



Ciencia Latina
Internacional

Ciencia Latina Revista Científica Multidisciplinar, Ciudad de México, México.
ISSN 2707-2207 / ISSN 2707-2215 (en línea), enero-febrero 2024,
Volumen 8, Número 1.

DOI de la Revista: https://doi.org/10.37811/cl_rcm.v8i1

**RESPUESTA BIOLÓGICA E INMUNE EN JUVENILES
DE TILAPIA ROJA (OREOCHROMIS MOSSAMBICUS
X O. NILOTICUS) CON INCLUSIÓN DE
BIOPOLÍMERO NATURAL EN DIETA**

**BIOLOGICAL AND IMMUNE RESPONSE IN JUVENILE RED
TILAPIA (OREOCHROMIS MOSSAMBICUS X O. NILOTICUS)
WITH INCLUSION OF NATURAL BIOPOLYMER IN DIET**

Mosquera Ponce Janeth Del Carmen
Universidad Estatal Amazónica, Ecuador

Muñoz Pinela Abel Guillermo²
Universidad Estatal Amazónica, Ecuador

DOI: https://doi.org/10.37811/cl_rcm.v8i1.10112

Respuesta Biológica e Inmune en Juveniles de Tilapia Roja (*Oreochromis Mossambicus* X *O. Niloticus*) con Inclusión de Biopolímero Natural en Dieta

Janeth Del Carmen Mosquera Ponce¹jd.mosquerap@uea.edu.ec<https://orcid.org/0009-0003-8346-1645>Universidad Estatal Amazónica
Ecuador**Abel Guillermo Muñoz Pinela**abel.munoz2014@uteq.edu.ec<https://orcid.org/0000-0003-1060-7714>Universidad Estatal Amazónica
Ecuador

RESUMEN

El uso de bioestimulantes en dietas para peces es de gran interés actualmente. Se evaluó la respuesta inmune y bioquímica en juveniles de tilapia roja (*Oreochromis mossambicus* x *O. niloticus*), con diferentes niveles: 0 (control), 1, 2, 3, 4 y 5% de suplementación de quitosano en dieta. Se sembraron inicialmente 270 animales, con un peso promedio de 7.53 ± 0.50 g, distribuidos en un diseño completamente al azar, en 18 tanques=réplicas (tres réplicas/tratamiento). Se realizó un análisis de varianza y una prueba de medias con LSD de Fisher. Los juveniles se alimentaron durante 55 días y se tomaron muestras de sangre a los 56. Se encontró una mejor respuesta en el crecimiento (TCE = 15.2), aprovechamiento del alimento (FCA = 0.76) y supervivencia (SP =100%) cuando se le alimenta 4% de quitosano en dieta ($p < 0.05$). Los resultados bioproductivos más bajos fueron encontrados en tratamiento control (0% de quitosano). Con respecto a las variables: contenido de leucocitos y actividad antioxidante se encontró mejor respuesta significativamente ($p < 0,05$) cuando se incluye quitosano en un 3 y 4 % en dieta. Se concluyó que la respuesta bioquímica e inmune juveniles de tilapia roja se favoreció con la inclusión de quitosano en dieta.

Palabras clave: supervivencia, inmunoestimulante, leucocitos, superóxido dismutasa

¹ Autor principal

Correspondencia: jd.mosquerap@uea.edu.ec

Biological and Immune Response in Juvenile Red Tilapia (*Oreochromis Mossambicus* X *O. Niloticus*) with Inclusion of Natural Biopolymer in Diet

ABSTRACT

The use of biostimulants in fish diets is currently of great interest. The immune and biochemical response was evaluated in juvenile red tilapia (*Oreochromis mossambicus* x *O. niloticus*), with different levels: 0 (control), 1, 2, 3, 4 and 5% dietary chitosan supplementation. Initially 270 animals were sown, with an average weight of 7.53 ± 0.50 g, distributed in a completely random design, in 18 tanks = replicates (three replicates / treatment). An analysis of variance and a mean test with Fisher's LSD were performed. Juveniles were fed for 55 days and tissue and blood samples were taken at 56. A better response was found in growth (TCE = 15.2), feed use (FCA = 0.76) and survival (SP = 100%) when 4% chitosan is fed in the diet ($p < 0.05$). The lowest bioproductive results were found in the control treatment (0% chitosan). Regarding the variables: leukocyte content and antioxidant activity, a significantly better response was found ($p < 0.05$) when chitosan is included in 3 and 4% in the diet. It was concluded that the biochemical and immune response of juvenile red tilapia was favored with the inclusion of chitosan in the diet.

Keywords: survival, immunostimulant, leukocytes, superoxide dismutase

Artículo recibido 29 diciembre 2023
Aceptado para publicación: 30 enero 2024



INTRODUCCIÓN

La acuicultura ha crecido de manera exponencial en los últimos 50 años, partiendo de una producción de menos de 1 millón de toneladas (t) en 1950 a más de 80 millones t a nivel mundial en los últimos años (FAO, 2020). Uno de los principales factores que incide en el éxito de esta industria es la selección de especies con alto potencial productivo, las cuales son ricas en proteínas y variedad de ácidos grasos insaturados (Jim et al., 2017), tal es el caso de la tilapia roja, de la cual existen híbridos como *Oreochromis mossambicus* x *O. niloticus* (Méndez-Martínez et al., 2019).

En Ecuador la tilapia roja se introdujo en 1993, y es la segunda especie de importancia en la acuicultura después del camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*), donde el cultivo comercial de tilapia nace a partir de la aparición del virus de la mancha blanca que afectó la producción camaronera, dejando infraestructuras disponibles. En la actualidad, la tilapia se cultiva en sistemas intensivos y semintensivos donde los requerimientos nutricionales son satisfechos con dietas artificiales; pero debido a las condiciones de cultivo como las altas densidades de siembra y limitada calidad de agua, promueve que los organismos se encuentran sujetos a estrés constante que se traduce en bajas tasas de crecimiento, ineficiencia alimenticia y bajas supervivencias (Lara-Flores et al., 2005; Al-Sagheer et al., 2018), lo cual a su vez ha provocado brotes de patógenos e infecciones que conllevan daño sustancial al rendimiento (Brum et al., 2017). Se ha encontrado que el estrés oxidativo en los peces puede producir leucopenia y cambios en la fórmula leucocitaria (Biller and Takahashi, 2018), además de efectos en células y tejidos de mutagénesis y carcinogénesis (Malachy et al., 2017).

