CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA FRECUENCIA DE ALIMENTACIÓN SOBRE LA EXPRESIÓN GÉNICA RELACIONADA CON EL METABOLISMO Y ENZIMAS DIGESTIVAS EN TILAPIA *Oreochromis niloticus.*

T E S I S

Que para obtener el grado de

Maestra en Ciencias

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

P r e s e n t a

María Guadalupe Aguilar Martínez

La Paz, Baja California Sur, septiembre de 2025.

ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 15:00 horas del 18 de agosto del 2025, 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:

EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA FRECUENCIA DE ALIMENTACIÓN SOBRE LA EXPRESIÓN GÉNICA RELACIONADA CON EL METABOLISMO Y ENZIMAS DIGESTIVAS EN TILAPIA *Oreochromis niloticus*.

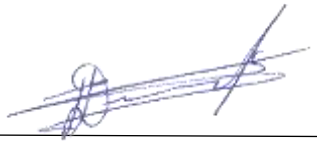
Presentado por la alumna:

María Guadalupe Aguilar Martínez

Aspirante al grado de MAESTRA EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACIÓN DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACION 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.

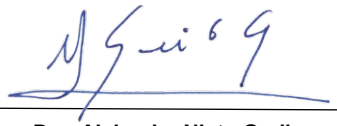
LA COMISIÓN REVISORA



Dr. Luis Daniel Espinosa Chaurand
Co-Director de Tesis

Dra. Rosa María Morelos Castro
Co-Directora de Tesis

Dra. Erika Torres Ochoa
Co-Tutora de Tesis



Dra. Alejandra Nieto Garibay
Directora de Estudios de Posgrado y
Formación de Recursos Humanos

La Paz, Baja California Sur, a 21 de agosto de 2025

Los miembros del comité de tesis de la estudiante MARÍA GUADALUPE AGUILAR MARTÍNEZ del Programa de la Maestría 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**: Excluir citas y bibliografía
  Excluir fuentes que sean menores a 15 palabras
- **Porcentajes de similitud**: 8% de similitud

iThenticate Página 2 de 113 - Descripción general de integridad Identificador de la entrega trn:oid:::3117:485384603

8% Similitud general

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para ca...

Filtrado desde el informe

- Bibliografía
- Texto citado
- Coincidencias menores (menos de 15 palabras)

Fuentes principales

8% Fuentes de Internet
1% Publicaciones
0% Trabajos entregados (trabajos del estudiante)

Marcas de integridad

N.° de alertas de integridad para revisión

No se han detectado manipulaciones de texto sospechosas.

Los algoritmos de nuestro sistema analizan un documento en profundidad para buscar inconsistencias que permitirían distinguirlo de una entrega normal. Si advertimos algo extraño, lo marcamos como una alerta para que pueda revisarlo.

Una marca de alerta no es necesariamente un indicador de problemas. Sin embargo, recomendamos que preste atención y la revise.

Director-Co/Directores _____ _____

Dr. Luis Daniel Espinosa Chaurand Dra. Rosa María Morelos Castro

Estudiante _____

María Guadalupe Aguilar Martínez

Personal técnico de asesoría en el análisis _____

Lic. Ana María Talamantes Cota

Conformación de Comités

Comité Tutorial

Dr. Luis Daniel Espinosa Chaurand
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.
Co-Director de Tesis

Dra. Rosa María Morelos Castro
Investigadora por México-SECIHTI-Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.
Co-Directora de Tesis

Dra. Erika Torres Ochoa
Universidad Autónoma de Baja California Sur
Co-Tutora de Tesis

Comité Revisor de Tesis

Dr. Luis Daniel Espinosa Chaurand
Dra. Rosa María Morelos Castro
Dra. Erika Torres Ochoa

Jurado del Examen

Dr. Luis Daniel Espinosa Chaurand
Dra. Rosa María Morelos Castro
Dra. Erika Torres Ochoa

Suplente

Dr. Eduardo Quiroz Guzmán

Resumen

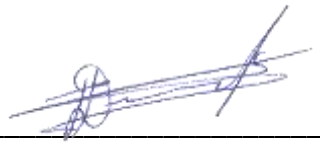
La tilapia del Nilo *Oreochromis niloticus* se ha consolidado como un recurso esencial de proteína animal a nivel mundial debido a su rápido crecimiento y sus ventajas adaptativas a condiciones adversas de cultivo. La frecuencia de alimentación influye significativamente en el desarrollo del organismo, variando según la composición de la dieta, el tamaño del alimento y la etapa de crecimiento. En este estudio, se evaluó la expresión de genes asociados al metabolismo y que codifican enzimas digestivas en juveniles y adultos de *O. niloticus* sometidos a frecuencias de alimentación de tres y siete veces al día. Se realizaron dos bioensayos en la Unidad Nayarit del CIBNOR, donde juveniles y adultos fueron alimentados bajo dichas condiciones, con pesos finales de 10.08±0.80 g y 465.23±46.42 g. Al finalizar el experimento, se tomaron muestras de hígado, estómago, músculo e intestino anterior, las cuales se preservaron en solución acuosa de sal sulfato a 4 °C por 24 horas y posteriormente se almacenaron a -20 °C hasta su análisis en el Laboratorio de Genética Acuícola en CIBNOR Unidad La Paz. En este laboratorio se cuantificó la expresión relativa de los genes que codifican para las enzimas digestivas α-amilasa (*amy*) y tripsina (*try*), adicionalmente los genes sintasa de ácidos grasos (*fas*) y factor de crecimiento insulínico-1(*igf-I*), involucrados en el metabolismo de lípidos y proteínas, así como el gen Glutamato deshidrogenasa (*gdh*), el cual codifica una enzima metabólica esencial; estos se evaluaron en en ambas frecuencias de alimentación y etapas de desarrollo. Los resultados mostraron diferencias significativas ($P<0.05$) del gen *amy* en el estómago entre etapas, sin diferencias significativas (*P>0.05*) en el intestino anterior entre etapas y tratamientos. En el gen *try* se observaron diferencias significativas ($P<0.05$) en el estómago entre juveniles a ambas frecuencias de alimentación con los adultos alimentados tres veces al día ($P<0.05$), también entre juveniles alimentados siete veces al día con los adultos alimentados a ambas frecuencias, en el intestino anterior de este gen no se observaron diferencias significativas entre etapas ni tratamientos (*P>0.05*). En el gen *fas* se observaron diferencias significativas en el estómago entre juveniles alimentados tres veces al día y adultos alimentados siete veces al día ($P<0.05$), así como en el hígado de los juveniles alimentados siete veces con los demás tratamientos ($P<0.05$) y en músculo de *fas* se observaron diferencias significativas entre etapas ($P<0.05$). En el gen *igf* se observaron diferencias significativas en el estómago de juveniles alimentados tres veces con los adultos a ambas frecuencias ($P<0.05$), también se observaron diferencias entre los adultos alimentados siete veces con los juveniles a ambas frecuencias ($P<0.05$), en el hígado no se observaron diferencias significativas entre etapas ni tratamientos (*P>0.05*), en el músculo se observaron únicamente diferencias entre los tratamientos de ambos bioensayos ($P<0.05$). Finalmente, en el estómago e intestino anterior del gen *gdh* no se observaron diferencias significativas entre etapas ni tratamientos (*P>0.05*), en el hígado se observaron diferencias significativas entre ambas etapas y tratamientos ($P<0.05$), en el músculo se observaron diferencias significativas entre los tratamientos de juveniles y adultos, ambos alimentados siete veces al día ($P<0.05$). Estos resultados sugieren que la expresión génica varía según la etapa de desarrollo, ya que la regulación genética del metabolismo y la digestión está influenciada por la ontogenia de los organismos. Esto resalta la importancia de considerar dicho factor tanto en la alimentación como en la comprensión de los mecanismos moleculares involucrados, incluyendo la selección genética de organismos con mayor eficiencia metabólica. Así, se favorece el desarrollo de enfoques de mejora genética que permitan seleccionar organismos con perfiles metabólicos óptimos, logrando una mayor eficiencia alimenticia y una mejor conversión de nutrientes. La producción de organismos adaptados a condiciones específicas de cultivo se ve

beneficiada, y, en conclusión, estos resultados fortalecen la base científica para el avance de técnicas moleculares que impulsen mejoras significativas en la acuicultura.

Palabras Clave: metabolismo, digestión, expresión génica, acuicultura, frecuencia de alimentación

ORCID iD: 0009-0007-6949-7755

Vo. Bo. Co-Directores de Tesis



Dr. Luis Daniel Espinosa Chaurand

Dra. Rosa María Morelos Castro

Summary

The tilapia of the Nile *Oreochromis niloticus* has been consolidated as an essential resource of animal protein worldwide due to its rapid growth and its adaptive advantages to adverse cultivation conditions. The food frequency significantly influences the health and development of the organism, varying according to the composition of the diet, the size of the food and the growth stage. In this study, the gene expression associated with metabolism and digestive enzymes in youth and adults of *O. niloticu*s underwent food frequencies three and seven times a day was evaluated. Two bioassays were performed in the Nayarit Unit of CIBNOR, where youth and adults were fed under these conditions, presenting initial weights of 0.39 ± 0.06 g and 3.38 ± 0.2 g, respectively, and initial lengths of 2.67 ± 0.14 cm and 8.54 ± 0.65 cm as well as final weights of 10.08 ± 0.80 g and 465.23 ± 46.42 g, respectively and final lengths of 8.14 ± 0.23 cm and 28.65 ± 1.10 cm. At the end of the experiment, liver, stomach, muscle and anterior intestine samples were taken, which were preserved in aqueous salt sulfate solution to 4 ° C for 24 hours and subsequently stored at -20 ° C until their analysis in the laboratory of aquaculture genetics in CIBNORUnit La Paz. In this laboratory, the relative expression of the Amylase (*amy*) and Trypsin (*try*) genes encoding digestive enzymes was quantified, in addition to the Fatty Acid Synthase (*fas*) and Insulin Growth Factor I (*igf-I*) genes involved in lipid and protein metabolism and the Glutamate dehydrogenase (*gdh*) gene encoding an essential metabolic enzyme, which were evaluated at both feeding frequencies and developmental stages. The results showed significant differences ($P<0.05$) in the *amy* gene in the stomach between stages, with no significant differences ($P>0.05$) in the foregut between stages and treatments. Significant differences ($P<0.05$) were observed in the *try* gene in the stomach between juveniles at both feeding frequencies and adults fed three times a day ($P<0.05$), as well as between juveniles fed seven times a day and adults fed at both frequencies. No significant differences were observed in the foregut of this gene between stages or treatments ($P>0.05$) In the *fas* gene, significant differences were observed in the stomach between juveniles fed three times a day and adults fed seven times a day ($P<0.05$), as well as in the liver of juveniles fed seven times with the other treatments ($P<0.05$). Significant differences were observed between stages in the *fas* muscle ($P<0.05$). Significant differences were observed in the *igf* gene in the stomachs of juveniles fed three times with adults at both frequencies ($P<0.05$). Differences were also observed between adults fed seven times with juveniles at both frequencies ($P<0.05$). No significant differences were observed in the liver between stages or treatments ($P>0.05$). In the muscle, differences were only observed between the treatments of both bioassays ($P<0.05$). Finally, in the stomach and foregut of the *gdh* gene, no significant differences were observed between stages or treatments ($P>0.05$). In the liver, significant differences were observed between both stages and treatments ($P<0.05$). In the muscle, significant differences were observed between the treatments of juveniles and adults, both fed seven times a day ($P<0.05$). These results suggest that gene expression may vary depending on the stage of development, where genetic regulation of metabolism and digestion is influenced by the ontogeny of organisms, highlighting the importance of considering this factor both in feeding and in understanding molecular mechanisms, including the genetic selection of organisms with greater metabolic efficiency, favoring the development of genetic improvement approaches by selecting organisms with optimal metabolic profiles for greater feed efficiency and better nutrient conversion. The production of organisms adaptable to specific cultivation conditions, in conclusion, the results obtained strengthen the scientific basis for the development of advanced molecular techniques that will enable improvements in aquaculture.

Keywords: metabolism, digestion, gene expression, aquaculture, feeding frequency

ORCID iD: 0009-0007-6949-7755

Vo. Bo. Co-Directores de Tesis

Dr. Luis Daniel Espinosa Chaurand	Dra. Rosa María Morelos Castro

Dedicatoria

A mis padres y hermanos, los amo

Agradecimientos

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C., (CIBNOR) por todos los recursos brindados en mi permanencia en este Centro, así como a los maestros que complementaron mis conocimientos a lo largo del camino, los cuales fueron clave para lograr culminar este trabajo.

Al Laboratorio de Genética Acuícola del CIBNOR.

Al Laboratorio de Fisiología Animal Comparada del CIBNOR.

Al Laboratorio de Genómica y Bioinformática del CIBNOR.

A la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI) por el otorgamiento de la beca de manutención con número 834526.

A la Dirección de Posgrado del CIBNOR por la beca de manutención otorgada.

Al personal de Posgrado, Ing. Horacio Sandoval Gómez, Dra. Gracia Alicia Gómez, Dra. Alejandra Nieto, Mtra. Osvelia Ibarra Morales, Tania V. Núñez Valdez y Adriana Franzoni García, por todo el apoyo recibido.

Al proyecto de Apoyos a la Ciencia de Frontera: Fortalecimiento y Mantenimiento de Infraestructuras de Investigación de Uso Común y Capacitación Técnica 2021 del Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) 316807 “Equipamiento para el fortalecimiento de los Laboratorios de Investigación en Ciencia Básica y de Frontera de Ecofisiología de Organismos Acuáticos, Biotecnología Acuícola y Sanidad e Inocuidad Acuícola de la Unidad Nayarit del CIBNOR”.

Al técnico del área de producción de UNCIBNOR José David López Jiménez por su apoyo en el montaje del sistema experimental y realización de biometrías.

A mis compañeros del Laboratorio: Susana, Dr. Pavel Galindo, Dr. Ricardo Pérez, Dr. Pedro Cruz, Adriana, Cristopher, Zitlalhi, Cristopher y Omar.

Al Ing. Alejandro Patiño de la Unidad Nayarit del CIBNOR por su ayuda con la construcción del experimento.

A la técnica del Laboratorio de Genética Acuícola M. en C. Susana Ávila Álvarez, por su apoyo en el manejo de todos los equipos de laboratorio, por todos sus consejos, por escucharme siempre y por apoyarme en lo que necesito.

A los de siempre, Lic. Karla Gutiérrez, BIA. Isabel Martínez, Ing. Víctor Ayala, Ing. David Núñez, M. en C. Natalia Joachin y M. en C. Andrea Murillo por su excepcional amistad.

A mis compañeros y amigos de posgrado Dante, Joshua, Jair, Levi y Víctor, agradezco tenerlos en mi vida, gracias por aceptarme y estar.

A Víctor Rojas por su constante apoyo.

A mi nana Lidia, mi tía mina, mi familia de La Bocana, a mis padres, hermanos, sobrinos y mi abuelita Guadalupe López por siempre estar ahí.

To my dear Friend Donna Clark, thank you for believe in me since we met. I hope to see you again, thank you for your inconditional friendship, for always gave me the best advices and lovely words.

A David López por su gran apoyo y cariño estos últimos años, te quiero.

A la Pancha, Nala, Totoyito y Tommy, mi mejor compañía, los amo.

Contenido

Resumen ..... **i**
Summary ..... **iii**
Dedicatoria ..... **v**
Agradecimientos ..... **vi**
Contenido ..... **viii**
Lista de figuras ..... **x**
Lista de tablas ..... **xii**
Abreviaturas ..... **xiii**
1. INTRODUCCIÓN **1**
2. ANTECEDENTES **8**
2.1 Cultivo de tilapia *Oreochromis niloticus* 8
2.2 La frecuencia de alimentación en el cultivo de tilapia *O. Niloticus* 9
2.2.1 Efecto de la frecuencia de alimentación en la expresión de genes que codifican enzimas digestivas e involucrados en el metabolismo energético en tilapia *O. niloticus* 10
2.3 Genes involucrados en el metabolismo de peces 11
2.3.1 Factor de crecimiento insulínico-1 (*Igf-I*) 11
2.3.2 Sintasa de ácidos grasos (*fas*) 12
2.3.3 Glutamato deshidrogenasa (*gdh*) 13
2.4 Genes que codifican enzimas digestivas 13
2.4.1 α-amilasa (*amy*) 13
2.4.2 Tripsina (*try*) 14
3. JUSTIFICACIÓN **15**
4. HIPÓTESIS **16**
5. OBJETIVOS **17**
5.1 Objetivo general 17
5.2 Objetivos particulares 17
6. MATERIAL Y MÉTODOS **18**
6.1 Diseño experimental 18
6.1.1 Bioensayo 1. Juveniles de tilapia *O. niloticus* sometidos a dos frecuencias de alimentación 18
6.1.2 Bioensayo 2. Adultos de tilapia *O. niloticus* sometidos a dos frecuencias de alimentación 19
6.1.3 Condiciones de cultivo 19
6.1.4 Obtención de material biológico 20
6.2 Extracción de ARN total y síntesis de ADN complementario (ADNc) 20
6.3 Amplificación de muestras de ADNc de hígado, estómago, intestino anterior y músculo de juveniles y adultos de tilapia *O. niloticus* 23
6.4 Evaluación de la estabilidad de genes de referencia para la normalización de la expresión de genes de metabolismo y enzimas digestivas 24
6.5 Análisis de dispersión de la expresión relativa de los genes α-amilasa (*amy*), tripsina (*try*), sintasa de ácidos grasos (*fas*), factor de crecimiento insulínico-1 (*igf-I*) y glutamato deshidrogenasa (*gdh*) 25
6.6 Análisis de expresión relativa en estómago, hígado, intestino anterior y músculo de *O. niloticus* ante distintas frecuencias de alimentación 26
6.7 Análisis estadísticos 26

7. RESULTADOS.....27
7.1 Análisis de la expresión relativa de genes de metabolismo y enzimas digestivas en diferentes tejidos de organismos juveniles y adultos de tilapia *Oreochromis niloticus* bajo distintas frecuencias de alimentación 27
7.1.1 Estabilidad de genes de referencia para la normalización de los genes *amy*, *try*, *fas*, *igf-I* y *gdh* en los tejidos estómago, hígado, intestino anterior y músculo de juveniles y adultos de tilapia *O. niloticus* alimentados a dos frecuencias de alimentación. 27
7.1.2 Análisis de variabilidad de la expresión relativa de los genes α-amilasa (*amy*), tripsina (*try*), sintasa de ácidos grasos (*fas*), factor de crecimiento insulínico-1 (*igf-I*) y glutamato deshidrogenasa (*gdh*) evaluados en diferentes tejidos de juveniles y adultos de *O. niloticus* bajo dos diferentes frecuencias de alimentación 29
7.2 Análisis de expresión relativa de genes que codifican enzimas digestivas y genes involucrados en el metabolismo de *O. Niloticus*.....38
7.2.1 Análisis de expresión relativa de los genes *amy* y *try* en estómago e intestino anterior de juveniles y adultos de *O. niloticus* bajo distintas frecuencias de alimentación.....38
7.2.2 Análisis de expresión relativa de los genes sintasa de ácidos grasos (*fas*), factor de crecimiento insulínico-1 (*igf-I*) y glutamato deshidrogenasa (*gdh)* en estómago, hígado y músculo de juveniles y adultos *O. niloticus* ante distintas frecuencias de alimentación.....41
7.2.3 Análisis de expresión relativa del gen *gdh* (glutamato deshidrogenasa) en estómago, intestino anterior, hígado y músculo de juveniles y adultos *O. niloticus* ante distintas frecuencias de alimentación 47
8. DISCUSIÓN.....50
8.1 Análisis de expresión relativa de genes que codifican enzimas digestivas en estómago e intestino anterior de la tilapia *Oreochromis niloticus*.....50
8.2 Análisis de expresión relativa de genes involucrados en el metabolismo de la tilapia *O. niloticus* 56
9. CONCLUSIONES.....67
10. LITERATURA CITADA 69

Lista de figuras

Figura 1. Ejemplar adulto de tilapia del Nilo *Oreochromis niloticus.*.....2
Figura 2. Diagrama del bioensayo 1 realizado con 600 organismos juveniles de tilapia *O. niloticus* en el Laboratorio de Investigación, Desarrollo Tecnológico e Innovación en tilapia (LIDETIT) de la Unidad Nayarit del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (UNCIBNOR) en Tepic, Nayarit. 18
Figura 3. Diagrama del bioensayo 2 realizado con 872 organismos adultos de tilapia *O. niloticus* en el Laboratorio de Investigación, Desarrollo Tecnológico e Innovación en tilapia (LIDETIT) de la Unidad Nayarit del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (UNCIBNOR) en Tepic, Nayarit. 19
Figura 4. Electroforesis de ARN total de tejidos de bioensayos de expresión génica. Del carril 1 al 5) estómago; 6 al 10) hígado; 11 al 15) intestino anterior y 16 al 20) músculo de *O. niloticus.* En el carril 1 se desglosan las unidades ribosomales. En los carriles 2 y 11 se observa ARN degradado. En el resto de los carriles se observa ARN total integro. 22
Figura 5. Electroforesis con el gen de referencia 18S. No amplificación de las muestras de tilapia *O. niloticus*. La M indica amplificación de una de las muestras. El signo ¨-¨indíca el negativo y el ¨+¨ indica el positivo.....22
Figura 6. Electroforesis con el gen de referencia 18S para la amplificación de ADNc en 4 tejidos de tilapia *O. niloticus.* El orden de las muestras: carriles del 2 al 6) estómago; 7 al 11) hígado; 12 al 16) intestino anterior y 17 al 21) músculo. En el carril 1) marcador de peso molecular; en el 22) ADNc de estómago como control positivo. 23
Figura 7. Estabilidad de los genes de referencia estimada con RefFinder con base en los métodos Delta CT, BestKeeper, Normfinder y Genorm. a) El gen más estable (ubi) fue utilizado para la normalización de la cuantificación de la expresión de los genes *gdh*, *igf-I*, *fas*, *amy* y *try* en hígado, intestino anterior y músculo de juveniles y adultos de *O. niloticus*; b) el gen más estable (*ef1a*) fue utilizado para la normalización de la cuantificación de la expresión de los genes gdh, *igf-I*, *fas*, *amy* y *try* en estómago de *O. niloticus.* 28
Figura 8. Dispersión de la expresión relativa del gen α-amilasa (*amy),* en a) estómago y b) intestino anterior en organismos juveniles (C3 y C7) y adultos (T3 y T7) de tilapia *O. niloticus*. Los triángulos indican datos anómalos que se encuentran fuera de la media + tres desviaciones estándar. 30
Figura 9. Dispersión de la expresión relativa del gen tripsina (*try)*, en a) estómago y b) intestino anterior en organismos juveniles (C3 y C7) y adultos (T3 y T7) de tilapia *O. niloticus*. Los triángulos indican datos anómalos que se encuentran fuera de la media + tres desviaciones estándar. 31
Figura 10. Dispersión de la expresión relativa del gen sintasa de ácidos grasos (*fas),* en a) estómago y b) hígado en organismos juveniles (C3 y C7) y adultos (T3 y T7) de tilapia *O. niloticus*. Los triángulos indican datos anómalos que se encuentran fuera de la media + tres desviaciones estándar.....32
Figura 11. Dispersión de la expresión relativa del gen sintasa de ácidos grasos (*fas)*, en c) músculo en organismos juveniles (C3 y C7) y adultos (T3 y T7) de tilapia *O. niloticus*. Los triángulos indican datos anómalos que se encuentran fuera de la media + tres desviaciones estándar. 33
Figura 12. Dispersión de la expresión relativa del gen factor de crecimiento insulínico-1 (*igf-I)*, en a) estómago y b) hígado en organismos juveniles (C3 y C7) y adultos (T3 y T7) de tilapia *O. niloticus*. Los triángulos indican datos anómalos que se encuentran fuera de la media + tres desviaciones estándar.....34

Figura 13. Dispersión de la expresión relativa del gen factor de crecimiento insulínico-1 (*igf-I)*, en c) músculo en organismos juveniles (C3 y C7) y adultos (T3 y T7) de tilapia *O. niloticus*. Los triángulos indican datos anómalos que se encuentran fuera de la media + tres desviaciones estándar.....35
Figura 14. Dispersión de la expresión relativa del gen glutamato deshidrogenasa (*gdh),* en a) estómago y b) hígado en organismos juveniles (C3 y C7) y adultos (T3 y T7) de tilapia *O. niloticus*. Los triángulos indican datos anómalos que se encuentran fuera de la media + tres desviaciones estándar.....36
Figura 15. Dispersión de la expresión relativa del gen glutamato deshidrogenasa (*gdh),* en c) hígado y d) músculo en organismos juveniles (C3 y C7) y adultos (T3 y T7) de tilapia *O. niloticus.* Los triángulos indican datos anómalos que se encuentran fuera de la media + tres desviaciones estándar.....37
Figura 16. Expresión relativa del gen α-amilasa (*amy*), en a) estómago (ES) y b) intestino anterior (IA) de organismos de tilapia *O. niloticus* juveniles (C3 y C7) y adultos (T3 y T7). Las barras indican los valores promedio y las líneas verticales en cada uno la desviación estándar. Letras diferentes sobre las columnas indican diferencias significativas (*P*<0.05). 39
Figura 17. Expresión relativa del gen tripsina (*try*), en a) estómago (ES) y b) intestino anterior (IA) de organismos de tilapia *O. niloticus* juveniles (C3 y C7) y adultos (T3 y T7). Las barras indican los valores promedio y las líneas verticales en cada uno la desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas (*P*<0.05). 40
Figura 18. Expresión relativa del gen sintasa de ácidos grasos (*fas),* en a) estómago (ES) y b) hígado (HI) de organismos juveniles (C3 y C7) y adultos (T3 y T7) de tilapia *O. niloticus*. Las barras indican los valores promedio y las líneas verticales en cada uno la desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas (*P*<0.05). 43
Figura 19. Expresión relativa del gen sintasa de ácidos grasos (*fas),* en músculo (MU) de organismos juveniles (C3 y C7) y adultos (T3 y T7) de tilapia *O. niloticus*. Las barras indican los valores promedio y las líneas verticales en cada uno la desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas (P<0.05). 44
Figura 20. Expresión relativa de factor de crecimiento insulínico-1 (*igf-I),* en a) estómago (ES) y b) hígado (HI) de organismos juveniles (C3 y C7) y adultos (T3 y T7) de tilapia *O. niloticus*. Las barras indican los valores promedio y las líneas verticales en cada uno la desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas (*P*<0.05).....45
Figura 21. Expresión relativa de factor de crecimiento insulínico-1 (*igf-I)* en músculo (MU) de organismos juveniles (C3 y C7) y adultos (T3 y T7) de tilapia *O. niloticus*. Las barras indican los valores promedio y las líneas verticales en cada uno la desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas (*P*<0.05). 46
Figura 22. Expresión relativa del gen glutamato deshidrogenasa (*gdh)*, en a) estómago (ES) y b) intestino anterior (IA) de organismos juveniles (C3 y C7) y adultos (T3 y T7) de tilapia *O. niloticus.* Las barras indican los valores promedio y las líneas verticales en cada uno la desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas (*P*<0.05).....48
Figura 23. Expresión relativa del gen glutamato deshidrogenasa (*gdh)*, en c) intestino anterior (IA) y d) músculo (MU) de organismos juveniles (C3 y C7) y adultos (T3 y T7) de tilapia *O. niloticus.* Las barras indican los valores promedio y las líneas verticales en cada uno la desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas (*P*<0.05).....49

Lista de tablas

Tabla 1. Genes evaluados para la cuantificación de su expresión en estómago, intestino anterior y músculo de juveniles y adultos de tilapia *Oreochromis niloticus.*.....25

Abreviaturas

ADN	Ácido Desoxirribunocleico
amy	Amylase (*α-amilasa*)
ARN	Ácido Ribonucleico
Igf-I	Insuline growth factor (*Factor de crecimiento insulínico-1*)
gdh	Glutamate dehydrogenase (*glutamato deshidrogenasa*)
try	Tripsine (*tripsina*)
fas	Fatty acid syntesis (*Sintasa de acidos grasos*)
USD	Dólares
ups	Unidades prácticas de salinidad
g/L	gramos por litro
h	horas
mg/L	miligramos por litro
n	número de repeticiones
OD	oxígeno disuelto
S	Salinidad
org	Organismo
µl	Microlitro
ANOVA	Análisis de varianza
L	Litro
mM	Milimolar
ml	Mililitro
m	Metro
pH	Potencial de Hidrógeno
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
qPCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa Cuantitativa
UPS	Unidades Prácticas de Salinidad
FA	Frecuencia de Alimentación
FA3	Frecuencia de Alimentación de tres veces al día
FA7	Frecuencia de Alimentación de siete veces al día
DE	Desviación Estándar

1. INTRODUCCIÓN

La acuicultura es la práctica de cultivar y producir organismos acuáticos, tanto de agua dulce como salada, mediante técnicas dirigidas a mejorar su rendimiento. A nivel mundial, esta actividad es de gran importancia, ya que representa una de las principales fuentes de proteína para la población y contribuye significativamente a la reducción de la presión sobre las pesquerías silvestres (Gutierrez, 2020). En 2022, la producción acuícola a nivel global alcanzó 130,9 millones de toneladas, con un valor estimado de 312.800 millones de dólares. Esta cifra representa el 59% de la producción total combinada de pesca y acuicultura. Por primera vez en la historia la acuicultura superó a la pesca de captura en la producción de animales acuáticos, alcanzando 94.4 millones de toneladas, lo que equivale al 51% del total mundial y un récord del 57% destinado al consumo humano. La acuicultura continental proporcionó un 62.6% de los animales acuáticos cultivados, destacándose la tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus)* (FAO, 2024).

La tilapia *O. niloticus* (Linnaeus, 1758) (Fig. 1) es una de las especies más importantes en la acuicultura a nivel mundial. Originaria de África, fue introducida en México en 1964, donde ejemplares de los géneros *tilapia* y *Oreochromis* fueron depositados en la estación piscícola de Temazcal, Oaxaca. Posteriormente estos organismos se distribuyeron en distintos embalses naturales y artificiales (Basualdo-Ramirez *et al.,* 2012).

Su ciclo de vida está claramente definido en cinco etapas; huevo, alevín, cría, juvenil y adulto (Chervinski 1982). Para reproducirse requieren de temperaturas superiores a los 24 °C y pueden aparearse entre seis a ocho veces al año. La hembra es capaz de incubar los huevos en su boca, lo que aumenta las tasas de supervivencia de las crías. En un período de seis a doce meses, pueden alcanzar su talla comercial, que varía de 250 a 500 gr, dependiendo de factores como la temperatura, la alimentación, la densidad de siembra, la calidad genética y manejo del cultivo (Basualdo-Ramirez *et al.,* 2012).

Figura 1. Ejemplar adulto de tilapia del Nilo *Oreochromis niloticus.*

La tilapia *O. niloticus* se caracteriza por ser principalmente omnívora, con una notable aceptación hacia distintos alimentos suplementarios. Este pez presenta gran adaptabilidad a su entorno, rápido crecimiento, tolerancia a bajos niveles de oxígeno y alta densidad de cultivo (Pullin *et al.,* 1982; Pullin & Capili, 1988; El-Sayed, 2006; Silva *et al.,* 2010). La tilapia pertenece a la familia Cichlidae dentro del orden de los perciformes, se clasifican en dos géneros principales: *Tilapia* y *Oreochromis*. Las especies del género *Tilapia* son macrófagas que ingieren fragmentos grandes de alimento y son reproductores de sustrato.

En contraste, las especies del género *Oreochromis* también son macrófagas, pero consumen partículas más pequeñas y son criadores bucales durante la reproducción (Cuellar, 2021). Aunque se han identificado alrededor de 70 especies en estos dos géneros, solo dos especies de *Tilapia* (*T. rendalli y T. zillii*) y tres especies de *Oreochromis* (*O. mossambicus, O. niloticus y O. aureus*) son comúnmente utilizadas en acuicultura. En los últimos años, la especie con mayor interés acuícola es la tilapia del Nilo *Oreochromis niloticus* (Hardy & Kaushik, 2022). Esta especie es el tercer pez más cultivado a nivel mundial en la acuicultura, después de la carpa herbívora (*Ctenopharyngodon idella*) y la carpa plateada (*Hypophthalmichthys molitrix*) (FAO, 2022).

