

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA EN ACUICULTURA



UNS
UNIVERSIDAD
NACIONAL DEL SANTA

Efecto del ayuno y realimentación en las características histológicas de hígado e intestino y el nivel de expresión de los genes IGF1, IGF2, GHR1 y GHR2 de juveniles de *Arapaima gigas* (Schinz, 1822)

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE BIÓLOGO ACUICULTOR

Autor

-Bach. Medina Herrera, Diego

Asesor

-Dra. Zelada Mázmela, Eliana Victoria

-Orcid: 0000-0002-5813-0954

Co-asesor

-Dr. Delgadin, Tomás Horacio

-Orcid: 0000-0003-3895-3053

Nuevo Chimbote – Perú

2024

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA

FACULTAD DE CIENCIAS

**ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE BIOLOGÍA EN
ACUICULTURA**



“Efecto del ayuno y realimentación en las características histológicas de hígado e intestino y el nivel de expresión de los genes IGF1, IGF2, GHR1 y GHR2 de juveniles de *Arapaima gigas* (Schinz, 1822)”

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE
BIÓLOGO ACUICULTOR**

Aprobado por:

Asesora

**Dr. Eliana Victoria Zelada Mázmela
DNI: 17842746
ORCID: 0000-0002-5813-0954**

Co-Asesor

**Dr. Tomás Horacio Delgadin
Carnet: 005364123
ORCID: 0000-0003-3895-3053**

**Nuevo Chimbote – Perú
2024**

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA

FACULTAD DE CIENCIAS

**ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE BIOLOGÍA EN
ACUICULTURA**



“Efecto del ayuno y realimentación en las características histológicas de hígado e intestino y el nivel de expresión de los genes IGF1, IGF2, GHR1 y GHR2 de juveniles de *Arapaima gigas* (Schinz, 1822)”

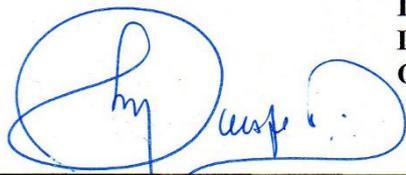
**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE
BIÓLOGO ACUICULTOR**

Revisado y aprobado por el Jurado Evaluador:



Presidente

Dr. Carlos Alberto Azañero Díaz
DNI: 18093785
ORCID: 0000-0002-5612-4104



Secretario

Dr. Manuel Quispe Villanueva
DNI: 17916826
ORCID: 0000-0001-6120-8399



Integrante

Dr. Eliana Victoria Zelada Mázmela
DNI: 17842746
ORCID: 0000-0002-5813-0954

**Nuevo Chimbote – Perú
2024**

ACTA DE CALIFICACIÓN DE LA SUTENTACIÓN DE LA TESIS

En el Distrito de Nuevo Chimbote, en la Universidad Nacional de Santa, en el
Aula Multimedia, 3er piso - Facultad de Ciencias, siendo las 18:00 horas del
día 04 de Julio del 2024, dando cumplimiento a la Resolución N°
217-2024-UNS-FC se reunió el Jurado Evaluador presidido por Dr. Carlos
Azañero Díaz, teniendo como miembros a Dr. Manuel Quispe
Villanueva (secretario) (a), y Dra. Eliana Zelada Mázemela (integrante),
para la sustentación de tesis a fin de optar el título de Biólogo Acuicultor
realizado por el, (la), (los) tesista (as)

Diego Medina Herrera

....., quien (es) sustentó (aron) la tesis intitulada:

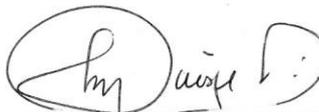
Efecto del ayuno y realimentación en las características
histológicas de hígado e intestino y el nivel de expresión
de los genes ISF-1, GH, GHR1 y GHR2 de juveniles de
Arapaima gigas (Schinz, 1822)

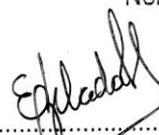
Terminada la sustentación, el (la), (los) tesista (as)s respondió (ieron) a las preguntas formuladas
por los miembros del jurado.

El Jurado después de deliberar sobre aspectos relacionados con el trabajo, contenido y
sustentación del mismo y con las sugerencias pertinentes, declara la sustentación como
Aprobado asignándole un calificativo de Excelente 19 puntos, según
artículo 111° del Reglamento General de Grados y Títulos vigente (Resolución N° 580-2022-CU.-
R-UNS)

Siendo las 19:30 horas del mismo día se dio por terminado el acto de sustentación firmando
los miembros del Jurado en señal de conformidad


Nombre: Dr. Carlos Azañero Díaz
Presidente


Nombre: Dr. Manuel Quispe Villanueva
Secretario


Nombre: Dra. Eliana Zelada Mázemela
Integrante

Distribución: Integrantes J.E (3), tesistas (1) y archivo (02).



**ACTA DE LEVANTAMIENTO DE OBSERVACIONES POSTERIOR A LA
SUSTENTACIÓN DE LA TESIS Y CERTIFICACIÓN**

En el Distrito de Nuevo Chimbote, en la Universidad Nacional de Santa, en el Aula Multimedia 3er piso - Facultad de Ciencias, dando cumplimiento a la Resolución N° 217-2024-UNS-FC, siendo las 12:30 horas del día 08 de Julio, se reunió el Jurado Evaluador presidido por Dr. Carlos Azañero Díaz, teniendo como miembros a Dr. Manuel Quispe Villanueva (secretario) (a) y Dra. Eliana Zelada Nazmela (integrante), para el levantamiento de observaciones posterior a la sustentación de tesis, presentada por (el), (la), (los) tesistas: Drega Medina Herrera

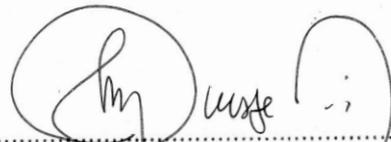
.....
quien (es) expuso (ieron) el trabajo intitulado: Efecto del ayuno y realimentación en las características histológicas de hígado e intestino y el nivel de expresión de los genes IGF-1, GH, GHR1 y GHR2 de juveniles de Arapaima gigas (Schinz, 1822)

Terminada la revisión se observa que (el), (la), (los) tesistas han cumplido con levantar las observaciones, por tanto se CERTIFICA LA APROBACIÓN DE LA TESIS EN MENCIÓN.

Siendo las 13:20 horas del mismo día se dio por terminado el acto firmando los miembros del Jurado en señal de conformidad.



Nombre: Dr. Carlos Azañero Díaz
Presidente



Nombre: Dr. Manuel Quispe Villanueva
Secretario



Nombre: Dra. Eliana Zelada Nazmela
Integrante

Distribución: Integrantes J.E (03), tesistas(1) y archivo FC (02).





Recibo digital

Este recibo confirma que su trabajo ha sido recibido por Turnitin. A continuación podrá ver la información del recibo con respecto a su entrega.

La primera página de tus entregas se muestra abajo.

Autor de la entrega: Diego Medina Herrera
Título del ejercicio: TESIS
Título de la entrega: Efecto del ayuno y realimentación en las características hist...
Nombre del archivo: Tesis_Diego_Paiche.pdf
Tamaño del archivo: 5.95M
Total páginas: 129
Total de palabras: 32,875
Total de caracteres: 183,532
Fecha de entrega: 12-jun.-2024 02:38p. m. (UTC-0500)
Identificador de la entre... 2401267810

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA ACADEMICO PROFESIONAL DE BIOLOGÍA EN
ACUICULTURA



“Efecto del ayuno y realimentación en las características histológicas de hígado e intestino y el nivel de expresión de los genes IGF1, IGF2, GHR1 y GHR2 de juveniles de *Arapaima gigas* (Schinz, 1822)”
TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE BIÓLOGO ACUICULTOR

Autor Bach. Diego Medina Herrera
Asesora Dr. Eliana Victoria Zelada Mázmeda
Co-asesor Dr. Tomás Horacio Delgadín

Nuevo Chimbote – Perú
2024

Efecto del ayuno y realimentación en las características histológicas de hígado e intestino y el nivel de expresión de los genes IGF1, IGF2, GHR1 y GHR2 de juveniles de *Arapaima gigas* (Schinz, 1822)

INFORME DE ORIGINALIDAD

16%

INDICE DE SIMILITUD

16%

FUENTES DE INTERNET

4%

PUBLICACIONES

2%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	ciad.repositorioinstitucional.mx Fuente de Internet	2%
2	hdl.handle.net Fuente de Internet	2%
3	dspace.unitru.edu.pe Fuente de Internet	2%
4	archive.org Fuente de Internet	1%
5	revistas.iiap.gob.pe Fuente de Internet	1%
6	digital.bl.fcen.uba.ar Fuente de Internet	1%
7	www.scielo.cl Fuente de Internet	1%
8	ciencia.lasalle.edu.co Fuente de Internet	<1%

DEDICATORIA

*A ti, querido Dios, por tu guía y bendiciones
en este viaje,
por iluminar mi camino y darme fuerza para
perseverar...*

*A mi amada familia por su amor, paciencia y
aliento constante, para superar cualquier
obstáculo...*

AGRADECIMIENTO

Una gratitud infinita y un profundo amor a mis queridos padres. Su apoyo incondicional a lo largo de mi vida ha sido un regalo invaluable, y hoy quiero honrar su confianza en mí, sus consejos y su amor inquebrantable durante los momentos más hermosos y difíciles que hemos enfrentado juntos. Desde que tengo memoria, mis padres han sido mi roca, mi guía y mi mayor fuente de inspiración. Gracias por todo.

A mi querido hermanito, Piero del cual estoy muy orgulloso y por el cual me esfuerzo por ser un ejemplo, porque quiero que vea en mí que no hay límites para lo que puede lograr. Agradezco de todo corazón la oportunidad de ser tu hermano y de compartir contigo esta hermosa travesía llamada vida.

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento a la Dra. Eliana Zelada Mázmela por brindarme la oportunidad y confianza para llevar a cabo esta tesis. Por su dedicación, paciencia y valiosa orientación, que han sido fundamentales en mi desarrollo profesional y académico, por la sensación de calidez y pertenencia que ha creado, haciendo que cada día de trabajo sea una experiencia enriquecedora, donde ha creado un ambiente de camaradería y colaboración, haciéndome sentir parte de una familia científica con un objetivo en común: el avance del conocimiento.

A mi co-asesor, el Dr. Tomas, por su invaluable asesoría en la culminación de esta tesis, por su paciencia, guía y dedicación que han sido fundamentales en mi proceso de comprensión y resolución de dudas, su habilidad para explicar conceptos complejos de manera clara y comprensible ha sido un verdadero regalo. Su compromiso y pasión por la investigación han sido inspiradores y me han motivado a dar lo mejor de mí en cada etapa del proceso.