Entre los factores limitantes de las producciones acuícolas esta la carencia de herramientas inmunoterapéuticas profilácticas que reduzcan el efecto de enfermedades en los diferentes cultivos (Kumari et al., 2006, Brum et al., 2017), que favorezcan no solo las funciones del sistema inmunológico, sino también los factores metabólicos, tasa de crecimiento (Heo et al., 2001; Fadl et al., 2020) y sean amigables con el medio ambiente.

Los inmunoestimulantes pueden activar respuestas inmunes no específicas y / o específicas, donde los mecanismos de defensa incluyen procesos metabólicos antioxidantes no enzimáticos y enzimáticos cuyas funciones pueden depender de cantidades óptimas de inmunoestimulantes para expresar este tipo de respuestas contra condiciones estresantes o presencia de patógenos (Mehana et al., 2015; Abdel-



Ghany et al., 2019), además de considerarse una estrategia prometedora para reducir el uso de antibióticos y productos quimioterapéuticos, potenciar la respuesta productiva y disminuir las pérdidas económicas (Mehana et al., 2015, Ayyat et al., 2018).

En este sentido el quitosano se ha convertido en un candidato, dado a que este polisacárido alcalino natural (b-1,4-N-acetilglucosamina) con cargas positivas más abundantes (Lin et al., 2009); biodegradable no tóxico, que contiene grupos amino e hidroxilo, y da al quitosano diversas propiedades: hemostática, antiinflamatorio, actividad antitumoral, actividad antimicrobiana, actividad hipoglucémica e hipo colesterol y un efecto estimulador catabólico y anabólico (Pérez et al., 2014; Mahmoud et al., 2017; Udo et al., 2018).

Alishahi y Aider (2012), encontraron que es una alternativa potencial como fuente de precaución para abordar el estrés de los peces. Se ha documentado la actividad bioestimuladora del quitosano en peces como la trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) (Sakai et al., 1992), dorada (*Sparus aurata*) (Esteban et al., 2001), lubina juvenil (*Dicentrarchus labrax*) (Zaki et al., 2015), *Labeo rohita* (Mastan, 2015), y bagre africano (*Clarias gariepinus*) (Udo et al., 2018). Sin embargo, el efecto del quitosano en la dieta sobre aspectos inmunológicos, bioquímicos y metabólicos en peces como la tilapia no ha recibido mucha atención. La presente propuesta se desarrolló para evaluar el efecto del quitosano en dieta sobre aspectos bioproductivos e inmune de juveniles de tilapia roja.

En el sector acuícola existen diferentes causas que afectan el cultivo de tilapia roja. Los desbalances nutricionales en las dietas para peces, el mal manejo de los sistemas de producción, y el elevado costo del balaceado comercial, influyen de manera negativa en la producción de tilapia roja de buena calidad, acarreando consigo efectos desfavorables como: sistema inmune débil, presencia de enfermedades, bajos rendimientos productivos, baja supervivencia de los juveniles, poca rentabilidad y elevados costos de producción. Intentando solucionar esta problemática, han surgido diferentes estrategias como la suplementación de probióticos, prebióticos y/o bioestimulantes en la dieta para ayudar a incrementar el metabolismo, la respuesta fisiológica y productiva y reducir la tasa de mortalidad de las especies en cultivo. El quitosano es un biopolímero, que puede potenciar los mecanismos de defensa celular, debido al aumento de la inmunidad humoral, además de estimular y mejorar la respuesta metabólica y por ende productiva.



Si se incluye quitosano en dieta peletizada se pudiera lograr una óptima respuesta biológica e inmune en juveniles de tilapia roja (*Oreochromis mossambicus* x *Oreochromis niloticus*) y una alternativa económica - amigable con el medio ambiente.

El objetivo principal de esta investigación es evaluar el efecto de la inclusión del biopolímero quitosano en la alimentación de juveniles de tilapia roja (*Oreochromis mossambicus* x *Oreochromis niloticus*).

METODOLOGÍA

La investigación se realizó en el Centro de Investigación, propiedad de la Universidad Estatal Amazónica, localizada en la ciudad de Santa Clara, provincia de Pastaza, cuya ubicación geográfica es de -77.99" de latitud sur y 79°29'22" de longitud oeste y a una altura de 73 msnm. En la tabla 1 se muestran las condiciones agroclimáticas.

Diseño de Investigación

Se aplicó un diseño enteramente al azar (DCA) bajo condiciones controladas de laboratorio a lo largo de 55 días, para un total de 6 tratamientos (0, 1, 2, 3, 4 y 5% de quitosano en dieta) como variable independiente, con 3 repeticiones (tanques de plástico), las dosis se establecieron desde resultados en otros trabajos. Se empleó una densidad de 15 peces/tanque, los cuales se colocaron en 18 tanques operados con 90 L agua, para un total de 270 peces y se evaluaron como variables dependientes parámetros biológicos e inmunológicos.

Instrumentos de investigación

En la presente investigación las dietas se formularon (Tabla 2) utilizando software (LINDO Systems, Inc. IL, USA) y se prepararon siguiendo los procedimientos para esta y otras especies. Todos los ingredientes se tamizaron con una malla de 250 μm , se pesaron con una balanza digital y cada dieta se preparó mezclando todos los macro ingredientes en una licuadora industrial hasta obtener una mezcla homogénea, los micro ingredientes y los aceites también se mezclaron individualmente antes de agregarlos a la mezcla con los macro ingredientes. Durante este paso se añadió el 30% de su peso en agua. La mezcla se pasó por un molino de carne para obtener los pellets de 2mm. El producto obtenido se secó durante 8 horas a 45 °C en una estufa. Una vez secados se envasaron en bolsas de plástico herméticas y se almacenaron en refrigerador a -4 °C hasta cada uso (Méndez-Martínez et al., 2019; 2021).



