

# Acuabio 1 estimula el metabolismo anaerobio y el sistema inmune innato de las larvas de goldfish y tilapia

Rebeca Martínez<sup>1</sup>, Yamila Carpio<sup>1</sup>, Yoelys Gómez<sup>1</sup>, Manuel Raíces<sup>2</sup>, Antonio Morales<sup>1</sup>, Fidel Herrera<sup>1</sup>, Osmany González<sup>1</sup>, Reynold Morales<sup>1</sup>, Mario P Estrada<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Biotecnología Acuática, División de Biotecnología Animal Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Apartado Postal Box 6 162, Ciudad de La Habana, Código Postal 10 600, Cuba  
E-mail: mpablo@cigb.edu.cu

<sup>2</sup>Grupo de Negociación y Desarrollo de Proyectos

## RESUMEN

Acuabio 1 es una mezcla de proteínas y aminoácidos esenciales que ejercen un efecto nutricional importante en las etapas iniciales del desarrollo de los organismos acuáticos. Su efecto sincroniza y estimula el crecimiento de las larvas. Con su empleo se activa y acelera el mecanismo de crecimiento desde edades muy tempranas, así como el desarrollo y la talla de los animales, lo cual provoca, como efecto secundario, una mayor resistencia ante organismos parásitos. Estas propiedades del Acuabio 1 lo hacen muy atractivo para su utilización en el mejoramiento de la producción, supervivencia y calidad de las larvas de los organismos acuáticos, etapa crucial en el cultivo de esos animales. En esta investigación se evidenció la acción estimuladora de Acuabio 1. Se obtuvieron larvas de goldfish con un peso 3.5 veces mayor, y larvas de tilapia con un peso 1.6 veces mayor, comparando ambos resultados con el control negativo. A su vez, hubo un estímulo del metabolismo anaerobio y de los factores que median la respuesta inmune innata. A partir de este estudio, se comprendieron mejor los mecanismos moleculares que activa este suplemento nutricional.

**Palabras clave:** peces, crecimiento, sistema inmune innato

*Biotecnología Aplicada 2006;23:287-293*

## ABSTRACT

**Acuabio 1 is able to stimulate the anaerobic metabolism and immune system in goldfish and tilapia larvae.** Acuabio 1 is an mixture of essential protein and amino acids able to generate an important effect at preliminary developmental states of aquatic organisms. When Acuabio 1 is used, it is able to synchronize and stimulate the offspring growth since early states speeding animal development and growth generating in parallel a higher resistance to parasites. These qualities made the product very attractive for being used in improving the survival rate, quality and quantities of aquatic organisms at larvae stage, a moment that is crucial when cultivating such animals. In this work it is shown the stimulating effect in goldfish, heavier larvae 3.5 times and in the case of tilapia 1.6 times more than the negative control larvae, also it was detected an increase in the anaerobic metabolism and in other factors responsible in mediate the innate immunological response in treated larva, helping to understand the molecular mechanisms released by this food supplement.

**Key words:** fish, growth, innate immune system

## Introducción

La acuicultura constituye una vía alternativa para la protección de los ecosistemas marinos y de agua dulce. Sin embargo, las altas densidades de peces que se alcanzan mediante las tecnologías aplicadas a la acuicultura, aumentan el estrés en los peces, lo cual provoca la aparición de enfermedades ocasionales por agentes patógenos oportunistas restringiendo la productividad acuícola, requiriendo especial atención por parte de los investigadores [1]. Uno de los retos de la acuicultura consiste en aumentar los índices de producción en el estadio larval. En este período de la vida de los peces ocurre la mayor pérdida de ejemplares. Por ello, cualquier intento para mejorar la supervivencia y la calidad de vida de las larvas, ayudará a que un mayor número de peces alcance el estado adulto, lo que resultará en un aumento de la producción acuícola.

La biotecnología acuática ha desarrollado múltiples estrategias experimentales, encaminadas a modificar el crecimiento en los peces a partir de la administración de varias hormonas como la prolactina, la insulina, la hormona de crecimiento (HC) y las hormonas

esteroideas [2], así como la aplicación de dietas ricas en nutrientes proteicos específicos. Se le ha conferido particular importancia al mejoramiento genético, mediante la transferencia de genes y las manipulaciones cromosómicas. Con el empleo de estas tecnologías se han obtenido variedades de salmón, trucha, tilapia y de otras especies comerciales, con mayor tasa de crecimiento, menor susceptibilidad a las condiciones ambientales adversas, con necesidades nutricionales significativamente inferiores y mayor resistencia ante las enfermedades [3].

Con este propósito, el Departamento de Biotecnología Acuática del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB, Ciudad de La Habana, Cuba) ha desarrollado el suplemento nutricional Acuabio 1, comercializado por la firma Heber Biotec. Este producto es una mezcla de proteínas y aminoácidos esenciales, que ejercen un efecto nutricional importante en las etapas iniciales de desarrollo de los organismos acuáticos. Su efecto estimula y acelera el crecimiento de las larvas de peces, así como el posterior crecimiento

1. Dautrempuits C, Betoulle S, Vernet G. Stimulation of antioxidant enzymes levels in carp (*Cyprinus carpio* L.) infected by *Ptychobothrium* sp. (Cestoda). *Fish and Shellfish Immunol* 2003;(15):467-71.

2. Pullin RS, McConell RH. The biology and culture of tilapias. Conference Proceeding 7, 432 p. International Center for living Aquatic Resources Management. Manila, Philippines, pages ISSN 0115-4389; 1982.