Las distintas fases de cultivo según Cama (2017) son:

a) Alevinaje: con pesos de 1 g a 5 g, y alimentados con un contenido proteico mínimo del 45%, equivalente al 10% de su biomasa.
b) Crecimiento: con pesos de 50 g a 150 g, donde deben ser alimentados con un 40% de proteína, equivalente al 6-10 % de su biomasa total.
c) Engorde: desde los 150 g en adelante, con alimentación que contenga entre 33-38 % de proteína, equivalente al 1.5-3 % de su biomasa total.

Este pez se cultiva en más de 120 países, siendo fundamental en muchos de ellos como recurso proteico debido a su alta disponibilidad y capacidad para transformar eficientemente los recursos alimenticios. Además, contribuye significativamente a la seguridad alimentaria y a las economías dedicadas a la acuicultura (Fitzsimmons, 2000; Young & Muir, 2002; Prabu *et al.,* 2019). En América Latina, la acuicultura ha mostrado un crecimiento notable; México se posiciona como el tercer productor mundial de tilapia del Nilo *O. niloticus*. Se ha reportado que esta especie es la más producida en el país por volumen y valor, siendo Chiapas, Jalisco y Veracruz los principales estados productores (Ortega-Mejía *et al.,* 2023).

Los peces como la tilapia del Nilo *O. niloticus* requieren para su crecimiento normal una dieta equilibrada que incluya el aporte de proteínas, lípidos (grasa), carbohidratos, vitaminas y minerales. Estos requerimientos varían a lo largo de su ciclo de vida dependiendo del sexo, estado reproductivo y condiciones ambientales. Un manejo inadecuado del alimento puede desencadenar problemas significativos; el exceso puede deteriorar la calidad del agua, generar enfermedades y elevar los costos de producción (Basualdo-Ramírez *et al.,* 2012).

Los costos de producción pueden reducirse mediante estrategias óptimas de alimentación que mejoran el crecimiento, la supervivencia y el Factor de Conversión Alimenticia (FCA), minimizando el desperdicio alimenticio y favoreciendo la eficiencia productiva. Esta influye directamente en la eficiencia en el uso del alimento, reduce el desperdicio (lo que contribuye a la calidad del agua) y ayuda a disminuir los costos de producción (Oliveira-Tenazoa y Delgado-Vargas, 2019; Abdo-de la Parra *et al*., 2020). Entre estas estrategias se encuentra la frecuencia de alimentación (Tekinay, 1999; Dwyer *et al.,* 2002). Esta frecuencia se refiere a cuántas veces al día se suministra alimento

a los peces en un período de 24 horas, siendo su objetivo principal acelerar el tránsito del alimento por el tracto digestivo y reducir el desperdicio para maximizar su aprovechamiento (García-Ulloa, 2004).

La tilapia tiende a ser alimentada varias veces al día, existe información sobre criterios técnicos y económicos para la producción sustentable de tilapia en México, se recomienda alimentar a los alevines entre seis a ocho veces al día, disminuyendo a 4 veces diarias para juveniles una vez que alcanzan los 7 cm de longitud (Vega-Villasante *et al.,* 2011; Basualdo-Ramírez, *et al.,* 2012).

Desde una perspectiva fisiológica, alimentar a los peces en múltiples ocasiones a lo largo del día permite reducir la competencia por el alimento, mejorar la digestibilidad y evitar fluctuaciones extremas en los niveles de glucosa y amonio en el sistema circulatorio (Jobling, 1994). Al dividir la ración diaria total en varias porciones más pequeñas, se mejora la eficiencia del consumo y se reduce el desperdicio de alimento, lo cual tiene implicaciones tanto biológicas como económicas y ambientales (Cho & Bureau, 2001).

Por otro lado, la frecuencia de alimentación debe estar sincronizada con el tamaño del pez y la capacidad del sistema de cultivo para mantener la calidad del agua. Por ejemplo, en sistemas intensivos con recirculación, puede recomendarse una mayor frecuencia (cuatro a seis veces al día) en las primeras etapas de crecimiento, mientras que en sistemas extensivos o semi-intensivos podría bastar con una o dos alimentaciones diarias, siempre y cuando se respeten los requerimientos nutricionales del pez (El-Sayed, 2006; Muin *et al*., 2017).

Es importante señalar que la frecuencia no debe confundirse con la tasa de alimentación, que representa el porcentaje del peso corporal que se ofrece en alimento por día. Ambas variables están estrechamente relacionadas, pero tienen efectos diferenciados sobre la fisiología del pez y el manejo del sistema (Wang *et al*., 2017). La frecuencia de alimentación en sistemas acuícolas constituye un factor determinante en el rendimiento productivo y económico de la tilapia, una de las especies más cultivadas a nivel mundial por su alta rusticidad, tolerancia a diversas condiciones ambientales y excelente conversión alimenticia. La decisión sobre cuántas veces alimentar al día a los peces no sólo incide en el crecimiento y la supervivencia, sino también en la

eficiencia del uso del alimento y la calidad del agua, elementos esenciales para la sostenibilidad del cultivo (El-Sayed, 2006; Wang *et al*., 2017).

Una mayor eficiencia en el crecimiento está estrechamente vinculada a un metabolismo energético adecuado. Este proceso bioquímico transforma nutrientes en energía utilizable, esencial para funciones vitales como el crecimiento, la reproducción y el mantenimiento celular (Martínez-Porchas, 2009). Los principales nutrientes involucrados son carbohidratos, lípidos y proteínas, que se metabolizan para producir ATP (Trifosfato de Adenosina), la principal fuente energética de la célula (Berg *et al*., 2015). Los carbohidratos constituyen la fuente energética primaria para la tilapia, mientras que los lípidos actúan como una fuente de energía densa durante periodos de ayuno o cuando el suministro de carbohidratos es limitado (Nelson *et al*., 2017; Berg *et al*., 2015). Aunque las proteínas no representan la principal fuente de energía, pueden ser catabolizadas en situaciones críticas donde existe insuficiencia energética (Voet & Voet, 2011). El metabolismo energético está regulado por factores internos como la disponibilidad nutricional y la temperatura del agua, así como por factores externos como el nivel de oxígeno. Además, está relacionado con las enzimas digestivas necesarias para descomponer nutrientes durante la digestión (Lodish *et al*., 2016).

La tecnología enzimática es una rama biotecnológica de gran utilidad en la acuicultura, se centra en el uso de enzimas para catalizar reacciones químicas específicas, ofreciendo procesos más eficientes. En la acuicultura la aplicación de enzimas ha demostrado ser útil en la mejora de la digestibilidad de los alimentos para peces, la reducción de desechos y la optimización de la calidad del agua (Borrell, 2014). En peces como *O. niloticus* las enzimas digestivas α*-amilasa, lipasa* y *proteasa* son fundamentales para la descomposición de carbohidratos, lípidos y proteínas en sus unidades básicas: glucosa, ácidos grasos y aminoácidos respectivamente. Estas unidades son absorbidas en el intestino anterior y estómago, las cuales son utilizadas en vías metabólicas como la glicólisis para generar energía (Voet & Voet, 2011). La importancia de la actividad enzimática se debe a la influencia que tiene directamente en la salud, el crecimiento y la reproducción de los peces (Uscanga-Martínez, 2020).

Por otro lado, el metabolismo está influenciado por diversos factores ambientales y nutricionales, entre los cuales la frecuencia de alimentación puede ser fundamental. La cantidad y distribución del alimento a lo largo del día pueden afectar el uso de energía, la eficiencia digestiva y la expresión génica de enzimas clave en los procesos metabólicos (Liu *et al*., 2022). Además, el estrés alimentario o la subalimentación pueden alterar la expresión de genes específicos, lo que impacta en la eficacia de la digestión y absorción de nutrientes (Villarroel *et al*., 2005).

La actividad de enzimas digestivas como la α-amilasa, puede variar en respuesta a diferentes condiciones ambientales y de alimentación, lo que a su vez afecta el gasto energético y la eficiencia digestiva en juveniles de tilapia (Juárez-Gutierrez *et al*., 2024). Por lo tanto, la manipulación adecuada de la frecuencia de alimentación es esencial para optimizar la expresión génica relacionada con el metabolismo y las enzimas digestivas, mejorando así el rendimiento y la salud de la tilapia en sistemas acuícolas.

La frecuencia de alimentación no solo influye en el crecimiento y la eficiencia alimenticia, sino también en la regulación de la expresión génica que controla procesos fisiológicos clave en los peces (Hu *et al.*, 2020; Nahayat *et al.*, 2022; Wang *et al.*, 2022). Dicha expresión puede ser modulada por factores ambientales como la disponibilidad y distribución del alimento (Li *et al.,* 2020; Juárez-Gutiérrez *et al.*, 2024). La expresión génica es una herramienta molecular en la que la información codificada de un gen se utiliza para dirigir la síntesis de proteínas o ARN, el cual es esencial para el desarrollo, diferenciación y función celular en todos los organismos vivos. El estudio de la expresión génica permite comprender las respuestas de los genes a estímulos como la frecuencia de alimentación y su contribución a la adaptación y supervivencia, entre otras respuestas (Imentai *et al.*, 2022; Juárez-Gutiérrez *et al.,* 2024).

En la acuicultura se utiliza la expresión génica para mejorar las características productivas como el crecimiento y la salud de los organismos, identificando genes relacionados con la optimización de la conversión de alimentos o el crecimiento. Para la tilapia *O. niloticus* se han realizado estudios de genes relacionados con el metabolismo lipídico y carbohidratos para maximizar la eficiencia alimentaria (Zhao, 2020). También se ha investigado la expresión génica de enzimas digestivas como α-*amilasa,* la cual cataliza la degradación del almidón en azúcares, y de la *tripsina*, la cual

es fundamental en la digestión de proteínas. Estas investigaciones se realizan para mejorar formulaciones dietéticas que promuevan la digestión y la absorción de nutrientes (Wang *et al.,* 2017). Por esta razón, el presente trabajo se enfocó en el uso de herramientas moleculares para evidenciar el efecto que tiene la frecuencia de alimentación sobre los genes: síntasa de ácidos grasos (*fas*), factor de crecimiento insulínico-1 (*igf-I*), glutamato deshidrogenasa (*gdh*), α-amilasa (*amy*) y tripsina (*try*), los cuales están involucrados en los procesos digestivos y metabólicos de la tilapia *O. niloticus.*

2. ANTECEDENTES

2.1 Cultivo de tilapia *Oreochromis niloticus*

Estudios realizados desde hace décadas han descrito cómo el cultivo de tilapia O. niloticus enfrenta desafíos relacionados con la sostenibilidad ambiental, y mencionan que es importante implementar técnicas para minimizar el impacto sobre los ecosistemas acuáticos naturales (ONU, 2015; Teresinha-Kist *et al.,* 2016; Fialho *et al.,* 2021). El uso de sistemas de recirculación y la implementación de tecnologías para reducir la carga de nutrientes en los efluentes son algunas estrategias clave para lograr una producción sostenible (El-Sayed, 2006).

La reproducción de la tilapia *O. niloticus* es una de sus características más destacadas gracias a su notable capacidad reproductiva (Morales, 1991). Estos organismos alcanzan la madurez sexual a los 10-30 cm de longitud total (LT), lo cual es a su vez determinado por la disponibilidad de alimento y la temperatura, logrando reproducirse cada 30 días (Trewavas, 1983). Para mitigar desafíos como la reproducción no controlada, sobrepoblación y crecimiento desigual, se emplean técnicas de manejo como la producción de híbridos y el uso de cultivos monosexuales exclusivamente de machos (El-Sayed, 2006).

En la tilapia *O. niloticus* se utilizan técnicas como el cultivo monosexo para optimizar su cultivo, la cual consiste en cultivar organismos de peces exclusivamente masculinos sexualmente revertidos (Alcántar-Vázquez *et al*., 2014). Se han realizado estudios donde se sugiere que en los cultivos monosexo de tilapia hay un rápido crecimiento en los organismos ya que no utilizan el alimento ingerido en la preparación de la maduración sexual y mayor rendimiento productivo (Pérez & Martínez, 2015).

La reversión sexual se realiza agregando al alimento del pez para su ingesta, la hormona 17-α-metiltestosterona, la cual promueve la masculinización de los lotes alevines, al completar dicho procedimiento, los organismos de tilapia *Oreochromis niloticus* incrementan significativamente su crecimiento y engorda con una eficacia del 95%, dicha tecnología ha sido fundamental en el desarrollo de la industria acuícola mundial de tilapia (Urías-Sotomayor & Maeda-Martínez, 2024).

2.2 La frecuencia de alimentación en el cultivo de tilapia *O. Niloticus*

El-Sayed *et al*. (2018) han realizado estudios para evaluar la frecuencia óptima de alimentación para la tilapia *O. niloticus*. Ellos reportaron que la frecuencia de alimentación de dos veces al día tiene un impacto significativo en la tasa de crecimiento específica y la tasa de conversión alimenticia. Por otro lado, se realizó un estudio por De Oliveira *et al*. (2022), donde evaluaron organismos de tilapia *O. niloticus* que fueron alimentados dos veces al día, en dicho estudio observaron que la frecuencia de alimentación influye en la actividad enzimática digestiva, principalmente de la tripsina, la cual puede mostrar variaciones según el tiempo de alimentación, por lo que indican que junto con la frecuencia de alimentación estos contribuyen en la eficiencia de la digestión y la absorción de nutrientes.

Por otro lado Hisano *et al*. (2020) en un estudio sobre el efecto de frecuencias de alimentación (dos, cuatro y seis veces al día) en la calidad del agua, crecimiento y parámetros hematológicos, obtuvieron como resultado que la frecuencia de alimentación de cuatro veces al día mostró el mejor crecimiento y la mayor respuesta de eficiencia alimenticia, también se reportó que es esencial establecer una frecuencia de alimentación óptima en organismos de tilapia *Oreochromis niloticus*, donde reportaron como dicha técnica permite incrementar la eficiencia en el cultivo de peces, reducir la sobrealimentación, mantener óptimos parámetros fisicoquímos como la calidad el agua (Riche *et al*., 2004), además también se ha reportado desde hace más de una decada la influencia que tiene la frecuencia de alimentación en la supervivencia, la ingesta de alimento, crecimiento (Wang *et al*., 2007; Xie *et al*., 2011), la actividad enzimática e inmunidad de la tilapia (Peixoto *et al* ., 2017; Liu *et al*., 2018).

Wang *et al.,* (2017) realizaron un estudio de la frecuencia de alimentación y sus afectaciones en el rendimiento del crecimiento, la eficiencia alimenticia y los parámetros fisiológicos de la tilapia roja *Oreochromis. sp.* Encontraron que con la frecuencia de alimentación de tres veces al día había un crecimiento más eficiente, con una conversión alimenticia óptima y menores niveles de estrés, los cuales fueron medidos a través de biomarcadores de cortisol. La alimentación de cuatro veces al día evaluada no mejoró significativamente el crecimiento de los peces y mostró un aumento en los niveles de cortisol. En este estudio se menciona la importancia de seleccionar una

frecuencia de alimentación adecuada para optimizar el crecimiento mientras se minimiza el estrés en la tilapia.

2.2.1 Efecto de la frecuencia de alimentación en la expresión de genes que codifican enzimas digestivas e involucrados en el metabolismo energético en tilapia *O. niloticus*

Un estudio previo sobre juveniles de *Solea seleganensis* mostró que la disponibilidad, ingesta y frecuencia de alimentación (una o seis veces al día) influyen en el metabolismo energético, la digestión y la expresión génica relacionada, impactando directamente en la salud y el rendimiento de los peces en cultivo (Gilannejad *et al*., 2021).

En la tilapia *O. niloticus*, la expresión diferencial de los genes relacionados con el metabolismo energético y que codifican las enzimas digestivas, que son importantes para su crecimiento y adaptación a diferentes condiciones ambientales, pueden darnos información importante para el establecimiento y optimización de las prácticas de alimentación y mejorar la eficiencia de los sistemas acuícolas, asegurando el bienestar de los peces y la sostenibilidad del cultivo. Los genes que están implicados en procesos metabólicos como la glucólisis, el ciclo de Krebs, la β-oxidación de ácidos grasos y la síntesis de proteínas, son fundamentales para la obtención de energía y el procesamiento de nutrientes (Cheng *et al.,* 2024)

Santos *et al*. (2020) investigaron el impacto de la frecuencia de alimentación sobre la expresión de genes que codifican las enzimas digestivas (α-amilasa *y* tripsina) y factores de crecimiento (*igf-I* Factor de crecimiento insulínico-1) en tilapia roja *Oreochromis sp.,* estos organismos fueron alimentados con distintas frecuencias (una, dos, tres y cuatro veces al día), y los autores reportaron que los resultados de la expresión de *igf-I* fue mayor en los peces alimentados tres veces al día lo que se relaciona a un mayor crecimiento. En el estudio mencionado anteriormente se reportó que los genes que codifican para las enzimas digestivas α-amilasa y *tripsina* también mostraron una mayor expresión, sugiriendo que esta frecuencia es óptima para una mayor capacidad digestiva. Por otro lado, Zhang *et al*. (2021) evaluaron los genes *HSP70* (proteína de choque térmico 70) y *il-1*β (interleucina 1 beta), obteniendo como resultado que alimentar tres veces al día redujo la expresión de *HSP70,* lo que sugiere menores niveles de estrés. Sin embargo,

observaron una mayor expresión de il-*1β* en los peces alimentados una vez al día, reflejando un estado inmunológico más activo.

Huang *et al*. (2015) realizaron un estudio acerca del efecto de la frecuencia de alimentación en la fisiología y crecimiento de tilapia *O. niloticus* genéticamente mejorada, donde utilizaron tres frecuencia de alimentación de dos, tres y cinco veces al día, donde la frecuencia de alimentación de dos veces al día indicó que había un mayor crecimiento (ganancia de peso final fue de 12.8±0.2 g y una tasa de crecimiento específica de 2.47±0.03%/día) y un menor daño en el hígado; también indicaron que metabólicamente el contenido lipídico del organismo se acumula (el contenido lipídico corporal aumentó a 9.1% con cinco alimentaciones diarias en comparación con 7.2% con dos alimentaciones diarias) y el contenido de ceniza disminuye (disminuyó de 2.3% a 2.0%) a medida que se aumentó la tasa de alimentación en las dos frecuencias (tres y cinco veces al día), por lo que sugieren que una mayor cantidad de energía alimentaria a un nivel de alimentación elevado puede convertirse en grasa de pescado como ya ha sido reportado por Shearer *et al*. (1997) en el salmón Chinook juvenil *Oncorhynchus tshawytscha*.

A pesar de que se han realizado diferentes estudios de la expresión génica relacionada con el metabolismo energético (Huang *et al*., 2015; Fava *et al*., 2022; Zhong *et al.*, 2022) y la digestión (Santos *et al*., 2020) en peces, el conocimiento sobre cómo la frecuencia de alimentación afecta la expresión de genes específicos relacionados con el metabolismo energético y las enzimas digestivas en tilapia *O. niloticus,* así como la implicación que tienen estos genes en la expresión en distintos tejidos y etapas del organismo; por lo tanto no se encuentra establecido el efecto de la frecuencia de alimentación en el metabolismo y digestión a nivel molecular en la tilapia *O. niloticus.*

2.3 Genes involucrados en el metabolismo de peces

2.3.1 Factor de crecimiento insulínico-1 (*Igf-I*)

El crecimiento de los peces es una importante característica en la acuicultura y se encuentra controlado por diferentes hormonas como el *igf-I* (Khatab *et al.,* 2014). Se ha demostrado que este gen desempeña un papel importante en el sistema inmunitario de los teleósteos, ya que

participa en la proliferación, diferenciación y función de las células inmunitarias (Kajimura *et al*., 2002). El *Igf-I* también puede regular la osmorregulación de los peces, así como otros múltiples procesos fisiológicos. El receptor específico del *igf-I*, altamente expresado en el estómago de los peces, sugiere una función reguladora en la expresión génica de este órgano, mediada por diversas vías hormonales que destacan el papel fundamental del *igf-I* en la transcripción gástrica (Tanamati *et al*., 2015).

Este conocimiento es fundamental para una comprensión integral del *igf-I* y fomenta el estudio de la digestión y absorción reguladas por hormonas (Zhong *et al.,* 2022). En un estudio se sugiere que el gen *igf-I* puede ser utilizado como una terapia inmunopotenciadora en el tracto digestivo de tilapia *O. niloticus*, donde se mejora su rendimiento productivo (Herkenhoff *et al.,* 2020). Comprender la regulación y función del gen *igf-I* en tilapia *O. niloticus* puede influir en optimización de las prácticas acuícolas y mejorar la eficiencia alimentaria.

2.3.2 Sintasa de ácidos grasos (*fas*)

Los lípidos son una fuente fundamental de ácidos grasos esenciales en los peces, desempeñando un papel fundamental en el crecimiento, la salud, la reproducción y las funciones corporales (Boyer, 2023). En tilapias juveniles, una dieta con un 5% de lípidos permite alcanzar el crecimiento mínimo, mientras que un 12% es necesario para lograr el máximo crecimiento (Chou & Shiau., 1996). El gen *fas* es clave en la lipogénesis, el proceso de síntesis de ácidos grasos, que es esencial para el desarrollo de especies como la tilapia *O. niloticus* (Carpio *et al*., 2023).

Este gen codifica una enzima que convierte acetil-CoA y malonil-CoA en ácidos grasos, lo cual es vital para la producción de lípidos que se utilizan en el almacenamiento de energía y en la formación de membranas celulares. La expresión del gen *fas* puede verse influenciada por diversos factores, entre ellos las condiciones de alimentación (Carpio *et al*., 2023). La restricción alimentaria provoca cambios significativos en la expresión de genes asociados al metabolismo lipídico, incluyendo el gen *fas* el cual se encuentra relacionado con la regulación de procesos esenciales para la tilapia *O. niloticus* como la apoptosis y la respuesta inmune, por lo que una

gestión adecuada de la alimentación en los organismos es fundamental para optimizar tanto el crecimiento como la salud de la tilapia *O. niloticus* (Ornelas-Luna *et al*., 2017).

2.3.3 Glutamato deshidrogenasa (*gdh*)

El gen *gdh* se encuentra implicado en la homeostasis energética, al participar en el ciclo del ácido cítrico, contribuye a la producción de energía celular (Kanamori & Ross, 1995), este gen está presente en casi todos los organismos vivos y es fundamental en el metabolismo del nitrógeno y la regulación de glutamato en organismos acuáticos como la tilapia del Nilo *O. niloticus*. El gen *gdh* permite la detoxificación del amoníaco, un subproducto tóxico del metabolismo proteico, convirtiéndolo en glutamato, que puede ser utilizado para la síntesis de aminoácidos (Rangel Zuñiga, 2008).

La expresión del gen *gdh* se encuentra directamente influenciada por diversos factores incluyendo la dieta y las condiciones ambientales. Un estudio sobre la regulación transcripcional del gen *gdh* en dorada (*Spaurus* aurata) mostró que el silenciamiento de este gen afecta el flujo metabólico entre glucólisis y gluconeogénesis, donde se favorece el uso de carbohidratos como fuente de energía (Condori, 2018). En la tilapia *O. niloticus*, la expresión de este gen es esencial para diversas funciones biológicas, incluyendo el metabolismo del nitrógeno, la homeostasis energética y la detoxificación del amoníaco. Este gen se puede regular bajo distintos factores nutricionales (Condori, 2018). El estudio del gen *gdh* no solo proporciona información valiosa sobre la fisiología de la tilapia, sino también sobre cómo optimizar las prácticas acuícolas mediante una mejor comprensión del metabolismo nutricional.

2.4 Genes que codifican enzimas digestivas

2.4.1 α-amilasa (*amy*)

La α-amilasa (*amy*) es una enzima digestiva fundamental en la fisiología de la tilapia *O. niloticus* Este gen juega un papel fundamental en la digestión de carbohidratos, facilitando la conversión de almidones y glucógenos en azúcares simples que pueden ser absorbidos y utilizados como fuente de energía (Smith, 1980). La capacidad de la tilapia para digerir eficientemente los carbohidratos tiene implicaciones significativas para su nutrición y crecimiento. La formulación

de dietas que optimicen la actividad de α-amilasa puede mejorar significativamente el rendimiento productivo (Machuca-Valverde, 2021).

Los cambios en las dietas de tilapia *O. niloticus* pueden modificar la actividad enzimática, incluyendo la α-amilasa, lo que sugiere que ciertos cambios en la frecuencia de alimentación pueden modificar la digestibilidad y eficiencia alimentaria. El gen *amy* (codificante de la enzima α-amilasa) es esencial para el metabolismo energético y nutricional en la tilapia *O. niloticus* (Machuca-Valverde, 2021). Su capacidad para hidrolizar carbohidratos complejos permite a este pez maximizar su eficiencia alimentaria, lo cual es crítico para su crecimiento y desarrollo sostenido en condiciones acuícolas (Torres-Novoa & Hurtado-Nery, 2012).

2.4.2 Tripsina (*try*)

La *tripsina* (*try*) es una enzima proteolítica que juega un papel importante en la digestión de proteínas en muchos organismos, incluidos los peces (Boyer, 2023). En tilapia *O. niloticus*, la *try* es fundamental para el proceso digestivo, ya que descompone las proteínas en péptidos y aminoácidos, que son esenciales para el crecimiento y desarrollo del pez (Muñoz, 2018). Ju *et al*., (2008) examinaron la importancia del gen *try* en la digestión de tilapia, su regulación y cómo afecta la nutrición y la salud del pez. Los autores mencionan que esta enzima es secretada por el páncreas en forma de un precursor inactivo llamado tripsinógeno. Una vez liberada en el intestino delgado, el tripsinógeno es activado por la enteropeptidasa, convirtiéndose en tripsina (Soltan, 2009). Esta enzima es capaz de hidrolizar enlaces peptídicos específicos en las proteínas, facilitando su descomposición en fragmentos más pequeños que pueden ser absorbidos por las células intestinales (Long *et al*., 2015).

La digestión eficiente de las proteínas es fundamental para el crecimiento óptimo de la tilapia (Luo *et al*., 2014). La actividad de la tripsina facilita la disponibilidad de aminoácidos esenciales, permitiendo a los peces sintetizar sus propias proteínas y mantener funciones fisiológicas adecuadas (Xu & Pan, 2012). La expresión del gen que codifica la tripsina puede estar influenciada por diversos factores como la composición de la dieta y las condiciones ambientales. Por ejemplo, se ha observado que una dieta alta en proteínas estimula la producción de tripsina, mientras que una dieta baja en proteínas puede reducir su actividad (Long *et al*., 2015).

3. JUSTIFICACIÓN

La frecuencia de alimentación es un factor clave que influye significativamente en el metabolismo y la eficiencia digestiva de la tilapia del Nilo *Oreochromis niloticus*. Estudios han demostrado que un aumento en la frecuencia de alimentación mejora notablemente el crecimiento y la conversión alimenticia en juveniles de tilapia, ya que permite al organismo disponer de más tiempo para realizar procesos metabólicos adecuados, optimizando así el aprovechamiento de los nutrientes.

Sin embargo, a pesar de estos avances, aún es necesario profundizar en cómo diferentes frecuencias de alimentación afectan la regulación molecular de genes implicados en el metabolismo y la digestión. En este contexto, genes como *fas* (sintasa de ácidos grasos) e *igf-I* (factor de crecimiento insulínico-1) son fundamentales para la regulación del metabolismo energético y el crecimiento, mientras que *gdh* (glutamato deshidrogenasa) participa en el metabolismo de aminoácidos, y *amy* (α-amilasa) y *try* (tripsina) son esenciales para la digestión de carbohidratos y proteínas, respectivamente. La expresión de estos genes en tejidos clave como estómago, hígado, intestino anterior y músculo puede reflejar cómo la frecuencia de alimentación modula los procesos metabólicos y digestivos a nivel molecular.

Conocer cómo la frecuencia de alimentación modula la expresión de estos genes permitirá la comprensión de los mecanismos moleculares que subyacen al efecto de la frecuencia de alimentación en el metabolismo y la digestión de *O. niloticus*.

4. HIPÓTESIS

Diferentes frecuencias de alimentación modificarán la expresión de genes relacionados con el metabolismo, como sintasa de ácidos grasos (*fas*), factor de crecimiento insulínico-1 (*igf-I*) y glutamato deshidrogenasa (*gdh*) y la digestión como α-amilasa (*amy*) y tripsina (*try*) en estadios juveniles y adultos de tilapia *Oreochromis niloticus*, generando respuestas transcripcionales diferenciadas al incrementar la frecuencia de alimentación de tres a siete veces al día.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

- Evaluar la expresión de los genes relacionados con el metabolismo como la sintasa de ácidos grasos (*fas*), el factor de crecimiento insulínico-1 (*igf-I*) y el glutamato deshidrogenasa (*gdh*), así como los genes que codifican las enzimas digestivas como la α-amilasa (*amy*) y tripsina (*try*) en juveniles y adultos de tilapia *Oreochromis niloticus* sometidos a tres y siete frecuencias de alimentación.

5.2 Objetivos particulares

1. Evaluar el efecto de tres y siete frecuencias de alimentación en la expresión de los genes que codifican la α-amilasa (*amy*) y tripsina (*try*), relacionados con enzimas digestivas, en juveniles y adultos de tilapia *Oreochromis niloticus*.

2. Evaluar el efecto de tres y siete frecuencias de alimentación en la expresión de los genes sintasa de ácidos grasos (*fas*), factor de crecimiento insulínico-1 (*igf-I*) y glutamato deshidrogenasa (*gdh*), relacionados con el metabolismo en juveniles y adultos de tilapia *Oreochromis niloticus*.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Diseño experimental

Se realizaron dos bioensayos en juveniles y adultos (un bioensayo por etapa) de *Oreochromis niloticus* de una línea comercial mejorada en el Laboratorio de Investigación, Desarrollo Tecnológico e Innovación en Tilapia (LIDETIT). Este laboratorio se encuentra en la Unidad Nayarit del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (UNCIBNOR), en Tepic, Nayarit (21° 28’ 58’’ N, 104° 50’ 42” O).

6.1.1 Bioensayo 1. Juveniles de tilapia *O. niloticus* sometidos a dos frecuencias de alimentación

En el Bioensayo 1 se utilizaron 600 juveniles de *O. niloticus* sexualmente revertidos con un peso inicial de 0.39±0.06 g y longitud inicial de 2.67±0.14 cm. Los organismos se mantuvieron por 35 días en seis tinas circulares de 100 L con 100 organismos cada una con 3 réplicas por tratamiento (C3: frecuencia de alimentación de tres veces al día, C7: frecuencia de alimentación de 7 veces al día) (Fig. 2).

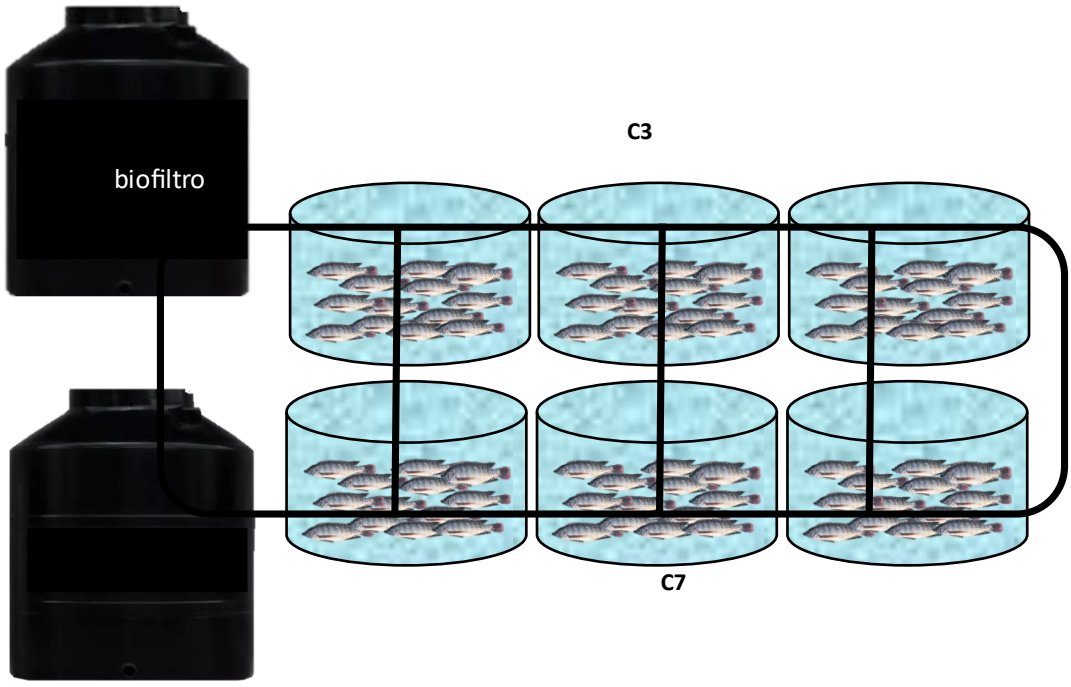


Figura 2. Diagrama del bioensayo 1 realizado con 600 organismos juveniles de tilapia *O. niloticus* en el Laboratorio de Investigación, Desarrollo Tecnológico e Innovación en tilapia (LIDETIT) de la Unidad Nayarit del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (UNCIBNOR) en Tepic, Nayarit.