A los investigadores del laboratorio LGFyR, al Dr. Edgar López, la Dra. Anaid, Lalo, Cleila y Karen, por los consejos y apoyo moral que me brindaron en transcurso de mi estadía en el laboratorio. A Luis y Lise, por su apoyo y consejos cuando comencé mi tesis y por vuestra disposición a apoyarme en la medida de lo posible.

A mis compañeros y amigos, Daniela y Ángel por su compañía, apoyo y divertidas ocurrencias, desde el inicio de este viaje académico, compartiendo risas, momentos de estudio arduo y celebraciones a cada objetivo logrado, vuestra presencia ha sido un bálsamo en momentos de estrés y una fuente de inspiración, también a los que se integraron después Leonardo y Mariesther por su apoyo y amistad.

AGRADECIMIENTO ESPECIAL

Esta investigación ha sido totalmente financiada y subvencionada, por el Convenio N° PE501078587-2022-PROCIENCIA a través de Proyectos de Investigación Básica 2022-01 E041-2022-01 en el Proyecto Semilla “Análisis de la alta tasa de crecimiento somático del Paiche: una perspectiva genómica y experimental”



ÍNDICE

	Página
DEDICATORIA.....	I
AGRADECIMIENTO	II
ÍNDICE.....	IV
ÍNDICE DE TABLAS.....	VI
ÍNDICE DE FIGURAS	VII
RESUMEN	X
ABSTRACT	XI
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MARCO TEÓRICO	4
2.1. Biología de <i>Arapaima gigas</i>	4
2.2. Taxonomía	5
2.3. Aspectos alimenticios	5
2.4. Producción	6
2.5. Sistema digestivo	10
2.4.1. Hígado	10
2.4.1.1. Organización estructural del hígado	10
2.4.1.2. Fisiología del hígado	13
2.4.1.3. Citotipos hepáticos	14
2.4.2. Intestino	18
2.4.2.1. Desarrollo del intestino.....	18
2.4.2.2. Organización estructural del intestino	19
2.4.2.3. Morfología intestinal	21
2.4.2.4. Citotipos intestinales.....	23
2.6. Ayuno y realimentación.....	28
2.7. Crecimiento compensatorio	29

2.8.	Eje neuroendocrino del crecimiento	30
2.8.1.	Hormona de crecimiento (GH)	30
2.8.2.	Factor de crecimiento tipo insulina I (IGF1)	31
2.8.3.	Receptor de la hormona de crecimiento (GHR)	32
2.8.3.1.	Receptor de la hormona de crecimiento tipo I - II (GHR1 – GHR2)	33
2.9.	Factores que influyen en el eje neuroendocrino del crecimiento.....	34
3.	OBJETIVOS	35
3.1.	Objetivo general.....	35
3.2.	Objetivos específicos	35
4.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	36
4.1.	Diseño experimental	36
4.2.	Análisis histológico.....	37
4.3.	Análisis transcriptómico	41
4.3.1.	Extracción de ARN total y digestión con DNasa	41
4.3.2.	Preparación de bibliotecas de RNA-Seq y secuenciación.....	42
4.3.3.	Análisis bioinformático de datos de RNA-Seq.....	42
4.4.	Análisis estadístico.....	43
5.	RESULTADOS	44
5.1.	Hígado.....	44
5.2.	Intestino.....	55
5.3.	Análisis transcriptómico	67
5.3.1.	Hígado	67
5.3.2.	Músculo	69
6.	DISCUSIÓN.....	71
7.	CONCLUSIONES.....	81
8.	RECOMENDACIONES.....	82
9.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83
10.	ANEXOS	111

ÍNDICE DE TABLAS

Página

Tabla 01. Diagrama del proceso de deshidratación, aclaramiento e infiltración de tejidos de <i>A. gigas</i>	37
Tabla 02. Diagrama del proceso de coloración de muestras de <i>A. gigas</i>	39
Tabla 03. Número de núcleos de hepatocitos por campo en juveniles de <i>A. gigas</i>	52
Tabla 04. Área del núcleo de hepatocitos de juveniles de <i>A. gigas</i>	53
Tabla 05. Área de los hepatocitos de juveniles de <i>A. gigas</i>	54
Tabla 06. Diámetro del intestino de juveniles de <i>A. gigas</i>	61
Tabla 07. Longitud de las vellosidades intestinales de juveniles de <i>A. gigas</i>	62
Tabla 08. Resultado del efecto principal e interacción del RM-ANOVA de la longitud de las vellosidades intestinales.	62
Tabla 09. Ancho de la capa muscular circular interna del intestino de juveniles de <i>A. gigas</i>	63
Tabla 10. Longitud de los enterocitos de juveniles de <i>A. gigas</i>	64
Tabla 11. Resultado del efecto principal e interacción del RM-ANOVA de la longitud de los enterocitos.....	65
Tabla 12. Número de células calciformes en juveniles de <i>A. gigas</i>	66
Tabla 13. Resultado del efecto principal e interacción del RM-ANOVA del número de células calciformes.	66
Tabla 14. Estadística básica de la expresión de los transcritos en hígado de <i>A. gigas</i> bajo condiciones de ayuno/realimentación.....	67
Tabla 15. Estadística básica de la expresión de los transcritos en músculo de <i>A. gigas</i> bajo condiciones de ayuno/realimentación.....	69

ÍNDICE DE FIGURAS

Página

Figura 01. Producción de paiche en el período 2007 – 2016.	6
Figura 02. Producción mundial de paiche proveniente de la pesca y la acuicultura entre el período de 2008 – 2018.	7
Figura 03. Producción mundial de carne de paiche en toneladas.	8
Figura 04. Exportaciones peruanas de carne de paiche (TM) entre los períodos de 2010 – 2015.	9
Figura 05. Cavidad abdominal de <i>A. gigas</i>	10
Figura 06. Esquema de un lobulillo hepático clásico de algunos mamíferos.	11
Figura 07. Unidades morfofuncionales hepáticas de <i>A. gigas</i>	12
Figura 08. Diagrama esquemático de una placa de hepatocitos interpuesta entre sinusoides hepáticos.	15
Figura 09. Las principales capas del intestino en teleósteos.	20
Figura 10. Velloidades intestinales en teleósteos.	23
Figura 11. Tipos de células que derivan de las células madre basales en teleósteos.	24
Figura 12. Diagrama de un enterocito en teleósteos.	25
Figura 13. Diagrama de una célula caliciforme en teleósteos.	26
Figura 14. Eje de producción de IGF1 a partir de GH.	32
Figura 15. Diseño experimental del protocolo de ayuno y realimentación.	36
Figura 16. Detalle de un espacio portal con una tríada típica en <i>A. gigas</i> alimentado normalmente.	44
Figura 17. Microfotografías de hepatocitos de juveniles de <i>A. gigas</i> alimentado normalmente.	45
Figura 18. Microfotografías de hepatocitos en la primera semana de ayuno de juveniles de <i>A. gigas</i>	46
Figura 19. Microfotografías de hepatocitos en la segunda semana de ayuno de juveniles de <i>A. gigas</i>	47

Figura 20. Microfotografías de hepatocitos en la primera semana de realimentación de juveniles de <i>A. gigas</i>	48
Figura 21. Microfotografías de hepatocitos en la segunda semana de realimentación de juveniles de <i>A. gigas</i>	49
Figura 22. Microfotografías de hepatocitos en la tercera semana de realimentación de juveniles de <i>A. gigas</i>	50
Figura 23. Índice hepatosomático (IHS), de <i>A. gigas</i>	51
Figura 24. Número de núcleos de hepatocitos (NNH), en <i>A. gigas</i>	52
Figura 25. Área de los núcleos de los hepatocitos (ANH), en <i>A. gigas</i>	53
Figura 26. Área celular de los hepatocitos (AH), en <i>A. gigas</i>	54
Figura 27. Microfotografía de una vellosidad intestinal de <i>A. gigas</i> alimentado normalmente.	55
Figura 28. Microfotografías del intestino en la primera semana de ayuno de juveniles de <i>A. gigas</i>	56
Figura 29. Microfotografías del intestino en la segunda semana de ayuno de juveniles de <i>A. gigas</i>	57
Figura 30. Microfotografías del intestino en la primera semana de realimentación de juveniles de <i>A. gigas</i>	58
Figura 31. Microfotografías del intestino en la segunda semana de realimentación de juveniles de <i>A. gigas</i>	59
Figura 32. Microfotografías del intestino en la tercera semana de realimentación de juveniles de <i>A. gigas</i>	60
Figura 33. Diámetro intestinal (DI), en <i>A. gigas</i>	61
Figura 34. Longitud vellosidades (LVI), en <i>A. gigas</i>	63
Figura 35. Ancho de la capa muscular circular interna (ACM), de <i>A. gigas</i>	64
Figura 36. Longitud de los enterocitos (LE), en juveniles de <i>A. gigas</i>	65
Figura 37. Número de células calciformes por vellosidad (NCC), en juveniles de <i>A. gigas</i>	66

Figura 38. Mapa de calor mostrando la agrupación de los tratamientos con base en los transcriptos expresados diferencialmente en el hígado de juveniles de *A. gigas*. 68

Figura 39. Mapa de calor mostrando la agrupación de los tratamientos con base en los transcriptos expresados diferencialmente en el músculo de juveniles de *A. gigas*. 70

RESUMEN

El paiche (*A. gigas*) habita en la cuenca amazónica y es de los peces más grandes del mundo. A pesar de ser altamente demandado por la calidad de su carne, su cultivo enfrenta obstáculos tecnológicos y problemas de sobreexplotación. El hígado es un órgano crucial en los vertebrados, ya que actúa como reserva energética y productor de factores como IGF1 principal promotor del crecimiento somático en peces. El objetivo de este trabajo fue evaluar cómo los cambios en el crecimiento afectan a la histología hepática e intestinal, como también en la expresión génica de IGF1, IGF2, GHR1 y GHR2 del paiche. Se distribuyeron aleatoriamente 96 juveniles con pesos promedio de 198 g, en dos grupos: control (alimentado diariamente) y tratados (dos semanas de ayuno seguidas de tres semanas de realimentación). Se tomaron medidas de peso y longitud semanalmente, así como muestras de hígado, intestino y músculo. Las muestras para histología se fijaron en solución de Bouin, se incluyeron en parafina y se tiñeron con hematoxilina y eosina; las muestras para transcriptómica fueron sumergidas en *RNAlater* y almacenadas a -20°C hasta el momento de la purificación del ARN total. Los peces ayunados disminuyeron en peso e índice hepatosomático ($p < 0.001$), con una longitud menor a los controles ($p < 0.001$). Se observó una reducción en el tamaño de los hepatocitos y sus núcleos, así como un adelgazamiento del diámetro y la capa muscular del intestino ($p < 0.05$), también se observaron signos de atrofia y desorganización de las vellosidades intestinales, junto con una disminución en la cantidad de células calciformes. Por otra parte, la expresión hepática fue principalmente influenciada por la sobreexpresión de IGF1, mientras que la expresión del músculo fue en la sobre expresión de GHR1. Sin embargo, la realimentación permitió una recuperación de los parámetros hepáticos e intestinales, lo que sugiere una alta capacidad de adaptación y resistencia del paiche al ayuno.

