoglossus* L.) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*) serum. *Comp. Biochem. Physiol.* 136B, 99–106. doi: 10.1016/S1096-4959(03)00173-8

Lauth, X., Babon, J. J., Stannard, J. A., Singh, S., Nizet, V., Carlberg, J. M., et al. (2005). Bass hepcidin synthesis, solution structure, antimicrobial activities and synergism, and in vivo hepatic response to bacterial infections. *J. Biol. Chem.* 280, 9272–9282. doi: 10.1074/jbc.M411154200

Lazado, C. C., and Caipang, C. M. (2014). Mucosal immunity and probiotics in fish. *Fish Shellfish Immunol.* 39, 78–89. doi: 10.1016/j.fsi.2014.04.015

Li, P., Mai, K., Trushenski, J., and Wu, G. (2009). New developments in fish amino acid nutrition: towards functional and environmentally oriented aquafeeds. *Amino Acids* 37, 43–53. doi: 10.1007/s00726-008-0171-1

Lim, J. E., Porteus, C. S., and Bernier, N. J. (2013). Serotonin directly stimulates cortisol secretion from the interrenals in goldfish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 192, 246–255. doi: 10.1016/j.ygcen.2013.08.008

Lin, W.-C., Chang, H.-Y., and Chen, J.-Y. (2016). Electrotransfer of the tilapia piscidin 3 and tilapia piscidin 4 genes into skeletal muscle enhances the antibacterial and immunomodulatory functions of *Oreochromis niloticus*. *Fish Shellfish Immunol.* 50, 200–209. doi: 10.1016/j.fsi.2016.01.034

Liu CH, Tseng MC, Cheng W (2007) Identification and cloning of the antioxidant enzyme, glutathione peroxidase, of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, and its expression following *Vibrio alginolyticus* infection. *Fish & Shellfish Immunology*. 23 (1): 34-45

Lovell RT, Miyazaki T., Rabegnator S, (1984) Requirement for alpha-tocopherol by channel catfish fed diets low in polyunsaturated triglycerides. *J. Nutr.*, 114, 894–901

Mamane, Y., Heylbroeck, C., Génin, P., Algarte, M., Servant, M. J., LePage, C., et al. (1999). Interferon regulatory factors: the next generation. *Gene* 237, 1–14. doi: 10.1016/S0378-1119(99)00262-0

Manor D, Morley S (2007) The alpha-tocopherol transfer protein. *Vitam. Horm.* 76:45–65

Masso-Silva, A. J., and Diamond, G. (2014). Antimicrobial peptides from fish. *Pharmaceuticals* 7, 265–310. doi: 10.3390/ph7030265

Martínez-Álvarez RM, Morales AE Sanz A (2005) Antioxidant Defenses in Fish: Biotic and Abiotic Factors. *Rev Fish Biol Fisheries* 15, 75–88 (2005). <https://doi.org/10.1007/s11160-005-7846-4>

Mesa-Rodríguez A, Hernández-Cruz CM, Socorro JA, Fernández-Palacios H, Izquierdo MS, Roo J. (2014) Skeletal Development and Mineralization Pattern of the Vertebral, Column, Dorsal, Anal and Caudal Fin Complex in *Seriola Rivoliiana* (Valenciennes, 1833) Larvae. *J Aquac Res Development* 5: 266. doi:10.4172/2155-9546.1000266

Meydani, M., Hernandez-Rodriguez, J., Youdim, M. B., & Gutierrez-Robledo, L. M. (2001). Antioxidants and cognitive function/Discussion/Comment. *Nutrition reviews*, 59(8), S75.

Miller, P. A., Fitch, A. J., Gardner, M., Hutson, K. S., & Mair, G. (2011). Genetic population structure of Yellowtail Kingfish (*Seriola lalandi*) in temperate Australasian waters inferred from microsatellite markers and mitochondrial DNA. *Aquaculture*, 319(3-4), 328-336.