3. Devlin HR, Sundstrom LF, Muir WM. Interface of biotechnology and ecology for environmental risk assessments of transgenic fish. *TIB* 2006;(24):89-97.

y desarrollo de los animales desde edades muy tempranas, a la vez que provoca, como efecto secundario, una mayor resistencia ante organismos parásitos. Además, se ha comprobado que Acuabio 1 estimula la liberación de la hormona de crecimiento (HC) endógena en sangre, así como la transcripción del factor del crecimiento tipo insulina en el hígado.

Es conocido que la interacción entre el sistema inmune y el endocrino, por la vía de las hormonas y las citoquinas, es importante para ajustar los mecanismos de defensa tanto en mamíferos como en peces [4]. El sistema inmune actúa sobre los agentes infecciosos que tienen contacto con el huésped, y es por ello que su estudio es básico para el desarrollo de estrategias, con el objetivo de mejorar el estado inmunológico de los peces en cultivo.

Hasta el momento no se han realizado estudios bioquímicos ni ensayos dirigidos a buscar evidencias de la estimulación del sistema inmune en animales tratados con Acuabio 1. Por todo ello, el objetivo de esta investigación fue estudiar algunos parámetros bioquímicos como las enzimas lactato deshidrogenasa (LDH), la creatina quinasa (CK), la aspartato amino transferasa (ASAT), los triacilglicéridos (TAG), así como los niveles de lisozima, lectinas y la actividad antiproteasa, indicadores del sistema inmune innato, en las larvas de goldfish (*Carasius auratus*) y de tilapia (*Oreochromis sp.*) tratadas con el suplemento nutricional Acuabio1. La tilapia (*Oreochromis sp.*) es una de las especies de mayor importancia en la acuicultura, debido a que tiene elevado nivel proteico, bajo costo de producción y solo necesita seis meses para alcanzar el peso comercial de 250 gramos [5]. Por ello, constituye una especie de elección para los estudios de crecimiento. En la actualidad, existe un creciente interés mundial por los peces ornamentales [6], así como por la estimulación del crecimiento de estas especies. Estos estudios pueden ser modelo para aplicaciones futuras en peces de interés económico, lo cual constituye una alternativa tentadora en la que se pudiera incursionar.

## Materiales y métodos

### Experimentos de crecimiento

Los experimentos de crecimiento se realizaron en el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB), Ciudad de La Habana, en condiciones estables de temperatura (28 °C) y con un fotoperíodo controlado (14 horas de luz y 10 de oscuridad). Para ello se emplearon larvas de goldfish (*Carasius auratus*) y de tilapia (*Oreochromis sp.*), procedentes del Centro Acuícola Mampostón (CPAM), del Ministerio de la Industria Pesquera.

Se conformaron grupos experimentales de 150 larvas, que fueron alimentadas con pienso comercial pulverizado, proveniente del Centro para la Producción de Animales de Laboratorios (CENPALAB), suministrado dos veces al día, una cantidad equivalente al 40% del peso corporal.

Los peces fueron tratados con Acuabio 1, a una concentración de 0.01 g/L (dosis que sugiere el fabricante), por la vía de la inmersión, tres veces por semana y durante una hora. A los peces identificados

como controles negativos se les administró placebo a igual concentración. Transcurrida una hora de tratamiento, los estanques de goldfish se oxigenaron mediante goteo y los de tilapias, mediante oxigenación artificial.

Los animales se anestesiaron con 3-aminobenzoato de etilo (sal metanosulfonato) (Sigma Chemical Co.), se midieron, se pesaron y luego se congelaron a -70 °C para su posterior uso.

Para el estudio del efecto del suplemento nutricional Acuabio 1 en las larvas de goldfish (*Carasius auratus*), se realizó un experimento de crecimiento durante 19 días. Al inicio de este se pesó un grupo de 15 peces, para obtener el promedio de la masa inicial (0.0012 g). Al final del experimento (día 19), se midieron y pesaron 30 peces de cada grupo.

Con los datos de la talla (mm) y el peso (g) de los peces se calculó el factor de condición (k), según Rhaman y Maclean [7], mediante la fórmula:

$$k = \frac{\text{peso (g)}}{\text{Longitud (cm)}^3} \cdot 1000$$

La velocidad de crecimiento específica (VCE) se calculó según Gill y colaboradores [8], por medio de la fórmula, donde T es el tiempo que duró el experimento:

$$\text{VCE (\%/día)} = \frac{\ln(\text{peso final}) - \ln(\text{peso inicial})}{T} \cdot 1000$$

### Preparación homogénea de extractos de larvas

Las larvas de tilapia se homogeneizaron con Politrón ULTRA-TURRAX T25 (IKALaborotechnik), mediante una relación de 10 mL de una solución de PBS 1X por cada gramo de tejido larval. Posteriormente, la mezcla se centrifugó a 5 000 rpm, durante 15 minutos a 4 °C. Se tomó el sobrenadante y se almacenó a -70 °C hasta su posterior uso, 48 horas después.

### Determinación de los parámetros bioquímicos LDH, ASAT, CK, TAG y de las proteínas totales

Posteriormente, se tomaron 1.5 mL del extracto crudo, se centrifugaron a 12 500 rpm durante 4 minutos a 4 °C y se tomó el sobrenadante, a partir del cual se determinaron las actividades enzimáticas de LDH, ASAT, CK, TAG y de las proteínas totales. Para la determinación de las actividades enzimáticas específicas LDH, ASAT, CK y de la concentración de triglicéridos, se utilizaron juegos de reactivos comerciales producidos por HELFA. Diagnósticos. EPB "Carlos J. Finlay", Quimefa, Cuba. Las determinaciones se realizaron según las recomendaciones del fabricante; la de las proteínas totales, mediante el método del ácido bicinonónico, empleando un juego de reactivos de la firma Pierce.