Palabras claves: Ayuno, expresión génica, hígado, intestino, IGF1, paiche, realimentación.

ABSTRACT

The paiche (*A. gigas*) inhabits the Amazon basin and is one of the largest fish in the world. Despite being highly demanded for the quality of its meat, its cultivation faces technological obstacles and problems of overexploitation. The liver is a crucial organ in vertebrates, since it acts as an energy reserve and producer of factors such as IGF1, the main promoter of somatic growth in fish. The objective of this work was to evaluate how changes in growth affect the hepatic and intestinal histology, as well as the gene expression of IGF1, IGF2, GHR1 and GHR2 in paiche. Ninety-six juveniles with average weights of 198 g were randomly distributed into two groups: control (fed daily) and treated (two weeks of fasting followed by three weeks of refeeding). Weight and length measurements were taken weekly, as well as liver, intestine and muscle samples. Samples for histology were fixed in Bouin's solution, embedded in kerosene and stained with hematoxylin and eosin; samples for transcriptomics were immersed in *RNAlater* and stored at -20°C until the time of total RNA purification. Fasted fish decreased in weight and hepatosomatic index ($p < 0.001$), with shorter length than controls ($p < 0.001$). A reduction in the size of hepatocytes and their nuclei was observed, as well as a thinning of the diameter and muscle layer of the intestine ($p < 0.05$), signs of atrophy and disorganization of the intestinal villi were also observed, along with a decrease in the number of calciform cells. On the other hand, hepatic expression was mainly influenced by IGF1 overexpression, while muscle expression was in the overexpression of GHR1. However, refeeding allowed a recovery of hepatic and intestinal parameters, suggesting a high adaptive capacity and resistance of paiche to fasting.

Keywords: Fasting, gene expression, liver, intestine, IGF1, paiche, refeeding.

1. INTRODUCCIÓN

Arapaima gigas, conocido como paiche en Perú y pirarucu en Brasil, es considerado el segundo pez escamado más grande que habita en aguas continentales de América del sur y el sexto pez escamado más grande del mundo (Chu Koo *et al.*, 2017, p. 14; Farias *et al.*, 2019, p. 17). De manera natural *A. gigas*, tiene una distribución que abarca parte de las Guyanas y el eje principal de los sistemas Ucayali-Amazonas y Tocantins en Brasil, Perú, Colombia, Ecuador y Venezuela (Arantes *et al.*, 2013, p. 1264), también fue introducido en países como Bolivia, Cuba, México, China, Singapur y Tailandia (FAO, 2012, p. 28).

El paiche es una especie ampliamente reconocida por su importancia cultural, social, económica y ecológica (Cavole *et al.*, 2015, p. 4), destaca además por su alto valor nutricional y la excelente calidad de su carne (Fogaça *et al.*, 2011, p. 97). Estos atributos impulsaron la demanda a nivel nacional e internacional, lo que desencadenó una serie de impactos negativos, incluyendo la pesca excesiva, la degradación de su hábitat y capturas accidentales, estas actividades provocaron notables reducciones en las poblaciones naturales del paiche y conduciéndolo a un estado de alta vulnerabilidad respecto a su posible extinción (Imbiriba, 2001, p. 306; Castello *et al.*, 2015, p. 590), por lo que la especie fue incluida en el Apéndice II de la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora (CITES) por la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) (Ríos, 2012, p. 105).

Dado el interés en la conservación y el potencial del paiche para adaptarse y prosperar en entornos controlados debido a su tolerancia a variaciones en la temperatura, pH y concentración de oxígeno (Chu-Koo *et al.*, 2009, p. 32), se ha promovido la acuicultura en Brasil, Colombia y Perú, siendo en nuestro país donde la producción superó las 142 TM en 2016, de las cuales, aproximadamente 40 TM se exportaron a Estados Unidos, Francia y España (PRODUCE, 2016, pp. 146, 166). Sin embargo, la sostenibilidad de esta actividad sigue siendo un desafío debido al elevado costo de alimentación del paiche, que representa el mayor gasto operativo (60% - 70% de los costos totales) y limita la rentabilidad del negocio (Miranda *et al.*, 2011, p. 241).

Por lo tanto, comprender los factores involucrados en la regulación del crecimiento es de gran importancia para la producción acuícola. Al igual que en los mamíferos, la regulación endocrina del crecimiento en los teleósteos ocurre principalmente a través del eje hormona del crecimiento (GH)/factor de crecimiento tipo insulina I (IGF1) (Picha *et al.*, 2008, p.

201). GH es un importante regulador del crecimiento en los vertebrados y se expresa principalmente en la hipófisis, aunque también se encuentra en tejidos extrahipofisarios, y sus efectos biológicos dependen de la presencia de su receptor (GHR) en los tejidos diana, principalmente el hígado y el músculo (Yang *et al.*, 1999, p. 132; Chang y Wong, 2009, p. 154). Otro factor importante es IGF1, el cual desempeña funciones fundamentales en el desarrollo de los peces (Miandare *et al.*, 2013, p. 45), ejerciendo una amplia variedad de funciones como la regulación del crecimiento mediada por GH, el desarrollo muscular, osmorregulación y hematopoyesis; y se expresa principalmente en el hígado, así como en el músculo y el tejido óseo (Funkenstein *et al.*, 1997, p. 199).

El análisis histológico de órganos diana es una valiosa herramienta para detectar alteraciones en los tejidos debido a su alta sensibilidad y especificidad. El hígado y el intestino son órganos relevantes en estas evaluaciones debido a su estrecha asociación con los procesos de crecimiento, donde el hígado desempeña un papel fundamental en el metabolismo, almacenamiento de nutrientes, desintoxicación y porque actúa como uno de los órganos hematopoyéticos en los peces; mientras que el intestino, es crucial para la digestión y absorción de nutrientes (Mahony *et al.*, 2016, p. 1344).

En la búsqueda de optimizar la alimentación en la acuicultura, se han implementado diversas estrategias para mejorar la eficiencia de la alimentación y los resultados productivos, estando entre las convencionales el uso de bandejas de alimentación, alimentadores automáticos, suplementos alimenticios y la modificación de la composición del alimento. Actualmente se practican la aplicación de períodos cortos de ayuno seguidos de un período de realimentación que puede producir efectos beneficiosos en algunas especies. La reducción controlada de la ración de alimento es utilizado como una estrategia para obtener beneficios similares a los obtenidos con una alimentación constante, lo que permite optimizar el uso de los recursos alimentarios, mejorar la eficiencia de la conversión alimenticia y minimizar posibles impactos ambientales asociados a la sobrealimentación (Castro y Ordinola, 2021, pp. 3-4; García, 2022, p. 5).

El ayuno y la realimentación tienen una gran importancia práctica, pues sería posible implementar períodos controlados de ayuno, así eliminando la alimentación durante ciertos días, lo que conduce a un ahorro significativo de alimento y al mismo tiempo mejorar la eficiencia en el suministro de alimento, lo que provocaría un crecimiento compensatorio, clave en esta estrategia, pero sin comprometer el bienestar y desarrollo de los peces (Gómez *et al.*, 2016, p. 572; Castro y Ordinola, 2021, p. 6; García, 2022, p. 20).

En tal sentido, el análisis de los cambios que suceden en el hígado e intestino, brindan información valiosa sobre la eficacia del ayuno y la realimentación para estimular el crecimiento en el paiche, así como para comprender los cambios morfológicos que influyen en estos tejidos y su capacidad para promover o afectar el crecimiento (Caballero *et al.*, 2003, p. 337; Hurtado, 2009, p. 34; Giorgini *et al.*, 2018, p. 6).

Por tanto, el comprender mejor los genes reguladores del crecimiento y sus efectos en *A. gigas* durante el ayuno y la realimentación podría ayudar a determinar el mejor régimen para regular y mejorar su crecimiento y desarrollo, lo que sería beneficioso para la acuicultura de esta especie. El objetivo de este estudio fue investigar cómo el protocolo de ayuno y posterior realimentación afectarían el crecimiento del paiche, cuantificando la expresión de genes clave relacionados con el crecimiento, como IGF1/IGF2 y los receptores de la hormona de crecimiento (GHRs), junto a análisis histológicos del hígado e intestino, para evaluar los cambios morfológicos relacionados con la regulación del crecimiento.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Biología de *Arapaima gigas*

El paiche es uno de los peces de agua dulce más grandes del mundo, alcanza una longitud superior a los 80 cm durante su primer año de vida en el quinto año puede llegar a medir cerca de los 2 m y en condiciones favorables, el paiche puede llegar a tener una longitud total de hasta 3 metros y un peso promedio de 200 kg. Estas características lo convierten en una especie con la tasa de crecimiento más destacada dentro de los peces escamados (Campos, 2001, p. 2; Imbiriba, 2001, p. 309; Arantes *et al.*, 2010, p. 6; Watson, 2011, p. 40; Chu Koo *et al.*, 2017, p. 15).

La cabeza del paiche es proporcionalmente pequeña en comparación con su cuerpo y representa aproximadamente el 10% de su peso total. Tiene 58 placas de diferentes tamaños que se distribuyen en la superficie de la cabeza, cada una con 6 a 8 agujeros en el borde posterior, cuando esos agujeros son sometidos a presión, se libera una mucosidad blanquecina que los nativos de la selva consideran como leche, de la cual se alimentan las pequeñas larvas mientras nadan en cardúmenes cerca de las cabezas de los adultos (Imbiriba, 2001, p. 307).

El cuerpo del paiche se caracteriza por su morfología alargada y ovalada, destacando la presencia de escamas cicloideas grandes y gruesas. Los alevines y juveniles de paiche exhiben un color negro, el cual se transforma en un tono marrón claro alrededor de los ocho o nueve meses de edad. En los adultos de paiche, la cabeza presenta un color marrón, mientras que el dorso se caracteriza por su color negro y la mitad posterior del cuerpo se encuentra cubierta por escamas, las cuales, durante el período de reproducción en los machos, muestran un oscurecimiento marcado con bordes de color rojo oscuro (Campos, 2001, pp. 6-7; Garcia y Sugaya, 2015, p. 5; Chu *et al.*, 2017, p. 37).