Mommsen TP, Vijayan MM, Moon TW (1999). Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. *Rev Fish Biol Fish* 9:211–268. <https://doi.org/10.1023/A:1008924418720>

Mutoloki, S., Munang'andu, H. M., and Evensen, Ø. (2015). Oral vaccination of fish—antigen preparations, uptake, and immune induction. *Front. Immunol.* 6:519. doi: 10.3389/fimmu.2015.00519

Nakano T, Kanmuri T, Sato M, Takouchi M (1999) Effect of astaxanthin rich red yeast on oxidative stress in rainbow trout. *Biochimica et Biofysica Acta* 1426: 119-125

National Center for Biotechnology Information (2021). PubChem Compound Summary for CID 1742129, (-)-alpha-Tocopherol. Retrieved August 15, 2021, from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/alpha-Tocopherol>.

National Center for Biotechnology Information (2021). PubChem Compound Summary for CID 6305, Tryptophan. Retrieved August 15, 2021, from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Tryptophan>.

Nelson, D. L., and Cox, M. M. (2013). *Lehninger principles of biochemistry*. 7th Edn. (New York, USA: W.H. Freeman and Company).

Ng WK, Koh CB (2016) The utilization and mode of action of organic acids in the feeds of cultured aquatic animals. *Reviews in Aquaculture*. <https://doi.org/10.1111/raq.12141>

Nimse SB, Pal D. (2015). Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *RSC Advances* 5:27986–28006. <https://doi.org/10.1039/C4RA13315C>

Noble, C., Cañon Jones, H., Damsgård, B., Flood, M., Midling, K., Roque, A., et al. (2012). Injuries and deformities in fish: their potential impacts upon aquacultural production and welfare. *Fish Physiol. Biochem.* 38, 61–83. doi: 10.1007/s10695-011-9557-1

Noga, E. J., Silphaduang, U., Park, N. G., Seo, J. K., Stephenson, J., and Kozłowicz, S. (2009). Piscidin 4, a novel member of the piscidin family of antimicrobial peptides. *Comp. Biochem. Physiol.* 152B, 299–305. doi: 10.1016/j.peptides.2010.11.005

NRC (National Research Council) (2011). *Nutrient Requirements of Fish and Shrimp*. National Academies Press, Washington, DC.

O'Mahony, S. M., Clarke, G., Borre, Y. E., Dinan, T. G., and Cryan, J. F. (2015). Serotonin, tryptophan metabolism and the brain-gut-microbiome axis. *Behav. Brain Res.* 277, 32–48. doi: 10.1016/j.bbr.2014.07.027

Olmos-Soto, J., Paniagua-Michel, J. J., Lopez, L., and Ochoa, L. (2015). “Functional feeds in aquaculture” in *Springer handbook of marine biotechnology*. ed. S. K. Kim (Berlin/Heidelberg: Springer), 1303–1319.

Ostaff, M. J., Stange, E. F., and Wehkamp, J. (2013). Antimicrobial peptides and gut microbiota in homeostasis and pathology. *EMBO Mol. Med.* 5, 1465–1483. doi: 10.1002/emmm.201201773

Palazón, A., Goldrath, A. W., Nizet, V., and Johnson, R. S. (2014). HIF transcription factors, inflammation, and immunity. *Immunity* 41, 518–528. doi: 10.1016/j.immuni.2014.09.008

Pan J-H, Feng L, Jiang W-D, Wu P, Kuang S-Y, Tang L, Zhang Y-A, Zhou X-Q, Liu Y (2016) Vitamin E deficiency depressed fish growth, disease resistance, and the immunity and structural integrity of immune organs in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*): Referring to NF-κB, TOR and Nrf2 signaling, *Fish and Shellfish Immunology* doi: 10.1016/j.fsi.2016.11.044

Pastor E, Grau A, Massutí E, Sánchez-Madrid A (2002). Preliminary results on growth of meagre, *Argyrosomus regius* (Asso, 1801) in sea cages and indoor tanks. *EAS Espec. Publ.*, 32: 422-423.