6.1.2 Bioensayo 2. Adultos de tilapia *O. niloticus* sometidos a dos frecuencias de alimentación

En el bioensayo 2 se utilizaron 872 tilapias del Nilo *O. niloticus* sexualmente revertidas con un peso inicial de 3.38±0.21 g y longitud inicial de 8.54±0.65 cm (Fig.3). Los organismos se mantuvieron durante de 240 días en ocho jaulas flotantes de 8.2 m^3 (2.3*4*1 m) en estanques de 56 m^3 (14*4*1.2 m) con 218 organismos cada uno (22 peces/m^3) y 4 réplicas por tratamiento (T3: frecuencia de alimentación de tres veces al día, T7: frecuencia de alimentación de 7 veces al día),

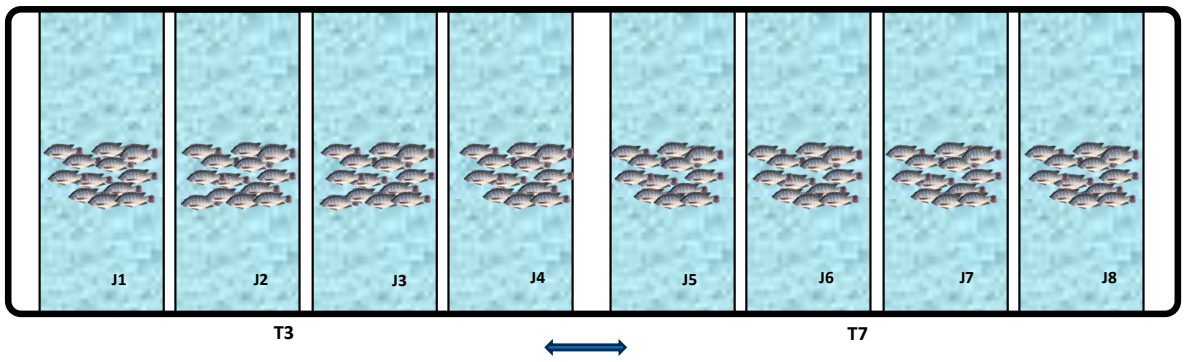


Figura 3. Diagrama del bioensayo 2 realizado con 872 organismos adultos de tilapia *O. niloticus* en el Laboratorio de Investigación, Desarrollo Tecnológico e Innovación en tilapia (LIDETIT) de la Unidad Nayarit del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (UNCIBNOR) en Tepic, Nayarit.

6.1.3 Condiciones de cultivo

Ambos bioensayos se sometieron a dos tratamientos; (1) frecuencia de alimentación de tres veces al día (grupos C3 juveniles y T3 en adultos) con ofrecimiento de alimento en los horarios 0700, 1300 y 1900 horas; y (2) frecuencia de alimentación de siete veces al día (grupos C7 en organismos juveniles y T7 en adultos) en los horarios 0700, 0900, 1100, 1300, 1500, 1700 y 1900 horas. Los parámetros fisicoquímicos del agua de cultivo de ambos bioensayos (se monitorearon con un medidor multiparamétrico (HANNA HI 98194), el cual permitió registrar el oxígeno disuelto (mg/L), pH (0-14) y temperatura (°C). Los niveles de amonio (NH_4) se analizaron mediante colorimetría con un kit de pruebas de amonio (API AMMONIO TEST KIT). Los parámetros se tomaron diariamente tres veces al día, en horarios de 0730, 1430, y 0730 horas.

El alimento proporcionado fue comercial (El Pedregal®) para los juveniles se utilizó tipo mini pellet extruido semiflotante con un aporte nutricional inicial de 45% de proteína (PC), 16% de grasa,

2.50% de fibra, 12% de ceniza y 12 % de humedad, con una tasa inicial alimentaria del 8% de su peso vivo fraccionado según el número de frecuencia diaria por tratamiento, con un cambio para la etapa de engorda a pellet semiflotante con un aporte nutricional de 35% de PC, 5% de grasa, 5% de fibra, 5% de ceniza y 12% de humedad, con una tasa inicial alimentaria del 8% de su peso vivo el cual se fraccionó según el número de frecuencia diaria por tratamiento.

6.1.4 Obtención de material biológico

Al término del bioensayo, se tomaron cinco organismos de tilapia O. niloticus de cada tina y cada jaula, se anestesiaron con eugenol al 3% durante cinco minutos y, al no observar movimientos ni reflejos, se sacrificaron con un bisturí, descerebrando a los peces. Se tomaron muestras de 50 a 100 mg de tejido para el estómago, el hígado, el intestino anterior y el músculo. Se colocaron por separado en tubos de polipropileno de 1.5 ml en solución acuosa sal sulfato (Nolan & Bustin, 2008) y posteriormente se preservaron a 4°C por 18 h y se congelaron a -20°C hasta su transporte al Laboratorio de Genética Acuícola del CIBNOR Unidad La Paz, Baja California Sur.

6.2 Extracción de ARN total y síntesis de ADN complementario (ADNc)

En el Laboratorio de Genética Acuícola del CIBNOR Unidad La Paz, Baja California Sur, se realizó la extracción individual de ARN total de estómago, hígado, intestino anterior y músculo de los cinco organismos juveniles y adultos de tilapia *O. niloticus* de cada replica por tratamiento de los Bioensayos antes descritos.

La extracción se realizó utilizando TriPure Isolation Reagent (Roche Applied Science) siguiendo el procedimiento del proveedor con modificaciones (Anexo I). El ARN se eluyó en 50 µl de H_2O libre de nucleasas. Del volumen total de ARN de cada muestra se eliminó el ADN genómico utilizando de 5 U de RQ1 DNase I (Promega) y 1X de Buffer 5X, y se incubaron a 37 °C por 60 min. Se adicionaron 10 µl de LiCl 4M y 375 µl de etanol absoluto frío. Se mezclaron por inversión y se dejaron precipitando toda la noche a -20°C. Se centrifugaron por 10 min a -4°C a 12,000 rpm y se decantó el sobrenadante. Se lavó el pellet con etanol al 75% por 10 min y se centrifugo por 10 min con las mismas condiciones. Se eliminó el sobrenadante y se centrifugó por 1 min para eliminar el excedente de etanol. Las muestras se eluyeron en 50 µl.

Se cuantificó la concentración del ARN obtenido de cada individuo utilizando el espectrofluorómetro NanoDrop 1000 (ThermoFisher). Se verificó su integridad por medio de electroforesis horizontal de 2 µl de ARN obtenido de cada tejido en un gel de agarosa al 1% con buffer TBE a una concentración de 1X, por 60 min a 70 voltios. Para su visualización en el fotodocumentador-UV (Gel Doc XR+ Gel Documentation System Bio-Rad) se utilizó una tinción fluorescente con GelRed (Biotium) (Fig. 4).

Una vez eliminado el ADN genómico, 1 µl de cada una de las muestras se utilizó para amplificar por PCR punto final el gen de referencia 18S para su confirmación. La reacción de PCR se llevó a cabo utilizando un volumen de reacción de 8 µl la cual contenía 1 µl de ARN, 0.09 U de GoTaq Flexi Polymerasa (Promega), 2.6 de Colorless GoTaq Flexi Buffer (Promega), 0.64 µl de $MgCl_2$ (Promega), 0.16 µl de dNTP mix (Promega), 0.32 µl de primer Forward 18S, 0.32 µl de primer Reverse 18S y 2.87 µl H_2O libre de nucleasas. Las condiciones para la amplificación fueron de 4 min a 94°C seguido de 35 ciclos, cada uno de 30 s a 94°C, 30 s a 60°C y 45 s a 72°C (desnaturalización / alineación / extensión), con una extensión final de 10 min a 72°C. La no-amplificación se analizó mediante electroforesis horizontal en un gel de agarosa al 1% con buffer TBE a una concentración de 1X, por 30 min a 80 voltios, con un marcador de tamaño de 100 a 2,000 pb Low DNAmass. Su visualización se realizó como se menciona anteriormente (Fig. 5).

Una vez verificada cada muestra se utilizó 1 µg de cada ARN total para la síntesis del ADN complementario (ADNc) siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante de la enzima Improm II Reverse Transcriptase (Promega) usando Oligo (dT)18 (Sigma-Aldrich). Una vez sintetizado el ADNc, 1 µl de cada una de las muestras fue utilizado para amplificar por PCR de punto final el gen de referencia 18S para verificar que se haya llevado a cabo la síntesis de ADNc. La reacción de PCR y la visualización de los productos se llevó a cabo como se mencionó anteriormente para la verificación de la eliminación del ADN genómico (Fig. 6).

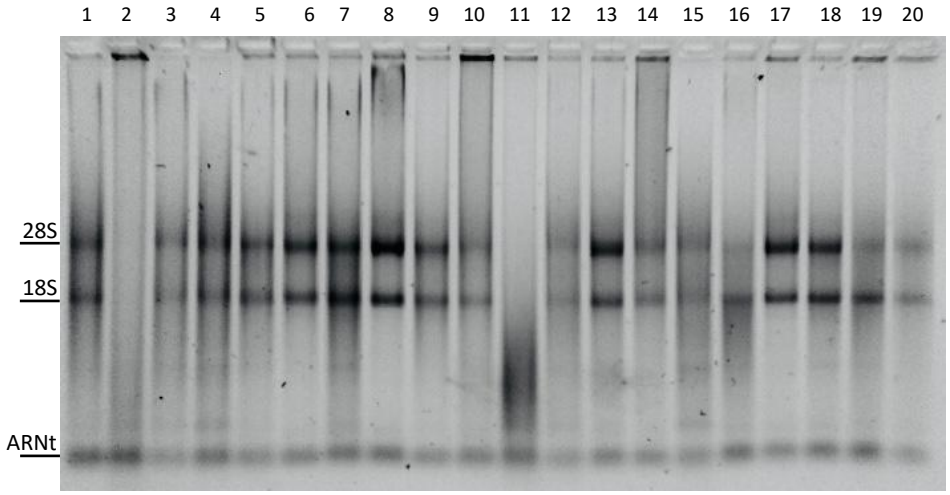


Figura 4. Electroforesis de ARN total de tejidos de bioensayos de expresión génica. Del carril 1 al 5) estómago; 6 al 10) hígado; 11 al 15) intestino anterior y 16 al 20) músculo de *O. niloticus.* En el carril 1 se desglosan las unidades ribosomales. En los carriles 2 y 11 se observa ARN degradado. En el resto de los carriles se observa ARN total integro.

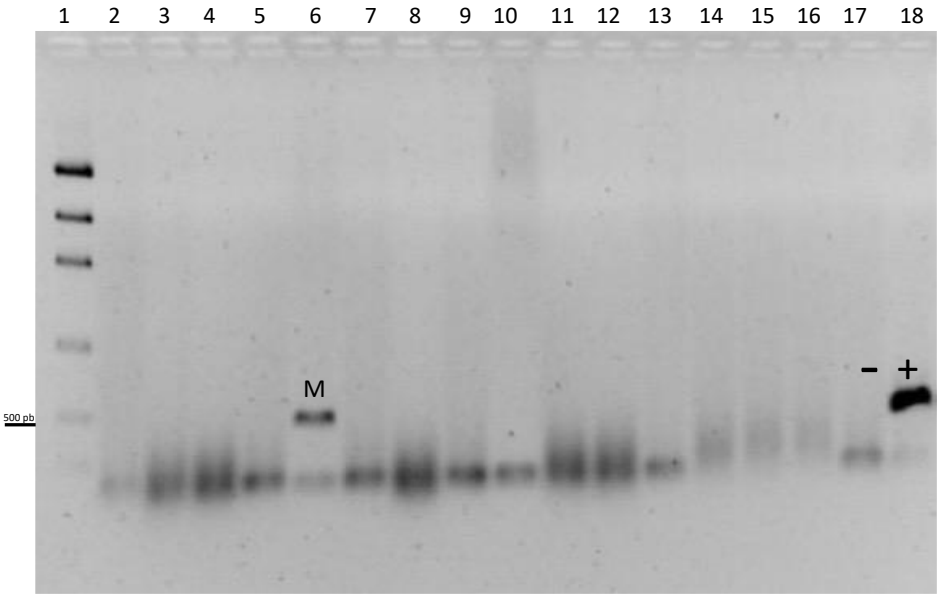


Figura 5. Electroforesis con el gen de referencia 18S. No amplificación de las muestras de tilapia *O. niloticus*. La M indica amplificación de una de las muestras. El signo ¨-¨indica el negativo y el ¨+¨ indica el positivo.

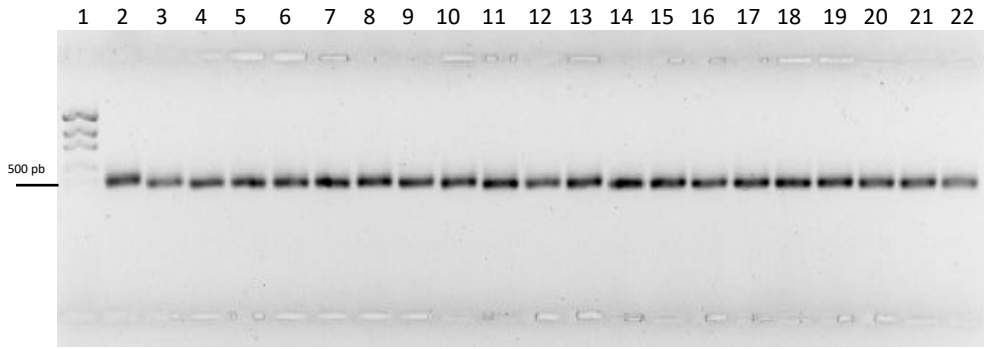


Figura 6. Electroforesis con el gen de referencia 18S para la amplificación de ADNc en 4 tejidos de tilapia *O. niloticus.* El orden de las muestras: carriles del 2 al 6) estómago; 7 al 11) hígado; 12 al 16) intestino anterior y 17 al 21) músculo. En el carril 1) marcador de peso molecular; en el 22) ADNc de estómago como control positivo.

6.3 Amplificación de muestras de ADNc de hígado, estómago, intestino anterior y músculo de juveniles y adultos de tilapia *O. niloticus*

Se determinó la eficiencia de amplificación (E) para cada uno de los genes de referencia y blanco (Tabla 1), calculando la pendiente de diluciones seriadas (1:5) (curvas de eficiencia) realizadas a partir de un pool de todas las muestras en concentraciones equivalentes (1 µg) del ADNc. Los valores de eficiencia (E) fueron obtenidos de la pendiente del logaritmo del factor de dilución contra la fluorescencia, usando la ecuación E= (10(-1/slope) -1) (Bustin *et al.,* 2009).

Las amplificaciones se realizaron por triplicado en un termociclador de tiempo real CFX96 (Bio-Rad), utilizando placas de 96 pozos y filmes adhesivos ópticos (Axygen). Las reacciones se realizaron en un volumen final de 15 µl utilizando 7.5 µl de una mezlca para qPCR previamente descrito (LleraHerrera *et al.,* 2012) que contiene: 1x EvaGreen (Biotium, Hayward, CA), 0.45 U de Go-Taq Flexi Polymerasa (Promega), 1x de Colorless GoTaq Flexi Buffer (Promega), 2.5 mM de MgCl2, 0.2 mM de dNTP mix (Promega) y H_2O grado biología molecular (Sigma); 5 µl de la dilución de ADNc y una concentración de cada cebador de 0.3 µM.

La concentración se adecuó hasta obtener una eficiencia de amplificación (E) mayor a 90 para cada par de cebadores de los genes a evaluar. Se obtuvieron diferentes concentraciones con base en las curvas de eficiencia como se puede observar en la Tabla 1. Las condiciones de amplificación fueron: 10 min a 95 °C, seguido de 34 ciclos de 20s a 95 °C, 20s a (Tm para cada gen, Tabla I) y 20s a 72 °C donde se llevó a cabo la lectura de la fluorescencia (desnaturalización/alineación-extensión). La curva de desnaturalización fue de 60 °C a 95 °C con incrementos de 0.5 °C / seg.

Una vez determinada la eficiencia de cada gen se llevó a cabo la amplificación a partir de una dilución de 1:50 del ADNc de cada muestra de estómago, hígado, intestino anterior y músculo por triplicado. La PCR en tiempo real se llevó a cabo utilizando las mismas condiciones de amplificación ya mencionadas en las curvas de eficiencia en esta misma sección. Los Cq y Ct (Quantitative Cycle y Threshold Cycle por sus siglas en inglés) obtenidos de cada réplica se promediaron y fueron utilizados para calcular la estabilidad en la expresión de cada gen de referencia y el análisis de la expresión de los genes blanco.

6.4 Evaluación de la estabilidad de genes de referencia para la normalización de la expresión de genes de metabolismo y enzimas digestivas

Los genes de referencia evaluados para ser seleccionados de acuerdo con su estabilidad para ser utilizados en la normalización de la expresión de los genes blanco en el presente estudio fueron: beta actina (*act-β*), factor de elongación 1 alfa (*ef1 α*), 18S-ARNr (*18S*) y ubiquitina (*ubi*) (Tabla 1). La estabilidad se calculó utilizando los Cq de cada gen en la página RefFinder (https://www.ciidirsinaloa.com.mx/RefFinder-master/) que usa los algoritmos utilizados por los programas geNorm (Vandesompele *et al.,* 2002), NormFinder (Andersen *et al.,* 2004), Bestkeeper (Pfaffl *et al.,* 2004) y el método de Cq Comparativo (Silver *et al.,* 2006).

Tabla 1. Genes evaluados para la cuantificación de su expresión en estómago, intestino anterior y músculo de juveniles y adultos de tilapia *Oreochromis niloticus.*

Gen	Secuencia Cebadores (5´-3')	Tm (°C)	Conc (µM)	Eficiencia (E)	Referencia
ef1a	F-TCAAGTACGCCTGGGTGTTG R-CGCAGTCAGCCTGAGAGGTA	60	0.3	97.3	Morelos-Castro *et al*., 2020
act-β	F-GGGTATGGGCCAGAAAGACA R-CTCTCCCTGTGGCTGG	60	0.4	105.5	Morelos-Castro *et al*., 2020
18s	F-CTGAACTGGGGCATGATTAAGAG R-GGTATCTGATCGTCTTCGAACCTC	60	0.4	96.2	Morelos-Castro *et al*., 2020
ubi	F-ACGCACACTGTCTGACTAC R-TGTCGCAGTTGTATTTCTGG	60	0.4	95	Srichanun *et al., 2013*
Igf-1	F-CCCGAACTTCCTCGACTTGA R-CCTCAGCCAGACAAGACAAAAA	62	0.4	100.4	Wang *et al*., 2008
gdh	F-GGTTCCAGGACAAGACCTTCGT R-TCTCCGACTCCGACGCACTT	65	0.3	95.8	Xu *et al*., 2022
fas	F-TCATCCAGCAGTTCACTGGCATT R-TGATTAGGTCCACGGCCACA	66	0.4	94.8	Li *et al*., 2020
amy	F- CACTCTTCATGTGGAAGCTGGTTC R- CCATAGTTCTCAATATTGCCACTG	60	0.4	97.4	Modificado de Moguel-Hernández *et al.*, 2016
try	F- ATGAGCTCCACTGCTGACAGGAAC R-AGAGTCACCCTGGCAAGAGTCCTT	60	0.4	98	Morelos-Castro *et al*., 2020

Nota: F= Directo R=Inverso, Tm= Temperatura de Fusión. Conc= Concentración

6.5 Análisis de dispersión de la expresión relativa de los genes α-amilasa (*amy*), tripsina (*try*), sintasa de ácidos grasos (*fas*), factor de crecimiento insulínico-1 (*igf-I*) y glutamato deshidrogenasa (*gdh*)

Para evaluar la variabilidad y distribución de la expresión relativa de los genes a distintas frecuencias de alimentación, se utilizó un análisis de dispersión con el fin de visualizar y analizar la variación en los valores de expresión relativa obtenidos mediante PCR en tiempo real, con el programa STATISTICA 8.0 (StatSoft, Inc.), se realizaron gráficas de dispersión con la finalidad de identificar tendencias y patrones de variabilidad en la expresión relativa, posteriormente se obtuvo una base cuantitativa y visual. Para asegurar la calidad y precisión del análisis de expresión relativa se empleó el ciclo umbral (Threshhold point) como criterio para detectar y excluir datos atípicos en los gráficos de dispersión (Pfaffl, 2001). Los puntos que superaron el umbral predefinido fueron marcados como datos anómalos, dichos datos se excluyeron de los análisis estadísticos posteriores para evitar sesgos en la interpretación de la variabilidad génica.

6.6 Análisis de expresión relativa en estómago, hígado, intestino anterior y músculo de *O. niloticus* ante distintas frecuencias de alimentación

La expresión relativa de los genes *fas*, *igf-I*, *gdh* relacionados con el metabolismo*, amy* y *try* que codifican a enzimas digestivas, se analizaron utilizando los Cq de las muestras de estómago, hígado, intestino anterior y músculo de juveniles y adultos de tilapia *O. niloticus.* Las cantidades relativas (CR) de los genes de referencia (*act-β*, *ef1-α*, *18S*, *ubi* seleccionados por su estabilidad en cada análisis) y de los genes blanco (*fas*, *igf-I*, *gdh*, *amy* y *try*) se estimaron utilizando la ecuación $CR= (1+E)^{(Cq\ promedio-\ Cq)}$. Los valores de expresión relativa (ER) de los genes *fas*, *igf*, *gdh*, *amy* y *try* se calcularon como la proporción de las Cantidades Relativas (CR) de cada muestra con la ecuación ER= CRt/CRnf (t=target gene (gen blanco), y nf=factor de normalización= las CR de genes de referencia más estables) (Hellemans *et al.,* 2007).

6.7 Análisis estadísticos

Los resultados obtenidos de expresión de los genes *amy, try, igf-I, fas y gdh* en tilapia *O. niloticus* del presente trabajo se analizaron utilizando el programa STATISTICA 8.0 (StatSoft, Inc.). Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías, tomando como factores la frecuencia de alimentación y las etapas juvenil y adulto. Las diferencias significativas entre tratamientos se determinaron por medio de prueba de Fisher ($P<0.05$). Los datos de expresión génica fueron transformados a logaritmo natural para corregir la heterocedasticidad, no normalidad y la no-aditividad (Zar, 1999). Posteriormente, los resultados fueron retransformados a su escala original para su representación gráfica.

7. RESULTADOS

7.1 Análisis de la expresión relativa de genes de metabolismo y enzimas digestivas en diferentes tejidos de organismos juveniles y adultos de tilapia *Oreochromis niloticus* bajo distintas frecuencias de alimentación

7.1.1 Estabilidad de genes de referencia para la normalización de los genes *amy*, *try*, *fas*, *igf-I* y *gdh* en los tejidos estómago, hígado, intestino anterior y músculo de juveniles y adultos de tilapia *O. niloticus* alimentados a dos frecuencias de alimentación.

El gen de referencia más estable para la normalización de la expresión de los genes blanco α-amilasa (*amy), tripsina* (*try*)*,* sintasa de acidos grasos (*fas*)*,* factor de crecimiento insulínico-1 (*igf-I-1*) *y* glutamato deshidrogenasa (*gdh*) de *O. niloticus* fue ubiquitina (*ubi*) en los tejidos de hígado, intestino anterior y músculo (Fig. 8a), mientras que el gen de referencia *ef1a* resultó ser el más estable en las muestras de estómago (Fig. 8b). Estos genes considerados los más estables obtuvieron los mejores promedios según el programa *RefFinder*.

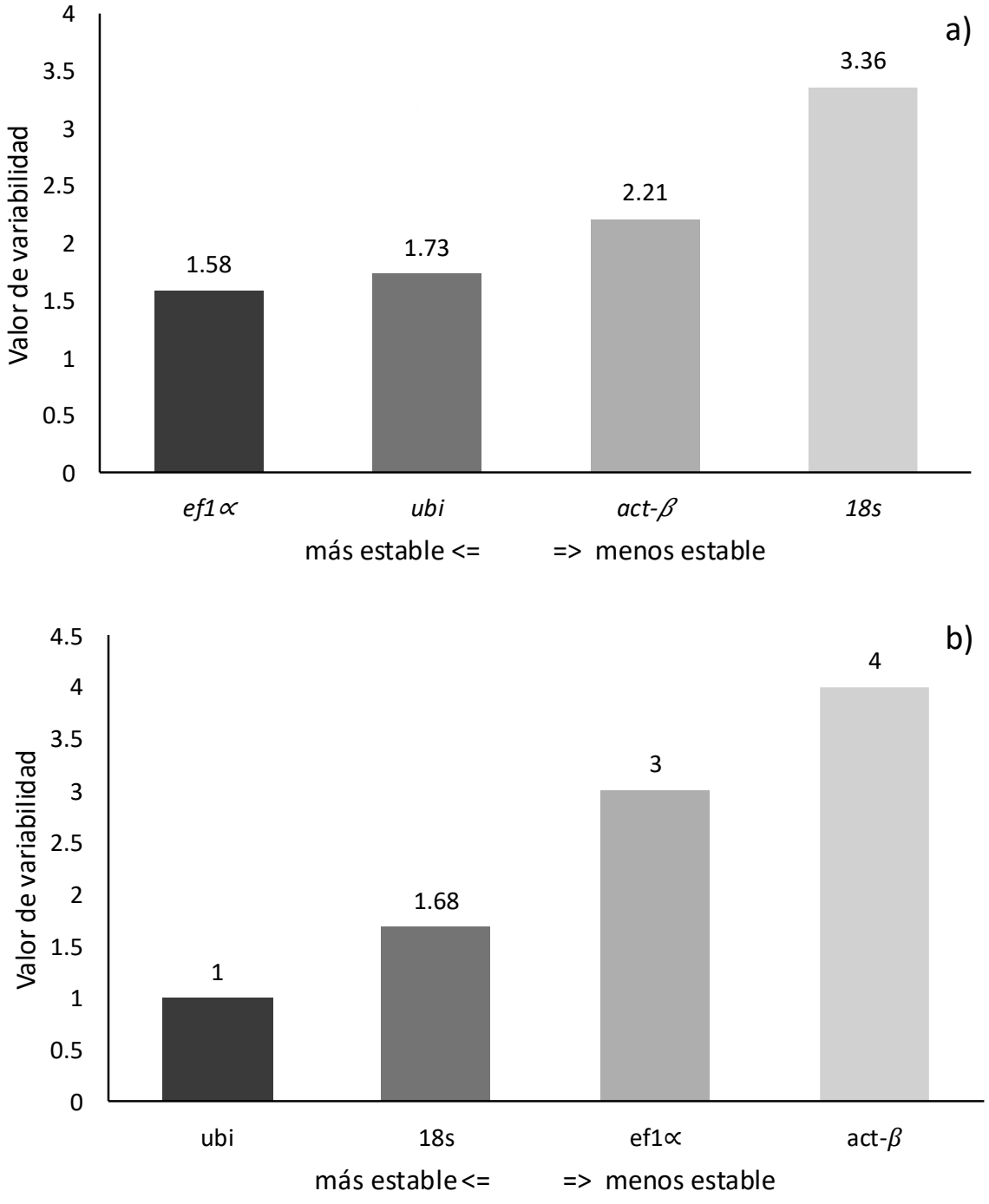


Figura 7. Estabilidad de los genes de referencia estimada con RefFinder con base en los métodos Delta CT, BestKeeper, Normfinder y Genorm. a) El gen más estable (ubi) fue utilizado para la normalización de la cuantificación de la expresión de los genes *gdh*, *igf-I*, *fas*, *amy* y *try* en hígado, intestino anterior y músculo de juveniles y adultos de *O. niloticus*; b) el gen más estable (*ef1a*) fue utilizado para la normalización de la cuantificación de la expresión de los genes gdh, *igf-I*, *fas*, *amy* y *try* en estómago de *O. niloticus.*

7.1.2 Análisis de variabilidad de la expresión relativa de los genes α-amilasa (*amy*), tripsina (*try*), sintasa de ácidos grasos (*fas*), factor de crecimiento insulínico-1 (*igf-I*) y glutamato deshidrogenasa (*gdh*) evaluados en diferentes tejidos de juveniles y adultos de *O. niloticus* bajo dos diferentes frecuencias de alimentación

En el análisis de variabilidad de expresión relativa (ER) del gen *amy* se observó un valor atípico (ER = 126.37) en el estómago de los organismos adultos alimentados tres veces al día (T3) (Fig 8a) y en el intestino anterior (ER =199.71) de los organismos adultos alimentados tres veces al día (T3) (Fig. 8b). En *try* dicho valor atípico se observó en los organismos adultos en el estómago del tratamiento T3 (ER= 2.43133E-06) y T7 (ER=1.82526E-06) (Fig. 9a) y en el intestino anterior (ER=24.77) de los organismos juveniles del tratamiento C3 (Fig. 9b).

Para el gen *fas* evaluado en los tejidos estómago, hígado y músculo se identificaron dos valores atípicos en el estómago de los organismos adultos alimentado siete veces al día (T7) (ER =1.21 y ER=1.51) (Fig. 10 a), por otro lado, en el hígado de organismos adultos del tratamiento T7 se observó un valor atípico (ER =935.63) (Fig 10b) y en el músculo de los organismos adultos del tratamiento T3 (ER=0.004) (Fig 11c). En los resultados de expresión relativa del gen *igf-I* evaluado en los tejidos estómago, hígado y músculo se identificaron valores atípicos en el estómago de organismos adultos del tratamiento T3 (ER =115.70) (Fig. 12a), en el tejido hígado de los organismos adultos del tratamiento T3 (ER =8.38E-08) (Fig 12b) y en el músculo de los organismos adultos de los tratamientos T3 y T7 (ER =1.22, 1.26) (Fig. 12c). Finalmente, para el gen *gdh* evaluado en los estómago, intestino anterior, hígado y músculo se identificaron valores atípicos en el estómago de los organismos adultos del tratamiento T3 (ER = 1.02) (Fig. 14a), en el intestino anterior de los organismos adultos del tratamiento T3 (ER = 27.29) (Fig 14b), así como en el hígado (ER =43.48) y músculo (ER =24.55) del tratamiento de los adultos de tratamiento T3.

Estos valores exceden el limite superior establecido por la media más tres desviaciones estándar (*amy* (ES) ER=88.06; *amy* (IA) ER=131.35 ; *try* (ES) ER=1.6793E-06; *try* (IA) =14.68; *fas* (ES) ER=1.93; *fas* (HI) ER=486.94; *fas* (MU) ER=0.003; *igf-I* (ES) ER=69.70; *igf-I* (HI) ER=7.13719E-08; *igf-I* (MU) ER=1.14; *gdh*(ES) ER= 6732.35; *gdh*(IA) ER=29.43; *gdh*(HI) ER=22.24; *gdh*(MU) ER=19.74) (Hellemans *et al.,* 2007) y fueron considerados puntos fuera de la tendencia de los datos. La eliminación de esto valores atípicos afirma que los resultados obtenidos son viables para obtener conclusiones válidas.