Las aletas pectorales del paiche se encuentran separadas de las aletas pélvicas, mientras que las aletas dorsal y anal se ubican cerca a la aleta caudal. Asimismo, las aletas ventrales del paiche adulto presentan manchas negras y amarillas dispuestas en ondas irregulares y las aletas dorsal, anal y caudal cuentan con manchas claras (Dantas *et al.*, 2021, p. 68).

2.2. Taxonomía

A. gigas se clasifica como una de las cinco especies de peces de aguas dulces tropicales reconocidas por la comunidad científica, como parte de la familia Arapaimidae (Chu *et al.*, 2017, p. 13).

Reino: Animalia

Filo: Chordata

Subfilo: Vertebrata

Clase: Actinopterygii

Subclase: Teleostei

Orden: Osteoglossiformes

Suborden: Osteoglossoidei

Superfamilia: Osteoglossoidae

Familia: Arapaimidae

Género: *Arapaima*

Especie: *Arapaima gigas* (Cuvier, 1822)

A. gigas se ha considerado un género monotípico desde 1847; sin embargo, en base a nuevas descripciones de las características morfológicas y morfométricas, se cree en la existencia de hasta cuatro especies del género *Arapaima*: *A. gigas*, *A. agassizii*, *A. mapae* y *A. leptosoma*; quedando aún por confirmar, la validez de una quinta especie denominada *A. arapaima* (Stewart, 2013, pp. 474-475)

2.3. Aspectos alimenticios

A. gigas, es un pez depredador que se alimenta principalmente de peces de menor tamaño como boquichico (*Prochilodus nigricans*), mojarra (*Tetragonopterus chalceus*) y especialmente carachamas (*Panaque schaeferi*). La boca es de posición superior, grande y oblicua, y cuenta con muchos dientes relativamente pequeños y similares entre sí. La lengua está bien desarrollada y se caracteriza por un hueso interno plano y ligeramente arqueado llamado hioides, que mide entre 10 y 20 cm de largo y está recubierto por numerosos conos esmaltados pequeños pero resistentes. Además, en la boca tiene dos placas óseas laterales que funcionan como verdaderos dientes, capaces de detener y matar a la presa antes de ser tragada (Hurtado, 2009, p. 11; Chu *et al.*, 2017, pp. 48-49). Captura a su presa mediante un potente movimiento de succión y un rápido movimiento de cabeza. El paiche es activo durante los amaneceres y atardeceres, ya que busca su alimento a lo largo de toda la columna

de agua, mientras que durante el día busca refugio en la sombra para evitar el calor intenso (Guerra *et al.*, 2002, p. 35; Chu *et al.*, 2017, p. 15).

2.4. Producción

La actividad acuícola en la Amazonía peruana tuvo sus inicios en la década de 1940 con el paiche, pero la captura intensiva de este pez, motivada por la alta calidad de su carne, ocasionó una notable disminución de su población. Como respuesta a esta situación, el Estado peruano estableció áreas protegidas para su conservación y estudio, con el objetivo de promover su explotación de manera sostenible y fomentar su cultivo extensivo. Según Rebaza *et al.* (1999, p. 54), el paiche ha demostrado un notable potencial para la piscicultura debido a su resistencia y adaptabilidad a las condiciones de cultivo, mostrando además un excelente desempeño zootécnico en ambientes controlados, con un alto valor en el mercado local. Además, presenta condiciones óptimas para la elaboración de productos con valor agregado, como carne, escamas y cuero (Alvan *et al.*, 2017, p. 184; Delgado, 2019, p. 67).

Loreto y Ucayali son las regiones donde se ha dado el mayor crecimiento en la producción de carne y semillas de paiche (Fig. 1), lo que ha sido posible gracias a los significativos avances en el conocimiento científico de la especie y al desarrollo tecnológico en su cultivo. Estos avances han sido liderados principalmente por el Instituto de Investigaciones de la Amazonía peruana (IIAP) y por empresarios dedicados a la paichicultura, quienes han contribuido al ajuste de la tecnología de reproducción y producción (Alvan *et al.*, 2017, pp. 183-184).

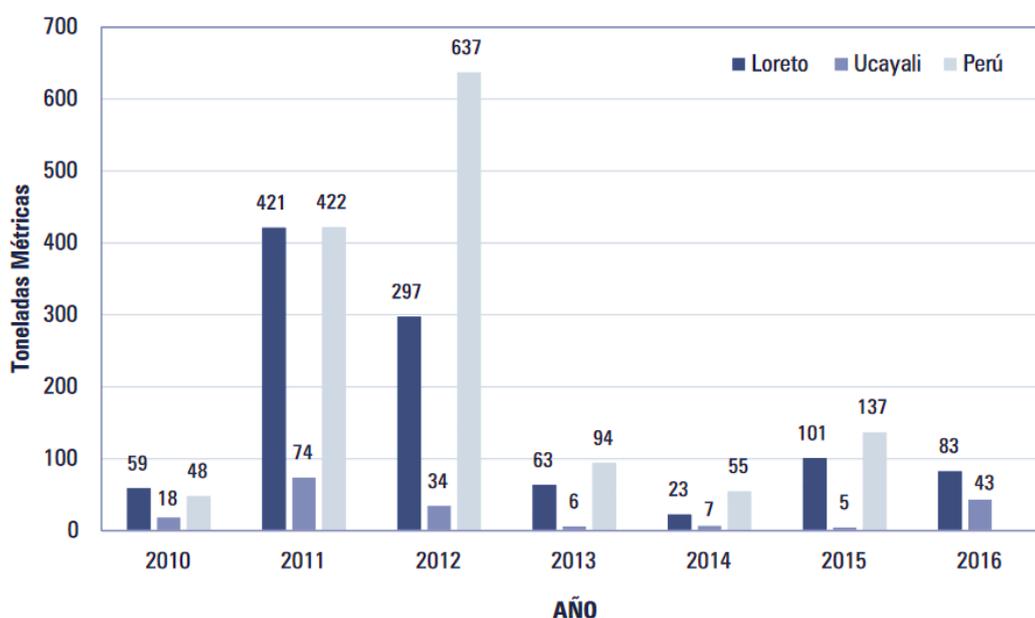


Figura 01. Producción de paiche en el período 2007 – 2016. Figura tomada de Alvan *et al.* (2017, p. 186).

La incursión de productores e inversionistas privados ha desempeñado un papel importante en el aumento de la producción, expandiendo la actividad hacia otras regiones como Piura, Lima y Tumbes. Ejemplos claros del creciente interés y del prometedor futuro de la paichicultura en el país son la participación de importantes consorcios económicos nacionales, como el Grupo Hochschild (propietario de Acuícola Los Paiches S.A.C.), el Grupo Favre (Acuicultura de Huaura S.A.C.) y Camposol S.A. (Grupo Marinazul S.A.) (Alvan *et al.*, 2017, p. 186).

El aumento gradual de la disponibilidad de semillas y la introducción de una amplia variedad de alimentos balanceados comerciales (como Purina, Nutrimix, Aquatech y Nicovita) destinados a la alimentación del paiche, han facilitado la incursión de inversionistas en la producción de esta especie en las localidades de Yurimaguas, Iquitos y Pucallpa. Sin embargo, su consumo está principalmente dirigido a los estratos socioeconómicos medio y alto, siendo menos común en los sectores de menores ingresos (García y Sugaya, 2015, p. 45; Alvan *et al.*, 2017, p. 187).

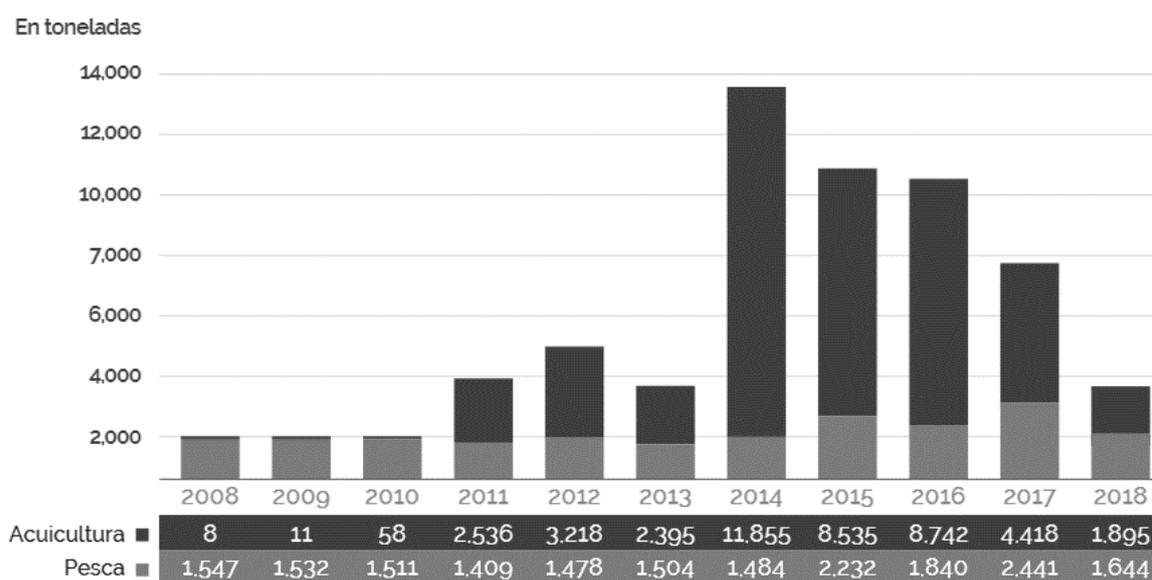


Figura 02. Producción mundial de paiche proveniente de la pesca y la acuicultura entre el período de 2008 – 2018. Figura tomada de Del Carpio (2020, p. 29).

Entre 2010 al 2016, se obtuvieron 1.046,7 TM de carne de paiche en Loreto, generando un movimiento económico total de US\$ 157,4 millones. El año de mayor producción fue 2011, con 421,2 TM (US\$ 6,3 millones), en el mismo período en Ucayali, la cosecha de paiche fue de 74 TM. En el año 2014, la producción mundial de paiche alcanzó una producción de 13'300 TM (Fig. 02), donde el 95,3% correspondió a Brasil y el 4,7% a Perú (227 TM/año) (Alvan *et al.*, 2017, p. 188; Del Carpio, 2020, p. 28).

El mercado peruano y particularmente el mercado de Lima se presentan como espacios prometedores para la comercialización de la carne de *A. gigas*, aunque aún no lo suficientemente amplios para impulsar plenamente la actividad (Bergleiter, 2002, p. 45). Aunque el paiche es considerado como un producto destinado principalmente a la exportación, datos oficiales de PRODUCE (2016) indican que el 47,4% de la carne proveniente de la acuicultura entre 2010 - 2015 (un poco más de 632 TM) se comercializó en el mercado interno (Fig. 03) (García y Sugaya, 2015, p. 47; Alvan *et al.*, 2017, p. 187).