### Determinación de lisozima

La actividad de lisozima se determinó mediante el método turbidimétrico, basado en la lisis de partículas liofilizadas de *Micrococcus lysodeikticus* (Sigma) [9], con el empleo de lisozima de clara de huevo de gallina (Boehringer Mannheim, Alemania) como control positivo. Los patrones de lisozima se prepararon a concentraciones de 0.5, 1, 2, 4, 6, 8 y 10 µg/mL en una solución tampón de fosfato 0.05 M,

4. Yada T, Kaiya H, Mutoh K, Azuma T, Hyodo S, Kangawa K. Ghrelin stimulates phagocytosis and superoxide production in fish leukocytes. *J Endocrinol* 2006; 1(189):57-65.

5. Maclean, N, Rahman MA, Sohm F, Hwang G, Iyengar A, Ayad H, Smith A, Farahmand H. Transgenic tilapia and tilapia genome. *Gene* 2002;(295):265-77.

6. Mayer F, Antonio A. Perspectives on ornamental fisheries in the upper Paraná River floodplain, Brazil. *Fisheries Research*, 2005;72(1):109-19.

7. Rahman A, Maclean N. Chapter 5. Production of lines of growth enhanced transgenic tilapia (*Oreochromis niloticus*) expressing a novel piscine growth hormone gene. In *New Development in Marine Biotechnology*, edited by Le Gal and Halvorsen. Plenum Press, New York, 1998.

8. Gill JA, Sumpter PJ, Donaldson EM, Dye HM, Souza L, Berg T, Wypych, Langley K. Recombinant chicken and bovine growth hormones accelerate growth in aquacultured juvenile pacific salmon *Oncorhynchus kisutch*. *Bio/technology* 1985;(3):643-6.

9. Ellis AE. Lysozyme assays. In: Stolen JS, Fletcher TC, Anderson DB, Robertson BS, van Muiswinkel WB, editors. *Techniques in fish immunology*. Fair Haven, N.J.: SOS publications 1990:95-9.

pH 6.2. En placas de 96 pocillos, se añadieron 100  $\mu$ L de la muestra de interés por duplicado. En cada uno de estos pocillos, se agregaron 100  $\mu$ L de la suspensión del microorganismo, a una concentración de 0.4 mg/mL, y el volumen final fue de 200  $\mu$ L. La densidad óptica se leyó a 450 nm a los 0, 2, 5, 15, 30 y 60 minutos. La variación de 0.001 unidades de DO en un minuto se consideró como una unidad (U) de lisozima.

#### Determinación de lectinas

La sangre de conejo que se utilizó se colectó en una solución de D-glucosa 0.1 M, citrato de sodio 37 mM, NaCl 72 mM y ácido cítrico 2.9 mM, en una proporción de 50% volumen-volumen (v-v), almacenada a 4 °C hasta el momento del ensayo. La sangre colectada se lavó dos veces en PBS 1X pH 7.2 (NaCl 136mM, KCl 2.6 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8.0 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.47 mM). Para los lavados se centrifugó a 1 500 rpm durante 5 minutos. Para el ensayo se preparó una suspensión de eritrocitos al 2% v-v en PBS 1X, pH 7.2. Se hicieron diluciones seriadas de las muestras de interés en PBS 1X, pH 7.2, en placas de 96 pocillos de fondo en U (COSTAR, 96 Well Serocluster U-Bottom), en un volumen total de 100  $\mu$ L en cada pocillo. A cada pocillo se añadieron 100  $\mu$ L de la suspensión de eritrocitos al 2%, y durante 1 h se incubó la placa a 28 °C. Se incluyó un control negativo de 100  $\mu$ L de PBS 1X, pH 7.2 y 100  $\mu$ L de la suspensión de eritrocitos al 2%. El título de hemaglutinación para cada muestra, se determinó tomando como título de lectinas la mayor dilución de la muestra, en la cual se observa hemaglutinación completa.

#### Actividad antiproteasa

Se empleó el método descrito por Magnadottir *et al.* [10]. Se tomaron 20  $\mu$ L de los extractos homogéneos de larvas y se incubaron con igual volumen de una solución de tripsina 5 mg/mL durante 10 min a 22 °C. Posteriormente, se añadieron 200  $\mu$ L de solución tampón de fosfato 0.1M pH 7 y 250  $\mu$ L de azocaseína al 2%, y se incubó a 22 °C durante 1 hora. Transcurrido ese tiempo, se añadieron 500  $\mu$ L de ácido tricloroacético (TCA) al 10% y se incubó la mezcla durante 30 min a 22 °C. Luego se centrifugó a 6 000 rpm durante 5 min. Se transfirieron 100  $\mu$ L del sobrenadante a una placa de 96 pocillos que contenía 100  $\mu$ L por pocillo de 1N NaOH. La DO se leyó a 450 nm. Como grupo control al 100%, se añadió una solución tampón en lugar de los extractos homogéneos de larvas, y como control negativo, la solución tampón de fosfato reemplazó los extractos homogéneos de larvas y la tripsina. El porcentaje de inhibición de la actividad de tripsina para cada muestra se calculó en comparación con el grupo control al 100%. Todas las muestras se analizaron por duplicado.

#### Análisis estadístico

Los peces tratados y los no tratados con Acuabio 1 crecieron expuestos a las mismas condiciones ambientales, con el objetivo de minimizar los efectos del medio ambiente y la variación [11]. Los datos se presentan como la media  $\pm$  el error estándar de esta. Las medias de todos los parámetros analizados entre los animales tratados y los no tratados se compararon

mediante la prueba estadística t de Student. Las diferencias se consideraron significativas para  $p < 0.05$ .