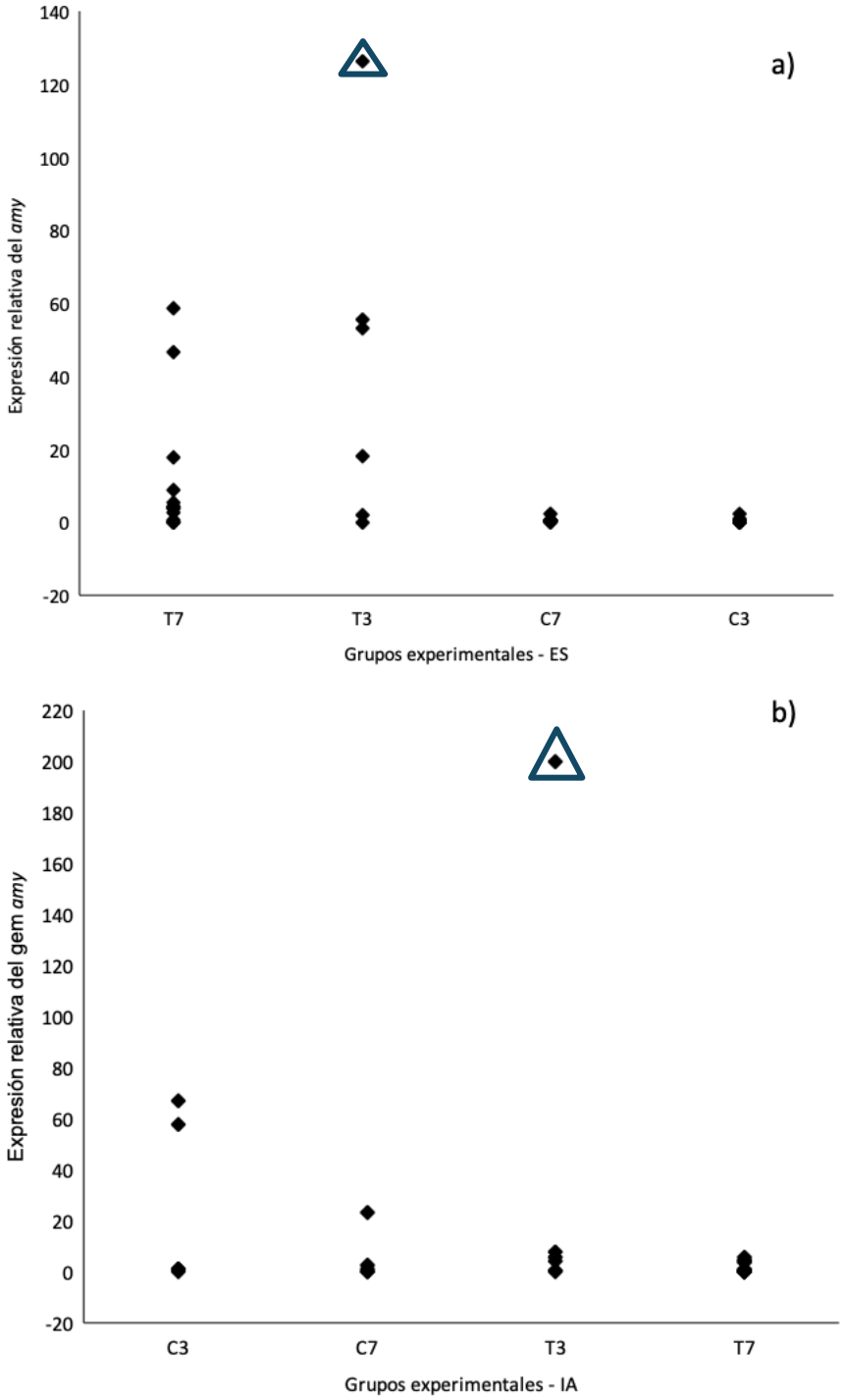


Figura 8. Dispersión de la expresión relativa del gen α-amilasa (*amy),* en a) estómago y b) intestino anterior en organismos juveniles (C3 y C7) y adultos (T3 y T7) de tilapia *O. niloticus*. Los triángulos indican datos anómalos que se encuentran fuera de la media + tres desviaciones estándar.

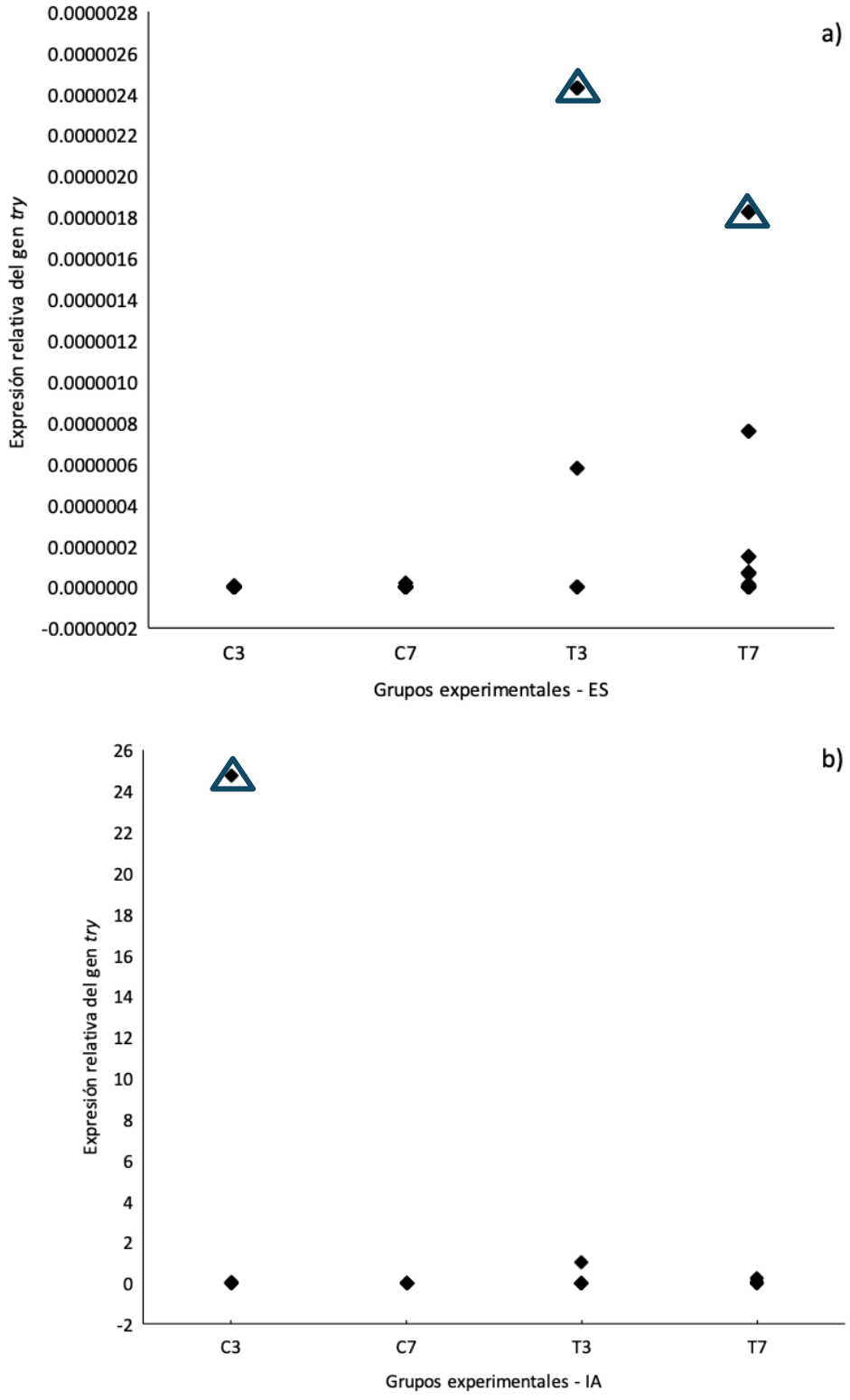


Figura 9. Dispersión de la expresión relativa del gen tripsina (*try)*, en a) estómago y b) intestino anterior en organismos juveniles (C3 y C7) y adultos (T3 y T7) de tilapia *O. niloticus*. Los triángulos indican datos anómalos que se encuentran fuera de la media + tres desviaciones estándar.

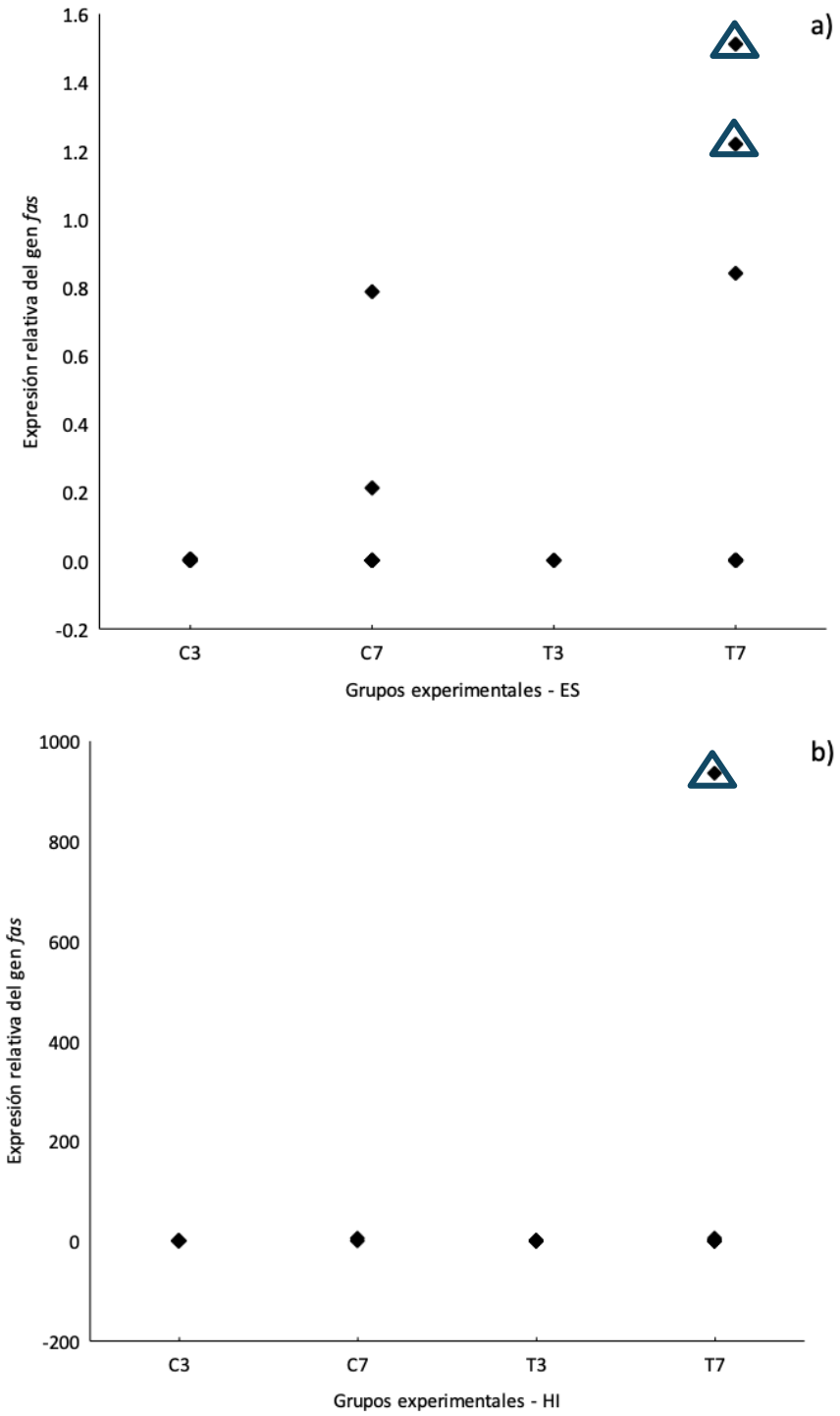


Figura 10. Dispersión de la expresión relativa del gen sintasa de ácidos grasos (*fas),* en a) estómago y b) hígado en organismos juveniles (C3 y C7) y adultos (T3 y T7) de tilapia *O. niloticus*. Los triángulos indican datos anómalos que se encuentran fuera de la media + tres desviaciones estándar.

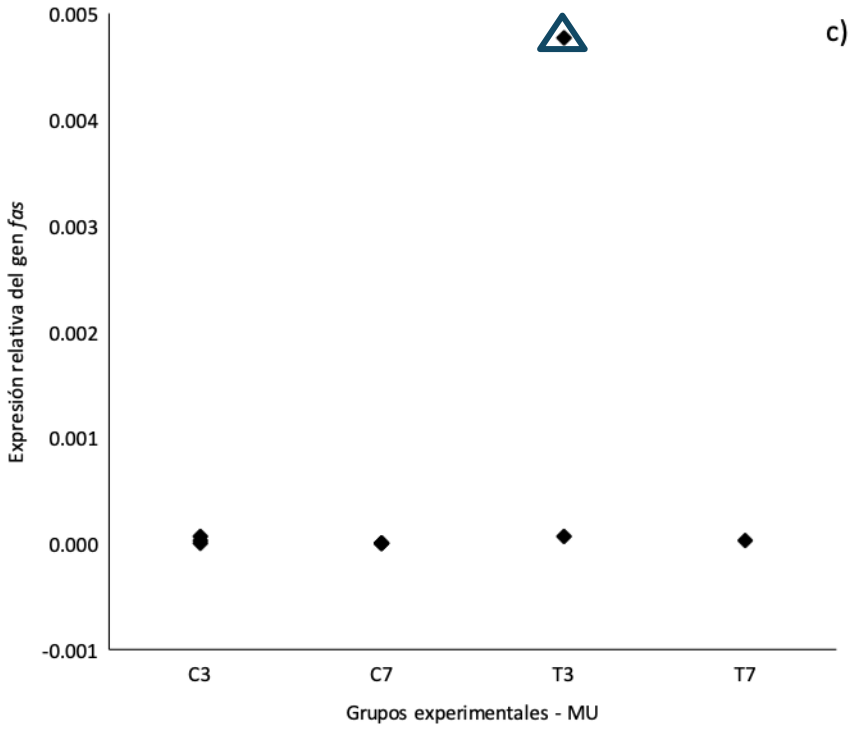


Figura 11. Dispersión de la expresión relativa del gen sintasa de ácidos grasos (*fas)*, en c) músculo en organismos juveniles (C3 y C7) y adultos (T3 y T7) de tilapia *O. niloticus*. Los triángulos indican datos anómalos que se encuentran fuera de la media + tres desviaciones estándar.

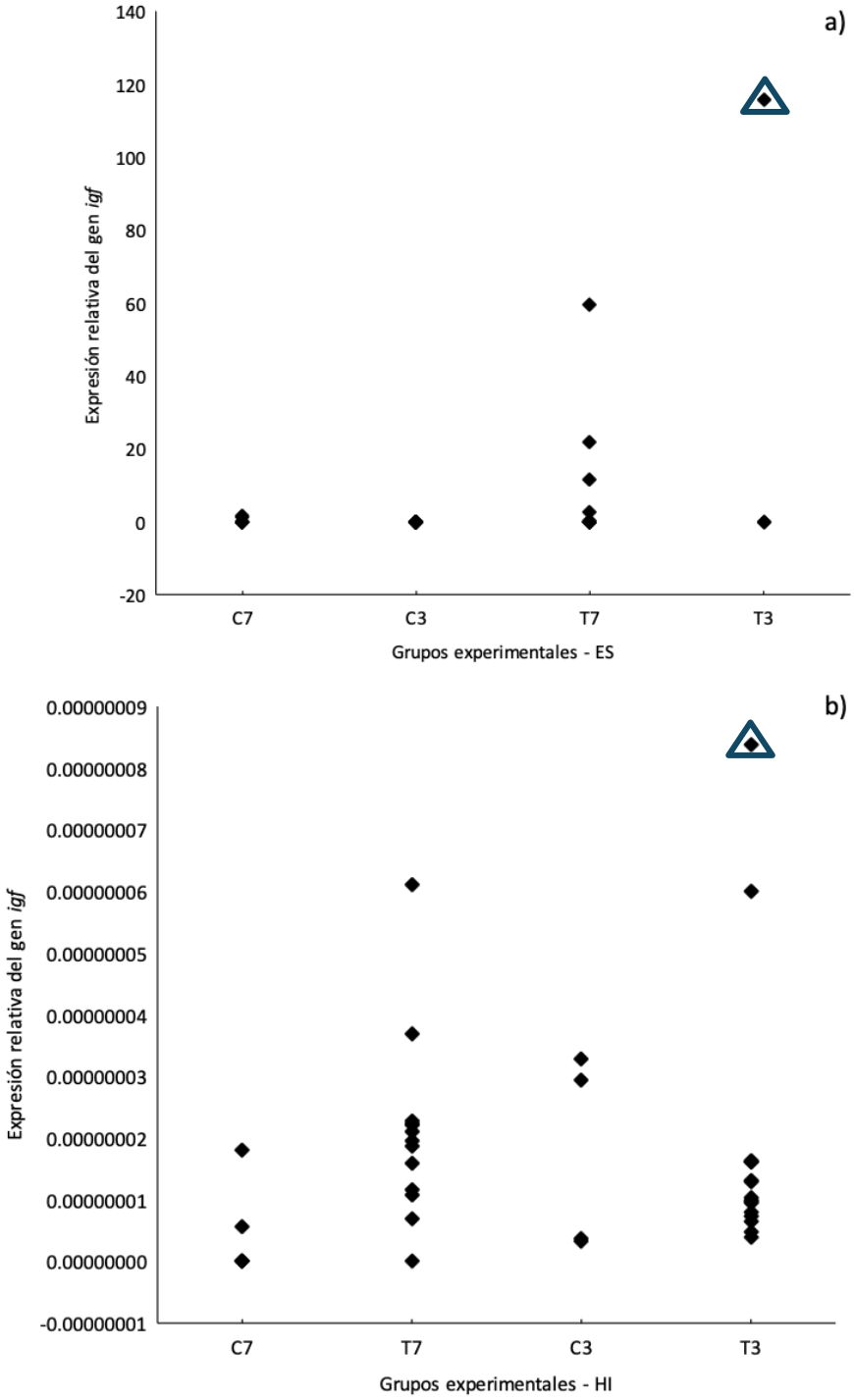


Figura 12. Dispersión de la expresión relativa del gen factor de crecimiento insulínico-1 (*igf-I)*, en a) estómago y b) hígado en organismos juveniles (C3 y C7) y adultos (T3 y T7) de tilapia *O. niloticus*. Los triángulos indican datos anómalos que se encuentran fuera de la media + tres desviaciones estándar.

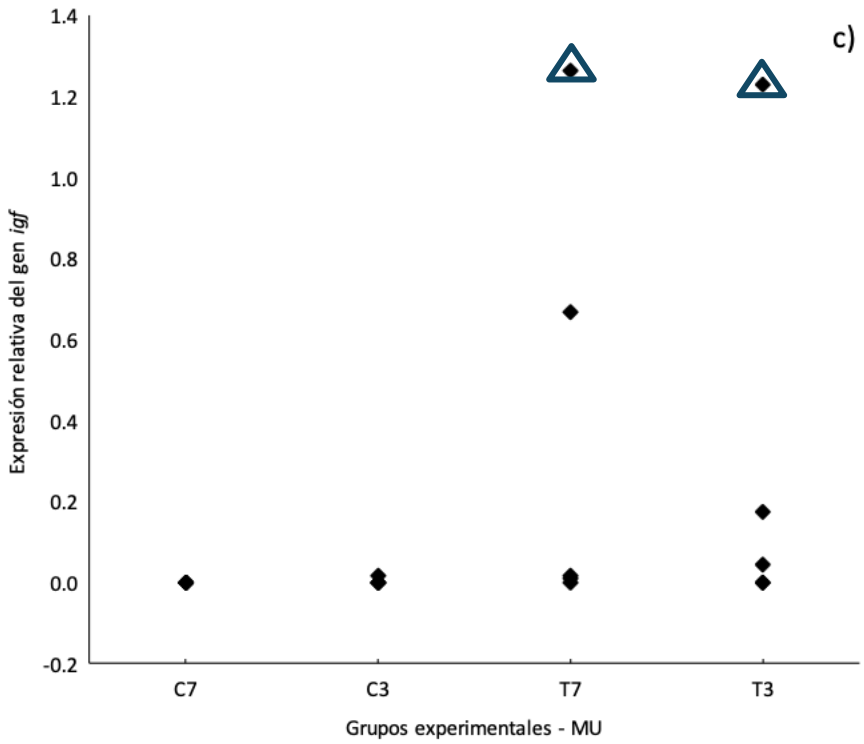


Figura 13. Dispersión de la expresión relativa del gen factor de crecimiento insulínico-1 (*igf-I),* en c) músculo en organismos juveniles (C3 y C7) y adultos (T3 y T7) de tilapia *O. niloticus*. Los triángulos indican datos anómalos que se encuentran fuera de la media + tres desviaciones estándar.

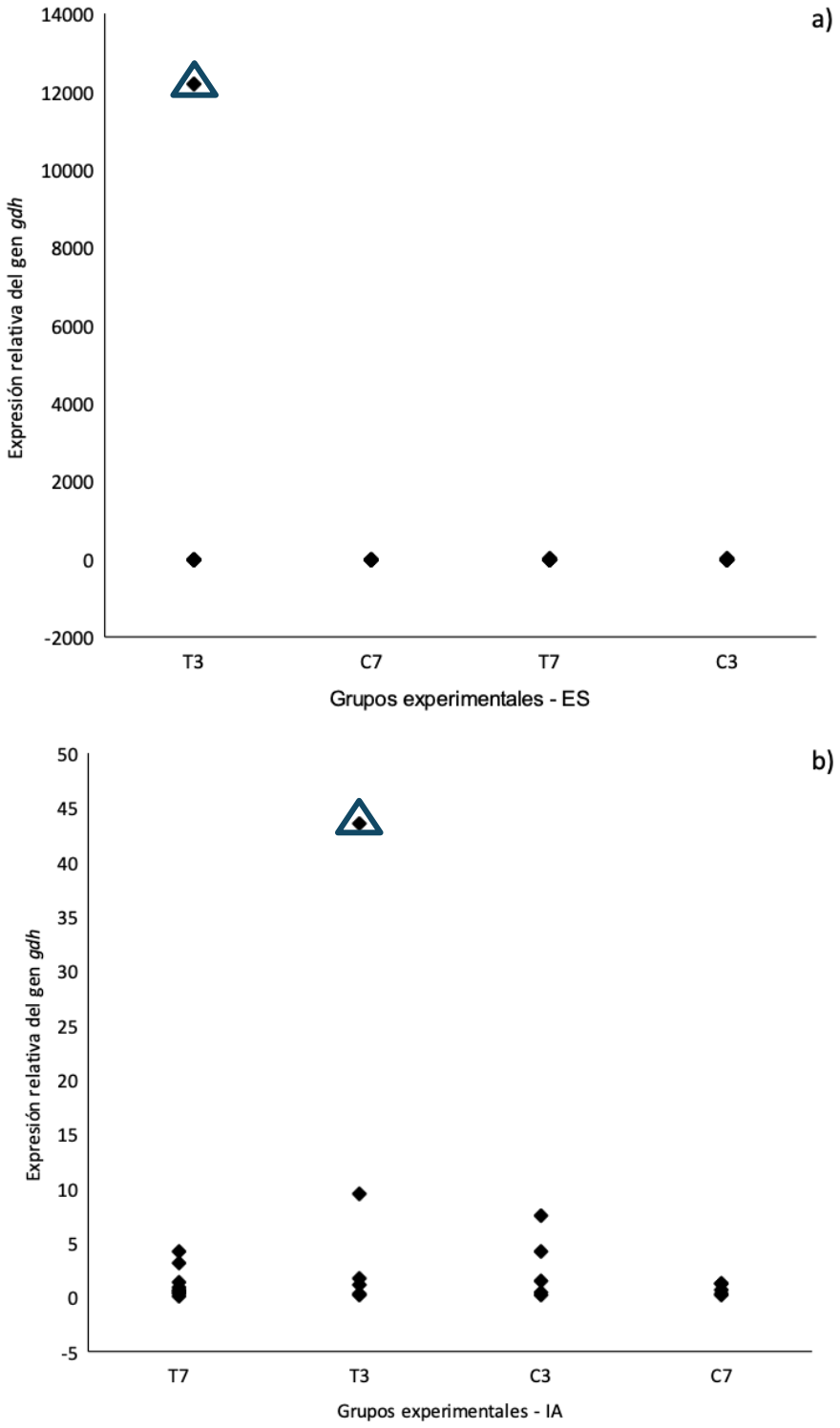


Figura 14. Dispersión de la expresión relativa del gen glutamato deshidrogenasa (*gdh),* en a) estómago y b) hígado en organismos juveniles (C3 y C7) y adultos (T3 y T7) de tilapia *O. niloticus*. Los triángulos indican datos anómalos que se encuentran fuera de la media + tres desviaciones estándar.

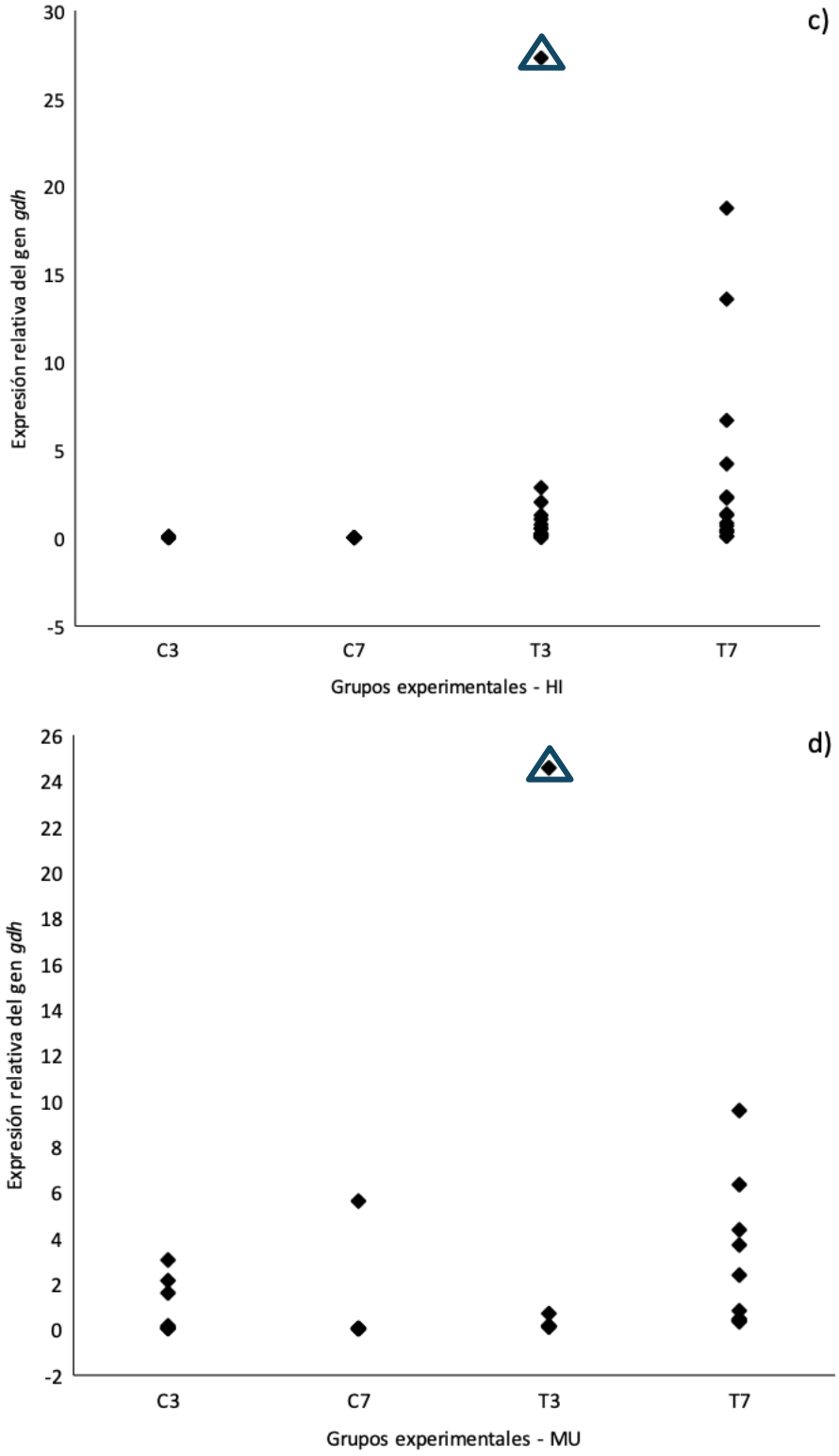


Figura 15. Dispersión de la expresión relativa del gen glutamato deshidrogenasa (*gdh),* en c) hígado y d) músculo en organismos juveniles (C3 y C7) y adultos (T3 y T7) de tilapia *O. niloticus.* Los triángulos indican datos anómalos que se encuentran fuera de la media + tres desviaciones estándar.

7.2 Análisis de expresión relativa de genes que codifican enzimas digestivas y genes involucrados en el metabolismo de *O. Niloticus*

7.2.1 Análisis de expresión relativa de los genes *amy* y *try* en estómago e intestino anterior de juveniles y adultos de *O. niloticus* bajo distintas frecuencias de alimentación

La expresión relativa del gen α-amilasa (*amy*) (Fig. 16) en el estómago (ES) fue significativamente diferente ($P < 0.05$) entre juveniles (C3 y C7) y adultos (T3 y T7) (Fig. 16 a). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas ($P > 0.05$) entre los tratamientos (alimentación 3 y 7 veces al día) en cada etapa. La mayor expresión de *amy* en el estómago fue en los organismos adultos, siendo el grupo T3 el que presentó la mayor expresión (ER=58.61$\pm$25.55), mientras que la menor se observó en los juveniles, principalmente en el grupo C3 (ER=0.04$\pm$25.55). Por otro lado, en el intestino anterior (IA) (Fig. 16b) la expresión relativa de *amy* no presentó diferencias significativas ($P > 0.05$) en ninguna de las etapas ni tratamientos. La mayor expresión de *amy* en el intestino anterior (IA) fue en los juveniles alimentados tres veces al día C3 (ER=67.16$\pm$39.24) y la menor expresión se observó en los adultos alimentados siete veces al día (T7) (ER=0.002$\pm$39.24).

El gen tripsina (*try*) (Fig. 17) mostró diferencias significativas ($P < 0.05$) en el estómago (ES) (Fig. 10a) de los organismos juveniles alimentados tres y siete veces al día (C3(ES) ER=1.37138E-09$\pm$5.0E-07; C7(ES) ER=2.25051E-09$\pm$5.06E-07) con el estómago de los organismos adultos alimentados tres veces al día (T3 (ES) ER=1.1535E-07$\pm$5.06E-07)) , también se observaron diferencias significativas ($P<0.05$) en el estómago del tratamiento C7 con los tratamientos T3 (ER=1.1535E-07$\pm$5.06E-07) y T7 (8.08514E-08$\pm$5.06E-07). La mayor expresión de *try* en el estómago fue en los organismos adultos, siendo el grupo T7 el que presentó la mayor expresión (ER=7.5766E-07$\pm$5.06 E-07), mientras que la menor se observó en los juveniles, principalmente en el grupo C3 (ER=4.05782E-11$\pm$5.0649E-07). En el intestino anterior (IA) (Fig. 17b), la expresión relativa de *try* no mostró diferencias significativas en ninguna de las etapas ni tratamientos. La mayor expresión de *try* en el intestino anterior (IA) fue en los adultos del grupo T3 (ER=1.003$\pm$4.59) y la menor expresión se observó en los adultos alimentados siete veces al día (T7) (ER=0.00$\pm$4.59).