A los ingredientes y dietas se le realizó análisis bromatológico (Tabla 3) según AOAC (2019), donde el contenido de humedad se determinó a través de la utilización de estufa, secando a 105°C cada dieta. Para la obtención de ceniza cada muestra se incineró a 550°C colocada en Mufla. La grasa se evaluó mediante la técnica de extracción Soxhlet, las grasas de la muestra se extrajeron con éter de petróleo y evaluadas como porcentaje del peso después de evaporar el solvente.

Para determinar el contenido de proteína fue por el método de Kjeldahl mismo que evalúa el contenido de nitrógeno total en la muestra, después de ser digerida con ácido sulfúrico en presencia de un catalizador de mercurio o selenio. La fibra se determinó por el método de Weende, después de ser digerida con soluciones de ácido sulfúrico e hidróxido de sodio y calcinado el residuo, la diferencia de pesos después de la calcinación indicó la cantidad de fibra presente. El extracto libre de nitrógeno al ser una categoría del sistema Weende se obtuvo por diferencia; $ELN = 100 - (\text{ceniza} + \text{extracto etéreo} + \text{proteína} + \text{fibra})$.

Los juveniles de tilapia roja se obtuvieron del Programa de Piscicultura de la Facultad de Ciencias Agropecuarias en el campus “La María” y trasladados al Laboratorio de Acuicultura donde tuvieron una semana de adaptación, donde fueron desparasitados con Stress Zyme. Todos los tanques experimentales se sifonearon diariamente en las mañanas previo a alimentar para desechar las heces y alimentos sobrantes y entre el 20 y 30% de agua era reemplazada. Los juveniles ser alimentaron inicialmente a una tasa del 5% de la biomasa día-1 dividido en 2 raciones 40% a las 9:00 horas y 60% a las 17:00 horas.

A lo largo del cultivo se realizó el control de los factores físico-químicos del agua, la temperatura se determinó con un termómetro de mercurio, el oxígeno disuelto con un oxímetro digital, para el análisis del pH, amonio, nitritos y nitratos se empleó con kit colorimétrico (Saltwater Master Test).

Los parámetros de calidad de agua fueron adecuados y se mantuvieron dentro de los límites establecidos para la tilapia roja durante los días de investigación (Tabla 4).

Los peces se pesaron individualmente en una balanza digital y el total de la longitud se determinó con un pie de rey (vernier). El registro del peso y crecimiento de los peces se llevó mediante un libro de campo (bitácora) para elaborar la base de datos, procesarlos estadísticamente y expresarlos en los resultados. La ingesta de alimento se determinó evaluando la saciedad aparente. Los gránulos no

consumidos fueron secados a 50 °C durante 18 horas en un horno de flujo de aire. Las siguientes formulas se aplicaron para obtener los parámetros (Méndez-Martínez et al., 2020; 2021):

(Ecuación 1)

$$\text{Incremento de peso (\%)} = 100 \times (Y2 - Y1)$$

(Ecuación 2)

$$\text{Ganancia de peso} = (Y2 - Y1)$$

(Ecuación 3)

$$\text{Tasa de crecimiento específico (TCE)} = \frac{[\ln Y2 - \ln Y1]}{t} \times 100$$

(Ecuación 4)

$$\text{Tasa de supervivencia (SR, \%)} = (\text{número final de alevines} / \text{número inicial de alevines}) \times 100$$

(Ecuación 5)

$$\text{Tasa de conversión alimenticia (C.A)} = \text{alimento ingerido} / \text{Peso ganado}$$

(Ecuación 6)

$$\text{Eficiencia alimenticia (E.A.)} = \text{Peso ganado} / \text{alimento ingerido} * 100$$

Dónde:

Y1 y Y2 Peso o Talla al inicio y al final del experimento. t1 y t2 Tiempo al inicio y al final del experimento.

Después de 55 días de ingesta de alimentos de los juveniles, se dejaron en inanición 14 horas antes de tomar muestras de sangre, para ello los juveniles se anestesiaron con solución de eugenol: alcohol (relación 1:3 mL en 10 L de agua), durante 2 min. Las muestras de sangre se obtuvieron según lo indicado por Azizoglu and Cengizler (1996), por venopunción caudal con jeringas desechables de 3 mL y depositada en tubos vacutenier (Vacuette, Laborgeräte GmbH, Eschau, DE), y se conservaron en refrigeración a 4 °C por 24 h. Luego se centrifugaron (Gemmy, PLC-05, Taipei, TW) a 1200 rpm durante 10 min para separar el plasma de los elementos formes.

Recuento total de leucocitos

El recuento total de leucocitos se realizó en cámara de Neubauer de 0.0025 mm² (Optic Labor, DE); se dejó reposar 3 min para que sedimenten los leucocitos y realizar el conteo manual, para eso se tomó

muestra de sangre con una pipeta de Thoma para glóbulos blancos, se hizo una dilución 1:20 usando ácido acético que deshace a los eritrocitos (Hrubec y Smith, 2010). El azul de metileno posibilita reconocer de forma sencilla el líquido y mirar mejor los glóbulos blancos, a los que tiñe sutilmente.

(Ecuación 7)

$$N \times 20 \times 10 = N \times 50 / 4$$

Donde:

N= Número de leucocitos contados

20= Título de la dilución.

10= Corrección de la profundidad de la cámara

4= Total de cuadros contados.

Enzima superóxido dismutasa

Se lavaron los eritrocitos 4 veces con 3,0 mL de solución de NaCl al 0,9 %, centrifugando durante 10 min a 3000 rpm después de cada lavado. Se empleó el Kit (Ransel, Randox, Crumlin, Antrim, UK), basado en metodología de McCord y Fridovich (1969), con principio en la oxidación de glutatión (GSH) por el hidropéroxido de cumeno catalizado por la GPx; en presencia de glutatión reductasa (GR) y NADPH; y se realizó lectura de absorbancia a 340nm.

El análisis estadístico de los resultados se mostró como medias \pm desviación estándar (SD). Las pruebas de Kolmogory – Smirnov ($P < 0.05$) y Bartlett ($P < 0.05$) se aplicaron previo al estudio de varianza (ANOVA). Una vez que se observaron valores significativos para F, se usó la prueba de rango múltiple de Duncan para equiparar las diferencias entre medias de los tratamientos, en $P < 0.05$. se aplicó el programa Minitab. Todos los datos porcentuales se transformaron antes de los estadísticos en Logn.