## Resultados

### Crecimiento de las larvas de goldfish

Los resultados del experimento de crecimiento de las larvas de goldfish se muestran en la tabla 1 y en las figuras 1 y 2.

Al finalizar el ensayo, se apreció una diferencia significativa en la talla, el peso y el factor de conversión de las larvas tratadas con Acuabio 1. Estas crecieron 2.38 mg/día, mientras que las larvas tratadas con el placebo, crecieron 0.61 mg/día. Esto indica que el crecimiento de los peces que recibieron el tratamiento con Acuabio 1 fue 3.9 veces más rápido que el de los peces controles.

### Parámetros bioquímicos

Con el objetivo de relacionar la estimulación del crecimiento provocado por el Acuabio 1 en los goldfish con algunos parámetros bioquímicos, se determinaron la actividad enzimática específica (AEE) de las enzimas asociadas con el metabolismo anaeróbico (LDH y CK), el metabolismo de aminoácidos (ASAT), así como las concentraciones de triacilglicéridos (TAG) y de lisozima en los extractos homogéneos de peces. Las enzimas líticas, como la lisozima, son elementos de defensa importantes, especialmente contra las

10. Magnadottir B, Jonsdottir H, Helgason S, Bjornsson B, Jorgensen T, Pilstrom L. Humoral immune parameters in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). II: the effects of size and gender under different environmental conditions. *Comp Biochem Physiol B* 1999;(122):181-8.

11. Dunham RA, Ramboux AC, Duncan PL, Hayat M, Chen TT, Lin CM, Kight K, Gonzalez-Villensor LI, Powers DA. Transfer, expression, and inheritance of salmonid growth hormone gene in channel catfish, *Ictalurus punctatus*, and effect on performance traits. *Mol Mar Biol Biotechnol* 1992;(21):380-9.

Tabla 1. Factor de condición y velocidad de crecimiento específica de las larvas de goldfish (*Carasius auratus*) tratadas con Acuabio 1

Grupo experimental	Factor de condición (k)	VCE (%/día)
CN	10.13 $\pm$ 1.03	11.19 $\pm$ 0.722
Acuabio 1	13.23 $\pm$ 0.78 *	18.77 $\pm$ 0.435 *

Los datos se expresan como la media  $\pm$  el error estándar.

(\*) indican las diferencias significativas entre los animales tratados con el Acuabio 1 y los tratados con el placebo para un valor de  $p < 0.05$ .

VCE: Velocidad de crecimiento específica.

CN: Grupo control negativo tratado con el placebo.

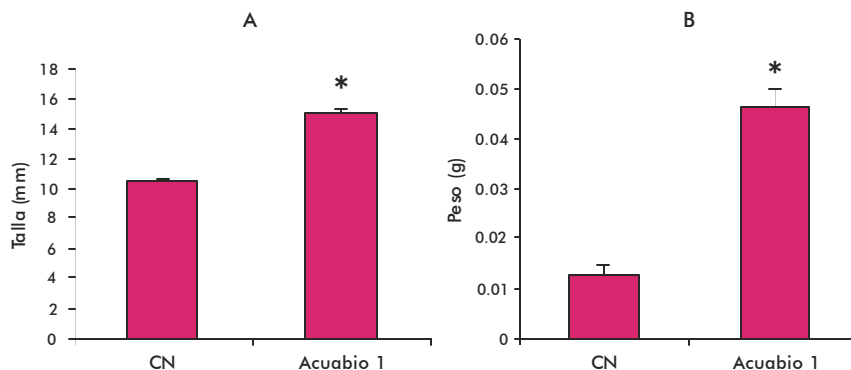


Figura 1. Efecto del suplemento nutricional Acuabio 1 en el crecimiento de larvas de goldfish (*Carasius auratus*). Datos de talla (A) y peso (B) obtenidos al final del experimento.

Leyenda:

El asterisco(\*) indica las diferencias entre el grupo tratado con Acuabio 1 y el grupo tratado con el placebo (CN);  $p < 0,05$  (test t).

n = 30 peces de cada grupo. Los datos se representan como la media  $\pm$  error estándar.

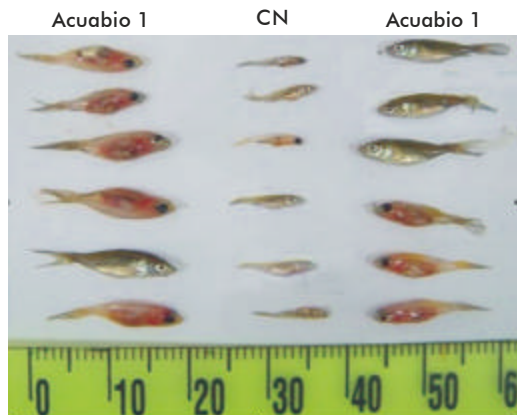


Figura 2. Fenotipo de las larvas de goldfish al término del experimento.

Leyenda:

Acuabio 1: Larvas tratadas con el suplemento nutricional Acuabio 1.

CN: Larvas tratadas con el placebo.

bacterias. Los resultados de las determinaciones se muestran en la tabla 2.

La determinación de la AEE de la LDH y de los valores de la concentración de lisozima en los extractos homogéneos de goldfish, mostró diferencias significativas entre las larvas tratadas con Acuabio 1 (n = 9) y las larvas tratadas con el placebo (n = 8). Por el contrario, no hubo diferencias significativas entre los grupos, al analizar la AEE de la CK, otra de las enzimas anaeróbicas, y la ASAT. Algo similar ocurrió con las concentraciones de TAG.