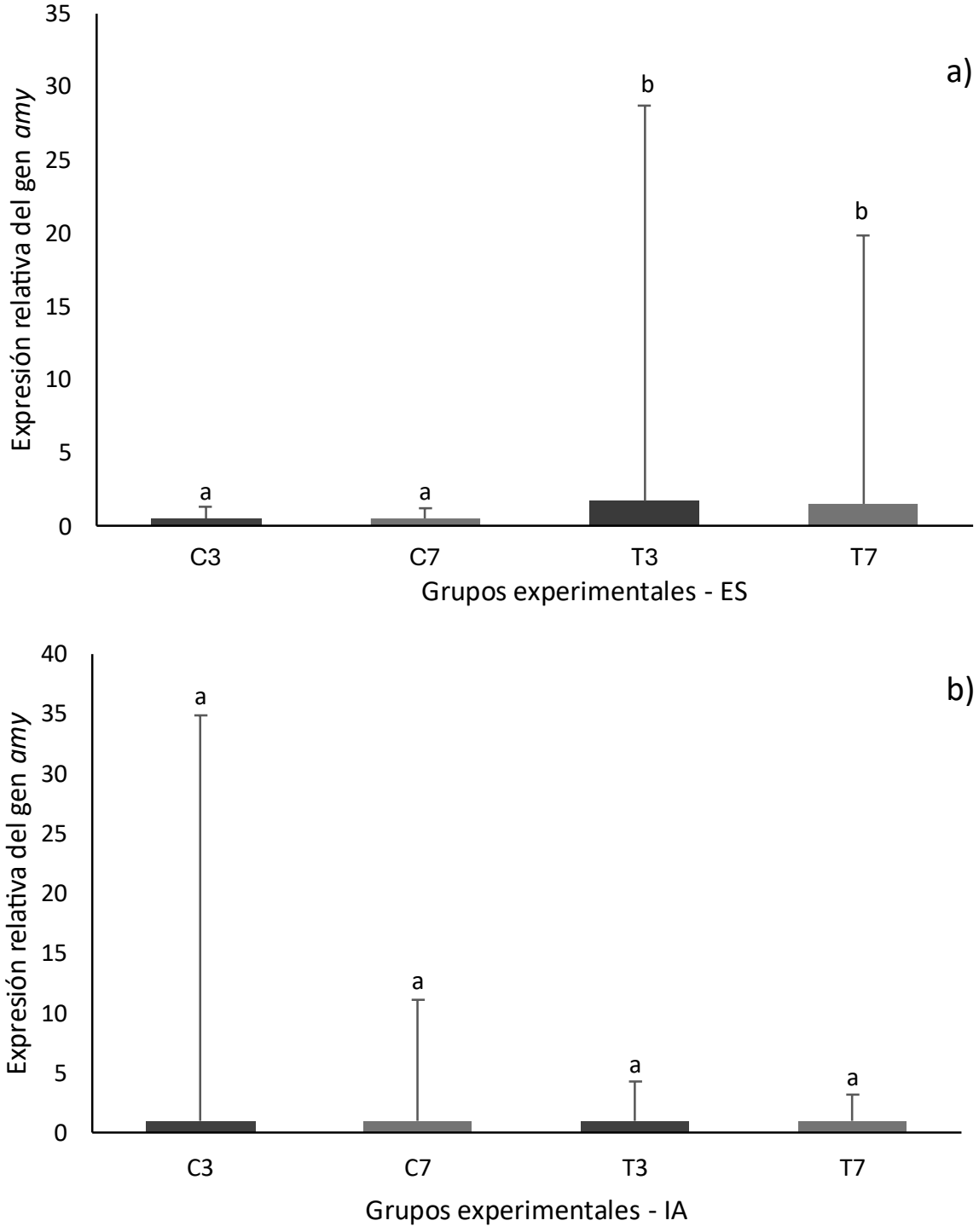


Figura 16. Expresión relativa del gen α-amilasa (*amy*), en a) estómago (ES) y b) intestino anterior (IA) de organismos de tilapia *O. niloticus* juveniles (C3 y C7) y adultos (T3 y T7). Las barras indican los valores promedio y las líneas verticales en cada uno la desviación estándar. Letras diferentes sobre las columnas indican diferencias significativas (P<0.05).

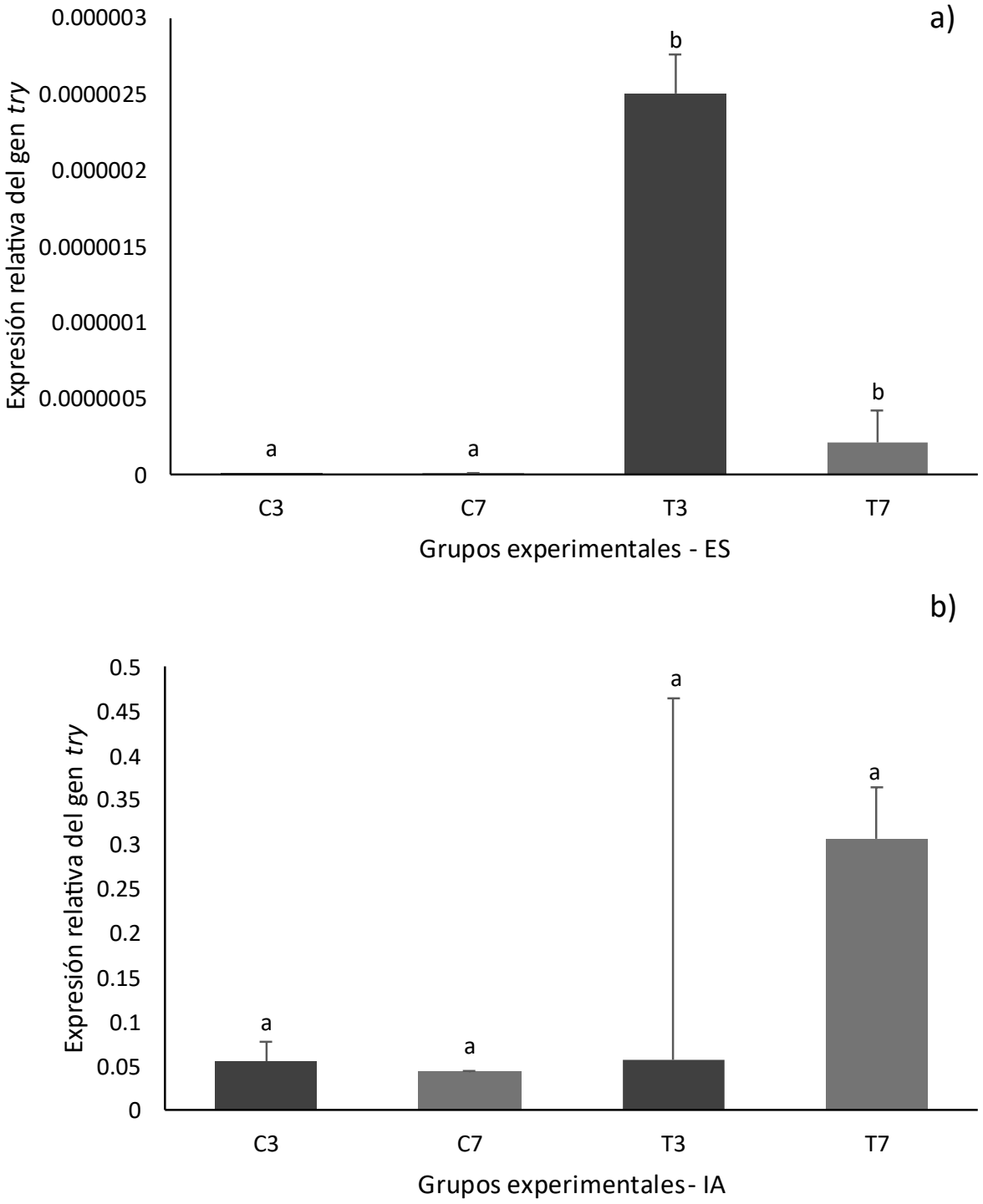


Figura 17. Expresión relativa del gen tripsina (*try*), en a) estómago (ES) y b) intestino anterior (IA) de organismos de tilapia *O. niloticus* juveniles (C3 y C7) y adultos (T3 y T7). Las barras indican los valores promedio y las líneas verticales en cada uno la desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas (P<0.05).

7.2.2 Análisis de expresión relativa de los genes sintasa de ácidos grasos (*fas*), factor de crecimiento insulínico-1 (*igf-I*) y glutamato deshidrogenasa (*gdh)* en estómago, hígado y músculo de juveniles y adultos *O. niloticus* ante distintas frecuencias de alimentación

La expresión relativa del gen *fas* en el estómago (ES) (Fig. 18 a) mostró diferencias significativas (P<0.05) entre los organismos juveniles alimentados tres veces al día (C3) (ER=0.001077449±0.35) y los organismos adultos alimentados siete veces al día (T7) (ER=0.070345373±0.35). En el hígado (HI) (Fig. 18 b) la expresión relativa de *fas* presentó diferencias significativas (P<0.05) en los organismos juveniles alimentados siete veces al día (C7) (ER=1.08163±1.2785) respecto a los tratamientos C3 (ER=0.1359±1.2785), T3 (ER=0.0397±1.2785) y T7 (ER=0.5183±1.2785) (Fig. 18 b). En la expresión relativa de *fas* en el músculo (MU) (Fig. 19c) se observaron diferencias significativas (P<0.05) entre etapas, es decir, entre los juveniles de los tratamientos C3 (ER=2.2987E-05±0.0009) y C7 (ER=5.5393E-06±0.0009) con los organismos adultos de los tratamientos T3 (ER=1.0700E-05±0.0009) y T7 (ER=4.0782E-06±0.0009) donde se observó una baja expresión relativa.

La mayor expresión de *fas* en el estómago (ES) fue en los adultos del grupo T7 (ER=0.84±0.35) y la menor expresión se observó en los juveniles del grupo C3 (ER=3.22413E-05±0.35).La mayor expresión de *fas* en el hígado (HI) fue en los juveniles del grupo C7 (ER=114.55±1.2785) y la menor expresión se observó en los juveniles del grupo C7 (ER=0.00±1.2785).La mayor expresión de *fas* en el músculo (MU) fue en los juveniles alimentados tres veces al día C3 (ER=6.516E-05±0.0009) y la menor expresión se observó en los juveniles del grupo C3 (ER=0.00±0.0009).

La expresión relativa del gen *igf-I* en el estómago (ES) (Fig. 20a) mostró diferencias significativas (P<0.05) entre los organismos juveniles alimentados tres veces al día (C3) con los organismos adultos alimentados tres y siete veces al día (T3 y T7) también se observaron diferencias significativas (P<0.05) entre el estómago de los organismos del tratamiento T7 (ER=6. 8661±10.5771) con los organismos de los tratamientos C3 (ER=0.003±10.5771) y C7 (ER=5.835E-07±10.5771). En el hígado (HI) (Fig. 20b) no se observaron diferencias significativas (P>0.05) entre etapas ni tratamientos. En el músculo (MU) (Fig. 21c) se observaron diferencias significativas (P<0.05) entre los juveniles de los tratamientos C3 (ER=0.0038±0.1334) y C7 (ER=2.6385E-06±0.1334) con los adultos de los tratamientos T3 (ER=0.0240±0.1334) y T7 (ER=0768±0.1334).

La mayor expresión de *igf-I* en el estómago (ES) fue en los adultos del grupo T7 (ER=59.67±10.5771) y la menor expresión se observó en los adultos del grupo T3 (ER=0±1.2951E-08).La mayor expresión de *igf-I* en el hígado (HI) fue en los juveniles del grupo C7 (ER=3.5984E-09±1.2951E-08) y la menor expresión se observó en los adultos del grupo T7 (ER=1.6356E-08± 1.2951E-08). La mayor expresión de *igf-I* en el músculo (MU) fue en los adultos del grupo T7 (ER=0.076± 0.1334) y la menor expresión se observó en los juveniles del grupo C3 (ER=09.0038±0.1334).

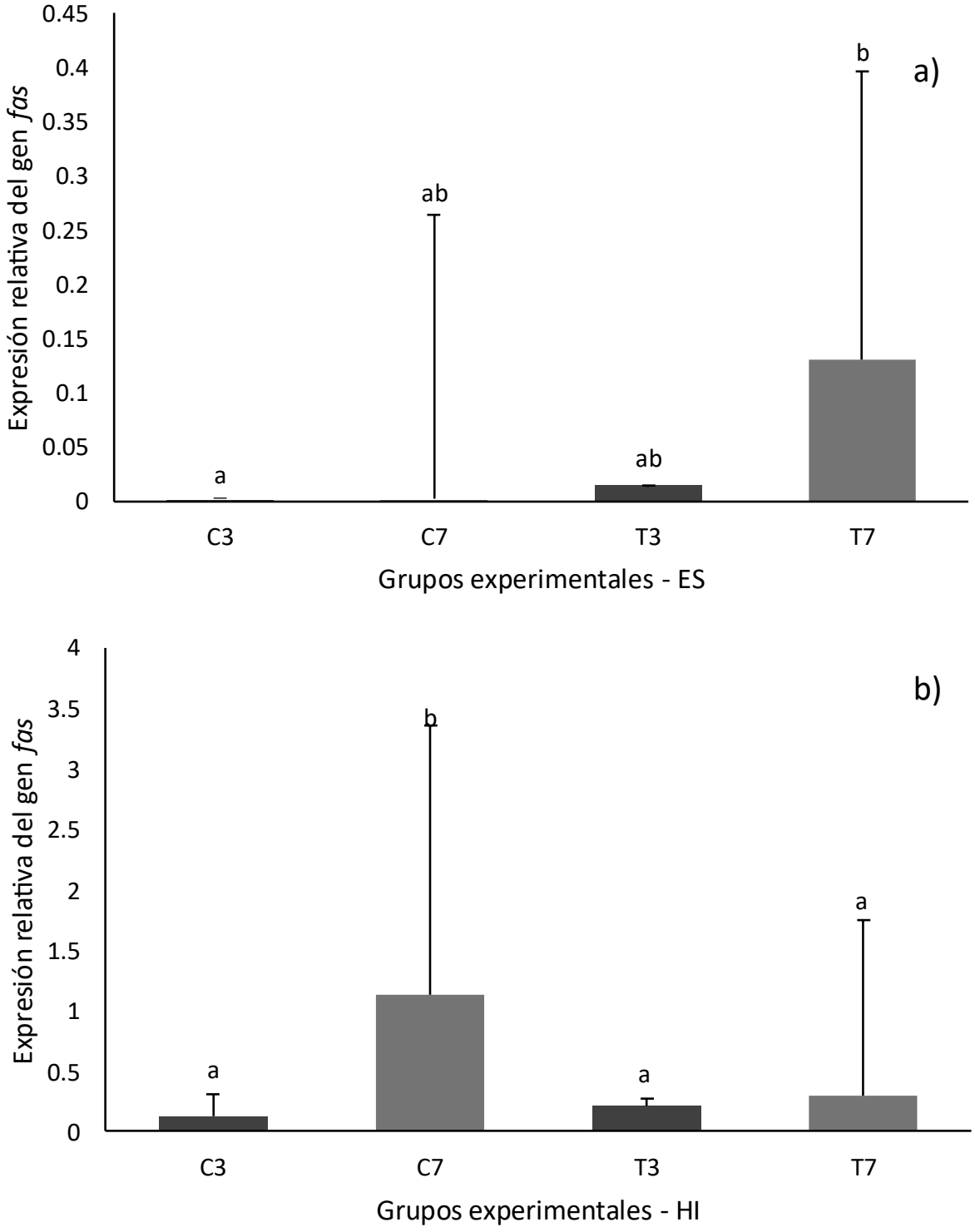


Figura 18. Expresión relativa del gen sintasa de ácidos grasos (*fas),* en a) estómago (ES) y b) hígado (HI) de organismos juveniles (C3 y C7) y adultos (T3 y T7) de tilapia *O. niloticus*. Las barras indican los valores promedio y las líneas verticales en cada uno la desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas (P<0.05).

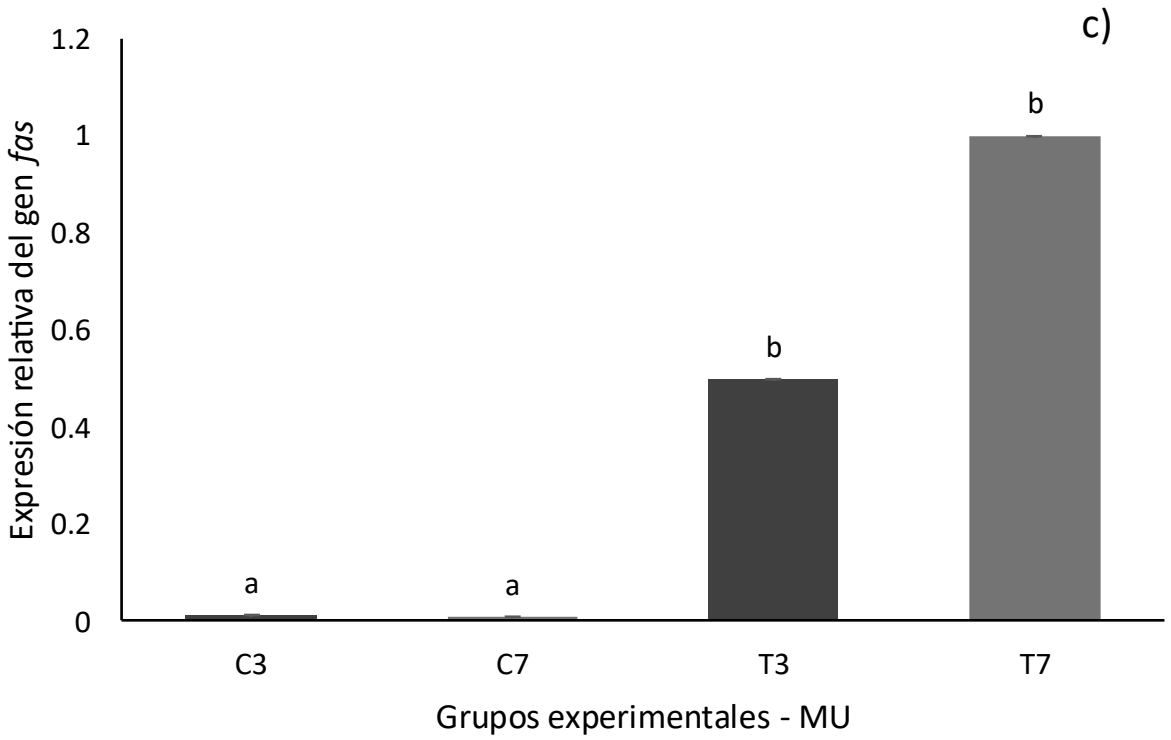


Figura 19. Expresión relativa del gen sintasa de ácidos grasos (*fas),* en músculo (MU) de organismos juveniles (C3 y C7) y adultos (T3 y T7) de tilapia *O. niloticus*. Las barras indican los valores promedio y las líneas verticales en cada uno la desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas (P<0.05).

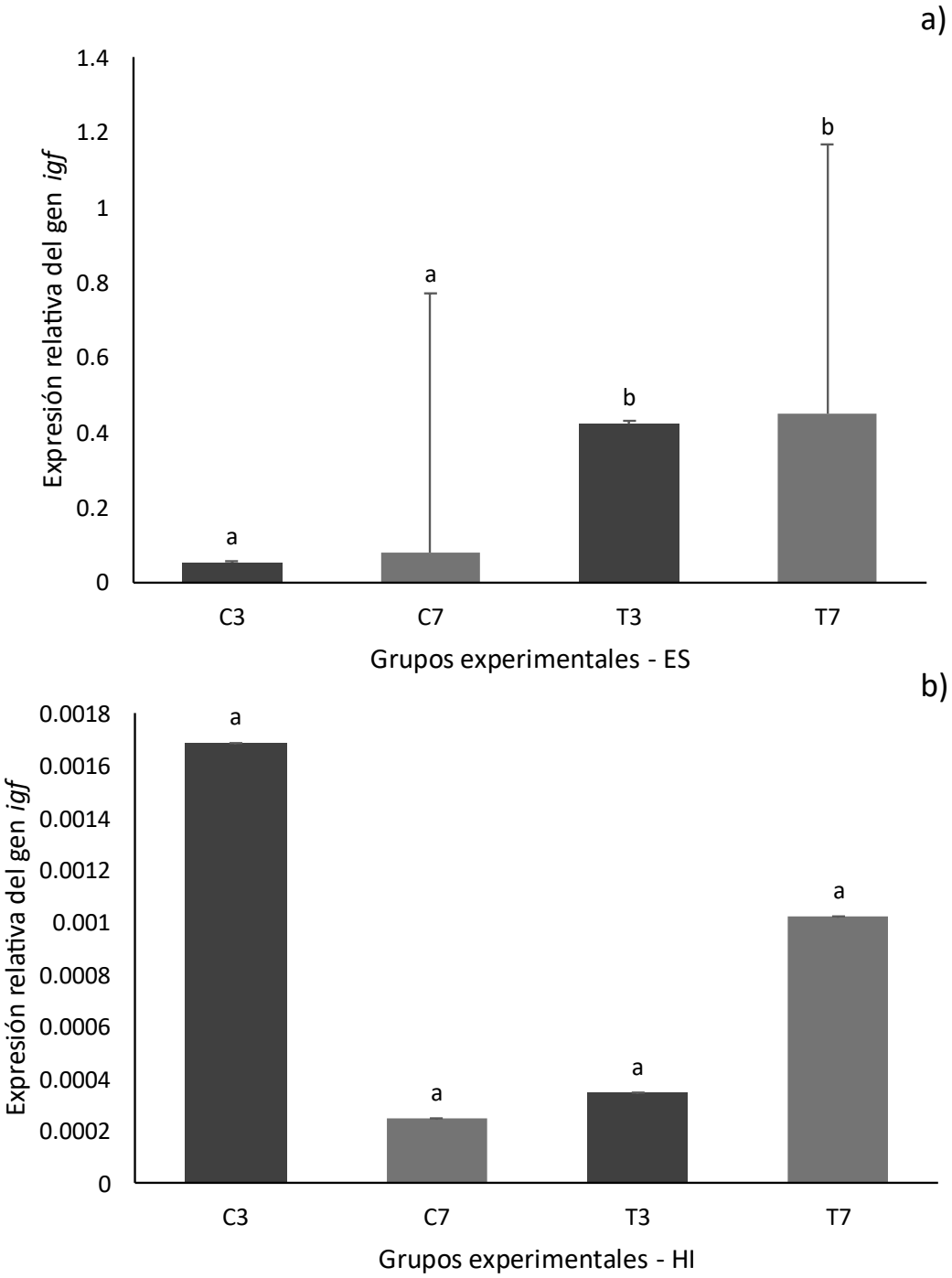


Figura 20. Expresión relativa de factor de crecimiento insulínico-1 (*igf-I),* en a) estómago (ES) y b) hígado (HI) de organismos juveniles (C3 y C7) y adultos (T3 y T7) de tilapia *O. niloticus*. Las barras indican los valores promedio y las líneas verticales en cada uno la desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas (P<0.05).

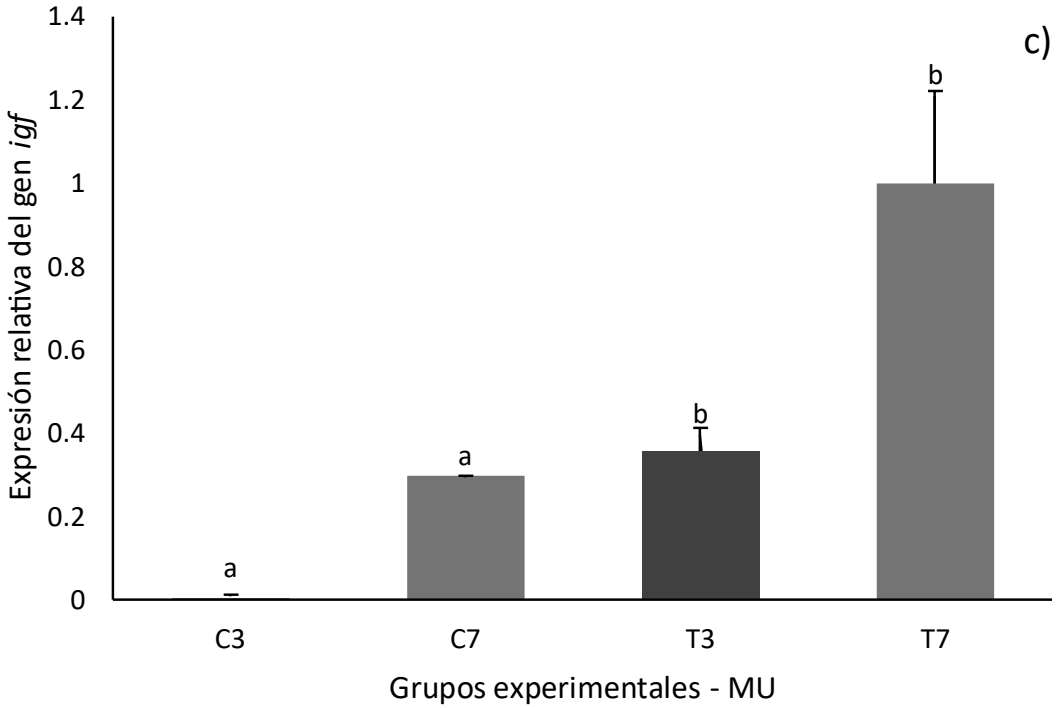


Figura 21. Expresión relativa de factor de crecimiento insulínico-1 (*igf-I)* en músculo (MU) de organismos juveniles (C3 y C7) y adultos (T3 y T7) de tilapia *O. niloticus*. Las barras indican los valores promedio y las líneas verticales en cada uno la desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas (P<0.05).

7.2.3 Análisis de expresión relativa del gen *gdh* (glutamato deshidrogenasa) en estómago, intestino anterior, hígado y músculo de juveniles y adultos *O. niloticus* ante distintas frecuencias de alimentación

La expresión relativa del gen *gdh* en el estómago (ES) (Fig. 22a) no mostró diferencias significativas ($P>0.05$) entre etapas ni tratamientos. En el intestino anterior (IA) (Fig. 22b) la expresión relativa de *gdh* tampoco presentó diferencias significativas ($P>0.05$) en las etapas (juveniles y adultos) ni los tratamientos (frecuencias de alimentación de tres y siete veces al día).

En el hígado (HI) (Fig. 23c) la expresión relativa de *gdh* presentó diferencias significativas ($P<0.05$) en las dos etapas evaluadas y en en los dos tratamientos, C3 con C7, T3 y T7. En la expresión relativa de *gdh* en el músculo (MU) (Fig. 23d) mostro diferencias significativas entre el tratamiento C7 y T7. La mayor expresión de *gdh* en el estómago (ES) fue en los juveniles del grupo C3 (ER=16.72$\pm$2120.48) y la menor expresión se observó en los adultos del grupo T3 (ER=0.005$\pm$2120.48).

La mayor expresión de *gdh* en el intestino anterior (IA) fue en los adultos del grupo T3 (9.50$\pm$8.67) y la menor expresión se observó en los adultos del grupo T7 (ER=0.10$\pm$8.67). La mayor expresión de *gdh* en el hígado (HI) fue en los adultos del grupo T7 (ER=18.79$\pm$6.33) y la menor expresión se observó en los juveniles del grupo C3 (ER=0.006$\pm$6.33).La mayor expresión de *gdh* en el músculo (MU) fue en los adultos del grupo T7 (ER=9.58$\pm$5.51) y la menor expresión se observó en los juveniles del grupo C3 (ER=0.03$\pm$5.51).

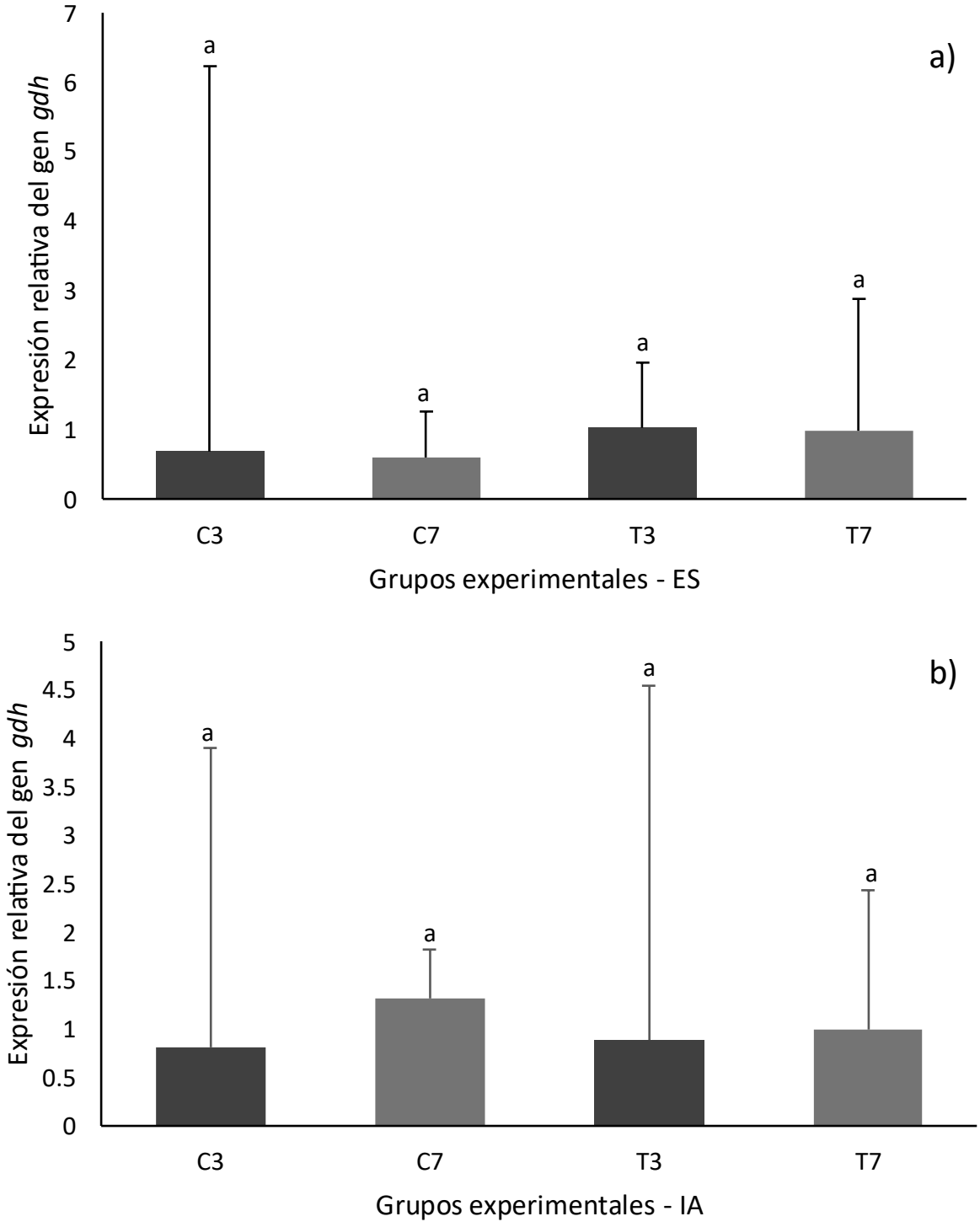


Figura 22. Expresión relativa del gen glutamato deshidrogenasa (*gdh)*, en a) estómago (ES) y b) intestino anterior (IA) de organismos juveniles (C3 y C7) y adultos (T3 y T7) de tilapia *O. niloticus.* Las barras indican los valores promedio y las líneas verticales en cada uno la desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas (P<0.05).