RESULTADO

El comportamiento de los indicadores bioproductivos: peso vivo, ganancia de peso, incremento en peso, factor de conversión alimenticia, eficiencia alimentaria, durante los 55 días se puede observar en la Tabla 5. Dichos resultados mostraron diferencias significativas ($P < 0.05$), una vez finalizado el periodo de alimentación.

El crecimiento (18.09 g de peso) y la conversión de alimento (0.76) final más adecuado para $P < 0.05$, se produjo en los juveniles alimentados con la dieta que contiene quitosano en dieta en un 4 %, el cual



fue significativamente diferente de los otros tratamientos. La mayor proporción de tasa de crecimiento (1.52) y la eficiencia proteica (0.80) se produjo en los juveniles alimentados con la dieta que contiene quitosano en dieta en un 4 %, que fue significativamente diferente de los tratamientos con menor y mayor contenido de quitosano. Se encontró un menor nivel de desempeño bioproductivo en los organismos alimentados con el tratamiento control con 0 % de quitosano (Tabla 5).

En cuanto al índice de supervivencia (Tabla 5). también se encontró diferencias significativas ($P \leq 0.05$) entre tratamientos, sin embargo, durante el tiempo de experimento el tratamiento con 4% inclusión de quitosano presentó una supervivencia del 100% el cual no difirió con respecto al tratamiento con 3% de quitosano en dieta con 97.78%, pero si con respecto los demás tratamientos.

En el presente estudio, la actividad de la enzima superóxido dismutasa (Ilustración 1) se vio significativamente influenciada ($p < 0,05$) por los niveles de quitosano en la dieta mostrando una mayor actividad en los tratamientos con 3 y 4 % de quitosano en dieta, mientras que los valores más bajos se alcanzaron en tratamiento con un 1%.

Con respecto al contenido de leucocitos, se observó una respuesta significativa ($p < 0,05$) al incluirse quitosano en dieta al 3 y 4% (Ilustración 2) se encontró mayor contenido de leucocitos, no difiriendo entre estos dos tratamientos, pero si con respecto a los demás, encontrándose que los valores más bajos fueron para el tratamiento control (0% de quitosano).

DISCUSIÓN

A pesar de las propiedades biológicas únicas del quitosano, se sabe poco sobre los efectos de los diferentes niveles de quitosano sobre el rendimiento bioproductivo e inmune en tilapia roja. Los datos disponibles han revelado que el quitosano en dieta puede afectar de manera positiva el crecimiento, y parámetros inmunes.

Este estudio demuestra que los juveniles de tilapia alimentados con una dieta fortificada con diferentes niveles de quitosano, particularmente a la concentración de 4% en dieta, tuvieron un peso vivo, ganancia de peso, incremento en peso, factor de conversión alimenticia, eficiencia alimentaría y supervivencia significativamente más altos en comparación con los demás niveles de inclusión y el grupo de control. Nuestros hallazgos concuerdan con los reportados por Wang y Li (2011) en *O. niloticus* y Udo et al. (2018) en *Clarias gariepinus*. La mejora en la tasa de crecimiento y la utilización del alimento después

de la adición de quitosano podría estar relacionada con distintas vías metabólicas en los peces en comparación con el quitosano, que podría haber jugado un papel crucial en la mejora de la asimilación y absorción de nutrientes que en concentraciones más bajas en la tilapia (Gopalakannan y Arul, 2006). La influencia de mejora del crecimiento y supervivencia con quitosano también podría estar fuertemente relacionada con su potente actividad antibacteriana (Huang et al., 2009; de Paz et al., 2011) como es evidente a partir de la fuerte inhibición dosis-dependiente de aeróbicos intestinales totales y poblaciones de bacterias anaerobias en los peces. La actividad antibacteriana del quitosano podría ser atribuido a su naturaleza policatiónica debido a la presencia de grupos amina primarios en sus unidades repetidas. Estos grupos amina se unen a la pared celular bacteriana que está cargada negativamente, y permite alterar la permeabilidad de la membrana de la célula y, posteriormente se une al ADN, lo que lleva a la inhibición de la replicación del ADN y la muerte celular (Nagy et al., 2011; Divya et al., 2017).

Los resultados obtenidos en nuestro trabajo pueden deberse a que la suplementación con quitosano en dieta mejoró la digestión y digestibilidad de nutrientes en los juveniles de tilapia, lo que condujo a una mejor utilización y/o asimilación de nutrientes, lo que, a su vez mejoró la ingesta de alimento, el crecimiento y supervivencia. Otra hipótesis es que el quitosano puede inhibir patógenos potenciales, mejorar la población de microorganismos benéficos y mejorar las actividades de las enzimas microbianas del intestino de los peces, en consecuencia, mejoran la digestibilidad del alimento y la absorción y asimilación de los nutrientes. La investigación realizada por Lin et al. (2012), en alevines de carpa (*Cyprinus carpio*), encontraron que el quitosano tiene un efecto positivo en la respuesta inmune y en resistencia a agentes patógenos lo cual contribuye a una mejora en la supervivencia.

En nuestro trabajo también se encontró que la enzima superóxido dismutasa (Ilustración 1) se vio influenciada significativamente ($p < 0,05$) por los niveles de quitosano en la dieta. Esta enzima es una de las principales enzimas antioxidantes, aunque el sistema inmune antioxidante consiste en varias enzimas involucradas en reacciones oxidativas que producen una reducción del estrés oxidativo (Soberanes-Yepiz et al., 2018). La actividad antioxidante del quitosano podría atribuirse a las actividades de captación de radicales libres sobre los radicales hidroxilos y sus capacidades quelantes (Ngo y Kim, 2014). El quitosano puede quelar los iones metálicos o eliminar los radicales libres mediante la donación de hidrógeno o un par de electrones (Lin et al., 2009).