### Crecimiento de las larvas de tilapia

Con el objetivo de estudiar el efecto del suplemento nutricional Acuabio 1 en las larvas de tilapias (*Oreochromis sp.*), se observó su crecimiento durante 27 días. Los peces se midieron y pesaron al inicio (día 0), en el día 15, y al final del ensayo (día 27). Al principio del experimento, la talla promedio de las larvas fue 15.22 ± 0.5 mm y el peso, 0.065 ± 0.01 g (los resultados se muestran en la tabla 3 y en la figura 3).

Tabla 2. Efecto del suplemento nutricional Acuabio 1 en los parámetros bioquímicos estudiados en larvas de goldfish (*Carasius auratus*).

Parámetros	CN	Acuabio 1
LDH (U/mg prot.)	0.466 ± 0.056 (n = 8)	0.814 ± 0.084* (n = 9)
CK (U/mg prot.)	0.094 ± 0.024 (n = 8)	0.136 ± 0.037 (n = 10)
ASAT (U/mg prot.)	0.127 ± 0.017 (n = 8)	0.123 ± 0.016 (n = 8)
TAG (mmol/L)	0.218 ± 0.025 (n = 9)	0.288 ± 0.040 (n = 10)
Lisozima (µg/g tej.)	28.25 ± 1.05 (n = 4)	33.48 ± 0.00* (n = 4)

Los datos se expresan como la media ± el error estándar.

(\*) Indican las diferencias significativas entre los animales tratados con el Acuabio 1 y los tratados con el placebo (CN) para un valor de p < 0.05.

n: Indica el número de grupos de goldfish de 250 mg aproximadamente, analizados en los ensayos.

U/mg prot.: Unidades por miligramos de proteínas totales.

µg/g tej.: Microgramos por gramos de tejido larval.

Tabla 3. Experimento de crecimiento con el suplemento nutricional Acuabio 1 en tilapias (*Oreochromis sp.*)

Tiempo (días)	Talla de larvas (mm) CN	Talla de larvas (mm) Acuabio 1
0	15.22 ± 0.5 (n = 23)	15.22 ± 0.5 (n = 23)
15	24.00 ± 1.12 (n = 11)	27.10 ± 0.94 (n = 10)
27	27.92 ± 0.53 (n = 51)	31.69 ± 0.38* (n = 162)

Los datos se expresan como la media ± el error estándar.

Los asteriscos (\*) indican las diferencias significativas entre los animales tratados con Acuabio 1 y los tratados con el placebo (CN) para un valor de p < 0.05.

La n indica el número de peces analizados individualmente.

La diferencia de peso de los animales tratados con respecto a los animales controles, se manifestó a los 15 días de tratamiento, y la velocidad específica de crecimiento de los peces tratados con Acuabio 1, fue mayor 1.21 veces que la de los peces tratados con el placebo (Tabla 4).

### Parámetros bioquímicos

Posterior al estudio de crecimiento, se evaluaron determinados parámetros bioquímicos, tales como la AEE de enzimas relacionadas con el metabolismo anaeróbico (LDH y CK) o con el metabolismo de aminoácidos (ASAT), así como las concentraciones de triacilglicéridos (TAG), como se observa en la tabla 5.

Los valores de AEE de las enzimas anaeróbicas LDH y CK indican una diferencia significativa entre los organismos tratados y los no tratados con Acuabio 1.

Las larvas de los peces no desarrollan inmunidad específica durante las etapas tempranas de desarrollo. Entre los parámetros de la inmunidad innata se destacan las lectinas. Estas son glicoproteínas que se han podido aislar de diversas especies de peces, y que

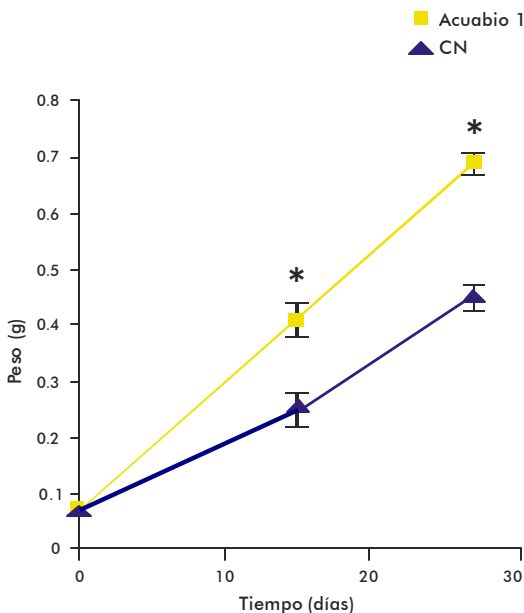


Figura 3. Comportamiento del peso de las larvas de tilapia tras el experimento de crecimiento con el suplemento nutricional Acuabio 1.

Leyenda: Los datos se expresan como la media ± el error estándar. Los asteriscos (\*) indican las diferencias significativas entre los animales tratados con Acuabio 1 y los animales tratados con el placebo (CN); p < 0.05 (test t); n = 162.

Tabla 4. Factor de condición (k) y velocidad de crecimiento específica (VCE) obtenidas en el experimento de crecimiento de larvas de tilapia (*Oreochromis sp.*)

Parámetros	CN	Acuabio 1
Factor de condición (k)	20.04 ± 0.47 (n = 51)	21.38 ± 0.75 (n = 162)
VCE (%/día)	6.862 ± 0.224 (n = 51)	8.327 ± 0.145* (n = 162)

Los datos se expresan como la media ± el error estándar.  
 (\*): Indican las diferencias significativas entre los animales tratados con Acuabio 1 y los tratados con el placebo (CN), para un valor de p < 0.05.  
 n: Indica el número de peces analizados individualmente.  
 VCE: Velocidad de crecimiento específica.

funcionalmente pueden estar involucradas en la defensa del hospedero. Se observó actividad hemaglutinante en los extractos homogéneos de larvas. Las larvas de tilapia tratadas con Acuabio 1 mostraron una actividad de hemaglutinación mayor. El título de lectinas fue 2.5 veces mayor en las larvas tratadas con Acuabio 1, en comparación con el control negativo (Figura 4).