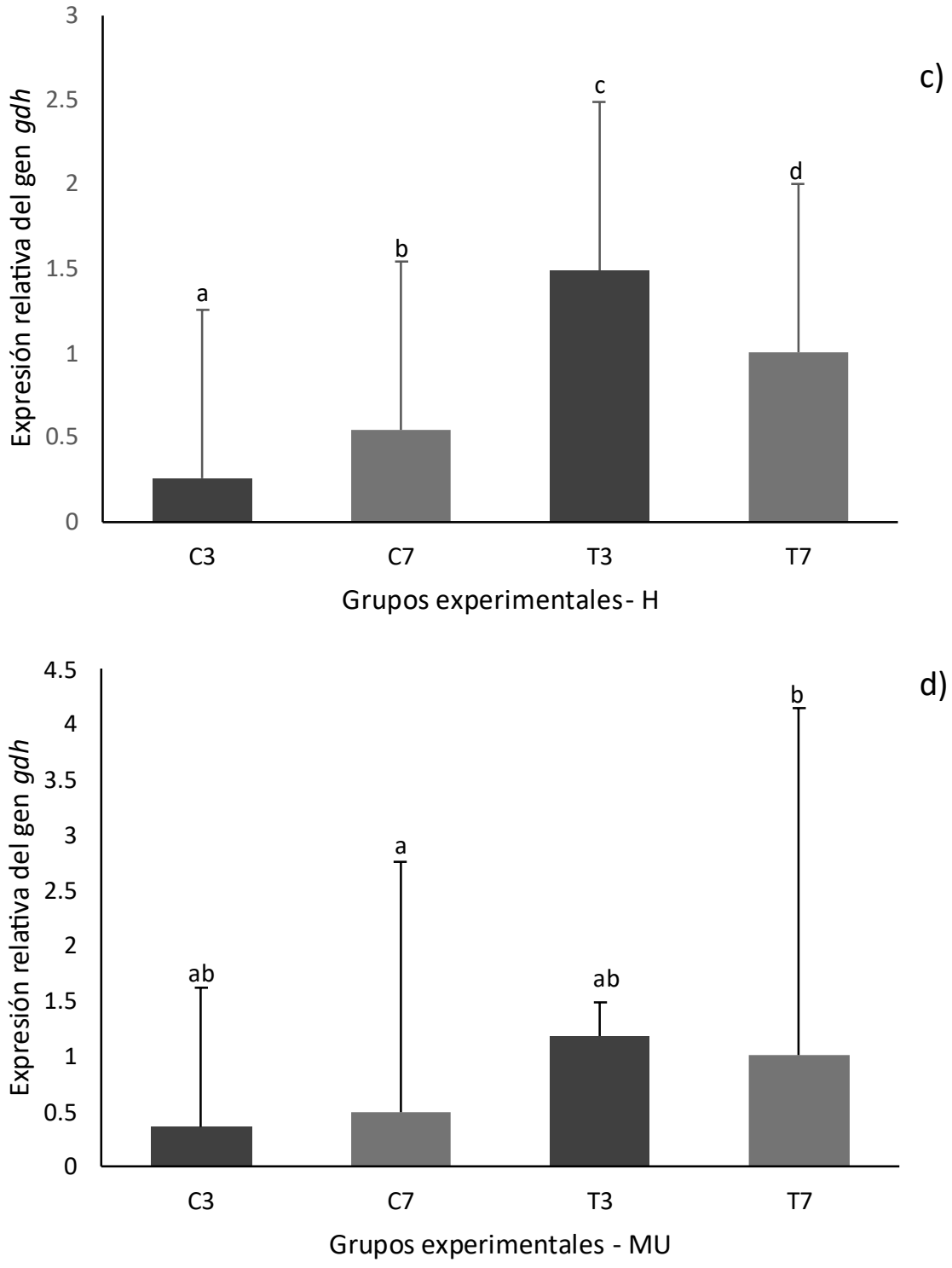


Figura 23. Expresión relativa del gen glutamato deshidrogenasa (*gdh),* en c) intestino anterior (IA) y d) músculo (MU) de organismos juveniles (C3 y C7) y adultos (T3 y T7) de tilapia *O. niloticus.* Las barras indican los valores promedio y las líneas verticales en cada uno la desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas (P<0.05).

8. DISCUSIÓN

La frecuencia de alimentación en peces, como la tilapia *Oreochromis niloticus*, modula a nivel molecular y metabólico procesos clave que afectan el crecimiento, la utilización del alimento y la composición lipídica muscular (Mahfouz *et al*., 2015; Cadorin *et al*., 2021; Hamed *et al*., 2024); bajas frecuencias pueden reducir la digestión proteica y aumentar la lipogénesis y acumulación de grasa (Cadorin *et al*., 2021), mientras que frecuencias más altas aceleran la glicólisis y gluconeogénesis, optimizando el balance energético y el crecimiento (Chen *et al*., 2024; Dai *et al*., 2024; Hamed *et al*., 2024). Aunque estudios previos (El-Araby *et al*., 2020; Rahman *et al*., 2023) han mostrado resultados contradictorios sobre el efecto de la frecuencia alimenticia en distintas etapas de desarrollo, se ha observado que al menos tres tomas diarias favorecen un mejor crecimiento y eficiencia alimenticia (Lanna *et al*., 2016; Xu *et al*., 2025), especialmente en juveniles, mientras que frecuencias menores pueden disminuir el crecimiento y aumentar la grasa muscular (Lanna *et al*., 2016; Fava *et al*., 2022) en la regulación molecular de estos efectos para optimizar prácticas de alimentación en acuicultura y mejorar el aprovechamiento nutricional y económico de los recursos.

8.1 Análisis de expresión relativa de genes que codifican enzimas digestivas en estómago e intestino anterior de la tilapia *Oreochromis niloticus*

La expresión génica en la tilapia *O. niloticus* es un área fundamental para entender los procesos biológicos que regulan su crecimiento, metabolismo y adaptación a distintas condiciones ambientales (Xu *et al*., 2015; Chen *et al*., 2022; Mwaura *et al*., 2023). Esto se debe a que el perfil de expresión de genes relacionados con rutas metabólicas clave, como el ciclo del ácido cítrico, la biosíntesis de ácidos grasos, el metabolismo de colesterol y mecanismos de osmorregulación permite comprender cómo la tilapia responde y se ajusta tanto fisiológica como bioquímicamente ante factores ambientales como la salinidad, el estrés o la composición de la dieta, impactando directamente en su capacidad de crecimiento y adaptación.

Esta especie, de gran importancia en la acuicultura, ha sido objeto de numerosos estudios centrados en genes relacionados con el metabolismo energético y la producción de enzimas digestivas (Chen *et al*., 2022; Rocha *et al*., 2022), destacando especialmente aquellos que codifican para α-amilasa (*amy*) y tripsina (*try*), enzimas clave en la digestión de carbohidratos y

proteínas, respectivamente (Santos *et al*., 2016; Castro-Ruiz *et al*., 2021). Estas enzimas desempeñan un papel crucial en la eficiencia alimenticia y el crecimiento, ya que aseguran una adecuada digestión de los nutrientes, tal como lo han demostrado Murashita *et al*. (2015) quienes observaron que una mayor actividad y expresión génica de enzimas digestivas como la α-amilasa y tripsina se traduce en una mejor utilización de los nutrientes de la dieta, promoviendo una mayor eficiencia alimentaria y mejores tasas de crecimiento en tilapia. Además, investigaciones como las de Cara *et al*. (2007), han evidenciado que la dieta suministrada puede modular tanto la expresión génica de estas enzimas como su actividad, lo que abre la posibilidad de optimizar las formulaciones alimenticias para mejorar el rendimiento productivo y la adaptación de la tilapia en sistemas acuícolas.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran que la expresión relativa del gen que codifica para *amy* en el tejido estomacal de tilapia varía significativamente entre juveniles y adultos, pero no entre los diferentes regímenes de alimentación (tres y siete veces al día) dentro de cada etapa de crecimiento (juveniles y adultos), lo que sugiere que el estadio de desarrollo tiene un mayor impacto en la regulación de este gen que la frecuencia alimenticia. Esta tendencia ha sido reportada en estudios previos, donde se observa que la maduración ontogénica del sistema digestivo en peces, incluida la tilapia, implica cambios importantes en la expresión de enzimas digestivas como la α-amilasa, adaptándose a las necesidades nutricionales de cada etapa de vida (Infante & Cahu, 2007; Lin *et al*., 2023).

Por otro lado, la falta de diferencias significativas entre las frecuencias de alimentación dentro de juveniles y adultos coincide con investigaciones que señalan la existencia de un umbral de estimulación enzimática, donde aumentos en la frecuencia de alimentación no necesariamente incrementan la expresión génica ni la actividad enzimática (Furuya *et al*., 2004; Perera & Yufera, 2017). Yúfera *et al.* (2017) en un estudio en *Spaurus aurata* han reportado que la frecuencia de alimentación puede impactar la actividad enzimática de enzimas como *amy* y *try*, siendo la *amy* la que presentó una menor actividad respecto a las otras enzimas digestivas analizadas.

Por otro lado, el análisis de la expresión génica del gen que codifica para *amy* en intestino anterior de juveniles y adultos de tilapia alimentados tres y siete veces al día no mostró diferencias

significativas (C3(IA) ER=0.56±25.55;C7(IA) ER=0.56±25.55 T3(IA) ER=25.66±25.55 ;T7(IA) ER=11.21±25.55). Esto puede ser debido a que la regulación de esta enzima digestiva en ese tejido está influenciada principalmente por factores complejos relacionados con la maduración ontogénica del sistema digestivo y señales fisiológicas internas más que por la frecuencia de alimentación (Infante & Cahu, 2001) como se ha observado en otras especies como el pejelagarto *Atractosteus tropicus* (Verdugo *et al*., 2022). Además, la expresión de *amy* puede estar modulada por la composición y calidad del alimento, la temperatura y otros factores ambientales (Sandoval-Muy *et al*., 2012; Barreto-Curiel *et al*., 2015), mientras que la frecuencia de alimentación no necesariamente altera los niveles de ARNm de esta enzima, ya que la actividad enzimática también puede estar regulada a nivel postranscripcional o mediante isoformas enzimáticas, lo que explica que cambios en la cantidad de alimento no se reflejen directamente en la expresión génica especialmente cuando el sistema digestivo ya está desarrollado en juveniles y adultos (Elías & Miranda, 2019).

Así mismo, se obtuvieron los resultados de la expresión génica del gen que codifica para la enzima digestiva tripsina (*try*) en estómago e intestino anterior de *O. niloticus* en su etapa juvenil y adulta bajo frecuencias de alimentación de tres y siete veces al día. En estos resultados se observó que, si hubo diferencias significativas ($P < 0.05$) entre etapas en el tejido estomacal, principalmente porque se observó una baja expresión en los juveniles de ambos tratamientos, mientras que en los adultos alimentados tres veces al día se observó la mayor expresión. Sin embargo, al analizar el intestino anterior, la mayor expresión se observó en los adultos alimentados siete veces al día, mientras que tanto en adultos alimentados tres veces al día como en juveniles de ambos tratamientos se observó baja expresión de este gen, sin mostrar diferencias significativas ($P > 0.05$).

Estudios recientes han demostrado que la frecuencia de alimentación modula la expresión de genes digestivos ya que esta modulación permite preparar al sistema digestivo para la absorción eficiente de nutrientes, optimizando el aprovechamiento de alimento durante los ciclos de alimentación. Diversos estudios han demostrado que la expresión de ARNm de enzimas digestivas varía de forma rítmica de acuerdo con los ciclos de alimentación (frecuencia y horarios), anticipándose al momento de la ingesta y mostrando paralelismo con la actividad de las enzimas

a nivel proteico. Por ejemplo, en peces cultivados, los genes que codifican las enzimas digestivas tienden a sobreexpresarse antes del inicio de cada ciclo alimentario, lo que indica una preparación anticipada de la maquinaria enzimática digestiva ante el estímulo de la comida (Yúfera, 2017; Navarro-Guillén & Yúfera, 2025). En larvas y juveniles de diferentes especies de peces, la dieta y la frecuencia de alimentación regulan el nivel de expresión génica de enzimas digestivas como tripsina, quimotripsina, amilasa, lipasa y pepsina. Este control ocurre tanto a nivel transcripcional (cambios en la expresión génica) como traduccional (síntesis de la proteína), y está relacionado con las fases del desarrollo y adaptación a diferentes hábitos alimenticios (Galaviz *et al.,* 2015; Castro-Ruiz *et al.,* 2021). Estudios experimentales bajo diferentes regímenes de alimentación en larvas han mostrado variaciones significativas en la expresión de genes de enzimas digestivas, así como en la actividad enzimática, dependiendo del tipo y frecuencia del alimento suministrado (Imentai *et al*., 2022).

En modelos animales, se ha observado que el aumento en la frecuencia de alimentación puede inducir cambios significativos en la expresión génica de enzimas digestivas, aunque estos efectos pueden depender del estadio de desarrollo y del segmento intestinal analizado (Zhang *et al*., 2021; Gilannejad *et al*., 2021; Imentai *et al*., 2022). La regulación de la expresión del gen que codifica la enzima *try* está influida por factores como la saciedad, el vaciamiento gástrico y la señalización hormonal (por ejemplo, colecistoquinina, CCK), que pueden variar entre juveniles y adultos (Gilannejad *et al*., 2021).

La baja expresión relativa del gen que codifica *try* en juveniles de tilapia puede atribuirse principalmente a factores fisiológicos y de desarrollo (Galaviz *et al*., 2015). En las primeras etapas de vida, como alevines y juveniles, la actividad de enzimas digestivas clave como la *try* podría estar relacionada con una menor demanda de síntesis enzimática debido a una inmadurez del sistema digestivo o a mecanismos regulatorios que priorizan la eficiencia digestiva sobre la cantidad de enzima producida (Gilannejad *et al*., 2021; Imentai *et al*., 2022). Además, en etapas tempranas, la regulación post-transcripcional puede jugar un papel relevante, haciendo que la actividad enzimática no siempre se correlacione directamente con los niveles de ARNm (Imentai *et al.,* 2022).

Los juveniles presentan requerimientos nutricionales específicos, con una mayor dependencia de proteínas fácilmente digeribles y una capacidad limitada para procesar proteínas complejas, lo que sugiere una menor necesidad de esta enzima en comparación con los adultos (Uscanga-Martínez, 2020). Inclusive, la baja expresión observada en juveniles con alta frecuencia de alimentación puede deberse a un mecanismo de protección frente a la sobrecarga digestiva o a una eficiencia en la utilización de enzimas ya presentes, evitando el gasto energético de sintetizar nuevas moléculas (Gilannejad *et al*., 2021; Imentai *et al*., 2022).

Factores ambientales como la salinidad y la temperatura, así como el tipo de dieta y el desarrollo del sistema digestivo también pueden influir en la actividad enzimática digestiva en juveniles, aunque en términos generales, la síntesis y secreción de enzimas proteolíticas como la *try* es más limitada en esta etapa debido a que el tracto digestivo no ha alcanzado su máxima eficiencia (Sandoval-Muy *et al*., 2012; Barreto-Curiel *et al*., 2015; Moguel-Hernández *et al.,* 2016). En peces, la capacidad enzimática para responder a la frecuencia alimenticia aumenta con el desarrollo, siendo limitada en estadios juveniles debido a una regulación específica y gradual de la expresión génica de enzimas digestivas (Srichanun *et al.,* 2013; Moguel-Hernández *et al*., 2016; Lavajoo *et al*., 2023). Aunque el crecimiento demanda muchos aminoácidos, la sobrealimentación no siempre incrementa la producción enzimática, ya que en fases tempranas se prioriza la maduración estructural y la eficiencia de absorción del sistema digestivo sobre la cantidad de enzimas producidas (Moyano *et al.,* 2005; Hilerio-Ruiz, 2017; Todelo-Solis, 2019).

En organismos adultos, el sistema digestivo está completamente desarrollado y adaptado para maximizar la digestión y absorción de nutrientes, especialmente proteínas (Gilannejad *et al*., 2021). Esto se refleja en una mayor expresión y actividad de la *try*, facilitando la digestión de dietas más variadas y ricas en proteínas (, 2018). Estos resultados son consistentes con estudios previos en peces y otros animales, donde los individuos adultos exhiben una mayor plasticidad en la regulación de enzimas digestivas en respuesta a cambios en el régimen alimenticio (Gilannejad *et al*., 2021; Zhang *et al*., 2021). En adultos, una alimentación distribuida en una frecuencia de alimentación de tres veces al día favorece la producción y liberación de enzimas digestivas como *try*, lo que contribuye a mantener la actividad del sistema digestivo y a cubrir el incremento en los requerimientos proteicos (Infante & Cahu, 2001). Asimismo, la elevada

expresión de *try* observada con siete comidas diarias en el intestino anterior de los organismos adultos sugiere una notable capacidad adaptativa del tracto digestivo para responder a una mayor carga alimentaria, esta adaptación se manifiesta en un incremento en la transcripción del gen de *try*, optimizando la digestión proteica (Yufera *et al*., 2017). Este hallazgo refuerza la idea de que los organismos adultos poseen una mayor plasticidad en la regulación de enzimas digestivas frente a variaciones en la dieta, tal como se ha reportado en otras especies como el lenguado (*Solea seleganensis*) (Zhang *et al*., 2021; Gilannejad *et al*., 2021).

Yúfera *et al.* (2017) en un estudio que abordó los aspectos funcionales y metodológicos de la digestión en peces cultivados mostró que la expresión de enzimas digestivas como la tripsina está regulada por efecto de la dieta, lo cual ocurre a nivel postranscripcional donde un incremento en la actividad de *try* cuando en juveniles y adultos hay una frecuencia de alimentación puntual de una a dos veces al día. La tripsina es una enzima digestiva fundamental en la hidrólisis de proteínas (Long *et al.,* 2015) por lo que es importante en la absorción de aminoácidos necesarios para el crecimiento y mantenimiento metabólico en los peces. La baja expresión de este gen podría estar relacionada con reservas preexistentes en los tejidos, lo que podría indicar una actividad enzimática constante sin necesidad de incrementar la transcripción del gen que codifica para *try* (Soltan, 2009; Long *et al*., 2015; Muñoz, 2018).

Por lo anteriormente mencionado por distintos autores como Lin *et al*. (2023) y Gilannejad *et al.* (2021), la frecuencia de alimentación tiene un efecto significativo sobre la calidad y la suficiencia de la dieta, la cual puede influir en la expresión y actividad de genes que codifican enzimas digestivas como *amy* y *try* respectivamente. El gen *amy* esencial en descomposición de carbohidratos y el gen *try* en hidrólisis proteica. Los resultados obtenidos mostraron como la frecuencia de alimentación tanto de tres como siete veces al día en la etapa juvenil afectó la expresión de ambos genes reduciendo la producción de las enzimas amilasa y tripsina, lo que indica una menor eficiencia digestiva y una absorción menos óptima de nutrientes resaltando que la frecuencia de alimentación no solo impacta la ingesta, sino también los procesos moleculares y enzimáticos esenciales para la salud digestiva de la tilapia *Oreochromis niloticus*

8.2 Análisis de expresión relativa de genes involucrados en el metabolismo de la tilapia *O. niloticus*

Diversos estudios como el de Carpio *et al.,* 2023 han demostrado que la frecuencia de alimentación puede modular la expresión de genes relacionados con el metabolismo energético y lipídico como el gen *fas* el cual regula procesos esenciales para la tilapia *Oreochromis niloticus* como lipogénesis, respuesta inmune y apoptosis donde los efectos pueden variar según la etapa de desarrollo y la especie (Oh & Venmathi-Maran, 2018).

En el presente trabajo, al analizar la expresión relativa del gen *fas* (Sintasa de Ácidos Grasos) en estómago de organismos de tilapia *Oreochromis niloticus*, se observó una baja expresión en los juveniles para la frecuencia de alimentación de tres y siete veces al día, así como en los organismos adultos alimentados tres veces al día, con una mayor expresión en adultos alimentados siete veces al día. En músculo, la expresión más alta de *fas* también se encontró en adultos alimentados siete veces al día, seguida por los adultos alimentados tres veces, con diferencias significativas respecto a los juveniles, quienes mostraron la expresión más baja de este gen.

El enzima ácido graso sintasa (*fas*) es clave en la lipogénesis de *novo*, catalizando la síntesis de ácidos grasos a partir de precursores como malonil-CoA y acetil-CoA. Su expresión está regulada por factores nutricionales, hormonales y de desarrollo (Strable & Ntambi, 2010). La expresión de *fas* está regulada por factores hormonales y nutricionales como insulina, glucosa, aminoácidos y ácidos grasos (Chakravarty *et al*., 2007; Sanhueza & Valenzuela, 2012). En los peces juveniles las frecuencias de alimentación mayores de tres o más veces al día suelen asociarse con un mayor crecimiento y contenido de lípidos y proteínas, aunque no siempre se observa un aumento proporcional en la expresión de genes lipogénicos como *fas*, esto sugiere que, en etapas juveniles la demanda energética se orienta principalmente hacia el crecimiento y la síntesis proteica, mientras que la lipogénesis puede estar menos activada independientemente de la frecuencia alimentaria (Carpio *et al*., 2023; Oh & Venmathi-Maran, 2018).

En juveniles, las frecuencias altas de alimentación favorecen el crecimiento al priorizar la síntesis proteica y el desarrollo muscular, lo que no necesariamente incrementa la expresión de genes

lipogénicos, sin embargo, la baja expresión de *fas*, incluso con alimentación frecuente, puede explicarse porque la energía se destina preferentemente al crecimiento y no a la acumulación de reservas lipídicas (Tocher, 2003). La baja expresión de *fas* en juveniles alimentados con alta frecuencia (siete veces al día) podría estar relacionada con un balance energético diferente, es decir hay un diferente uso de la energía obtenida según su etapa de desarrollo, así como una menor necesidad de síntesis de ácidos grasos de novo, posiblemente favoreciendo la oxidación de grasas como fuente energética, lo que es común en etapas de rápido crecimiento y alta actividad metabólica (Dervishi *et al*., 2023).

En condiciones de abundancia energética, como la alimentación frecuente en adultos, se estimula la lipogénesis y la expresión de *fas*, de manera contraria en estados de restricción o durante etapas de rápido crecimiento (juveniles), la prioridad metabólica se desplaza hacia la síntesis proteica y el crecimiento, limitando la activación de rutas lipogénicas (Sanhueza & Valenzuela, 2012). Además, la señalización hormonal (insulina, leptina) y la disponibilidad de nutrientes modulan la expresión de *fas*, integrando señales de saciedad y estado energético (Chakravarty *et al*., 2007).

Además, la regulación de *fas* está influenciada por la activación de AMPK, que reduce la expresión de genes lipogénicos como *fas* para promover el catabolismo energético en condiciones de baja disponibilidad de energía (Reyna *et al*., 2018).

En adultos alimentados siete veces al día, la alta expresión de *fas* sugiere un aumento en la síntesis lipogénica, probablemente debido a una mayor disponibilidad energética y una regulación metabólica que favorece el almacenamiento de lípidos en músculo (Tian *et al*., 2013). Esto puede estar mediado por factores de transcripción como SREBP-1, que inducen la expresión de genes lipogénicos como *fas* en respuesta a señales nutricionales y hormonales (Reyna *et al*., 2018).

En adultos la sobrealimentación puede activar rutas de almacenamiento de energía, reflejándose en una mayor expresión de la enzima *fas* y un incremento en el depósito de lípidos (Ayisi *et al*., 2017). La alta expresión de *fas* observada en músculo en los adultos alimentados siete veces al día indicaría que el exceso de nutrientes estimula la lipogénesis, mientras que con solo tres

raciones diarias limita la activación de esta vía metabólica por la menor disponibilidad energética (Chakravarty *et al.,* 2007; Sanhueza & Valenzuela, 2012).Se ha observado que el aumento de la frecuencia de alimentación puede reducir la expresión de *fas* en el tejido adiposo, pero los efectos en el músculo pueden diferir y están influenciados por la edad y el estado fisiológico (Hu *et al*., 2025).

Por otro lado, los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran que la expresión relativa del gen que codifica para *fas* analizado en el hígado de *O. niloticus* varía significativamente entre juveniles alimentados a una frecuencia de alimentación de siete veces al día con el resto de los grupos; no se encontraron diferencias significativas entre los adultos a las distintas frecuencias de alimentación.

Por el contrario, una frecuencia de alimentación de tres veces al día en juveniles puede generar periodos más prolongados de ayuno relativo, lo que reduce la señalización insulínica y la activación de SREBP-1c, disminuyendo la expresión de *fas* y, por ende, la capacidad lipogénica hepática (Reyna *et al*., 2018). El hígado es el principal órgano para la síntesis de ácidos grasos y la regulación de genes lipogénicos, incluyendo *fas*, está fuertemente influenciada por factores nutricionales y hormonales (Tian *et al*., 2013). Según la etapa de desarrollo La mayor frecuencia de alimentación en juveniles podría aumentar la disponibilidad constante de nutrientes y energía, estimulando la vía lipogénica y la expresión de *fas* para apoyar el crecimiento y almacenamiento de lípidos (Ng *et al.,* 2013; Tian *et al*., 2013). En cambio, los adultos podrían tener una regulación más estable o una menor necesidad de síntesis lipídica hepática, reflejando una menor expresión de *fas*, independientemente de la frecuencia alimentaria (Reyna *et al*., 2018).

Los resultados de la expresión relativa del gen *fas* en hígado de organismos adultos muestran similitudes con los obtenidos por Tian *et al*. (2013), quienes estudiaron los cambios en la expresión del gen *fas* en organismos adultos de tilapia *O. niloticus.* Estos resultados mostraron que la expresión relativa de *fas* en hígado disminuyó significativamente en condiciones de ayuno, lo que podría explicar la baja expresión de *fas* obtenida en el hígado de los juveniles y adultos del presente trabajo a una frecuencia de alimentación de tres veces al día. Esto indica que la expresión de *fas* se encuentra regulada tanto por la etapa de desarrollo como por la cantidad de

nutrientes que llegan al organismo, donde en organismos juveniles debe haber una mayor expresión de *fas* en el hígado (Tian *et al*., 2013).

La expresión del gen *fas* en *Oreochromis niloticus* puede variar dependiendo distintos factores fisiológicos como la dieta y etapa de desarrollo. Se ha demostrado por Ayisi *et al.* (2017) que la expresión del gen *fas* es mayor en etapas de rápido crecimiento, principalmente en juveniles donde la demanda de crecimiento es mayor, sin embargo, en adultos el metabolismo se dirige principalmente hacia el almacenamiento de energía por lo que los niveles de expresión son menores. Incrementar la frecuencia de alimentación puede promover la expresión génica de *fas,* pero los beneficios pueden disminuir debido a la sobrealimentación o a la saturación fisiológico, por lo que una frecuencia mayor a siete veces al día deja de ser óptima para los organismos juveniles.

Por otro lado, se analizaron los resultados de la expresión relativa del gen *igf-I* (Factor de crecimiento insulínico-1) en estómago, hígado y músculo de *O. niloticus* en sus etapas juvenil y adulta, bajo dos frecuencias de alimentación: tres y siete veces al día. En el hígado, los juveniles alimentados tres veces al día tuvieron la mayor expresión del gen, mientras que en adultos fue mayor en los alimentados siete veces al día. En el estómago, los adultos mostraron niveles similares y mayores de expresión que los juveniles, independientemente del régimen de alimentación. En el músculo, la mayor expresión se dio en adultos alimentados siete veces al día, seguida de adultos con tres comidas y juveniles con siete, siendo casi nula en juveniles con tres comidas.

El *igf-I* desempeña un papel central en la regulación del crecimiento en peces, actuando principalmente como mediador de la hormona de crecimiento (GH) a través del eje endocrino somatotrópico (Muñoz et al., 2010; Vélez *et al*., 2013). La GH estimula la síntesis de *igf-I*, y su efecto puede ser modulado por el estado nutricional y la disponibilidad de nutrientes, especialmente de aminoácidos esenciales (Chavez-García, 2020; Zhong *et al*., 2022).

En peces juveniles, los sistemas endocrino y metabólico están en desarrollo, lo que limita la respuesta del gen *igf-I* a cambios en la frecuencia de alimentación, aunque la ración diaria sea constante. Estudios en tilapia y otras especies como muestran que la expresión de *igf-I* varía

durante el desarrollo y es menos sensible a estímulos nutricionales en etapas tempranas. (Mun *et al.,* 2019; Zhong *et al*., 2022). En contraste, en adultos la alta expresión de *igf-I* observada con frecuencias de alimentación de tres y siete veces al día sugiere que el tejido estomacal responde de manera más eficiente a la disponibilidad constante de nutrientes, permitiendo una regulación más estable del crecimiento. La frecuencia de alimentación puede influir en la expresión génica asociada a la absorción y el metabolismo de nutrientes (Lavajoo et al., 2020; Bersin *et al.,* 2023), como lo demuestra Zhong *et al*. (2022) en los que la administración de *igf-I* en tilapia modificó la expresión de genes relacionados con el transporte de aminoácidos y procesos inmunológicos en el estómago.

El metabolismo energético y la eficiencia en la utilización del alimento difieren entre juveniles y adultos (Martínez-Porchas *et al*., 2009). La baja expresión de *igf-I* en el estómago de juveniles podría representar un mecanismo adaptativo para optimizar el uso de recursos en un sistema aún inmaduro, mientras que, en adultos, la alta expresión refleja una mayor capacidad para traducir la alimentación frecuente en señales de crecimiento (Villaroel *et al*., 2005; Tovar-Ramírez *et al*., 2017). Nuestros resultados coinciden con investigaciones que muestran que la expresión de *igf-I* en tilapia está modulada por la edad, el estado nutricional y la frecuencia de alimentación, afectando los procesos de absorción y crecimiento en el tracto digestivo, incluso cuando la ración diaria total se mantiene (Zhong *et al*., 2022; Chavez-García, 2020). Se ha demostrado que la expresión de *igf-I* es un indicador clave del crecimiento y metabolismo en peces, regulado por GH a través de su receptor y la vía JAK2/STAT5 (Escalante-Rojas *et al.,* 2019).

En juveniles alimentados tres veces al día, la expresión hepática de *igf-I* es mayor en comparación con aquellos alimentados siete veces al día, quienes presentan una baja expresión similar a la observada en adultos alimentados tres veces al día. Por su parte, los adultos alimentados siete veces al día muestran una expresión de *igf-I* menor que los juveniles. Desde una perspectiva fisiológica, la eficiencia en la utilización del alimento y la respuesta metabólica al estrés alimentario pueden explicar estas diferencias. La subalimentación o el estrés alimentario afectan negativamente la expresión de genes relacionados con el crecimiento, incluido *igf-I*, ya que el organismo prioriza funciones metabólicas esenciales sobre el crecimiento (Villaroel *et al.*, 2005). Además, la frecuencia de alimentación influye en el metabolismo energético; un número óptimo

de comidas permite un mejor aprovechamiento del alimento y una regulación más eficiente de la vía GH/*igf-I* (Carpio *et al*., 2023).

En juveniles, alimentar tres veces al día podría favorecer picos adecuados de GH y en consecuencia una mayor inducción de *igf-I*, promoviendo el crecimiento (García-Ulloa, 2004; Carpio *et al.,* 2023). En cambio, alimentar siete veces al día con la misma ración diaria podría fragmentar la respuesta hormonal y metabólica, disminuyendo la expresión de *igf-I* (Resnawati, 1998; Kamran *et al.,* 2008). En adultos, la capacidad metabólica y la regulación hormonal son diferentes que los juveniles (Okuzawa, 2002; Carrillo *et al.,* 2015), lo que explica la menor expresión de *igf-I* con siete alimentaciones diarias y la baja expresión con tres alimentaciones.

El *igf-I* es un mediador clave en la vía somatotrópica, promoviendo la proliferación celular, la diferenciación y la hipertrofia muscular, y su expresión puede variar según factores nutricionales como la frecuencia de alimentación (Werner *et al.,* 1995). La alta expresión de *igf-I* en adultos alimentados con mayor frecuencia podría reflejar un estado metabólico y anabólico más activo, favoreciendo el crecimiento y la reparación tisular (Ohlsson *et al.,* 2009; Fuentes *et al.,* 2013). Se ha reportado que una alimentación más frecuente puede mantener niveles constantes de nutrientes y hormonas anabólicas, estimulando la expresión génica en tejidos asociados a la digestión y absorción, como el estómago (Vélez *et al.,* 2013).

La baja expresión similar entre adultos con menor frecuencia de alimentación y juveniles con alta frecuencia sugiere que la edad y la frecuencia de alimentación interactúan para modular la expresión de *igf-I* (Lavajoo *et al*., 2020). Los juveniles, aunque alimentados con alta frecuencia, pueden mantener un nivel basal de expresión más bajo debido a diferencias en la regulación hormonal y metabólica propias de su etapa de desarrollo (Muin., 2019; Zhong *et al*., 2022).

La baja o casi nula expresión en juveniles con baja frecuencia de alimentación, a pesar de recibir la misma ración diaria total, puede deberse a que la distribución del alimento en pocas tomas genera periodos prolongados de ayuno, lo que reduce la señalización anabólica y la expresión de genes relacionados con el crecimiento como *igf-I* (Montserrat *et al*., 2007) Esto coincide con reportes donde la restricción o baja frecuencia de alimentación disminuye la expresión de *igf-I*,

afectando negativamente el crecimiento y el metabolismo energético en teleósteos (Gaillard *et al.*, 2018; Villaroel *et al*., 2005).