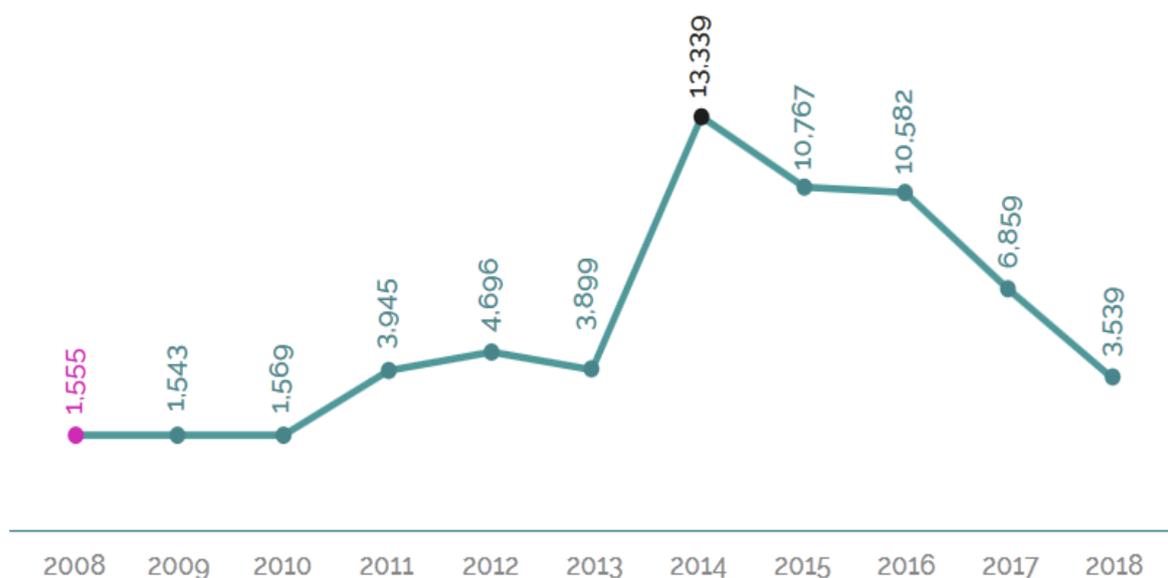


Figura 03. Producción mundial de carne de paiche en toneladas. Entre el período de 2008 – 2018. Figura tomada de Del Carpio (2020, p. 28).

El paiche, al tener todas las características necesarias para su producción acuícola, presenta una demanda en diversos mercados internacionales (Schaefer *et al.*, 2012, p. 50). La Asociación de Exportadores del Perú ha identificado previamente mercados de interés, entre ellos Estados Unidos, Alemania, Suiza, Chile, España, Holanda, Francia, Bélgica y Emiratos Árabes Unidos, siendo Estados Unidos el principal destino para la carne de paiche, con un total de 284 TM exportadas en el período 2010-2015, con un valor total de US\$ 4.02 millones (Fig. 04) (Schaefer *et al.*, 2012, p. 51; García y Sugaya, 2015, p. 45; PRODUCE, 2016, pp. 165-167; Chu Koo *et al.*, 2017, p. 91).

Además, se estima que el precio inicial de introducción para la venta de la carne de paiche en el mercado europeo oscilaría entre los 25 y 40 US\$/kg de carne fresca, de acuerdo a las expectativas del mercado internacional para este producto, como se ha observado en países como Bolivia, China, Cuba, México, Filipinas, Singapur y Tailandia (García y Sugaya, 2015, p. 48; PRODUCE, 2018, p.12; Del Carpio, 2020, pp. 29-32).

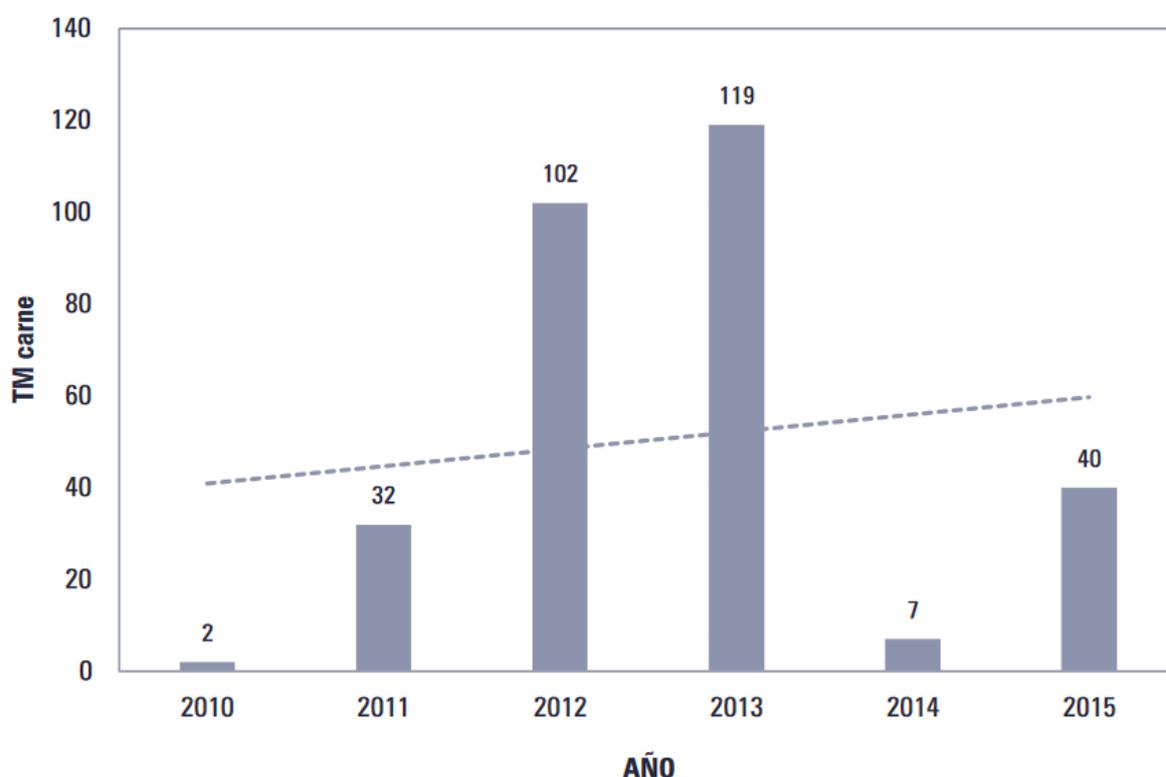


Figura 04. Exportaciones peruanas de carne de paiche (TM) entre los períodos de 2010 – 2015.
Figura tomada de Alvan *et al.* (2017, p. 188).

2.5. Sistema digestivo

La estructura básica del sistema digestivo en vertebrados consta de un tubo digestivo, que inicia en la cavidad bucofaríngea y se extiende a lo largo del cuerpo en forma de esófago, estómago e intestino, acompañado de órganos accesorios clave como el hígado (Fig. 05) y el páncreas y finaliza en el ano (Genten *et al.*, 2009, p. 75).

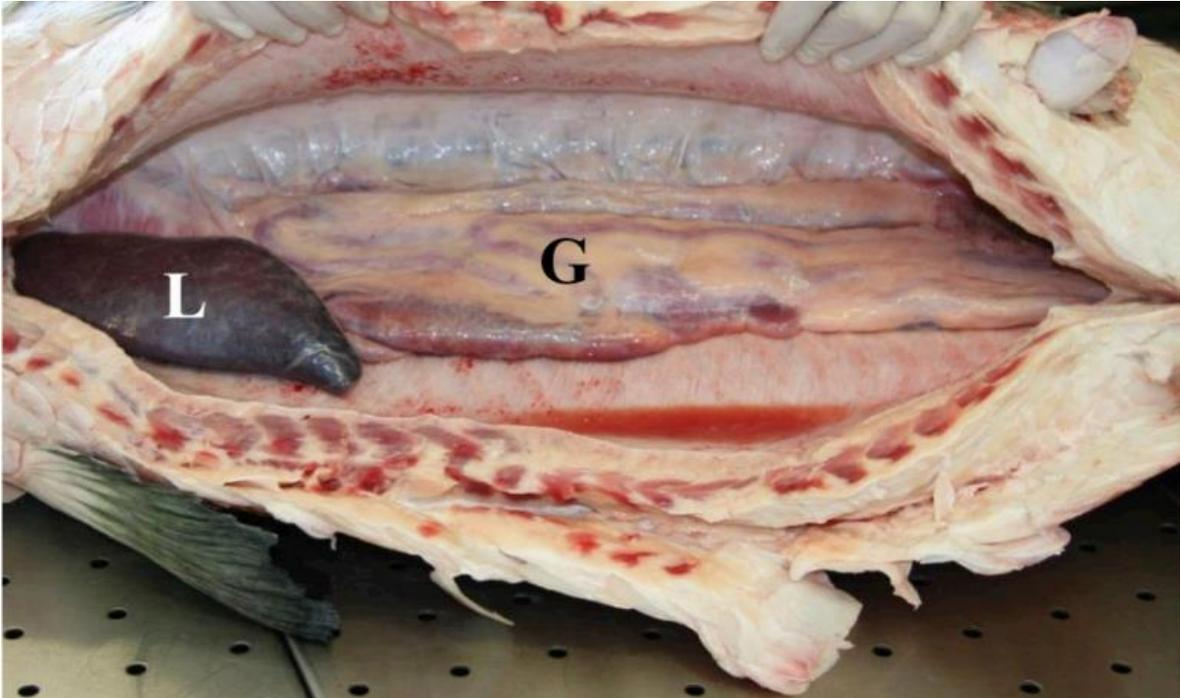


Figura 05. Cavidad abdominal de *A. gigas*. Hígado (L) e intestino (G). Figura tomada de Scadeng *et al.* (2020, p. 10)

2.4.1. Hígado

2.4.1.1. Organización estructural del hígado

El hígado está organizado en forma de túbulos de hepatocitos, que contienen canalículos, conductos biliares o productos como lumen, que están completamente separados por sinusoides, que junto con su espacio perisinusoidal (espacio de Disse) llenan los túneles o el laberinto, el cual es similar a la de las aves y los reptiles, presentando sin embargo características que la diferencian de la de los mamíferos. Por ejemplo, en los hígados de mamíferos, los principales conductos biliares parenquimatosos (canalículos) son cortos e interconectados con estructuras transicionales (productos biliares), y dentro de los túbulos hepáticos, las células epiteliales biliares son abundantes (Fig. 06) (Baratta *et al.*, 2009, p. 721).