Se ha encontrado que los peces con deficiencias nutricionales son propensos al estrés oxidativo causado por temperaturas extremas, hipoxia, enfermedades y contaminación (Li et al., 2003; Villa-Cruz et al., 2009). Un aumento de la actividad de superóxido dismutasa en puede ser como consecuencia de una respuesta a cambios en la composición lipídica de las membranas celulares de los leucocitos, probablemente debido a deficiencias nutricionales, que interfieren con la producción de factores activadores de células (citocinas o chaperoninas) que mejoran o disminuyen la capacidad fagocítica (Villa-Cruz et al., 2009). Arun y Subramanian (1998) y Soberanes-Yepiz et al. (2018), estudiaron la actividad de superóxido dismutasa en diferentes tejidos de langostinos *M. malcolmsonii* y *M. americanum* respectivamente, sugiriendo que mayores valores de antioxidantes son consecuencia de múltiples reacciones oxidativas, por tanto, esto pudiera indicar ser el sitio de mayor producción de radicales libres. Kim y Thomas (2007), encontraron que las dietas suplementadas con quitosano para el *Salmo salar* mostraban actividades antioxidantes y una reducción de la oxidación de lípidos. También se ha informado de que las propiedades antioxidantes del quitosano en términos de prevención del estrés oxidativo, que aumentaron progresivamente a medida que aumentaba su concentración (Sarbon et al., 2015; Abdel-Ghany y Salem, 2019).

El mecanismo de acción del efecto de inmunoestimulación del quitosano dentro del cuerpo del pez aún no se comprende completamente. Pero es sabido que la inmunidad celular no específica comprende tres mecanismos defensivos: la inflamación, la fagocitosis y la citotoxicidad no específica. La inflamación involucra a los leucocitos y sigue a la exposición a un desafío antigénico, posteriormente al contacto con el antígeno, el área afectada recibe mayor irrigación sanguínea, seguida de un aumento en la permeabilidad capilar y la migración de los leucocitos de la sangre hacia el tejido (Szwejszer et al., 2017), y aunque solo constituyen alrededor del uno por ciento de la sangre del organismo, implicados en diversas reacciones alérgicas y contribuyen a la reparación del tejido dañado, así como a la eliminación de células tumorales (Nakanishi et al., 2020).

En el presente estudio, se observó una respuesta significativa ($p < 0,05$) de leucocitos (Ilustración 2) en peces alimentados con quitosano, lo cual pudo estar relacionado con la hematopoyesis que implica la producción de células leucocitarias principalmente en el riñón en el caso los peces teleósteos (Press y Evensen, 1999; Zapata et al., 1996), órgano en el que se localizan las células madre hematopoyéticas

(Hanington et al., 2009), por lo que tienen una extensa redícula para atrapar partículas acarreadas en la sangre, principalmente en el riñón y el bazo donde se localizan poblaciones de macrófagos y linfocitos capaces de iniciar una respuesta inmune (Press y Evensen, 1999).

Esto sugiere que el nivel de quitosano en dieta pudo estimular el microambiente donde se desarrollan las células hematopoyéticas y factores y proteínas de crecimiento intracelulares; en este sentido, se ha encontrado que la proteína alfa de unión al potenciador CCAAT (C/EBP α), es requerida para el desarrollo de granulocitos, pero también promueve la diferenciación de células madres hematopoyéticas, sin embargo cuando es deficiente C/EBP α , se bloquea la diferenciación hacia el linaje mieloides (Zhang et al., 2004). Harikrishnan et al. (2012), encontraron que la suplementación dietética con quitosano estimuló parámetros inmunológicos en *Epinephelus bruneus* contra *Philasterides dicentrarchi*, aumentando significativamente el contenido de leucocitos y actividad fagocítica.

Ilustraciones, Figuras y Anexos

Tabla 1. Condiciones agroclimáticas.

Datos Meteorológicos	Promedios
Temperatura media $^{\circ}\text{C}$	25,80
Humedad relativa media %	84,00
Helifonía, anual, hora luz	995,00
Precipitación/mes	156,10

Tabla 2. Formulación de dietas experimentales con suplementación de quitosano.

Ingredientes	Niveles de quitosano en dietas (%)					
	0	1	2	3	4	5
Harina de pescado	46.50	46.50	46.50	46.50	46.50	47.00
Pasta de soya	28.00	28.00	28.00	28.00	28.00	28.00
Harina de trigo	13.90	13.90	13.90	13.40	12.90	11.90
Harina de maíz	4.00	3.00	2.00	1.50	1.00	0.50
Quitosano	0.00	1.00	2.00	3.00	4.00	5.00
Lecitina de Soya	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00

Aceite de pescado	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50
Alginato de sodio	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
Premezclas minerales ¹	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Premezclas vitamínicas ²	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
Vitamina C	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10

Leyenda: ¹ mg.kg⁻¹: Sulfato de magnesio 5,1; Cloruro de sodio 2,4; Cloruro de potasio 2; Sulfato ferroso 1; Sulfato de zinc 0,2; Sulfato cúprico 0,0314; Sulfato manganoso 0,1015; Sulfato de cobalto 0,0191; Yodato de calcio 0,0118; Cloruro de cloro 0,051. ² mg.kg⁻¹: Tiamina 60; Rivo flavina 25; Niacina 40; Vitamina B6 50; Ácido pantoténico 75; Biotina 1; Folato 10; Vitamina B12 0,2; Hill 600; Myoinositol 400; Vitamina C 200; Vitamina A 5000 UI; Vitamina E 100; Vitamina D 0,1; Vitamina K 5.

Tabla 3. Composición química (% Materia Seca) de dietas experimentales con suplementación de quitosano.

Composición proximal real	Niveles de quitosano en dietas (%)					
	0	1	2	3	4	5
Materia seca (%)	94.68	93.77	94.02	94.28	93.80	93.99
Grasa (%)	7.15	7.24	8.01	7.84	7.18	8.02
Proteína (%)	32.07	32.22	32.47	32.30	32.22	32.17
Fibra (%)	5.63	5.86	5.92	6.18	6.66	6.81
Ceniza (%)	8.20	9.30	10.10	10.22	12.01	9.80
E. L. N. N ¹ (%)	18.38	18.18	18.22	18.11	17.57	18.10
Energía bruta (kJ. g ⁻¹) ²	46.95	45.38	43.50	43.46	41.93	43.20

Leyenda: ¹Extracto libre de nitrógeno = 100 - (% proteína bruta +% extracto etéreo +% fibra bruta +% ceniza). ²Calculado usando factores 23.4 kJ. g⁻¹, 39.2 kJ.g⁻¹, 17.2 kJ.g⁻¹ de proteína, grasas y carbohidratos, respectivamente (Goddard, 1996).