Paulsen, S. M., Lunde, H., Engstad, R. E., and Robertsen, B. (2003). In vivo effects of β -glucan and LPS on regulation of lysozyme activity and mRNA expression in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Fish Shellfish Immunol.* 14, 39–54. doi: 10.1006/fsim.2002.0416

Pelster, B., and Egg, M. (2018). Hypoxia-inducible transcription factors in fish: expression, function and interconnection with the circadian clock. *J. Exp. Biol.* 221:jeb163709. doi: 10.1242/jeb.163709

Prego-Faraldo MV, Vieira LR, Eirin-Lopez JM, Mendez J, Guilhermino L (2017) Transcriptional and biochemical analysis of antioxidant enzymes in the mussel *Mytilus galloprovincialis* during experimental exposures to the toxic dinoflagellate *Prorocentrum lima*. *Mar Environ Res.* 129:304–315. doi:10.1016/j.marenvres.2017.06.009

Press, C. M., & Evensen, Ø. (1999). The morphology of the immune system in teleost fishes. *Fish & shellfish immunology*, 9(4), 309-318.

Qin, Q. W., Ototake, M., Noguchi, K., Soma, G., Yokomizo, Y., and Nakanishi, T. (2001). Tumor necrosis factor alpha (TNF α)-like factor produced by macrophages in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Fish Shellfish Immunol.* 11, 245–256. doi: 10.1006/fsim.2000.0311

Quintero-Pardo A. M. C., & Cardoso Giaquinto P. (2015). Influencia de dietas suplementadas con triptófano sobre el autobalanceo, consumo de alimento y desempeño productivo en ejemplares juveniles y adultos de tilapia Nilótica. *Revista Veterinaria y Zootecnia (On Line)*, 9(2), 13 - 23. <https://doi.org/10.17151/vetzo.2015.9.2.2>

Raftos, D. A., Robbins, J., Newton, R. A., and Nair, S. V. (2003). A complement component C3a-like peptide stimulates chemotaxis by hemocytes from an invertebrate chordate—the tunicate *Pyura stolonifera*. *Comp. Biochem. Physiol.* 134A, 377–386. doi: 10.1016/S1095-6433(02)00287-8

Rao, A.V., Agarwal, S. 1999. Role of lycopene as antioxidant carotenoid in the prevention of chronic diseases: A review, *Nutrition Research*, Volume 19, Issue 2, Pages 305-323, ISSN 0271-5317, [https://doi.org/10.1016/S0271-5317\(98\)00193-6](https://doi.org/10.1016/S0271-5317(98)00193-6).

Richard, D. M., Dawes, M. A., Mathias, C. W., Acheson, A., Hill-Kapturczak, N., and Dougherty, D. M. (2009). L-tryptophan: basic metabolic functions, behavioral research and therapeutic indications. *Int. J. Tryp. Res.* 2, 45–60. doi: 10.4137/IJTR.S2129

Ricklin, D., Hajishengallis, G., Yang, K., and Lambris, J. D. (2010). Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nat. Immunol.* 11, 785–797. doi: 10.1038/ni.1923

Rigotti A (2007). Absorption, transport and tissue delivery of vitamin E. *Mol. Aspects Med.*, 28, 423–436

Ringø, E., Olsen, R. E., Gifstad, T. Ø., Dalmo, R. A., Amlund, H., Hemre, G. I., & Bakke, A. M. (2010). Prebiotics in aquaculture: a review. *Aquaculture Nutrition*, 16(2), 117-136.

Rodríguez-Jaramillo MC, Hurtado MA, Romero-Vivas E, Ramírez JL, Manzano JL, Palacios E, (2008) Gonadal development and histochemistry of the tropical oyster, *Crassostrea corteziensis* (Hertlein, 1951) during an annual reproductive cycle. *J. Shellfish Res.* 27, 1129–1141

Roo, j., Fernandez-Palacios, H., Hernández-Cruz, C.M., Mesa-Rodríguez, A., Schuchardt, D., Izquierdo, M., 2014. First results of spawning and larval rearing of longfin yellowtail *Seriola rivoliana* as a fast-growing candidate for European marine finfish aquaculture diversification. *Aquac. Res.* 45, 689-700.