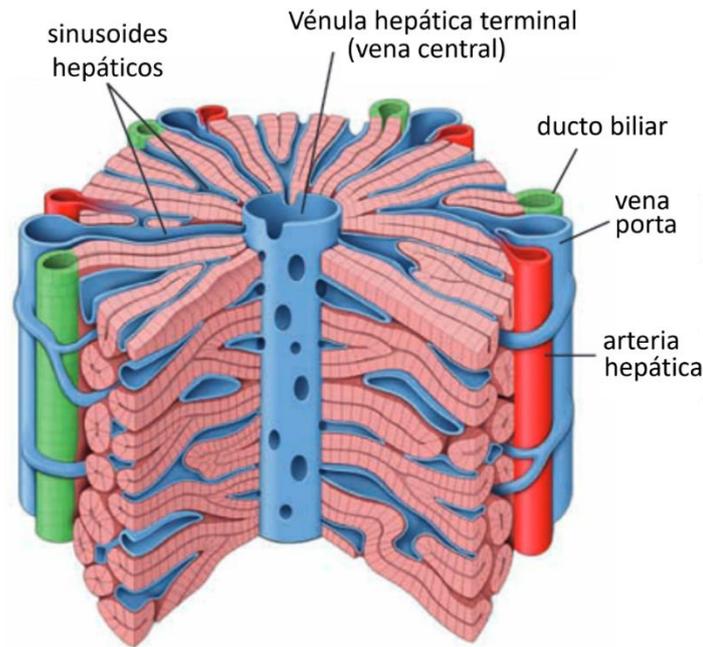


Figura 06. Esquema de un lobulillo hepático clásico de algunos mamíferos. Un lobulillo hepático clásico con triadas portales (arteria hepática, vena porta y conducto biliar) en cada una de las esquinas. Los vasos sanguíneos de las triadas portales envían ramas de distribución a lo largo de los lados del lobulillo, y estas ramas se abren en los sinusoides hepáticos. El eje largo del lobulillo está atravesado por la vénula hepática terminal (vena central), que recibe sangre de los sinusoides hepáticos (modificado de Ross y Pawlina, 2016, p. 631).

Por su parte en algunos teleósteos, el hígado está situado en la región media y anterior de la cavidad abdominal y se divide en lóbulos que se relacionan con el intestino a lo largo de la cavidad, se compone por un estroma y un parénquima:

- Estroma: corresponde al tejido de sostén, como la cápsula que recubre, protege e individualiza al órgano. Desde la cápsula se extienden septos hacia el interior, donde una red de tejido conectivo laxo sostiene el parénquima (Torres *et al.*, 2010, p. 709).
- Parénquima: está compuesto por dos componentes anatómicos: el hepático y el pancreático. El componente hepático corresponde a una glándula mixta compuesta por hepatocitos con función endocrina y un sistema de conductos que drena la bilis, con función exocrina (Radu *et al.*, 2020, p. 18).

En algunos peces como el pez ajo, el lenguado inglés, la platija estrellada, el lenguado de roca y el pez gato, se han observado los acinos de las células pancreáticas exocrinas, así como las células epiteliales centroacinares y ductulares, que se extienden a través del compartimento estromal e incluyen las venas proximales y el sistema portal hepático (Hussein *et al.*, 2023, p. 13).

En términos de unidad funcional, existen tres formas de describir la estructura del hígado: el lobulillo clásico, el lobulillo portal y el acino hepático (Fig. 07) (McMillan y Harris, 2017, p. 375).

- El lobulillo clásico (Fig.07A): Estructura que es fácil de visualizar y se basa en la distribución de las ramas de la vena porta y la arteria hepática dentro del hígado. En el centro del lobulillo, se encuentra una vénula relativamente grande conocida como vénula hepática terminal o vena central, que sirve como punto de drenaje para los sinusoides hepáticos (López *et al.*, 2020, p. 647).
- El lobulillo portal (Fig 07B): Se define al trazar sus márgenes exteriores mediante líneas imaginarias entre tres venas centrales más próximas a una tríada portal, lo que delimita una estructura triangular que incluye las porciones de los tres lobulillos clásicos que secretan la bilis hacia su conducto biliar axial. Este concepto permite una descripción de la estructura del parénquima hepático comparable a la de otras glándulas exocrinas (Vicentini *et al.*, 2005, p. 215).
- El acino hepático (Fig. 07C): Que se forma a partir de la unión de líneas imaginarias trazadas desde dos espacios portales hacia las dos venas centrales adyacentes, ya que recibe irrigación sanguínea a través de ramas terminales tanto de la vena porta como de la arteria hepática. Esta unidad estructural proporciona la mejor correlación entre la perfusión sanguínea, la actividad metabólica y la patología hepática (Torres *et al.*, 2010, p. 709).

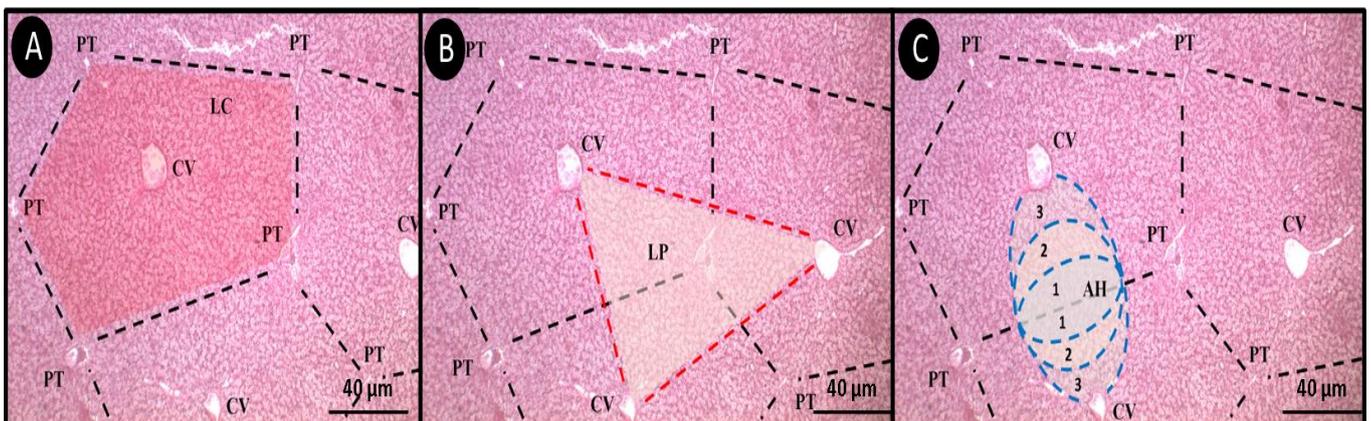


Figura 07. Unidades morfofuncionales hepáticas de *A. gigas*. A). El lobulillo clásico (sombreado rojizo) obtenido al unir varias triadas portales (PT) en torno a una vena central del lobulillo (CV); B). El lobulillo portal (sombreado blanco) obtenido al unir tres venas centrales; C). El acino hepático (sombreado azul) obtenido por la unión de líneas imaginarias trazadas desde dos espacios portales hacia las dos venas centrales.

2.4.1.2. Fisiología del hígado

El hígado de los peces desempeña funciones que en los mamíferos son realizadas con el páncreas, donde ocurre la captación, almacenamiento y distribución de nutrientes y vitaminas al torrente sanguíneo, y en la degradación de sustancias tóxicas y fármacos (Ross y Pawlina, 2016, p. 626).

El hígado también es importante en el metabolismo de los hidratos de carbono, ya que mantiene un suministro adecuado de nutrientes para los procesos celulares, y en el metabolismo de la glucosa, donde el hígado fosforila la glucosa absorbida del tracto gastrointestinal para convertirla en glucosa-6-fosfato, lo que según las necesidades energéticas, se almacena en el hígado en forma de glucógeno o se utiliza en las vías glucolíticas, esto durante eventos como el ayuno, degradándose mediante la glucogenólisis y liberando glucosa al torrente sanguíneo para cubrir las necesidades energéticas (Karatas, 2018, p. 1726).

El hígado, cumple múltiples funciones tanto exocrinas como endocrinas en el organismo. En su rol exocrino, el hígado despliega una actividad destacada al sintetizar y secretar la bilis, una secreción compleja que consta de sales biliares, fosfolípidos y colesterol, esencial para la digestión y absorción de grasas que se almacena en la vesícula biliar y se libera en el intestino en respuesta a la ingesta de alimentos, contribuyendo así al proceso de emulsificación y absorción de lípidos (Ross y Pawlina, 2016, p. 626).

En su rol endocrino el hígado desempeña importantes funciones como:

- Modificar la estructura y función de varias hormonas. Por ejemplo, amplifica la acción de la GH mediante la producción de IGF1. También degrada hormonas pancreáticas como la insulina y el glucagón (Ross y Pawlina, 2016, p. 629).
- Producción y secreción de proteínas plasmáticas circulantes como: albúminas, lipoproteínas, y glucoproteínas (Ross y Pawlina, 2016, p. 627).

2.4.1.3. Citotipos hepáticos

Los teleósteos muestran diversos citotipos en el hígado, tales como los hepatocitos, células endoteliales (células epiteliales especializadas que recubren las ramas intrahepáticas de la vena porta, la arteria hepática y las derivaciones de la vena hepática), células estrelladas hepáticas o células Ito (células del tejido conectivo del hígado situadas cerca de los sinusoides hepáticos), células de Kupffer (macrófagos fagocíticos residentes en el hígado) y células mesoteliales (se incorporan como revestimiento de la superficie externa del hígado). En algunos peces, se encuentran acinos de las células pancreáticas exocrinas, conocido como hepatopáncreas (Radu *et al.*, 2020, p. 19).

a. Hepatocitos

Los hepatocitos caracterizados por ser células poliédricas y grandes con un núcleo redondo que contiene un nucléolo distintivo, constituyen aproximadamente el 80% de las células hepáticas en los teleósteos, y se organizan en cordones o acúmulos junto con los sinusoides, que forman placas celulares anastomosadas en el lóbulo hepático. Asociadas a los sinusoides se encuentran las células de Kupffer, que forman parte del sistema retículo endotelial y constituyen la primera línea de defensa inmunitaria del hígado (Torres *et al.*, 2010, p. 707).

La membrana celular del hepatocito se evagina en sus superficies laterales, formando microvellosidades que se proyectan hacia el espacio perisinusoidal de Disse, permitiendo la difusión de sustancias metabolizadas hacia los sinusoides y luego hacia la vena central en el centro de cada lobulillo. Estas venas centrales se anastomosan formando la vena hepática, que lleva la sangre hacia la circulación general (Torres *et al.*, 2010, p. 709).