Muchas bacterias producen toxinas proteolíticas que digieren las proteínas de los tejidos hospederos como una fuente de aminoácidos; por tanto, la actividad antiproteasa constituye otro factor importante de la inmunidad innata. En este experimento la actividad antiproteasa fue 1.8 veces mayor en los extractos homogéneos de larvas tratadas con Acuabio 1, en comparación con el control negativo (Figura 5).

**Discusión**

El estado larval de los peces es el estadio en que ocurre la mayor pérdida de individuos, por lo que cualquier intento por mejorar la sobrevivencia y la calidad de vida de estas posibilitará que un mayor número de larvas alcance el estado adulto, lo que llevaría a un aumento de la producción acuícola.

En investigaciones precedentes se demostró que las dietas que incluían hidrolizados de proteínas concentrados, estimulaban la velocidad de crecimiento de las larvas de carpa común y de besugo [12]. Se ha observado que la forma en que se administra la fuente proteica pudiera ejercer efectos temporales en el desarrollo de las larvas de peces, probablemente relacionado con la ontogenia del tracto digestivo [13],

Tabla 5. Efecto del suplemento nutricional Acuabio 1 en los parámetros bioquímicos estudiados en larvas de tilapia (*Oreochromis sp.*).

Parámetros	CN	Acuabio 1
LDH (U/mg prot.)	308.8 ± 67.23 (n = 6)	567.7 ± 82.66* (n = 7)
CK (U/mg prot.)	0.028 ± 0.005 (n = 8)	0.048 ± 0.008* (n = 7)
ASAT (U/mg prot.)	0.064 ± 0.010 (n = 10)	0.070 ± 0.009 (n = 9)
TAG (mmol/L)	0.753 ± 0.075 (n = 10)	0.698 ± 0.048 (n = 10)

Los datos se expresan como la media ± el error estándar.  
 (\*): Indican las diferencias significativas entre los animales tratados con Acuabio 1 y los tratados con el placebo (CN), para un valor de p < 0.05.  
 n: Indica el número de peces analizados individualmente.  
 U/ mg prot.: Unidades por miligramos de proteínas totales.  
 µg/g tej.: Microgramos por gramos de tejido larval.

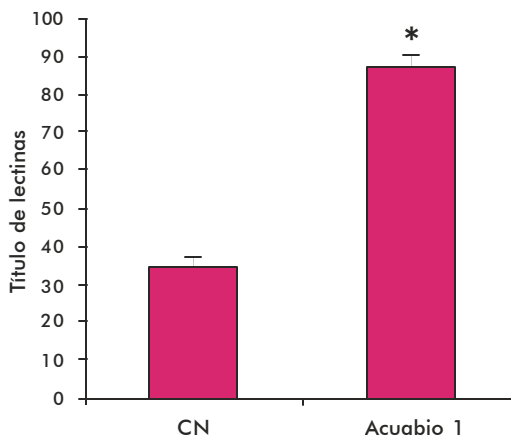


Figura 4. Título de lectinas. Se determinó el título de hemaglutinación para cada muestra, y se consideró como título de lectinas, la mayor dilución de la muestra a la cual se observa hemaglutinación completa.

Leyenda:  
 Los datos están expresados como la media geométrica ± intervalos de confianza (n = 10).  
 El grupo tratado con Acuabio 1 mostró mayor actividad hemaglutinadora en comparación con el control negativo (CN). Los asteriscos (\*) indican las diferencias significativas entre los animales tratados con Acuabio 1 y los animales tratados con el placebo (CN) (p < 0.05; test t). La n indica el número de peces analizados individualmente.

por lo que es importante el momento y la vía de administración.

En los experimentos realizados en este estudio se estimuló el crecimiento de las larvas de goldfish y de tilapia al administrarles el suplemento nutricional Acuabio 1. Se observó un aumento de la talla, el peso

12. Cahu CL, Zambonino Infante JL, Quazuguel P, Le Gall MM. Protein hydrolysate vs. fish meal in compound diets for 10-day old sea bass *Dicentrarchus labrax* larvae. *Aquaculture* 1999;(171):109-19.

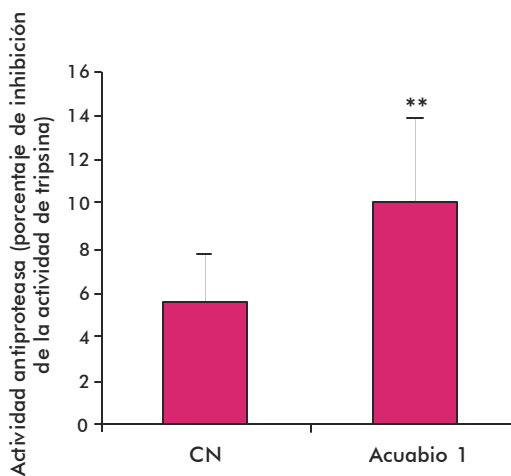


Figura 5. Actividad antiproteasa (porcentaje de inhibición de la actividad de la tripsina) en los extractos homogéneos de larvas de tilapia.