Rooijackers, S. H. M., and van Strijp, J. A. G. (2007). Bacterial complement evasion. *Mol. Immunol.* 44, 23–32. doi: 10.1016/j.molimm.2006.06.011

Ross, S.A., Caffery, P.J., Draguer, U.C., De Luca, L.M., 2000. Retinoids in embryonal development. *Phys. Rev.* 80: 1021–1054.

Sáez G.T., Están-Capell N. (2015) Antioxidant Enzymes. In: Schwab M. (eds) Encyclopedia of Cancer. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-662-46875-3_7210

Sahu, S., Ngasotter, S., Mog, M., Tesia, S., Sharma, S., & Waikhom, B. D. D. (2020). A review on physiological, behavioral and metabolic role of dietary tryptophan in fish. *IJCS*, 8(3), 2411-2417.

Sánchez-Valle V, Méndez-Sánchez N. Estrés oxidativo, antioxidantes y enfermedad. *Med Sur.* 2013;20(3):161-168.

Schokker, D., Zhang, J., Vastenhouw, S. A., Heilig, H. G., Smidt, H., Rebel, J. M., et al. (2015). Long-lasting effects of early-life antibiotic treatment and routine animal handling on gut microbiota composition and immune system in pigs. *PLoS One* 10:e0116523. doi: 10.1371/journal.pone.0116523

Scopece, A. (2019). Potential interaction between meagre (*Argyrosomus regius* Asso, 1801) aquaculture and fisheries in the Mediterranean Sea.

Secombes CJ, Wang T (2012) The innate and adaptive immune system of fish. In: Austin B (ed) Infectious disease in aquaculture: prevention and control. Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, pp 3–68

Semeza, G. L. (1998). Hypoxia-inducible factor 1: master regulator of O₂ homeostasis. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 8, 588–594. doi: 10.1016/S0959-437X(98)80016-6

Sepúlveda-Quiroz, C. A., Peña-Marín, E. S., Pérez-Morales, A., Martínez-García, R., Alvarez-Villagomez, C. S., Maytorena-Verdugo, C. I., ... & Álvarez-González, C. A. (2021). Fructooligosaccharide supplementation in diets for tropical gar (*Atractosteus tropicus*) juvenile: Effects on morphophysiology and intestinal barrier function. *Aquaculture Research*, 52(1), 37-50.

Shimon-Hophy, M. and Avtalion, R.R. (2021), Influence of chronic stress on the mechanism of the cytotoxic system in common carp (*Cyprinus carpio*). Immunology. <https://doi.org/10.1111/imm.13345>

Sicuro, B., U. Luzzana. 2016. The State of *Seriola* spp. Other Than Yellowtail (*S. quinqueradiata*) Farming in the World. Rev Fish Sci Aquac.

Smith, V. J., Desbois, A. P., and Dyrinda, E. A. (2010). Conventional and unconventional antimicrobials from fish, marine invertebrates and micro-algae. *Mar. Drugs* 8, 1213–1262. doi: 10.3390/md8041213

Sunyer, J. O., Zarkadis, I. K., and Lambris, J. D. (1998). Complement diversity: a mechanism for generating immune diversity. *Immunol. Today* 19, 519–523. doi: 10.1016/S0167-5699(98)01341-3

Tacon, A. (1989). Nutrición y alimentación de peces y camarones cultivados. Manual de Capacitación. FAO, Proyecto Aquila II. Documento de Campo no.4, pp.1-572.

Teles A, Salas-Leiva J, Alvarez-González CA, Gisbert E, Ibarra L, Pèrez-Urbiola JC, Tovar-Ramírez D, (2017) Histological study of the gastrointestinal tract in longfin yellowtail (*Seriola rivoliana*) larvae. *Fish Physiol Biochem* 43, 1613–1628 <https://doi.org/10.1007/s10695-017-0397-5>

Thilakaratne IDSIP, McLaughlin JD, Marcogliese DJ (2007) Effects of pollution and parasites on biomarkers of fish health in spottail shiners *Notropis hudsonius* (Clinton). *Journal of Fish Biology*, 71: 519-538. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2007.01511.x>

Toni, M., Manciocco, A., Angiulli, E., Alleva, E., Cioni, C., and Malavasi, S. (2019). Assessing fish welfare in research and aquaculture, with a focus on European directives. *Animal* 13, 161–170. doi: 10.1017/S1751731118000940

Tort L. Stress and immune modulation in fish. *Dev Comp Immunol*. 2011 Dec;35(12):1366-75. doi: 10.1016/j.dci.2011.07.002. Epub 2011 Jul 14. PMID: 21782845.