Aunque el hígado es la principal fuente de *igf-I*, este también se expresa en tejidos periféricos como el estómago, donde puede desempeñar funciones locales relacionadas con el crecimiento y la reparación celular (Zhong *et al*., 2022). La vía PI3K/AKT/mTOR, activada por *igf-I,* es esencial para la síntesis proteica y el crecimiento muscular, y su activación depende del estado nutricional y la disponibilidad constante de nutrientes, favorecida por una alimentación más frecuente (Fuentes *et al*., 2011; Laplante & Sabatini, 2012). Así, la frecuencia de alimentación modula no solo la expresión de *igf-I*, sino también la producción de enzimas digestivas y otros genes relacionados con el metabolismo, influyendo en la eficiencia del uso del alimento y el crecimiento (Carpio *et al*., 2023).

La alta expresión de *igf-I* en el músculo de adultos alimentados con mayor frecuencia se explica por el rol anabólico de *igf-I* en ese tejido, promoviendo la proliferación celular, la diferenciación y la hipertrofia muscular a través de vías de señalización como PI3K/AKT/mTOR, que regulan la síntesis proteica y el crecimiento muscular (Kuznetsova *et al*., 2025). La alimentación frecuente proporciona un suministro constante de aminoácidos y energía, favoreciendo la activación de estas rutas y la expresión del gen *igf-I* (García de la Serrana *et al*., 2013; Jiménez-Amilburu *et al*., 2013).

La expresión moderada en adultos con menor frecuencia de alimentación sugiere que, aunque el estadio adulto tiene mayor capacidad para expresar *igf-I*, la restricción en la frecuencia limita la señalización anabólica (Montserrat *et al*., 2007; Imsland *et al*., 2008). En contraste, los juveniles alimentados siete veces al día, pese a su menor desarrollo, mantienen una expresión similar debido a la alta disponibilidad constante de nutrientes que estimula la expresión de *igf-I* en etapas tempranas de crecimiento (Davis & Hardy, 2022). Esto indica que la frecuencia de alimentación puede compensar parcialmente la menor capacidad de expresión en juveniles. Por último, la baja expresión en juveniles con baja frecuencia alimentaria refleja una condición de menor estímulo anabólico y posiblemente un estado nutricional menos favorable, que limita la activación del eje GH/*igf-I* y la síntesis de proteínas musculares (Reigh *et al*., 2006).

Aunque la ración diaria total sea la misma, la distribución en pocas tomas puede no mantener niveles adecuados de aminoácidos y energía para inducir la expresión de *igf-I* en tejido muscular (Muñoz *et al*., 2010; Cotrino-Salcedo & Canosa, 2016). La expresión local de *igf-I* en músculo es crucial para la regulación autocrina y paracrina del crecimiento muscular (Cotrino-Salcedo & Canosa, 2016). En conclusión, la frecuencia de alimentación influye significativamente en la estabilidad de los nutrientes y las señales anabólicas, afectando la expresión génica de *igf-I* más allá de la cantidad total diaria de alimento suministrada (Carpio *et al*., 2023).

La expresión del gen *gdh* (glutamato deshidrogenasa) en *Oreochromis niloticus* varió según el tejido, la etapa de desarrollo y la frecuencia de alimentación (tres y siete veces al día). En adultos, la expresión fue mayor en músculo con alimentación tres veces al día, mientras que, en juveniles, la menor expresión se observó en el hígado independientemente de la frecuencia. Esto indica que los adultos tienen una mayor capacidad metabólica para adaptarse a diferentes patrones de alimentación, ajustando su metabolismo según la disponibilidad de nutrientes.

Estos resultados contrastan con los obtenidos por Basto-Silva *et al*. (2022), quienes evaluaron la expresión de *gdh* en juveniles de *Sparus aurata* alimentados con tres frecuencias de alimentación (frecuencia de alimentación de una, dos y tres veces al día) y dietas con diferentes niveles de proteína y carbohidratos. En su estudio, observaron que tanto la frecuencia de alimentación como la composición de la dieta afectaron la expresión del gen, con una mayor frecuencia y un mayor contenido de proteína promoviendo una mayor expresión hepática de *gdh*. Esto sugiere que la etapa de desarrollo y la especie son factores determinantes en la regulación de este gen

La *gdh* es una enzima mitocondrial clave en el metabolismo hepático, que cataliza la desaminación oxidativa del glutamato para formar α-cetoglutarato y amonio, conectando el metabolismo de aminoácidos con el ciclo de Krebs y la homeostasis del nitrógeno (Voss *et al.,* 2021; Cheng *et al*., 2024). Su expresión y actividad están moduladas por el estado metabólico y la disponibilidad de sustratos, siendo sensible a cambios nutricionales (Gaspar *et al*., 2018).

En juveniles, una mayor frecuencia de alimentación podría estimular un metabolismo más activo del glutamato para mantener el equilibrio energético y la eliminación de amonio, reflejando una mayor expresión de *gdh* (Couto *et al*., 2008; Polakof *et al*., 2012). En adultos, la mayor expresión

de *gdh* con menor frecuencia de alimentación (tres veces al día) podría indicar un ajuste metabólico diferente, posiblemente asociado a una mayor necesidad de movilizar aminoácidos y energía entre comidas más espaciadas, aumentando la actividad de *gdh* para la producción de α-cetoglutarato y amonio (Couto *et al*., 2008; Polakof *et al*., 2012; Mes *et al*., 2023). Estas diferencias también pueden estar relacionadas con la capacidad metabólica y la eficiencia hepática que cambia con la edad, donde los juveniles pueden responder mejor a estímulos frecuentes de alimentación, mientras que los adultos regulan la expresión de *gdh* para optimizar el uso de nutrientes bajo diferentes regímenes alimenticios (Couto *et al*., 2008; Polakof *et al*., 2012; Pérez-Jiménez *et al*., 2007).

La expresión diferencial de *gdh* en hígado, a pesar de la misma ración diaria tanto en juveniles como en adultos, sugiere que no solo la cantidad de alimento, sino la distribución temporal de la ingesta influye en la regulación transcripcional de genes metabólicos (Basto-Silva *et al*., 2022; Subandiyono *et al.*, 2022). Esto coincide con estudios que muestran que la expresión génica hepática es sensible a la frecuencia y composición de la dieta, afectando enzimas clave como *gdh* (Won *et al.,* 2012).

La expresión diferencial del gen *gdh* observada en el músculo de juveniles y adultos alimentados con la misma ración diaria, pero con distinta frecuencia (tres y siete veces al día), refleja una regulación metabólica dependiente de la edad y el patrón alimenticio (Gaspar *et al*., 2018). Donde la baja expresión en juveniles sugiere una menor demanda de catabolismo de aminoácidos para energía, probablemente debido a un metabolismo más orientado al crecimiento y síntesis proteica (Zhang *et al*., 2025), mientras que en adultos alimentados tres veces al día la mayor expresión de *gdh* indica un aumento en la oxidación de aminoácidos para mantener la homeostasis energética (Liu *et al*., 2012; Mes *et al*., 2023; Zhang *et al*., 2025).

La mayor expresión en el músculo de adultos sugiere que una alimentación más frecuente en adultos podría reducir la necesidad de catabolismo energético, modulando su expresión hacia niveles similares a los juveniles, lo cual es consistente con otros estudios (Wang *et al*., 2012) que muestran que la regulación de *gdh* está influida por el estado energético y la maduración fisiológica más que por la frecuencia de alimentación *per se*, ya que esta enzima mitocondrial

juega un papel clave en la conexión entre el metabolismo de aminoácidos y el ciclo de Krebs, adaptándose a las demandas metabólicas específicas de cada etapa de desarrollo y régimen alimenticio (Couto *et al*., 2009; Polakof *et al*., 2012).

La expresión del gen *gdh* en *Oreochromis niloticus* se encuentra modulada por el tejido, la etapa de desarrollo y la frecuencia de alimentación entre otros, resultando clave en la adaptación metabólia a diferentes condiciones nutricionales. En conclusión, en los adultos se observó una mayor expresión en el tejido muscular en organismos sometidos a una menor frecuencia de alimentación, lo qu epuede sugerir una mayor demanda de oxidación de aminoácidos para mantener la homeostasis energética entre cada alimentación, de maneara contraria, los juveniles mostrarón una menor expresión hepática independiente de la frecuencia, lo cual puede deberse a que su metabolismo está principalmente orientado al crecimiento y hay una menor necesidad de catabolismo energético, es decir, la descomposición de compuestos orgánicos (proteínas, lípidos y carbohidratos) para liberar energía que estos organismos necesitan para llevar a cabo sus funciones vitales. Las diferencias entre etapas de desarrollo y tejidos indicaron que la regulación del gen *gdh* está ligada al estado fisiológico y a las demandas metabólicas específicas de cada etapa de desarrollo.

La comprensión del efecto de la frecuencia de alimentación a nivel genético en *O. niloticus* es esencial para optimizar el manejo nutricional en acuicultura. La regulación de la expresión génica relacionada con el metabolismo y la digestión se ve directamente influenciada por la cantidad y distribución del alimento, lo que afecta la eficiencia en la asimilación de nutrientes, el crecimiento y la salud del organismo. En el presente estudio, se destaca si la frecuencia de alimentación puede modular la expresión de genes clave involucrados en procesos metabólicos y en la producción de enzimas digestivas, lo que permitiría ajustar las estrategias alimenticias para mejorar el rendimiento productivo. En los juveniles, estos cambios pueden favorecer un crecimiento acelerado al optimizar la actividad enzimática y la eficiencia en la conversión de nutrientes, mientras que, en los adultos, pueden influir en el mantenimiento del equilibrio metabólico y la eficiencia alimentaria. Conocer cómo se modifica la expresión de estos genes no solo contribuye a mejorar la nutrición y el bienestar de la tilapia, sino que también proporciona herramientas para el desarrollo de dietas más precisas y sostenibles, ofrece ventajas clave para la acuicultura al

proporcionar una comprensión detallada de los mecanismos genéticos que regulan el metabolismo y la digestión en *O. niloticus*. En el futuro, un enfoque basado en la regulación génica permitirá diseñar estrategias de alimentación más eficientes, reduciendo costos y minimizando el impacto ambiental en la acuicultura.

9. CONCLUSIONES

- La expresión génica de las enzimas digestivas *amy* (amilasa) y try (tripsina) en la tilapia *Oreochromis niloticus* está fuertemente influenciada por el estadio de desarrollo, mostrando mayor regulación ontogénica que por la frecuencia de alimentación.

- La expresión del gen *fas* (ácido graso sintasa) en *O. niloticus* está modulada por la frecuencia de alimentación y la etapa de desarrollo, reflejando diferentes prioridades metabólicas: en juveniles, la energía se dirige mayormente al crecimiento y síntesis proteica, limitando la lipogénesis, mientras que en adultos una alimentación frecuente aumenta la expresión de *fas*, favoreciendo la acumulación de lípidos.

- La expresión del gen *igf-I* (Factor de crecimiento insulínico-1) en *O. niloticus* está influenciada tanto por la edad como por la frecuencia de alimentación, afectando su regulación en hígado, estómago y músculo. Mientras que en juveniles una frecuencia moderada (tres veces al día) favorece una mayor expresión hepática, en adultos la alimentación más frecuente (siete veces al día) potencia la expresión en tejidos periféricos, reflejando una mayor capacidad metabólica y anabólica.

- La regulación de la expresión del gen *gdh* (glutamato deshidrogenasa) en *O. niloticus* depende de la etapa de desarrollo, el tejido y la frecuencia de alimentación, reflejando adaptaciones metabólicas específicas. En adultos, una menor frecuencia de alimentación aumenta la expresión en músculo, sugiriendo mayor catabolismo energético para mantener la homeostasis, mientras que en juveniles la expresión hepática es menor, acorde con un metabolismo orientado al crecimiento. Así, la modulación de *gdh* evidencia la flexibilidad metabólica necesaria para optimizar el uso de nutrientes según las demandas fisiológicas y nutricionales de cada etapa.

- La expresión génica en la tilapia O*. niloticus* está estrechamente regulada por la interacción entre el estadio de desarrollo y la frecuencia de alimentación, reflejando adaptacionesmetabólicas específicas que optimizan el crecimiento, la digestión y el balance energético en cada etapa biológica. La ontogenia juega un papel fundamental en la regulación de

genes quecodifican enzimas digestivas y genes asociados al metabolismo lipídico, hormonal y energético, mientras que la frecuencia alimenticia actúa modulando estas expresiones demanera diferenciada según las necesidades fisiológicas de juveniles y adultos.

10. LITERATURA CITADA

Abdel-Tawwab, M., Hagras, A. E., Elbaghdady, H. A. M., & Monier, M. N. (2015). Effects of dissolved oxygen and fish size on Nile tilapia*, Oreochromis. niloticus* (L.): growth performance, whole-body composition, and innate immunity. *Aquaculture International*, 23:1261-1274. DOI: 10.1007/s10499-015-9882

Abdo-de la Parra, M.I., Rodríguez-Ibarra, L.E., Ibarra-Castro, L., Martínez-Brown, J.M. & Velasco-Blanco, G. (2020). Efecto de la frecuencia y la hora de alimentación sobre el crecimiento, la eficiencia alimenticia, los índices somáticos y la supervivencia en juveniles de robalo blanco *Centropomus viridis. Ciencias Marinas*, 46(3):155 163. DOI: 10.7773/cm.v46i3.3089

Alcántar-Vázquez, J.P., Santos-Santos, C., Moreno-de la Torre, R. y Antonio-Estrada. C. (2014). Manual para la Producción de supermachos de tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*). Universidad del Papaloapan, Oaxaca, México. 81 p. ISBN 978-607-96428-0-8.

Andersen, C.L., Jensen, J.L., Orntoft, T.F. (2004). Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Research,* 64(15):5245-5250. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-04-0496.

Ayisi, C. L., & Zhao, J. L. (2017). Fatty acid composition, lipogenic enzyme activities and mRNA expression of genes involved in the lipid metabolism of Nile tilapia fed with palm oil. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, *17*(2):405-415. DOI: 10.4194/1303-2712v-17-2-20

Barreto-Curiel, F., Durazo, E., Viana, M. T., & Harris, C. (2015). Growth, ammonium excretion, and oxygen consumption of hybrid red tilapia (*Oreochromis mossambicus × Oreochromis aureus*) grown in seawater and freshwater. *Ciencias Marinas*, 41(3):189-254. DOI:10.7773/cm.v41i3.2526

Basualdo-Ramírez, L. J., Jiménez-Guzmán, F., Jiménez-Saavedra, A. C., Macal-Niño, F. J.-M., Montaño-Aguilar, D. M., & Gutiérrez, U. E. (2012). Criterios técnicos y económicos para la producción sustentable de tilapia en México. Comité Sistema Producto Tilapia de México AC. SITIO: http://www.conapesca.sagarpa.gob.mx/work/sites/cona/dgof/publicaciones/CriteriosTecnicosEconomicosTilapiaEnMexico.pdf

Basto-Silva, C., Enes, P., Oliva-Teles, A., Capilla, E., & Guerreiro, I. (2022). Dietary protein/carbohydrate ratio and feeding frequency affect feed utilization, intermediary metabolism, and economic efficiency of gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles. *Aquaculture*, 554:738182. DOI:10.1016/j.aquaculture.2022.738182

Berg, J. M., Tymoczko, J. L., & Stryer, L. (2015). *Biochemistry* (8th ed.). W. H. Freeman. ISBN: 978-84-291-7600-1

Boyer, B. B., Wiener, H. W., Hopkins, S. E., Purnell, J. Q., O'Brien, D. M., Aliwarga, T. & Tiwari, H. K. (2023). Obesity-associated dyslipidemia is moderated by habitual intake of marine-derived n-3 polyunsaturated fatty acids in Yup'ik Alaska native people: a cross-sectional mediation-moderation analysis. *The Journal of Nutrition*, 153(1):279-292. DOI: 10.1016/j.tjnut.2022.10.009

Bustin, S. A. Benes, V., Garson, J. A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., & Wittwer, C. T. (2009). The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments.*Clinical Chemistry*, 55(4):611-622. DOI: 10.1373/clinchem.2008.112797.

Borrell Valls, J. (2014). Nutrición acuícola, aditivos tecnológicos. Uso de enzimas. *Veterinaria Digital.* SITIO: https://www.veterinariadigital.com/articulos/nutricion-acuicola-i-vi/

Carrillo, M., Espigares, F., Felip, A., Escobar, S., Molés, G., Rodríguez, R. & Zanuy, S. (2015). Updating control of puberty in male European sea bass: a holistic approach. *General and Comparative Endocrinology*, 221:42-53. DOI: 10.1016/j.ygcen.2015.06.019

Carpio, B. A. B., Cañarte, C. A. N., Mestanza, A. L. B., Herrera, W. A. V., & Tobar, J. M. R. (2023). Caracterización de la frecuencia de alimentación en diferentes raciones en juveniles de tilapia roja (*Oreochromis mossambicus),* con base en indicadores de crecimiento (longitud y peso). *PENTACIENCIAS*, 5(2):449-462. ISSN:2806-5794

Cadorin, D. I., da Silva, M. F., Masagounder, K., & Fracalossi, D. M. (2021). Interaction of feeding frequency and feeding rate on growth, nutrient utilization, and plasma metabolites of juvenile genetically improved farmed Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Journal of the World Aquaculture Society*, *53*(2):500-515. DOI:10.1111/jwas.12833

Cama R. (2017). *Estudio de factibilidad para la producción de tilapia mediante la diversificación del uso del Agua. Tesis de Licenciatura*. Universidad Nacional de San Agustín, Arequipa, Perú. SITIO: http://repositorio.unsa.edu.pe/handle/UNSA/7014.

Cara B., Moyano F. J., Zambonino-Infante J. L., and Fauvel C. (2007). Trypsin and chymotrypsin as indicators of nutritional status of post-weaned sea bass larvae. *Journal of Fish Biology*, 70(6):1798–1808. DOI: 10.1111/j.1095-8649.2007.01457.x.

Carpio, B. A. B., Cañarte, C. A. N., Mestanza, A. L. B., Herrera, W. A. V., & Tobar, J. M. R. (2023). Caracterización de la frecuencia de alimentación en diferentes raciones en juveniles de tilapia roja (*O. mossambicus*), con base en indicadores de crecimiento (longitud y peso). *PENTACIENCIAS*, 5(2):449-462. ISSN:2806-5794.

Castro-Ruiz, D., Andree, K. B., Blondeau-Bidet, E., Fernández-Méndez, C., García-Dávila, C., Gisbert, E., & Darias, M. J. (2021). Isolation, identification, and gene expression analysis of the main digestive enzymes during ontogeny of the Neotropical catfish *Pseudoplatystoma punctifer* (Castelnau, 1855). *Aquaculture*, 543:737031. DOI: 10.1016/j.*Aquaculture*.2021.737031**.**

Chakravarti, B., & Chakravarti, D. N. (2007). Oxidative modification of proteins: age-related changes. *Gerontology*, *53*(3):128-139. DOI: 10.1159/000097865

Chen, B., Xiao, W., Zou, Z., Zhu, J., Li, D., Yu, J., & Yang, H. (2022). Comparing transcriptomes reveals key metabolic mechanisms in superior growth performance Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Frontiers in Genetics*, 13:879570. DOI: 10.3389/fgene.2022.879570.

Chen, P., Qu, H., Yang, J., Zhao, Y., Cheng, X., & Jiang, W. (2024). Effects of feeding rates on growth performance and liver glucose metabolism in juvenile largemouth bronze gudgeon (*Coreius guichenoti*). *Animals*, 14(17):2466. DOI:10.3390/ani14172466.

Cheng, Y. K., Zhang, Y., Zhang, Z. Y., Cong, P. K., Feng, J. Y., Zhang, R. & Cui, J. (2024). Biological characteristics and functions of a novel glutamate dehydrogenase from *Trichinella spiralis*. *Parasite*, 31:65.DOI:10.1051/parasite/2024065.

Chervinski, J. (1982). Environmental physiology of tilapias. In *The Biology and Culture of Tilapia. Proceedings ofthe 7th ICLARM Conference Proceedings 7: International Center for Living Aquatic Resorce Managment, Manila*,*Philippines* pp. 119–128. ISSN 0115-4389

Cho, C. Y., & Bureau, D. P. (2001). A review of diet formulation strategies and feeding systems to reduce excretory and feed wastes in aquaculture. *Aquaculture Research*, 32(1):349–360. DOI: 10.1046/j.1355-557x.2001.00027

Chou, B.S. & Shiau, S.Y. (1996) Optimal dietary lipid level for growth of juvenile hybrid tilapia, *Oreochromis niloticus × Oreochromis aureus. Aquaculture*, 143(2):185-195. DOI: 10.1016/0044-8486(96)01266-5

Gaspar Condori, J. C. (2018). Regulación transcripcional y efecto metabólico de la silenciación génica de la glutamato deshidrogenasa en dorada (S*parus aurata*). *Tesis doctoral*. Universitart de Barcelona. SITIOhttps://hdl.handle.net/2445/120951

Cotrino Salcedo, L. A. (2016). *Efectos de la hormona de crecimiento (GH), insulina, cortisol y estradiol sobre la expresión de los receptores de hormona de crecimiento (GHRs) y de los factores de crecimiento similares a insulina (IGFs) en hepatocitos de Pejerrey (Odontesthes bonariensis) en cultivo*. *Tesis de Licenciatura*. Universidad militar de Nueva Granada, Bogotá. SITIO: https://hdl.handle.net/10654/14110

Cuellar Sáenz, J. (2021). Ciclo reproductivo de la tilapia (*O. niloticus*). *Veterinaria Digital.* SITIO: https://www.veterinariadigital.com/articulos/ciclo-reproductivo-de-la-tilapia/

Couto, a., Enes, P., Peres, H., Oliva-Teles, A., (2008). Effect of water temperature and dietary starch on growth and metabolic utilization of diets in gilthead sea bream (*Sparus aurata)* juveniles. *Comparative Biochemistry and Physiology,* 151:45-50. DOI:10.1016/j.cbpa.2008.05.013

Dai, Y., Shen, Y., Guo, J., Yang, H., Chen, F., Zhang, W., & Li, J. (2024). Glycolysis and gluconeogenesis are involved of glucose metabolism adaptation during fasting and re-feeding in black carp (*Mylopharyngodon piceus*). *Aquaculture and Fisheries*, 9(2):226-233. DOI: 10.1016/j.aaf.2022.04.003

Davis, A.D., & Hardy, R.W. (2022). Feeding and fish husbandry. *Fish Nutrition,* 14:857-882. DOI:10.1016/B978-0-12-819587-1.00015-X

De Oliveira, C. G., López-Olmeda, J. F., Costa, L. S., do Espirito Santo, A. H., dos Santos, F. A. C., Luz, R. K., & Ribeiro, P. A. P. (2022). Gastrointestinal emptying and daily patterns of activity of proteinolytic enzymes in Nile tilapia (*O. niloticus*). *Aquaculture*, 546:737338. DOI:10.1016/j.aquaculture.2021.737338

Dwyer, K. B. (2002). Feeding frequency affects food consumption, feeding pattern and growth of juvenile yellowtail flounder (*Limanda ferruginea*). *Aquaculture*, 213(1-4):279-292. DOI:10.1016/S0044-8486(02)00224-7

Gaillard, A. L., Tay, B. H., Pérez Sirkin, D. I., Lafont, A. G., De Flori, C., Vissio, P. G., & Tostivint, H. (2018). Characterization of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) genes from cartilaginous fish: evolutionary perspectives. *Frontiers in Neuroscience,* 12:607. DOI:10.3389/fnins.2018.00607

Gilannejad, N., Moyano, F. J., Martínez-Rodríguez, G., & Yúfera, M. (2021). Feeding protocol modulates the digestive process in senegalese sole (*solea senegalensis*) juveniles. *Frontiers in Marine Science,* 8:698403. DOI: 10.3389/fmars.2021.698403

El-Araby, D. A., Amer, S. A., & Khalil, A. A. (2020). Effect of different feeding regimes on the growth performance, antioxidant activity, and health of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus. Aquaculture*, 528:735572. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2020.735572

El-Sayed, A. F. M. (2006). *Tilapia Culture*, CABI publishing, UK. ISBN-13: 978-0-85199-014-9.

El-Sayed, M., Abdullah S. Al-Quffail, Nasser A., Al-Asgah, Abdel-Wahab A. Abdel-Warith., & Yousef, S. Al-Hafedh. (2018) Effect of dietary fish meal replacement by red algae, *Gracilaria arcuata*, on growth performance and body composition of Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 25(2):198-203. DOI:10.1016/j.sjbs.2017.06.012.

FAO. (2022). The State of World Fisheries and Aquaculture. *Food and Agriculture Organization of the United Nationes*, Rome. 266 p. ISBN 978-92-5-136364-5

FAO. (2024). El estado mundial de la pesca y la acuicultura. Roma. Hacia la transformación azul. *Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO)*, 278. ISBN 978-92-5-138817-4

Fava, A. F., de Souza Bezerra, G., Neu, D. H., , Bittencourt, F., Signor, A., Carvalho, K. V., Gomes, R., Luan Marques., & B, Wilson R., (2022). Effects of feeding frequency for nile tilapia fingerlings (*O. niloticus*). *Aquaculture Nutrition*, 2022(1):1053556. DOI:10.1155/2022/1053556

Fialho, N. S., Valenti, W. C., David, F. S., Godoy, E. M., Proença, D. C., Roubach, R., & Bueno, G. W. (2021). Environmental sustainability of Nile tilapia net-cage culture in a neotropical region. *Ecological Indicators*, *129*:108008. DOI: 10.1016/j.ecolind.2021.108008

Fitzsimmons, K. (2000). tilapia: The most important aquaculture species of the 21st century. In *Proceedings from the fifth International Symposium on tilapia Aquaculture* (pp. 3-8). SITIO: https://search.library.uq.edu.au/permalink/61UQ_INST/mana2s/alma991005978819703131

Furuya, W. M., Pezzato, L. E., Barros, M. M., Pezzato, A. C., Furuya, V. R., & Miranda, E. C. (2004). Use of ideal protein concept for precision formulation of amino acid levels in fish-meal-free diets for juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture Research*, 35(12):1110-1116. DOI:10.1111/j.1365-2109.2004.01133.x

Galaviz, M. A., López, L. M., Escamilla, I. T., Arvizu, P. P., Gasca, A. G., Cornejo, R. H., & Truea, C. D. (2015). Avances en estudios sobre expresión y actividad de enzimas digestivas en juveniles de totoaba (Toto*aba macdonaldi*, Gilbert 1890) alimentados con proteínas de origen vegetal. *Nutrición acuícola: Investigación y Desarrollo, Universidad Autónoma de Nuevo Leon. 877-401 pp.* ISBN: 978-607-27-0593-7

Gaviria, Y. S., Figueroa, O. A., & Zapata, J, E. (2021). Effect of the inclusion of red tilapia (*Oreochromis spp*.) chemical viscera silage in broiler feed and its effect on productivity and blood parameters. *Información Tecnológica*, 32(3):79-88. DOI:10.4067/S0718-07642021000300079.

Garcia de la serrana, D., & Johnston, I. A. (2013). Expression of heat shock protein (Hsp90) paralogues is regulated by amino acids in skeletal muscle of Atlantic salmon. *PLoS One*, *8*(9): e74295. DOI: 10.1371/journal.pone.0074295

García-Ulloa, M., (2004). Efecto de la ración alimenticia en el crecimiento de juveniles de tilapia *Oreochromis aureus* (Steindachner) bajo condiciones experimentales de cultivo. *Avances en Investigación Agropecuaria*, 8(1):1-8. ISSN: 0188-7890.

García, J. A., & M. Villarroel. (2009). Effect of feed type and feeding frequency on macrophage functions in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fish and Shellfish Immunology,* 27(2):325–29. DOI:10.1016/j.fsi.2009.05.018.

Gilannejad, N., Moyano, F. J., Martínez-Rodríguez, G., & Yúfera, M. (2021). Feeding protocol modulates the digestive process in senegalese sole (*solea senegalensis*) juveniles. *Frontiers in Marine Science*, 8:698403. DOI:10.3389/fmars.2021.698403

Gutierrez, F. J. (2020). La acuícultura como activo económico y social. *Mediterráneo económico,*33:289-307. ISSN 1698-3726

Hamed, S., El-Kassas, S., Abo-Al-Ela, H. G., Abdo, S. E., Abou-Ismail, U. A., & Mohamed, R. A. (2024). Temperature and feeding frequency: interactions with growth, immune response,

and water quality in juvenile Nile tilapia. *BMC, Veterinary Research*, *20*(1):520. DOI: 10.1186/s12917-024-04366-4

Hisano, H., Rossi, P. V., Losekann, M.E., & Silveira, M. (2020): Effect of feeding frequency on water quality, growth, and hematological parameters of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* reared using biofloc technology, *Journal of Applied Aquaculture*, DOI: 10.1080/10454438.2020.1715909

Hardy, R. W., & Kaushik, S. J. (2022). *Fish nutrition,* 2022:1-16. DOI: 10.1016/B978-0-12-819587-1.00006-9

Hellemans, J., Mortier, G., De Paepe, A., Speleman, F., & Vandesompele, J. (2007). qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biology*, 8:1-14. DOI: 10.1186/GB-2007-8-2-r19

Herkenhoff, M. E., Ribeiro, A. O., Costa, J. M., Oliveira, A. C., Dias, M. A. D., Reis Neto, R. V., & Pinhal, D. (2020). Expression profiles of growth-related genes in two Nile tilapia strains and their crossbred provide insights into introgressive breeding effects. *Animal Genetics*, *51*(4):611-616. DOI: 10.1111/age.12944

Hilerio-Ruiz, G.A. (2017). *Expresión del gen tripsinógeno durante la ontogenia inicial de Cichlasoma trimaculatum (Amphilophus trimaculatus)*. *Tesis de Licenciatura*. Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas. SITIO: https://hdl.handle.net/20.500.12753/2122

Holt, G. J. (2011). Larval fish nutrition. John Wiley y Sons. Inc. ISBN 978-0-8138.1792-7

Hu, Y., Xiao, K., Yang, J., Liu, X., Wang, B., Zeng, Q., & Du, H. (2020). Effects of feeding frequency on juvenile Chinese sturgeon *Acipenser sinensis*. *Scientific Reports*, 10(1):17399. 10.1038/s41598-020-74120-x

Huang, Q., Huang, K., Ma, Y., Qin, X., Wen, Y., Sun, L., & Tang, L. (2015). Feeding frequency and rate effects on growth and physiology of juvenile genetically improved farmed Nile tilapia. *North American Journal of Aquaculture*, 77(4):503–512. DOI:10.1080/15222055.2015.1066472

Huang, W., Yang, S., Cai, W., Huang, W., Liu, Y., Li, S., & Dong, X. (2025). Effect of feeding frequency on the growth, body composition, and intestinal health of hybrid grouper (*Epinephelus fuscoguttatus× E. lanceolatu*) fed a high-fat diet. *Animals*, 15(3):346.

Imentai, A., Gilannejad, N., Martínez-Rodríguez, G., López, F. J. M., Martínez, F. P., Pěnka, T. & Policar, T. (2022). Effects of first feeding regime on gene expression and enzyme activity in pikeperch (*Sander lucioperca*) larvae. *Frontiers in Marine Science*, 9:864536. DOI: 10.3389/fmars.2022.864536

Imsland, A. K., Foss, A., Roth, B., Stefansson, S. O., Vikingstad, E., Pedersen, S., ... & Norberg, B. (2008). Plasma insulin-like growth factor-I concentrations and growth in juvenile halibut (*Hippoglossus hippoglossus*): effects of photoperiods and feeding regimes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, *151*(1):66-70. DOI: 10.1016/j.cbpa.2008.05.179

Infante, J. Z., & Cahu, C. L. (2001). Ontogeny of the gastrointestinal tract of marine fish larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, *130*(4):477-487. DOI: 10.1016/S1532-0456(01)00274-5

Infante, J. Z., & Cahu, C. L. (2007). Dietary modulation of some digestive enzymes and metabolic processes in developing marine fish: applications to diet formulation. *Aquaculture*, *268*(1-4):98-105. DOI:10.1016/j.aquaculture.2007.04.032.