Tabla 4. Indicadores de Calidad del Agua.

Indicadores	Mínimo	Máximo
Oxígeno, mg / L	4.06	5
Temperatura, °C	26.5	28.5
pH	7	8.1
Amonio, mg L ⁻¹	0.05	0.08
Nitratos, mg L ⁻¹	0.2	0.4
Nitritos, mg L ⁻¹	0.5	1

Tabla 5. Indicadores bioprodutivos en juveniles de tilapia roja con suplementación de quitosano en dieta.

NQD (%)	PI (g)	PF (g)	IP (%)	GP (g)	TCE	FCA	EA	SP (%)
0	7.47±0.18	12.66±0.92cd	518.98±7.72c	5.19±0.77c	0.94±0.1c	1.54±0.74c	0.38±0.05c	93.33±3.85c
1	7.62±0.33	10.37±1.24d	274.58±9.35d	2.75±0.94d	0.54±0.14d	1.29±0.15b	0.21±0.07c	84.44±3.85d
2	7.53±0.07	15.72±3.77b	818.84±7.12b	8.19±3.71b	1.28±0.45b	0.91±0.29ab	0.61±0.29b	86.67±3.8d
3	7.36±0.08	13.59±1.08bc	623.47±10.12c	6.23±1.01bc	1.09±0.13c	1.02±0.06b	0.45±0.06bc	97.78±3.85a
4	7.69±0.10	18.09±1.82a	1039.36±17.42a	10.40±1.74a	1.52±0.16a	0.76±0.09a	0.80±0.14a	100±0.00 a
5	7.31±0.43	15.58±3.96b	826.56±5.68b	8.27±3.57b	1.31±0.38b	0.89±0.23a	0.62±0.27b	95.56±7.70bc

Valores expresados en Media ± Desviación Estándar. NQD: Niveles de quitosano en dietas, PI: Peso inicial, PF: Peso Final, IP: Incremento de Peso, GP: Ganancia de Peso, TCE: Tasa de Crecimiento Específico, FCA: Factor de Conversión Alimenticia, EA: Eficiencia Alimentaria.

Ilustración 1. Actividad de superóxido dismutasa (media ± DE, $p = 0.0041$), en juveniles de tilapia roja con suplementación de quitosano en dieta.

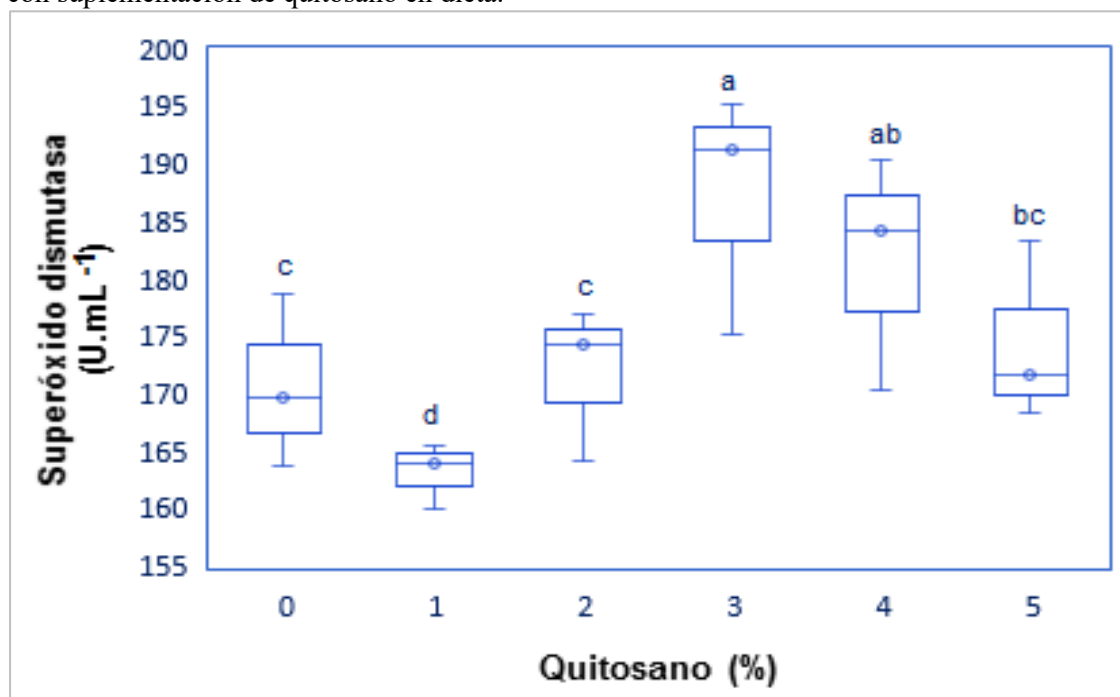
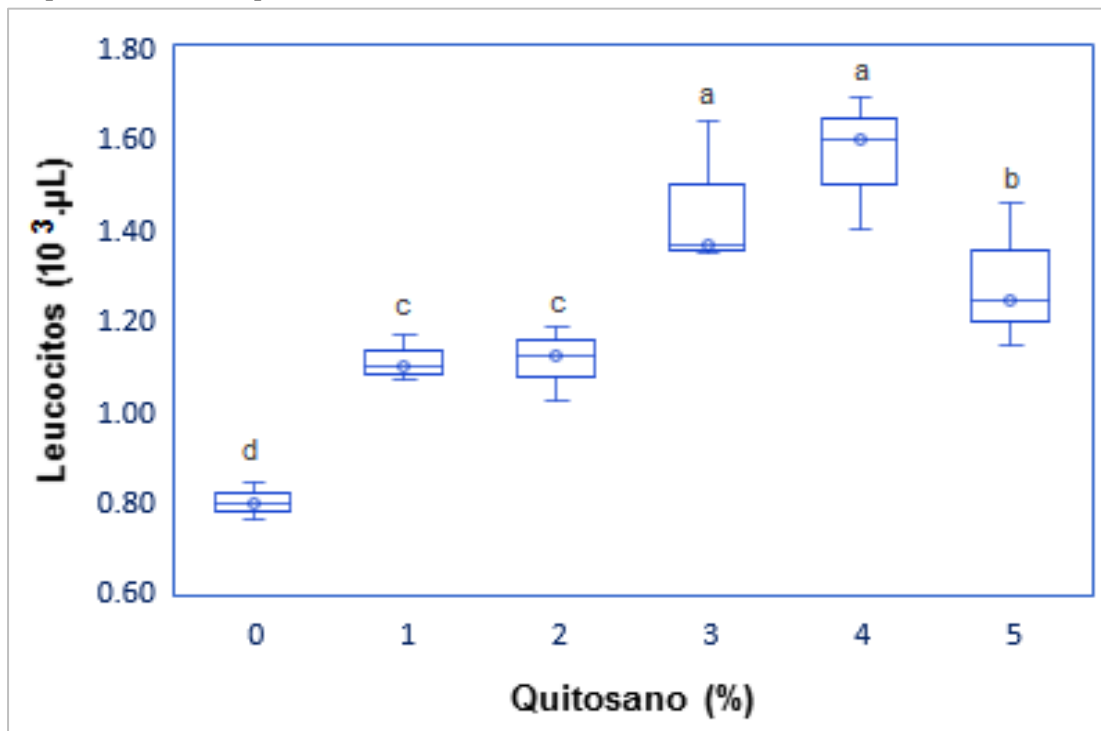