Leyenda:  
 Los datos se representan como la media ± la desviación estándar. Todas las muestras se analizaron por duplicado (n = 10). El grupo tratado con Acuabio 1 mostró mayor actividad antiproteasa en comparación con el control negativo (CN). Los asteriscos (\*) indican las diferencias significativas entre los animales tratados con Acuabio 1 y los animales tratados con el placebo (CN) (p < 0.01, test t). La n indica el número de peces analizados de manera individual.

y la velocidad de crecimiento. Resultados similares se obtuvieron en goldfish alimentados con hormona de crecimiento recombinante de carpa [14] y en salmónes diploides y triploides inyectados con hormona de crecimiento porcina recombinante [15] o alimentados con hidrolizados de proteínas [16].

El piruvato formado en la glucólisis en los tejidos animales, puede tomar dos rutas catabólicas alternativas. En condiciones aeróbicas, el piruvato se oxida a acetilcolina (CoA), el cual entra en el ciclo del ácido cítrico, y se oxida a  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$ . La otra ruta del catabolismo del piruvato es su reducción a lactato por la enzima lactato deshidrogenasa (LDH), que ocurre en condiciones de anaerobiosis. La oxidación anaeróbica del piruvato que produce lactato, es una vía alternativa del músculo para obtener ATP en condiciones estresantes. La creatina quinasa (CK) cataliza la fosforilación directa del ADP a partir de la fosfocreatina, lo que brinda el ATP necesario durante los primeros 30 segundos de la contracción rápida en el músculo blanco. Se ha sugerido que las actividades específicas de estas enzimas son indicadores de la capacidad anaeróbica de los peces [17].

El aumento significativo de los niveles de LDH de las larvas de goldfish y de tilapia tratadas con Acuabio 1, con respecto a las larvas controles, sugiere un aumento de las capacidades anaeróbicas de estos peces. Variaciones similares fueron descritas en estudios efectuados en trucha arcoiris [18] y en el hipogloso de California [19], en los que ocurrió un aumento de la actividad de esta enzima que llevó al aumento de la masa y del tamaño del animal.

En este estudio hubo un aumento significativo de la actividad de la CK en las larvas de tilapia tratadas con Acuabio 1 y, aunque en las larvas de goldfish la diferencia no fue significativa, sí se apreció un aumento de la actividad de la CK. Resultados similares se obtuvieron en otra especie, trucha arcoiris, en la cual las actividades relativamente altas de PK o LDH no necesariamente se correlacionaron con el aumento de las actividades de CK [18]. Los resultados de esta investigación sugieren que en las larvas que recibieron el tratamiento con Acuabio 1, el aporte energético proviene en gran medida del metabolismo anaeróbico. Se plantea que este aumento en la actividad de la LDH es un mecanismo potencial para mantener una máxima velocidad de desplazamiento, independientemente del tamaño del pez, (n distancia recorrida por el pez en un segundo) [17, 18].

En esta investigación, no hubo diferencias significativas en la actividad de la ASAT de los extractos homogéneos de larvas de goldfish y de tilapia tratados con Acuabio 1, con respecto a los grupos controles.

En los tejidos adiposo y hepático, los efectos indirectos de la HC promueven la lipólisis y la liberación de ácidos grasos [19]. En este estudio no se observaron diferencias significativas en la concentración de los TAG en las larvas de goldfish y de tilapia tratadas con Acuabio 1, lo cual indica que el tratamiento no alteró, el metabolismo de los TAG en ninguna de las dos especies analizadas.

La estimulación de las funciones inmunes por la HC es independiente de su efecto en el crecimiento [20]. Se sabía que el Acuabio 1 estimula la liberación de la hormona de crecimiento endógena, y además se detectó

que estimula la producción de lisozima en las larvas de goldfish. Se ha observado que la administración de homólogos de la HC estimula la lisozima en el plasma [21, 22]. La inyección de HC de salmón en la trucha arcoiris mantenida en agua dulce, aumenta los niveles de lisozima en el plasma [22]. Cuando se traslada la trucha parda (*Salmo trutta*) de agua dulce a agua salada se aprecia, además, un incremento en las trazas de HC en el plasma y disminuyen las trazas de las hormonas tiroideas. Esto se ha relacionado con el incremento de la actividad fagocítica de los leucocitos del riñón cefálico y con elevadas concentraciones de lisozima en el plasma [23]. Yada *et al.*, (2004) [24] reportaron que la HC y la prolactina aumentan los niveles de la lisozima en el plasma de la trucha arcoiris, en dependencia de la dosis. Estos experimentos mostraron, además, que la HC y la prolactina estimulan la producción de la lisozima por los leucocitos, sin afectar su proliferación. En este sentido se ha demostrado que los neutrófilos granulares, un tipo de leucocitos en la trucha, constituyen los mayores productores de lisozima en la sangre [25].

Otro parámetro de la inmunidad innata analizado en la tilapia fue la actividad de las lectinas. Estas proteínas del plasma se detectan mediante ensayos de hemaglutinación por ser bivalentes o polivalentes en su interacción con los azúcares de las glico-proteínas o de los glicolípidos, y por su capacidad de formar enrejados con distintos tipos celulares, lo cual provoca el fenómeno de aglutinación. Suzuki y Otake (2000) [26] encontraron que las larvas de *Anguilla japonica* tienen elevada actividad de lectinas en la piel, y que las células que producen estas proteínas aparecen en una etapa temprana del desarrollo larval: a los 8 días después de la eclosión. Estas proteínas se han identificado también en huevos de salmón [27], de *Paralichthys olivaceus* [28] y en larvas de *S. aurata* [29]. Recientemente se demostró que el suministro de HC en los seres humanos aumenta los niveles de las lectinas que unen manosa, lo que sugiere que tal vez en los peces la influencia de Acuabio 1 sobre este parámetro esté mediada por la HC [30].