Ju, Z. Y., Forster, I., Conquest, L., Dominy, W., Kuo, W. C., Horgen, F. D. (2008). Determination of microbialcommunity structures of shrimp floc cultures by biomarkers and analysis of floc amino acid profiles. *Aquaculture Research,* 39(2):118–133. DOI:10.1111/j.1365-2109.2007.01856.x

Juárez-Gutiérrez, M. E., Martínez-Chávez, C. C., Godoy-Figueroa, C. Y., Jiménez-Jacinto, V., Ríos-Durán, M. G., Martínez-Palacios, C. A., & Navarrete-Ramírez, P. (2024). effects of feeding frequency on liver transcriptome: unveiling appetite-regulating peptides in mexican pike silverside (*Chirostoma estor*). *Fishes*, *9*(10):393. DOI: 10.3390/fishes9100393

Kajimura, S., Uchida, K., Yada, T., Hirano, T., Aida, K., & Grau, E. G. (2002). Effects of insulin-like growth factors (IGF-I and-II) on growth hormone and prolactin release and gene expression in euryhaline tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *General and Comparative Endocrinology*, *127*(3):223-231. DOI: 10.1016/S0016-6480(02)00055-2

Kamran, Z., Sarwar, M., Nisa, M., Nadeem, M. A., Mahmood, S., Babar, M. E., & Ahmed, S. (2008). Effect of low-protein diets having constant energy-to-protein ratio on performance and carcass characteristics of broiler chickens from one to thirty-five days of age. *Poultry Science*, *87*(3):468-474. DOI:10.3382/ps.2007-00180

Kanamori, K., & Ross, B. D. (1995). Steady-state in vivo glutamate dehydrogenase activity in rat brain measured by 15N NMR. *Journal of Biological Chemistry*, *270*(42):24805-24809. DOI: 10.1074/jbc.270.42.24805

Khatab, S. A., Hemeda, S. A., El-Nahas, A. F., & El-Naby, W. S. H. A. (2014). Genetic polymorphism in IGF-II gene and its relationship with growth rate in tilapia nilotica. *Alexandria Journal of Veterinary Sciences,* 43:26-32. DOI: 10.5455/ajvs.167827

Kist, L. T., Porciúncula, Â., & Machado, Ê. L. (2016). Avaliação dos impactos ambientais da tilápia cultivada em sistema semi-intensivo. *Revista Monografias Ambientais*, *15*(1). DOI: 10.5902/22361308

Lanna, E. A. T., Bomfim, M. A. D., Ribeiro, F. B., & Quadros, M. (2016). Feeding frequency of Nile tilapia fed rations supplemented with amino acids. *Revista Caatinga*, *29*(02):458-464. DOI:10.1590/1983-21252016v29n223rc

Li, Q., Sun, Q., Zu, L., Cheng, Y., & Wu, X. (2020). Comparison of reproductive performance and offspring quality of purple and greenblack Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis. Aquaculture Research*, 52(3):1291–1298. DOI:10.1111/are.14987

Lin, H., Deng, Y., Zhu, D., Yang, Q., Zhou, X., Tan, B.,. & Chi, S. (2023). Effects of partially replacing fishmeal with corn gluten meal on growth, feed utilization, digestive enzyme activity, and apparent nutrient digestibility for juvenile white shrimp, *Litopenaeus vannamei. Frontiers in Veterinary Science*, *10*:1162599. DOI:10.3389/fvets.2023.1162599

Liu H-Y, Chen Q, Tan B-P, *et al*. (2018). Effects of dietary carbohydrate levels on growth, glucose tolerance, glucose homeostasis and GLUT4 gene expression in tilapia nilotica. *Aquaculture Research,* 49:3735–3745. DOI: 10.1111/are.13841

Liu, W., Wen, H. & Luo, Z. (2018).Effect of dietary protein levels and feeding rates on the growth and health status of juvenile genetically improved farmed tilapia (*Oreochromis niloticus*).*Aquaculture International*, 26:153–167. DOI: 10.1007/s10499-017-0202-6

Lodish, H. B. W. H. Freeman. Lodish, H., Berk, A., Kaiser, C. A., Krieger, M., Bretscher, A., Ploegh, H., Amon, A., & Martin, K. C. (2016). Molecular cell biology. 8th edition. W.H. Freeman. ISBN 9781464183393

Long, L., Yang, J., Li, Y., Guan, C., Wu, F. (2015). Effect of biofloc technology on growth, digestive enzymeactivity, hematology, and immune response of genetically improved farmed tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture,* 448(2015):135–141. http://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.05.017

Luna-González, A., Moreno-Herrera, J. T., Campa-Córdova, Á. I., González-Ocampo, H. A., Fierro-Coronado, J. A., Álvarez-Ruíz, P., & Bueno-Ibarra, M. A. (2013). Respuesta inmune y expresión de genes en el camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) inducida por inmunoestimulantes microbianos. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 41(5):898-907.DOI:103856/vol41-issue5-fulltext-10

Luo, G., Avnimelech, Y., Pan, Y., Tan, H. (2015). Effects of temperature on inorganic nitrogen dynamics in sequencing batch reactors using biofloc technology to treat aquaculture sludge. *Aquacultural Engineering*, 52(2013):73–79. DOI:10.1016/j.aquaeng.2012.09.003

Machuca Valverde, C. A. (2021). *Efecto inmunoestimulante de β-glucanos aislados de Cystobasidium benthicum sobre células del timo de Totoaba macdonaldi*, *Tesis de Maestría.* Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, SC) LA PAZ. SITIO: http://cibnor.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1001/2446

Mahfouz, M. E., Hegazi, M. M., El-Magd, M. A., & Kasem, E. A. (2015). Metabolic and molecular responses in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* during short and prolonged hypoxia. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, *48*(5):319-340. DOI: 10.1080/10236244.2015.1055915

Martínez-Porchas, M., Martínez-Córdova, L. R., & Ramos-Enríquez, R. (2009). Dinámica de crecimiento de peces y crustáceos. *Revista Electrónica de Veterinaria,* 10(10):1-16. ISSN 11695-7504

Montserrat, N., Gabillard, J. C., Capilla, E., Navarro, M. I., & Gutiérrez, J. (2007). Role of insulin, insulin-like growth factors, and muscle regulatory factors in the compensatory growth of the trout (*Oncorhynchus mykiss*). *General and Comparative Endocrinology*, *150*(3):462-472. DOI: 10.1016/j.ygcen.2006.11.009

Morales, D. A. (1991) La Tilapia en México. biología, cultivo y pesquerías. AG Editor, S.A. ISBN: 9684630573

Morelos-Castro, R. M., Román-Reyes, J. C., Luis-Villaseñor, I. E., Ramírez-Pérez, J. S., & Rodríguez-Montes de Oca, G. A. (2020). Expression analyses of digestive enzymes during early development and in adults of the chame fish *Dormitator latifrons*. *Aquaculture Research*, 51(1):265-275. DOI: 10.1111/are.14372.

Moyano, F. J., Barros, A. M., Prieto, A., Cañavate, J. P., & Cárdenas, S. (2005). Evaluación de la ontogenia de enzimas digestivas en larvas de hurta, *Pagrus auriga* (*Pisces: Sparidae*). *AquaTIC*, (22):39-47. ISSN 1578-4541

Muin, H., Taufek, N. M., Kamarudin, M. S., & Razak, S. A. (2017). Growth performance, feed utilization and body composition of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) fed with different levels of black soldier fly, *Hermetia illucens* (Linnaeus, 1758) maggot meal diet. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, *16*(2): 567-577. DOR: 20.1001.1.15622916.2017.16.2.10.3

Muñoz, V. (2018). *Contribución del biofloc inoculado con diferentes probiótico sobre el crecimiento y niveles de actividad enzimática digestiva en juveniles de tilapia (O. niloticus Var SPRING). Tesis de Maestría* . Mexico: CiCESE. SITIO: http://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1007/2057

Murashita, K., Fukada, H., Takahashi, N., Hosomi, N., Matsunari, H., Furuita, H., Oku, H. & Yamamoto, T. (2015). Effect of feed ingredients on digestive enzyme secretion in fish. *Bulletin of Fisheries Research Agency*, 40:69–74. ISSN: 1346-9894.

Mwaura, J. G., Wekesa, C., Ogutu, P. A., & Okoth, P. (2023). Whole transcriptome analysis of differentially expressed genes in cultured nile tilapia (*O. niloticus*) subjected to chronic stress reveals signaling pathways associated with depressed growth. *Genes*, *14*(4):795. DOI:10.3390/genes14040795.

Nahayat, M., Zakeri, M., Salati, A. P., & Qasemi, S. A. (2022). Changes in the neuropeptide y mrna expression in *Oncorhynchus mykiss* at different feeding frequencies. *Aquaculture Nutrition*, *2022*(1):2080639. DOI: 10.1155/2022/2080639.

Navarro-Guillén, C., & Yúfera, M. (2025). Understanding rhythms in the digestive functionality of fish gut. *Journal of Experimental Biology*, *228*(14):jeb249942. DOI:10.1242/jeb.249942.

Nelson, D. L., Y Cox, M. M. . (2017). *Lehninger principles of biochemistry* . W. H. Freeman. ISBN-10: 1464187967

NIH. (2023) National Human Genome Research Institute. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). SITIO: https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Reacción-en-cadena-de-la-polimerasa-PCR

Nolan T, Bustin S. (2008). Procedures for quality control of RNA samples for use in quantitative reverse transcription PCR. In: *Essentials of nucleic acid analysis:* a robust approach. Royal Society of Chemistry, UK. 189-207. ISBN: 978-0-85404-367-5

Ng, W.-K., Chong, C.-Y., Wang, Y., & Romano, N. (2013). Effects of dietary fish and vegetable oils on the growth, tissue fatty acid composition, oxidative stability and vitamin E content of red hybrid tilapia and efficacy of using fish oil finishing diets. *Aquaculture,* 372:97–110. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2012.10.030.

Oh, S.-Y., Venmathi Maran, B.A. and Park, J.W. (2018), Effect of feeding frequency on growth, food consumption, proximate composition, and blood chemistry of juvenile dark-banded rockfish, *Sebastes inermis. World Aquaculture Societ*y, 49(6):994-1001. DOI:10.1111/jwas.12512.

Okuzawa, K. (2002). Puberty in teleosts. *Fish Physiology and Biochemistry*, *26*(1):31-41. DOI: 10.1023/A:1023395025374

Ohlsson, C., Mohan, S., Sjogren, K., Tivesten, A., Isgaard, J., Isaksson, O., & Svensson, J. (2009). The role of liver-derived insulin-like growth factor-I. *Endocrine Reviews*, *30*(5):494-535. DOI: 10.1210/er.2009-0010

Oliveira-Tenazoa, J.A. & Delgado-Vargas, O.O. (2019). *Efecto de la tasa y frecuencia de alimentación en el crecimiento de alevinos de Arapaima gigas (Curvier, 1829) "paiche", cultivados en tanques circulares. Tesis de Licenciatura.* Universidad Nacional de la Amazonia Peruana. Repositorio institucional https://repositorio.unapiquitos.edu.pe/handle/20.500.12737/6171.

ONU. (2015) *Transformar nuestro mundo:* la Agenda 2030 para el Desarrollo Sostenible. SITIO:https://unctad.org/system/files/official-document/ares70d1_es.pdf .

Ornelas-Luna, R., Aguilar-Palomino, B., Hernández-Díaz, A., Hinojosa-Larios, J. Á., & Godínez-Siordia, D. E. (2017). Un enfoque sustentable al cultivo de tilapia. *Acta Universitaria,* 27(5):19-25. DOI: 10.15174/au.2017.1231.

Ortega-Mejía, M., Ortega, C., Delgadillo, S., Martínez-Castañeda, S., Bautista-Gómez, L., & Valladares-Carranza, B. (2023). Fresh water fish farming in Mexico: its current status and

factors associated with its production levels. *Journal of Aquaculture & Fisheries,* 7:57. DOI:10.24966/AAF-5523/100057.

Peixoto, S., E. Silva, C. B. Costa, R. C. Nery, F. Rodrigues, J. F. Silva, R. Bezerra, and R. Soares. (2017). Effect of feeding frequency on growth and enzymatic activity of *Litopenaeus vannamei* during nursery phase in biofloc system. *Aquaculture Nutrition*, 24:579–85. DOI:10.1111/ anu.12591.

Pérez, M., Sáenz, M., & Martínez, E. (2015). Crecimiento de las tilapias *O. niloticus* en cultivo monosexual y ambos sexos, en sistemas de producción semi-intensivos. *Universitas (León)*, 6(1): 66-70. DOI:10.5377/universitas.v6i1.13697.

Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR. *Nucleic Acids Research*, *29*(9):e45-e45. DOI: 10.1093/nar/29.9.e45

Pfaffl, M.W., Tichopad, A., Prgomet, C., Neuvians, T.P. (2004). Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnology Letters*, 26:509-515. DOI:10.1023/B:BILE.0000019559.84305.47.

Prabu, E., Rajagopalsamy, C., Ahilan, B., Jeevagan, I., & Renuhadevi, M. (2019). Tilapia-An excellent candidate species for world aquaculture: A review. *Annual Research & Review in Biology*, 31:1-14. DOI: 10.9734/arrb/2019/v31i330052.

Polakof., S., Panserat, S., Soengas, J.L., Moon, T.W., 2012. Glucose metabolisme in fish: a review. *Journal of Comparative Physiology*, 182:1015-1045. DOI: 10.1007/s00360-012-0658-7

Pullin, R. S. V. y Capili, J. B. (1988). Genetic improvement of tilapias: problems and prospects. *The Second International Symposium on Tilapia in Aquaculture, Bangkok, Thailand* 259-266. ISSN 0115-4435

Pullin, R. S. V. Y Lowe-McComell, R. H. (1982). The biology and culture of tilapias. ICLARM Conference Proceedings, 432. ISBN 971-04-0003-7.

Rahman, M. H., Alam, M. A., Moniruzzaman, M., Sultana, S., & Das, B. C. (2023). Effects of different feeding frequencies on growth performance and feed conversion ratio (FCR) of tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Asian Journal of Fisheries and Aquatic Research*, *23*:49-57. ISSN: 2582-3760.

Rangel Zúñiga, O. A. (2008). *Caracterización y regulación fisiológica de enzimas implicadas en la asimilación de nitrógeno orgánico en Prochlorococcus. Tesis Doctoral.* Universidad de Córdoba, España. ISBN-13-978-84-7801-916-8

Reyna, S., Valenzuela, R., & Villanueva, M. E. (2018). Action of flavonoids on conversion of long chain polyunsaturated fatty acids from essential fatty acids. *Revista Chilena de Nutrición*, *45*(2):153-162. DOI: 10.4067/S0717-75182018000300153.

Reinecke, M., Björnsson, B. T., Dickhoff, W. W., McCormick, S. D., Navarro, I., Power, D. M., & Gutiérrez, J. (2005). Growth hormone and insulin-like growth factors in fish: Where we are and where to go. *General and Comparative Endocrinology*, 142(1-2):20-24.

Resnawati, H. (1998). The nutritional requirements for native chickens. *Bulletin of Animal Science*, *Supplement Edition,* 522-527. ISSN 0126-4400

Riche, M., Haley, D. I., Oetker, M., Garbrecht, S., & Garling, D. L. (2004). Effect of feeding frequency on gastric evacuation and the return of appetite in tilapia *Oreochromis niloticus* (L.). *Aquaculture*, 234(1-4):657–673. DOI:10.1016/j.aquaculture.2003.12.012 .

Rocha, C. P., Maciel, C. M. T., Valenti, W. C., Moraes-Valenti, P., Sampaio, I., & Maciel, C. R. (2022). Prospection of putative genes for digestive enzymes based on functional genome of the

hepatopancreas of Amazon river prawn. *Animal Sciences*, *44*:e53894. DOI:10.4025/actascianimsci.v44i1.53894.

Rojas, M. E. E. (2019). *Mecanismos moleculares involucrados en el crecimiento muscular del pargo flamenco Lutjanus guttatus, Tesis Doctoral.* Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C, Mazatlan, México. SITIO: https://ciad.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1006/1185/1/Mauricio%20Eduardo%20Escalante%20Rojas.pdf

Sandoval-Muy, M. I., Guereña-Araiza, M. A., Miranda-Baeza, A., & Rivas-Vega, M. E. (2012). Metabolismo de rutina y actividad enzimática digestiva en juveniles de tilapia (*O. mossambicus x O. niloticus*) aclimatada a diferentes salinidades. *Biotecnia*, 14(2):11-17. ISSN: 1665-1456.

Sanhueza, J., & Valenzuela, A. (2012). Nutrigenómica: revelando los aspectos moleculares de una nutrición personalizada. *Revista Chilena de Nutrición*, *39*(1):71-85. DOI:10.4067/S0717-75182012000100008

Santos, W. M., Costa, L.S., López-Olmeda, J.F., Costa, N.C.S., Santos, F.A.C., Oliveira, C.G., Guilherme, H.O., Bahiense, R.N., Luz, R.K., Ribeiro, P.A.P. (2020). Dietary protein modulates digestive enzyme activities and gene expression in red tilapia juveniles. *Animal,* 14(9):1802-1810. DOI: 10.1017/S1751731120000543.

Santos, J. F., Soares, K. L. S., Assis, C. R. D., Guerra, C. A. M., Lemos, D., Carvalho Jr, L. B., & Bezerra, R. S. (2016). Digestive enzyme activity in the intestine of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) under pond and cage farming systems. *Fish Physiology and Biochemistry*, *42*(5):1259-1274. DOI:10.1007/s10695-016-0215-5

Shearer, K. D., J. T. Silverstein, and W. W. Dickhoff. (1997). Control of growth and adiposity of juvenile Chinook Salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Aquaculture,* 157:311–323. DOI: 10.1016/S0044-8486(97)00170-1.

Srichanun, M., Tantikitti, C., Utarabhand, P., & Kortner, T. M. (2013). Gene expression and activity of digestive enzymes during the larval development of Asian seabass (*Lates calcarifer*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 165(1):1-9.DOI:10.1016/j.cbpb.2013.02.005.

Silva, M. Q. Quintero, D., Sarmiento, J. (2010). Estudio de competitividad para el sector de la industria acuícola de tilapia en la región del Huila (Colombia). Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Bucaramanga, Colombia. SITIO: http://hdl.handle.net/20.500.12749/1906

Silver N, Best S, Jiang J, Thein SL. (2006). Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR. *BMC Molecular Biology*, 7:33. DOI:10.1186/1471-2199-7-33.

Smith, L. S. (1980). Digestion in teleost fishes. In:*Fish feeds technology AO/UNDP Aquaculture Development and Coordination Programme,* 3-18. SITIO: https://www.fao.org/4/x5738e/x5738e02.html.

Soltan, M. A. (2009). Effect of dietary fish meal replacement by poultry by-product meal with different grain source and enzyme supplementation on performance, feces recovery, body composition and nutrient balance of Nile Tilapia. *Journal of Nutrition*, 8(4):395–407. DOI:10.3923/pjn.2009.395.407.

Sousa, R. M. R. D., Agostinho, C. A., Oliveira, F. A., Argentim, D., Novelli, P. K., & Agostinho, S. M. (2012). Productive performance of Nile tilapia (*O. niloticus*) fed at different frequencies and

periods with automatic dispenser. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 64:192-197. DOI:10.1590/S0102-09352012000100027

Subandiyono, S., & Hastuti, S. (2022). Growth performances, feed utilization and hematological parameters of the carp (Cyprinus carpio), according to the dietary glutamate. *Aquaculture, Aquarium, Conservation & Legislation*, *15*(2):830-839. SITIO:http://www.bioflux.com.ro/aacl

Sunarto, A., Grimm, J., McColl, K., Ariel, E., Nair, K., Corbeil, S., Holmes, B. (2022). Bioprospecting for biological control agents for invasive tilapia in Australia. *Biological Control*, 174:105020. DOI: 10.1016/j.biocontrol.2022.105020

Strable, M. S., & Ntambi, J. M. (2010). Genetic control of *de novo* lipogenesis: role in diet-induced obesity. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, *45*(3):199–214. DOI:10.3109/10409231003667500

Tanamati, F., da Silva, S. C. C., Rodriguez, M. D. P. R., Schuroff, G. P., do Nascimento, C. S., Del Vesco, A. P., & Gasparino, E. (2015). GHR and IGF-I gene expression and production characteristics associated with GH gene polymorphism in Nile tilapia. *Aquaculture*, *435*:195-199. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2014.09.033

Tekinay, A. (1999). Dietary interactions influencing feed intake, nutrient utilisation and appetite regulation in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss.Doctoral Thesis.* University of Plymouth. DOI: 10.24382/3332

Telles, F. S., Romero, J. M., Galindo, C. G., & Pulido, H. G. (2019). Relaciones talla-peso y factor de condición de la tilapia *Orecochromis niloticus* en cinco cuerpos de agua del estado de Jalisco, México. CIBA *Revista Iberoamericana de las Ciencias Biológicas y Agropecuarias*, 8(16):82-105. DOI:10.23913/ciba.v8i16.92

Terrones España, S., & Reyes Avalos, W. (2018). Efecto de dietas con ensilado biológico de residuos de molusco en el crecimiento del camarón *Cryphiops caementarius* y Tilapia *O. niloticus* en co-cultivo intensivo. *Scientia Agropecuaria,* 9(2):167-176. DOI: 10.17268/sci.agropecu.2018.02.01

Tocher, D. R. (2003): Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish. *Reviews in Fisheries Science,* 11:2:107-184. DOI: 10.1080/713610925

Toledo-Solis F. J., Márquez-Couturier G., Uscanga-Martínez A., Guerrero-Zárate R., Perales-Garcia N., Martínez-García R., Álvarez-Gonzales C. A. (2016). Partial characterization of digestive proteases of the three-spor cichlid *Cichlasoma trimaculatum* (Günter 1867). *Aquaculture Nutrition,* 22(6):1230-1238. https://doi.org/10.1111/anu.12329

Thongprajukaew, K., Kovitvadhi, U., Kovitvadhi, S., Somsueb, P., & Rungruangsak-Torrissen, K. (2011). Effects of different modified diets on growth, digestive enzyme activities and muscle compositions in juvenile Siamese fighting fish (*Betta splendens* Regan, 1910). *Aquaculture*, 322:1-9. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2011.10.006

Thongprajukaew, K., Kovitvadhi, S., Kovitvadhi, U., & Preprame, P. (2017). Effects of feeding frequency on growth performance and digestive enzyme activity of sex-reversed Nile tilapia, *O. niloticus* (Linnaeus, 1758). *Agriculture and Natural Resources*, 51(4):292-298. DOI: 10.1016/j.anres.2017.04.005

Tian, J., Wen, H., Zeng, L. B., Jiang, M., Wu, F., Liu, W., & Yang, C. G. (2013). Changes in the activities and mRNA expression levels of lipoprotein lipase (LPL), hormone-sensitive lipase (HSL) and fatty acid synthetase (FAS) of Nile tilapia (*O. niloticus*) during fasting and re-feeding. *Aquaculture,* 400:29-35. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2013.01.032

Torres-Novoa, D. M., & Hurtado-Nery, V. L. (2012). Requerimientos nutricionales para tilapia del Nilo (*O. niloticus*). *Orinoquia,* 16(1):63-68. DOI:10.22579/20112629.266

Trewavas, E. (1983). Tilapiine fishes of the genera *Sarotherodon, Oreochromis* and *Danakilia.* London, British Museum *Natural History,* 878. ISBN 0-565-00878-1

Urías-Sotomayor, R., & Maeda-Martínez, A. N. (2023). La producción de tilapia del Nilo *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) en México como una alternativa para fortalecer la seguridad alimentaria nacional. *Estudios sociales. Revista de Alimentación Contemporánea y Desarrollo Regional*, *33*(62). DOI: 10.24836/es.v33i62.1322

Uscanga Martínez, A. (2020). *Estudios de la función digestiva y evaluación de ingredientes proteicos en tres cíclidos (Petenia splendida, Mayaheros urophthalmus, Oreochromis niloticus) cultivados en México. Tesis Doctoral.* Universidad de La Palmas de Gran Canaria. SITIO: https://accedacris.ulpgc.es/bitstream/10553/76615/1/Uscanga_Martinez_Arkady.pdf

Valasek, M.A., & Repa, J. J. (2005) The power of real-time PCR. *Advances in Physiology Education*, 29 (3):151-159. DOI:10.1152/advan.00019.2005

Vega-Villasante, F. Rojas.-Sahagún, C., Espinosa-Chaurand, L. D., Zuñiga-Medina, L. M., Y Nolasco-Soria, H. (2011). Efecto de la frecuencia de alimentación sobre el crecimiento y supervivencia de *O. aureus* en cultivos experimentales*. Revista Electrónica de Veterinaria*, 12:1-13. E-ISSN I 695-7504.

Verdugo, C. I. M., Marín, E. S. P., Álvarez-Villagómez, C. S., Pérez-Jiménez, G. M., Sepúlveda-Quiroz, C. A., de la Rosa, S. D. C., & Gonzalez, C. A. A. (2022). Efecto de manano-oligosacáridos en el crecimiento, actividad de enzimas digestivas y expresión de genes relacionados a la mucosa intestinal de larvas de pejelagarto *Atractosteus tropicus*. *Avances en Nutrición Acuicola,* 1(1):394-412. ISBN:978-607-27-1732-9.

Voet, D., & Voet, J. G. (2011). Biochemistry. *Wiley*. ISBN: 978-0-470-57095-1

Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., Speleman, F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology,* 3:0034. DOI: 10.1186/gb-2002-3-7-research0034

Villarroel, M., Robaina, L., & Izquierdo, M. (2005). Expresión diferencial de genes en tilapia *Oreochromis niloticus* (L.1758) bajo estrés alimentario. *Boletín Instituto Español de Oceanografía*, 21:1-4. ISSN 0074-0195

Voss, C. M., Arildsen, L., Nissen, J. D., Waagepetersen, H. S., Schousboe, A., Maechler, P., ... & Walls, A. B. (2021). Glutamate dehydrogenase is important for ammonia fixation and amino acid homeostasis in brain during hyperammonemia. *Frontiers in Neuroscience,* 15:646291. DOI: 10.3389/fnins.2021.646291

Wang, Y., Kong, L.-J., Li, K., & Bureau, D. P. (2007). Effects of feeding frequency and ration level on growth, feed utilization and nitrogen waste output of cuneate drum (*Nibea miichthioides*) reared in net pens. *Aquaculture,* 271(1-4):350–356. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2007.03.022

Wang, D.-S., Jiao, B., Hu, C., Huang, X., Liu, Z., & Cheng, C. H. K. (2008). Discovery of a gonad-specific IGF subtype in teleost. *Biochemical and Biophysical Research Communications,* 367(2):336-341.DOI:10.1016/j.bbrc.2007.12.136

Wang, X. X., Chen, M. Y., Wang, K., & Ye, J. D. (2017). Growth and metabolic responses in Nile tilapia (*O. niloticus*) subjected to varied starch and protein levels of diets. *Italian Journal of Animal Science,* 16(2):308-316. DOI: 10.1080/1828051X.2016.1275953

Wang, C., Xie, S., Zheng, H., Chen, F., & Fang, Y. (2022). Effects of feeding frequency on the growth, body composition and SOD, GPX and HSP70 gene expression in *Schizothorax wangchiachii*. *Aquaculture Reports*, *22*:100942. DOI: 10.1016/j.aqrep.2021.100942

Werner, H., Hernández-Sánchez, C., Karnieli, E., & Leroith, D. (1995). The regulation of IGF-I receptor gene expression. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, *27*(10):987-994. DOI: 10.1016/1357-2725(95)00074-Y

Won, E.T., Baltzelgar, D.A., Picha, M.E. & Borski, R.J. (2012). Cloning and chatracterization of leptin in a Perciform fish, the striped bass (*Morone saxatilis*): Control of feeding and regulation by nutritional state. *General and Comparative Endocrinology,* 178:98-107. DOI: 10.1016/j.ygcen.2012.04.019

Xie, F., Q. Ai, K. Mai, W. Xu, & H. Ma. (2011). The optimal feeding frequency of large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*, Richardson) larvae. *Aquaculture,* 311:162–67. DOI:10.1016/j.aquaculture.2010.12.005.

Xu, W., Pan, L. (2012). Effects of bioflocs on growth performance, digestive enzyme activity and body composition of juvenile *Litopenaeus vannamei* in zero-water exchange tanks manipulating C / N ratio in feed. *Aquaculture,* 356:147–152. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2012.05.022

Xu, Z., Gan, L., Li, T., Xu, C., Chen, K., Wang, X., & Li, E. (2015). Transcriptome profiling and molecular pathway analysis of genes in association with salinity adaptation in Nile tilapia *Oreochromis niloticus. PLoS One*, *10*(8):e0136506. DOI: 10.1371/journal.pone.0136506

Xu, H., Ren, M., Liang, H., Ge, X., Ji, K., Huang, D. Wu, L. (2022). Interactive effects of water salinity and dietary methionine levels on growth performance, whole-body composition, plasma parameters, and expression of major nutrient metabolism genes in juvenile genetically improved farmed tilapia (*O. niloticus*). A*quaculture*, 546:737381. DOI:10.1016/j.aquaculture.2021.737381

Xu, B., Wen, Z., Zheng, C., Tang, S., Xiao, T., Qiu, Y., & Liu, Q. (2025). Feeding frequency affects the growth performance and intestinal health of juvenile red-tail catfish (*Hemibagrus wyckioides*) with the same amount of daily feed. *Animals*, *15*(11):1621. DOI:10.3390/ani15111621

Young, J.A. y Muir, J. F. (2002). Tilapia:both fish and fowl . *Marine Resource Economics,* 17(2): 163-173. DOI:10.1086/mre.17.2.42629359

Younis, E. S. M., Al-Quffail, A. S., Al-Asgah, N. A., Abdel-Warith, A. W. A., & Al-Hafedh, Y. S. (2018). Effect of dietary fish meal replacement by red algae, *Gracilaria arcuata*, on growth performance and body composition of Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Saudi Journal of Biological Sciences*, *25*(2):198-203. DOI: 10.1016/j.sjbs.2017.06.012

Yúfera, M. (2017). El ciclo diario de la digestión en peces cultivados. aspectos funcionales y metodológicos. *Avances en Nutrición Acuicola*, 55-77 URL: http://hdl.handle.net/10261/179681

Zammit, V. A., & Newsholme, E. A. (1976). The maximum activities of hexokinase, phosphorylase, phosphofructokinase, glycerol phosphate dehydrogenases, lactate dehydrogenase, octopine dehydrogenase, phosphoenolpyruvate carboxykinase, nucleoside diphosphatekinase, glutamate-oxaloacetate transaminase and arginine kinase in relation to carbohydrate utilization in muscles from marine invertebrates. *Biochemical Journal*, *160*(3):447-462. DOI: 10.1042/bj1600447

Zafra Trelles, A. M., Díaz Barboza, M. E., Dávila Gil, F. A., Fernández Chumbe, R. E., Vela Alva, K. A., & Guzmán Santiago, H. H. (2019). Conversión y eficiencia alimenticia de *O. aureus* var.

suprema (Cichlidae) con diferente alimento balanceado en sistema cerrado, Trujillo, La Libertad, Perú. *Arnaldoa*, 26(2):815-826. DOI: 10.22497/arnaldoa.262.26219.

Zhang, H., Xia, P., Feng, L., Jia, M., & Su, Y. (2021). Feeding frequency modulates the intestinal Transcriptome without affecting the gut microbiota in pigs with the same daily feed intake. *Frontiers in Nutrition*, 8:743343. DOI:10.3389/fnut.2021.743343

Zhao, Y., Zhang, C., Zhou, H., Song, L., Wang, J., & Zhao, J. (2020). Transcriptome changes for Nile tilapia (*O. niloticus*) in response to alkalinity stress. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Preotomics,* 33:100651. DOI: 10.1016/j.cbd.2019.100651

Zhong, H., Lou, C., Ren, B. & Zhou,Y. (2022) Insulin-like growth factor 1 injection changes gene expression related to amino acid transporting, complement and coagulation cascades in the stomach of tilapia revealed by RNA-seq. *Frontiers in Immunology,* 13:959717. DOI:10.3389/fimmu.2022.959717