Ilustración 2. Contenido de Leucocitos (media \pm DE, $p=0,010$), en juveniles de tilapia roja con suplementación de quitosano en dieta.



CONCLUSIONES

El biopolímero Quitosano influye positivamente en la activación de los indicadores de crecimiento, aprovechamiento del alimento y supervivencia en tilapia roja, con mejores respuestas cuando se incluye un 4%. Es factible el tratamiento con Quitosano en dieta a los juveniles de tilapia roja debido a que este producto influye positivamente en variables inmunes como la actividad de superóxido dismutasa y el contenido de leucocitos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdel-Ghany, H. M. and M. E. S. Salem. 2019. Effects of dietary chitosan supplementation on farmed fish; a review. *Rev. Aquacult.* 12(1): 438-452.
- Alishahi, A. and M. Aïder. 2012. Applications of chitosan in the seafood industry and aquaculture: a review. *Food Bioproc Tech.* 5(3): 817-830.
- Al-Sagheer, A., H. Mahmoud, F. Reda, S. Mahgoub and M. Ayyat. 2018. Supplementation of diets for *Oreochromis niloticus* with essential oil extracts from lemongrass (*Cymbopogon citratus*) and geranium (*Pelargonium graveolens*) and effects on growth, intestinal microbiota, antioxidant and immune activities. *Aquacult. Nutr.* 24: 1006-1014.

- AOAC (Association of Official Analytical Chemists International). 2019. Official Methods of Analysis of AOAC International, 21st Edition. Gaithersburg, Maryland, USA.
- Arun, S. and P. Subramanian. 1998. Antioxidant enzymes in freshwater prawn *Macrobrachium malcolmsonii* during embryonic and larval development. *Comp. Biochem. Physiol. B.* 121(3): 273-277.
- Azizoglu, A. and I. Cengizler. 1996. An investigation on determination of some hematologic parameters in healthy *Oreochromis niloticus* (L.). *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 20: 425-431.
- Billar, J. D. and L. S. Takahashi. 2018. Oxidative stress and fish immune system: phagocytosis and leukocyte respiratory burst activity. *An. Acad. Bras. Ciênc.* 90 (4): 3403-3914.
- Brum, A., S. A. Pereira, M. S. Owatari, E. C. Chagas, F. C. M. Chaves, J. L. P. Mouriño and M. L. Martins. 2017. Effect of dietary essential oils of clove basil and ginger on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) following challenge with *Streptococcus agalactiae*. *Aquaculture* 468: 235-243.
- Esteban, M. A., A. Cuesta, J. Ortuno and J. Meseguer. 2001. Immunomodulatory effects of dietary intake of chitin on gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) innate immune system. *Fish Shellfish Immunol.* 11: 303-315.
- Fadl, S.E., G. A. El-Gammal, W.S. Abdo, M. Barakat, O. A. Sakr, E. Nassef, D. M. Gad and H. S. El-Sheshtawy, 2020. Evaluation of dietary chitosan effects on growth performance, immunity, body composition and histopathology of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) as well as the resistance to *Streptococcus agalactiae* infection. *Aquac. Res.* 51: 1120-1132.
- FAO. 2020. FishStatJa tool for fishery statistics analysis, Release 2.0.0. Universal software for fishery statistical time series. Global capture and aquaculture production: Quantities 1950-2018; Aquaculture values 1984-2018. Food and Agriculture Organization (FAO) Fisheries Department, Fishery Information, Data and Statistics Unit. Rome.
- Hanington, P. C., J. Tam, B. A. Katzenback, S. J. Hitchen, D. R. Barreda and M. Belosevic. 2009. Development of macrophages of cyprinid fish. *Dev. Comp. Immunol.* 33: 411-429.