En este estudio, la actividad antiproteasa de los extractos homogéneos de las larvas tratadas con Acuabio 1 fue mayor, comparada con el control negativo. Se ha descrito que el plasma de los peces contiene numerosos inhibidores de proteasas, principalmente  $\alpha 1$ -antiproteinasa y  $\alpha 2$ -macroglobulina [31]. Se ha demostrado que la diferencia en la actividad de la  $\alpha 2$ -macroglobulina entre dos especies de trucha está relacionada con la resistencia ante la infección por *A. salmonicida* [32]. Por tanto, un aumento de este parámetro es beneficioso para la salud de los peces tratados con Acuabio 1.

## Conclusiones

Mediante ensayos controlados de crecimiento de larvas de goldfish y de tilapia, se corroboró la actividad estimuladora del crecimiento que caracteriza al suplemento nutricional Acuabio 1. Además, se estudio la actividad de enzimas relacionadas con las vías metabólicas de energía, así como el incremento de factores asociados con la inmunidad innata de estas larvas. Ello explica, a su vez, la resistencia que adquieren estos peces frente a agentes patógenos, tras el empleo del suplemento nutricional en los ensayos de campo.

13. Carvalho AP, Sá R, Oliva-Teles A, Bergot P. Solubility and peptide profile affect the utilization of dietary protein by common carp (*Cyprinus carpio*) during early larval stages. *Aquaculture* 2004; 234(1-4):319-33.

14. Walker RL, Buret AG, Jackson CL, Scott KG-E, Bajwa R, Habibi HR. Effects of growth hormone on leucine absorption, intestinal morphology, and ultrastructure of the goldfish intestine. *Can J Physiol Pharmacol* 2004;(82):951-9.

15. McLean E, Sadar MD, Devlin RH, Souza LM, Donaldson EM. Promotion of growth in diploid and triploid coho salmon with parenteral delivery of a recombinant porcine somatotropin. *Aquat. Living Resour* 1991;(4):155-60.

16. Refstie S, Olli JJ, Standal H. Feed intake, growth, and protein utilisation by post-smolt Atlantic salmon (*Salmo salar*) in response to graded levels of fish protein hydrolysate in the diet. *Aquaculture* 2004;239(1-4):331-49.

17. Gibb AC, Dickson KA. Functional Morphology and biochemical indices of performance: Is there a correlation between metabolic enzyme activity and swimming performance? *Integ and Comp Biol* 2002; (42):199-207.

18. Burness GP, Leary SC, Hochachka PW, Moyes CD. Allometric scaling of RNA, DNA, and enzyme levels: an intraspecific study. *Am J Physiol* 1999;277(4 Pt 2):1164-70.

19. Mommsen TP. Paradigms of growth in fish. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 2001;129(2-3):207-19.

20. Yada T, Azuma T, Takagi Y. Stimulation of non-specific immune functions in seawater-acclimated rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, with reference to the role of growth hormone. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B* 2001;(129):695-701.

21. Yada T, Uchida K, Kajimura S, Azuma T, Hirano T. Immunomodulatory effects of prolactin and growth hormone in the tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Journal of Endocrinology* 2002;(173):483-92.

22. Yada T, Azuma T, Takagi Y. Stimulation of non-specific immune functions in seawater-acclimated rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, with reference to the role of growth hormone. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B* 2001;(129):695-701.

23. Yada T, Nagae M, Moriyama S, Azuma T. Effects of prolactin and growth hormone on plasma immunoglobulin m levels of hypo-physectomized rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Gen Comp Endocrinol* 1999;(115):46-52.

24. Yada T, Muto K, Azuma T, Ikuta K. Effects of prolactin and growth hormone on plasma levels of lysozyme and ceruloplasmin in rainbow trout. *Comparative Biochemistry. Part C* 2004;(139):57-63.

25. Hassenzahl DL, Yorgey NK, Keedy MD, Price AR, Hall JA, Myzcka CC, Kuruvilla HG. Chemorepellent signaling through the pacap/lysozyme receptor is mediated through camp and pkc in *Tetrahymena thermophila*. *J Comp Physiol [A]* 2001;3(187):171-6.

26. Suzuki Y, Otake T. Skin lectin and the lymphoid tissues in the leptocephalus larvae of the japanese eel *Anguilla japonica*. *Fish Sci* 2000;(66):636-43.

27. Yousif AN, Albrigh LJ, Evelyn T.P. Interaction of coho salmon egg lectin with the pathogen *A. salmonicida*. *Dis Aquat Org* 1995;(21):193-9.
28. Hikimi J, Hirono I, Aoki T. Characterization and expression of c-type lysozyme cDNA from Japanese flounder. *Mol Mar Biol Biotechnol* 1997;(6):342-7.
29. Bakopoulos V, Hanif A, Dimitriadis GJ. Maternal transfer of humoral specific and non-specific immune parameters to sea bream (*Sparus aurata*) larvae. *Fish Shellfish Immunol* 2004;(17):411-35.
30. Gravholt CH, Leth-Larsen R, Lauridsen AL, Thiel S, Hansen TK, Holmskov U, Naeraa RW, Christiansen JS. The effects of gh and hormone replacement therapy on serum concentrations of mannan-binding lectin, surfactant protein d and vitamin d binding protein in Turner syndrome. *Eur J Endocrinol* 2004;3(150):355-62.
31. Ellis AE. Inhibition of the *Aeromonas salmonicida* extracellular protease by  $\alpha$ 2-macroglobulin in the serum of rainbow trout. *Microb Pathogen* 1987;(3):167-77.
32. Freedman SJ. The role of  $\alpha$ 2-macroglobulin in furunculosis: a comparison of rainbow trout and brook trout. *Comp Biochem Physiol B* 1991;(98):549-53.

---

Recibido en septiembre de 2006. Aprobado en noviembre de 2006.