A pesar de estar asociadas al aparato digestivo, los hepatocitos tienen una vida media relativamente larga (5 meses) y una notable capacidad de regeneración en casos de pérdida de tejido hepático debido a procesos hepatotóxicos, enfermedades o cambios en la dieta (Cao *et al.*, 2011, p. 1826).

Una característica distintiva de los hepatocitos en comparación con otros tipos de células hepáticas residentes, es la presencia abundante de glucógeno, que se puede observar a través de la tinción positiva con el reactivo de Schiff ácido peryódico en la región celular y sus membranas plasmáticas. No obstante, una reducción en el contenido de glucógeno y un aumento relativo del retículo endoplásmico rugoso (RGE), hacen que estas células muestren una mayor basofilia durante los períodos de menor actividad sintética (Lemus *et al.*, 2017, p. 55).

El retículo endoplásmico rugoso (rER) generalmente predomina sobre el retículo endoplásmico liso (sER) en los hepatocitos (Fig. 08), y la proporción entre ambos tipos varía según el estado fisiológico y la posición de los hepatocitos dentro del acino hepático. rER junto con los ribosomas libres, son responsables de la síntesis de albúmina, fibrinógeno y otras proteínas plasmáticas que son liberadas a la circulación sanguínea (Ross y Pawlina, 2016, p. 638).

Los lisosomas acompañados de hidrolasas intervienen especialmente en el metabolismo del colesterol y de los lípidos, además regulan metabólicos de la célula, cubren con diferentes redes el núcleo, la membrana celular y otros orgánulos como las gotas lipídicas y las mitocondrias, y participan en los fenómenos de autofagia/lipofagia celular (Czaja, 2011, p. 6; K. Liu y Czaja, 2013, p. 4).

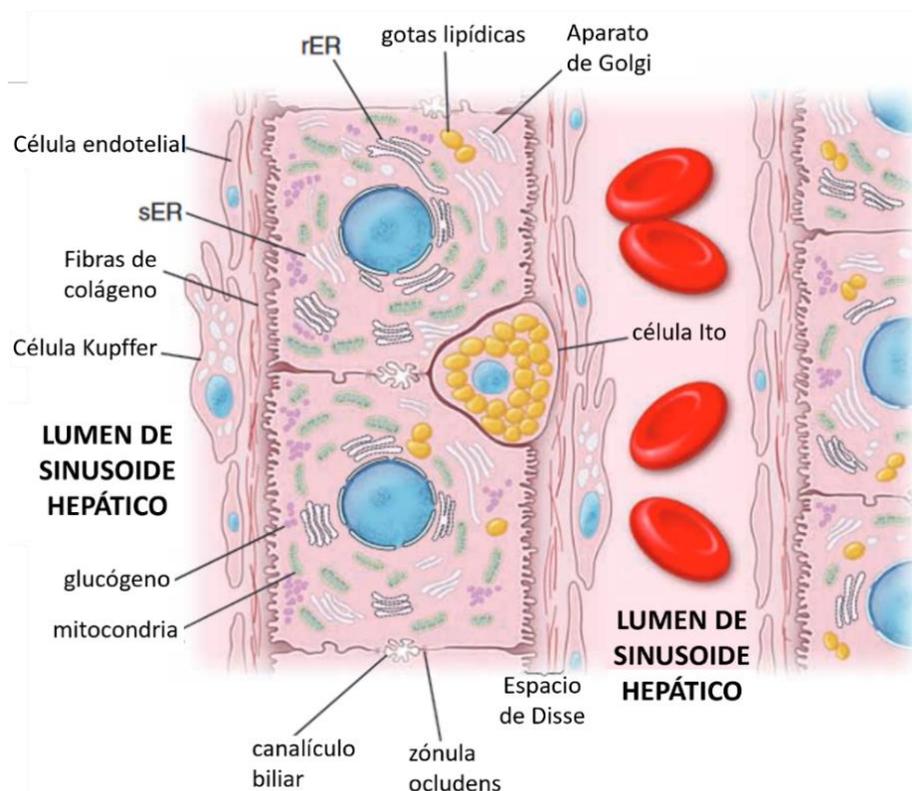


Figura 08. Diagrama esquemático de una placa de hepatocitos interpuesta entre sinusoides hepáticos. En un hepatocito cuboidal, se observa la localización y las características de una célula estrellada hepática (célula Ito) llena de vacuolas citoplasmáticas que contienen vitamina A. Las escasas fibras de colágeno que se encuentran en el espacio perisinusoidal (de Disse) son producidas por las células Ito. Obsérvese que el macrófago sinusoidal estrellado (célula de Kupffer) forma parte integrante del revestimiento sinusoidal (modificado de Ross y Pawlina, 2016, p. 637).

b. Células endoteliales

Las células que componen la pared sinusoidal hepática son células endoteliales aplanadas, tienen una estructura única con poros y fenestraciones variables, formando una delgada pared perforada (Carotti *et al.*, 2020, p. 18). Su función principal incluye filtrar sangre, regular el flujo sanguíneo y facilitar el intercambio de nutrientes y desechos con otras células hepáticas, también participan en la endocitosis, sintetizan diversas sustancias y desempeñan un papel en la regeneración hepática y la fibrosis (Ding *et al.*, 2010, p. 6; Carotti *et al.*, 2020, p. 18).

c. Células estrelladas hepáticas o células de Ito

En los teleósteos, las células del tejido conectivo que se encuentran en el hígado dentro del espacio perisinusoidal de Disse son las células estrelladas hepáticas, también conocidas como células de Ito que junto con los fibroblastos asociados al hilio, proporcionan soporte estructural al hígado. Las células Ito, al no almacenar grasa, se asemejan a los fibroblastos en cuanto a su estructura, ya que ambas células presentan unas cisternas retiradas del rER bien desarrollado, estas células han sido descritas en diversos peces y reptiles, presentando citofilamentos contráctiles que sugieren un papel en la regulación del flujo sanguíneo dentro de los sinusoides debido a la orientación de las células adiposas (Friedman, 2008, p. 133).

d. Células de Kupffer

En algunas especies de teleósteos las células de Kupffer son una característica típica del hígado, presentan grandes núcleos vesiculares y numerosos procesos citoplasmáticos que se proyectan hacia el lumen de los sinusoides (Narváez *et al.*, 2012, p. 258). Sin embargo, en muchos teleósteos, las células de Kupffer son poco comunes y apenas reconocibles en el hígado. Cuando están presentes, muestran una fuerte actividad fagocítica, siendo así la primera línea de defensa contra el daño hepático. De esta manera, las células de Kupffer constituyen un complejo celular muy dinámico, capaz de contrarrestar los microorganismos e identificar alteraciones en la integridad tisular (Karlmark *et al.*, 2009, p. 273; Gomez *et al.*, 2015, p. 3).

Los centros melanomacrófagos (CMM) presentan una composición heterogénea y se distribuyen entre los hepatocitos, alrededor de los conductos biliares, en la adventicia de los vasos sanguíneos y asociados a los complejos pancreático-venosos. Además, los melanomacrófagos se caracterizaban por presentar procesos similares a pseudópodos y núcleo excéntrico, y su citoplasma contenía numerosos gránulos similares a la melanina (Rocha *et al.*, 1994, p. 248; Coimbra *et al.*, 2007, p. 234; Sales *et al.*, 2017, p. 10)

En algunos teleósteos, se observaron macrófagos intrahepáticos, células de Kupffer y centros melanomacrófagos en el hígado. Los macrófagos que están situados entre los hepatocitos, presentan un citoplasma con lisosomas que aparecen como vesículas pequeñas y densas, vacuolas fagocíticas y fagosomas, que representaban grandes cuerpos densos con contenidos heterogéneos (Narváez *et al.*, 2012, p. 256).

Las células de Kupffer son pleomórficas localizadas en los sinusoides hepáticos que se proyectaban ligeramente hacia el lumen sinusoidal y establecen un estrecho contacto con las células endoteliales. Estas células presentan superficies celulares irregulares y contienen lisosomas, fagosomas vacuolares y algunas gotitas de grasa. Los núcleos de las células de Kupffer están indentados y a menudo tienen una localización excéntrica (Hussein *et al.*, 2023, p. 10).

2.4.2. Intestino

2.4.2.1. Desarrollo del intestino

El desarrollo intestinal en los peces teleósteos se acompaña de numerosos cambios morfológicos y funcionales. Las etapas iniciales del desarrollo en la mayoría de peces están influenciadas por los niveles de alimento endógeno hasta la eclosión, aunque algunos peces se desarrollan directamente hasta convertirse en juveniles con sistemas digestivos completamente funcionales al nacer como en el caso de *Anarhichas lupus* (Falk-Petersen y Hansen, 2001, p. 1476). De presentar una etapa larvaria, el canal alimentario en el momento de la eclosión es un tubo simple ubicado dorsalmente al saco vitelino, con un epitelio indiferenciado en los peces marinos con huevos pelágicos pequeños, o en proceso de diferenciación en peces con huevos demersales grandes como los salmónidos (Govoni *et al.*, 1986, p. 66).

Un ejemplo bien estudiado del desarrollo intestinal en peces es la lubina (*Dicentrarchus labrax*), que posee un verdadero estómago. En las larvas recién eclosionadas, se presenta un tubo intestinal recto con músculo liso, concluyendo la primera etapa cuando la boca y el ano se abren a los 7 días después de la eclosión (dph), donde el epitelio es en gran parte indiferenciado, aunque se pueden observar algunas diferencias a nivel ultraestructural (García *et al.*, 2001, p. 66).

En el lenguado japonés (*Paralichthys olivaceus*), el primordio estomacal se diferencia durante la fase larvaria a los 20 a 30 dph, aunque la secreción de pepsinógeno no comienza hasta la metamorfosis (45 dph). Por otro lado, las enzimas digestivas pancreáticas, como el tripsinógeno-1, comienzan a expresarse al primer dph, seguidas por la primera alimentación exógena a los 3 dph (Srivastava *et al.*, 2002, p. 634).

Para el pez cebra (*Danio rerio*), que carece de estómago, el desarrollo del aparato digestivo ocurre durante los estadios somáticos intermedios, en el cual el desarrollo morfológico del intestino comienza después de la eclosión hasta la apertura de la boca, luego la apertura del ano y finaliza con la remodelación, compartimentación y diferenciación del epitelio intestinal (Wallace y Pack, 2003, p. 23). Del mismo modo, en el caso de medaka (*Oryzias latipes*), que también carece de estómago, el desarrollo general del intestino es similar al del pez cebra, excepto que la formación del tubo comienza tanto en la porción anterior como en la posterior, donde el endodermo contribuye en gran medida al desarrollo embrionario del intestino (Iwamatsu, 2004, p. 605; Kobayashi *et al.*, 2006, p. 293).