- Harikrishnan R., J.-S. Kim, C. Balasundaram and M.-S. Heo. 2012. Dietary supplementation with chitin and chitosan on haematology and innate immune response in *Epinephelus bruneus* against *Philasterides dicentrarchi*. *Exp. Parasitol.* 131(1):116-124.
- Heo, G. J., J. H. Kim, B. G. Jeon and K. Y. R. J. Park. 2001. Effects of FST-chitosan mixture on cultured rockfish (*Sebastes schlegeli*) and olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Korean J. Vet. Public. Heal.* 25(3): 141-149.
- Hrubec, T. and S. Smith. 2010. Hematology of Fishes. p. 994-1003. In: Weiss, D. J., Wardrop, K. J. and O. W. Schalm's (Eds). *Veterinary Hematology*, 6th Edition. Wiley-Blackwell. Iowa, USA.
- Jim, F., P. Garamumhango, and C. Musara. 2017. Comparative analysis of nutritional value of *Oreochromis niloticus* (Linnaeus), Nile Tilapia, Meat from three different ecosystems. *J. Food Qual.* <https://doi.org/10.1155/2017/6714347>
- Kim, K. W. and R. L. Thomas. 2007. Antioxidative activity of chitosans with varying molecular weights. *Food Chem.* 101: 308-313.
- Lara-Flores, M., M. A. Olvera-Novoa, B. E. Guzmán-Méndez and W. López-Madrid. 2003. Use of the bacteria *Streptococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus*, and the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as growth promoters in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture* 216(4): 193-201.
- Lin, S.-B., S.-H. Chen and K.-C. Peng. 2009. Preparation of antibacterial chito-oligosaccharide by altering the degree of deacetylation of β -chitosan in a *Trichoderma harzianum* chitinase-hydrolysing process, *J. Sci. Food Agric.* 89: 238-244.
- Mahmoud, H. K., A. A. Al-Sagheer, F. M. Reda, S. A. Mahgoub and M. S. Ayyat, 2017. Dietary curcumin supplement influence on growth, immunity, antioxidant status, and resistance to *Aeromonas hydrophila* in *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture* 475: 16-23.
- Malachy, N. O. A, Pramod, K. P., K. Kumar and P. Nalini. 2017. Assessment of mutagenic, hematological and oxidative stress biomarkers in liver of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) in response to sublethal verapamil exposure. *Drug Chem. Toxicol.* 40(3): 286-294.



- Mastan, S. A. 2015. Use of immunostimulants in aquaculture disease management. *Int. J. Fish. Aquat. Stud.* 2(4): 277-280.
- McCord, J. M. and Fridovich, I. 1969. Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J. Biol. Chem.* 244:6049-6055.
- Mehana, E. E., H. A. Rahmani and M. S. Aly. 2015. Immunostimulants and Fish Culture: An Overview. *Annu. Res. Rev. Biol.* 5(6): 477-489.
- Méndez-Martínez Y., Y. Pérez, D.M. Verdecia, E. Cortés-Jacinto, O.F. Cevallos- Falquez, O. Romero. 2019. Effect of the inclusion of *Azolla filiculoides* meal on the growth and survival of red tilapia small fish (*Oreochromis mossambicus x O. niloticus*). *Cuba. J. Agric. Sci.* 53: (2): 289-299.
- Méndez-Martínez, Y., Y. G. Torres-Navarrete, Y. Pérez-Tamames, M. Romás-Viltres, E. Cortés-Jacinto (2021). Effect of duckweed meal dietary inclusion on growth performance and survival of African catfish fingerlings. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)* 38: 84-104.
- Méndez-Martínez, Y., Y. Pérez, D.M. Verdecia, E. Cortés-Jacinto, O.F. Cevallos- Falquez, O. Romero. 2019. Effect of the inclusion of *Azolla filiculoides* meal on the growth and survival of red tilapia small fish (*Oreochromis mossambicus x O. niloticus*). *Cuba. J. Agric. Sci.* 53: (2): 289-299.
- Nakanishi, T., Y. Shibasaki, Y. Matsuura. 2015. T Cells in Fish. *Biology.* 4: 640-663.
- Ngo, D.-H. and S.-K. Kim. 2014. Antioxidant effects of chitin, chitosan, and their derivatives. *Adv. Food Nutr. Res.* 73: 15-31.
- Pérez, R., B. Romeu, M. Lastre, Y. Morales, O. Cabrera, L. Reyes, E. González, S. Sifontes, O. Pérez. 2014. Inmunopotenciadores para la acuicultura TT-Immunepotentiators for the Aquaculture. *Vaccimonitor* 23(1): 24-31.
- Press, C. M. and O. Evensen. 1999. The morphology of the immune system in teleost fishes. *Fish Shellfish Immunol.* 9: 309-318.
- Sakai, M., Kamiya, H., Ishii, S., Atsuta, S. and Kobayashi, M. 1992. The immunostimulating effects on chitin in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Dis. Asian Aquacult.* 1: 413-417.



- Sarbon, N. M., S. Sandanamsamy, S. F. S. Kamaruzaman and F. Ahmad. 2015. Chitosan extracted from mud crab (*Scylla olivacea*) shells: physicochemical and antioxidant properties, *J. Food Sci. Technol.* 52: 4266-4275.
- Soberanes-Yepiz, M. L., Y. Méndez-Martínez, M. U. García-Guerrero, F. Ascencio, J. Violante-González, S. García-Ibañez, E. Cortés-Jacinto. 2018. Superoxide dismutase activity in tissues of juvenile cauque river prawn (*Macrobrachium americanum* Bate, 1868) fed with different levels of protein and lipid. *Lat. Am. J. Aquat. Res.* 46(3):543–55.
- Szwejsjer, E., B. M. L. K. Verburg-van, M. Maciuszek, M. Chadzinska. 2017. Estrogen-dependent seasonal adaptations in the immune response of fish. *Horm. Behav.* 88: 15-24.
- Udo, I. U., U. Etukudo and U. I. U. Anwana. 2018. Effects of chitosan and chitosan nanoparticles on water quality, growth performance, survival rate and meat quality of the African catfish, *Clarias gariepinus*. *Nanoscience* 1(1): 12-25.
- Villa-Cruz, V., J. Davila, M. T. Viana and R. Vazquez-Duhalt. 2009. Effect of broccoli (*Brassica oleracea*) and its phytochemical sulforaphane in balanced diets on the detoxification enzymes levels of tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to a carcinogenic and mutagenic pollutant. *Chemosphere* 74: 1141-1155.
- Zaki, M. A., M. El-S. Salem, M. M. Gaber and A. M. Nour. 2015. Effect of chitosan supplemented diet on survival, growth, feed utilization, body composition and histology of seabass (*Dicentrarchus labrax*). *World Journal of Engineering and Technology.* 3: 38-47.
- Zapata, A. G., A. Chibá and A. Varas. 1996. Cells and tissues of the immune system of fish. p. 61-62. In: Iwama, G., and T. Nakanishi (Eds). *The fish immune system: organism, pathogen and environment*. Academic Press, Ltd., London.
- Zhang, P, J. Iwasaki-Arai, H. Iwasaki, M. L. Fenyus, T. Dayaram, B. M. Owens. 2004. Enhancement of hematopoietic stem cell repopulating capacity and self-renewal in the absence of the transcription factor C/EBP alpha. *Immunity* 21(6): 853-863.