Traber MG (2007) Vitamin E regulatory mechanisms. *Annu. Rev. Nutr.* 27:347–362

Traber MG, Olivecrona T, Kayden HJ (1985) Bovine milk lipoprotein lipase transfers tocopherol to human fibroblasts during triglyceride hydrolysis in vitro. *J. Clin. Invest.* 75:1729–1734

Urbinati, E. C., Zanuzzo, F. S., & Biller, J. D. (2020). Stress and immune system in fish. In *Biology and physiology of freshwater neotropical fish* (pp. 93-114). Academic Press.

Uribe-Herranz, M., Rafail, S., Beghi, S., Gil-de-Gómez, L., Verginadis, I., Bittinger, K., ... & Facciabene, A. (2020). Gut microbiota modulate dendritic cell antigen presentation and radiotherapy-induced antitumor immune response. *The Journal of clinical investigation*, 130(1), 466-479.

Vecchio, A. J., Simmons, D. M., and Malkowski, M. G. (2010). Structural basis of fatty acid substrate binding to cyclooxygenase-2. *J. Biol. Chem.* 285, 22152–22163. doi: 10.1074/jbc.M110.119867

Veyrand-Quiroz, Bernardo. 2021. Aislamiento, caracterización y efecto del bacteriófago vb_pd_pdcc-1 en el desarrollo temprano del jurel *Seriola rivoliana* y su impacto sobre la dinámica microbiana. Tesis CIBNOR S.C.

Watanabe, T., Takashima, F., Ogino, C. & Hibiya, T. (1970). Requirements of young carp for a-tocopherol. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, 36, 972–976.

Wen, H., Jiang, W., Liu, Y., Jiang, J., Li, S., Tang, L., et al. (2014). Dietary tryptophan modulates intestinal immune response, barrier function, antioxidant status and gene expression of TOR and Nrf2 in young grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Fish Shellfish Immunol.* 40, 275–287. doi: 10.1016/j.fsi.2014.07.004

Welker T, Congleton, (2009) Effect of dietary alpha-tocopherol+ascorbic acid, selenium and iron on oxidative stress in subyearling Chinook salmon. *Journal of Physiology and nutrition* 93: 15-25

Wendelaar-Bonga, S. E. (1997). The stress response in fish. *Physiol. Rev.* 7, 591–265. doi: 10.1152/physrev.1997.77.3.591

Wolke RE, (1992) Piscine macrophage aggregates: a review, *Annu. Rev. Fish Dis.* 2 91–108, [https://doi.org/10.1016/0959-8030\(92\)90058-6](https://doi.org/10.1016/0959-8030(92)90058-6)

Yang, J., Lu, X. J., Chai, F. C., and Chen, J. (2016). Molecular characterization and functional analysis of a piscidin gene in large yellow croaker (*Larimichthys crocea*). *Zool. Res.* 18, 347–355. doi: 10.13918/j.issn.2095-8137.2016.6.347

Ye, H., Lin, Q., Luo, H., 2018. Applications of transcriptomics and proteomics in understanding fish immunity. *Fish Shellfish Immunol.* 77, 319–327.

Yin, G., Ardo, L., Thompson, K.D., Adams, A., Jeney, Z., Jeney, G., 2009. Chinese herbs (*Astragalus radix* and *Ganoderma lucidum*) enhance immune response of carp, *Cyprinus carpio*, and protection against *Aeromonas hydrophila*. *Fish and Shellfish Immunol.* 26, 140–145.

Zhang, Y.-A., Salinas, I., Li, J., Parra, D., Bjork, S., Xu, Z., et al. (2010). IgT, a primitive immunoglobulin class specialized in mucosal immunity. *Nat. Immunol.* 11, 827–835. doi: 10.1038/ni.1913