En los mamíferos, el tubo endodérmico primitivo se forma en los primeros estadios de los somitos. El epitelio digestivo se origina a partir del endodermo intestinal, mientras que el mesénquima da lugar al músculo y al tejido conectivo, en peces modelo como, medaka y pez cebra, la faringe y el esófago se desarrollan de manera independiente a la morfogénesis del intestino rostral (Wallace y Pack, 2003, p. 22; Kobayashi *et al.*, 2006, p. 292).

2.4.2.2. Organización estructural del intestino

A diferencia de los mamíferos, en los peces no existe una distinción evidente entre el intestino delgado y el grueso. El tracto gastrointestinal de los peces puede dividirse en cuatro regiones topográficas: el intestino cefálico, el intestino anterior, el intestino medio y el intestino posterior (Santos *et al.*, 2024, pp. 856-857).

- El intestino cefálico: está formado por la boca y la faringe, y su función es obtener y procesar mecánicamente los alimentos (Evans y Claiborne, 2005, p. 551).
- El intestino anterior: que incluye el esófago y el estómago, es donde comienza la digestión química de los alimentos, aunque en algunos peces la degradación de los alimentos puede ocurrir parcial o totalmente en el estómago.
- El intestino medio: constituye la mayor proporción de la longitud intestinal, y es donde continúa la digestión química y se produce principalmente la absorción.
- El intestino posterior: es la parte final del intestino, incluyendo el recto, aunque en algunos casos no existe una distinción morfológica clara entre el intestino medio y el posterior (Wilson y Castro, 2010, p. 3).

La pared intestinal, que se extiende radialmente desde el intestino anterior al posterior, está compuesta por cuatro capas concéntricas (Fig. 09).

- La mucosa del tubo digestivo de los peces presenta características distintas, como el epitelio cilíndrico simple, las células caliciformes y las glándulas gástricas, son adaptaciones evolutivas que permiten a los peces habitar entornos diversos y tener una amplia variedad de hábitos alimentarios (Ortiz *et al.*, 2024, p. 7).
- La submucosa es otra capa de tejido conectivo laxo que cumple funciones vitales como: proporcionar soporte a las capas del tubo digestivo y permitir la flexibilidad y distensión necesarias para una absorción óptima de los nutrientes, las numerosas fibras de colágeno, aumentan su capacidad para sostener eficazmente las capas mucosas. Además, en peces como *Trichomycterus bogotensis*, la submucosa

contribuye a los mecanismos de defensa inmunitaria a través del tejido linfoide asociado al intestino (GALT) (Ortiz *et al.*, 2024, p. 7).

- La capa muscular está compuesta por músculo liso dispuesto en direcciones circular interna y longitudinal externa, debido a su función principalmente absorbente y leves movimientos peristálticos, facilita la disrupción física del alimento y la mezcla de las secreciones gástricas, típicas de las especies con hábitos alimentarios carnívoros, por ende, es menos gruesa comparada a la capa muscular del estómago (Ortiz *et al.*, 2024, p. 7).
- La capa serosa está compuesta por células mesoteliales y tejido conectivo laxo que contiene vasos sanguíneos y sólo se encuentra dentro de la cavidad celómica (Wilson y Castro, 2010, p. 15; Rodrigues y Carginin, 2017, p. 954).

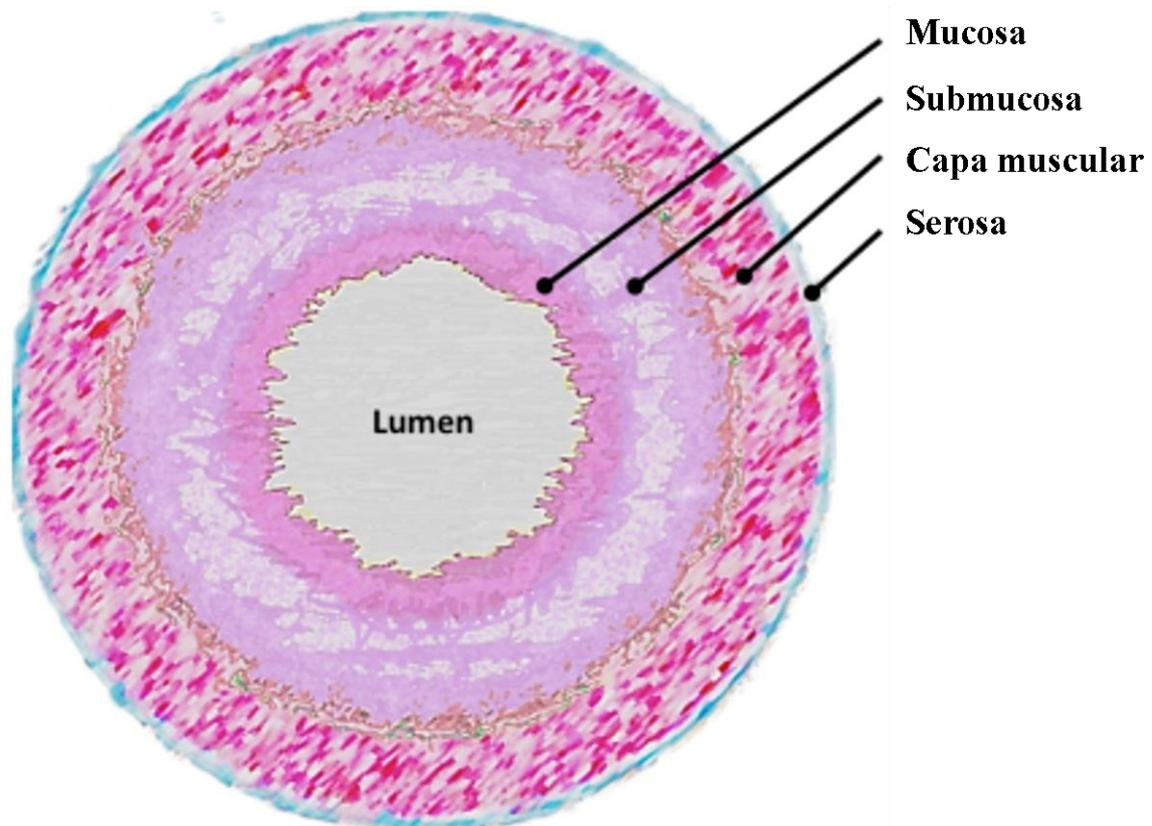


Figura 09. Las principales capas del intestino en teleósteos. Desde la superficie luminal interna hacia fuera, son la mucosa, la submucosa, la capa muscular y la serosa.

2.4.2.3. Morfología intestinal

La función principal del intestino en los peces es finalizar los procesos digestivos iniciados en el estómago y absorber los nutrientes, y para conseguirlo, aumentan la superficie intestinal mediante el plegamiento de la mucosa y la ampliación de la membrana plasmática apical (Genten *et al.*, 2009, p. 76).

La longitud intestinal en peces es variable y suele estar relacionada con diversos factores, como los hábitos alimentarios, el tamaño (en masa y longitud), la forma del cuerpo, la historia reciente de alimentación (hambriento/alimentado), la ontogenia y la filogenia (Evans y Claiborne, 2005, p. 58). Las especies carnívoras tienden a tener intestinos más cortos que los peces herbívoros, y estos últimos suelen presentar un extenso enrollamiento del intestino, lo cual se cree que permite el procesamiento posterior de elementos relativamente difíciles de digerir. No obstante, en los peces omnívoros no existe una relación clara entre el grado de herbivoría o carnivoría y la morfología intestinal (Evans y Claiborne, 2005, p. 60).

En teleósteos con intestino largo como los *Cyprinidae* y los *Loricadae*, puede observarse varias disposiciones de válvulas en bucle y en espiral. En cambio en los *Cobitidae*, *Salmonidae* y *Agnathans*, únicamente se observan intestinos cortos y rectos, sin bucles ni válvulas espirales (Wilson y Castro, 2010, p. 14).

Ruiz (2010, p. 60), sostiene que no existen relaciones claras entre la morfología intestinal y el tipo de alimentación, y que no es posible extraer conclusiones sobre una a partir de la otra, ya que factores como la calidad de la dieta y la eficiencia de la digestión también influyen en la morfología intestinal.

Un estudio realizado por Day *et al.* (2014, pp. 506-507), que examinó la superficie total del intestino en tres especies con distintos hábitos alimentarios: *Ictalurus punctatus* (omnívora), *Micropterus salmoides* (carnívora) y *Ctenopharyngodon idella* (herbívora), y al comparar individuos del mismo tamaño, encontró diferencias en la superficie total, a pesar de las variaciones en la longitud intestinal entre especies. Esto sugiere que, existe una compensación mediante un mayor plegamiento para acomodar las diferencias de longitud.

En la mayoría de los teleósteos, el inicio del intestino posterior se caracteriza por la presencia de una válvula "ileorrectal" o un engrosamiento de la capa muscular circular, un cambio repentino en el diámetro del intestino y/o el patrón de plegamiento de la mucosa, sin embargo estas características sólo se dan en algunos teleósteos, por lo general en los peces suelen ser corto y no observarse subdivisiones, terminando en el recto con un esfínter muscular que se abre en la cloaca (Ruiz, 2010, p. 54).

Las vellosidades intestinales

Las vellosidades intestinales forman parte esencial del aparato digestivo de los peces, son proyecciones en forma de dedo de la mucosa intestinal, y están compuestas por una capa de células epiteliales y un núcleo de tejido conectivo que contiene vasos sanguíneos y linfáticos, aunque la forma y el tamaño de las vellosidades intestinales pueden variar significativamente entre las diferentes especies de peces. Algunas especies de peces óseos tienen una superficie intestinal relativamente lisa, mientras que otras presentan pliegues longitudinales o con patrones complejos, y otras tienen vellosidades, similares a las de los vertebrados superiores (Fig. 10) (Genten *et al.*, 2009, p. 76).

En los peces no existen verdaderas glándulas de Lieberkühn entre el epitelio de las vellosidades y las invaginaciones tubulares simples de la superficie del intestino, excepto en los bacalaos, que tienen glándulas que se parecen a estas criptas (Bočina *et al.*, 2017, p. 90). En los mamíferos, las criptas albergan células inmunitarias de Paneth, se encargan de la secreción de líquido intestinal, algo similar se observó en *Anarhichas lupus*, donde las células madre se encuentran en la base de los pliegues intestinales primarios y/o secundarios (Hellberg y Bjerkås, 2000, pp. 294-295).

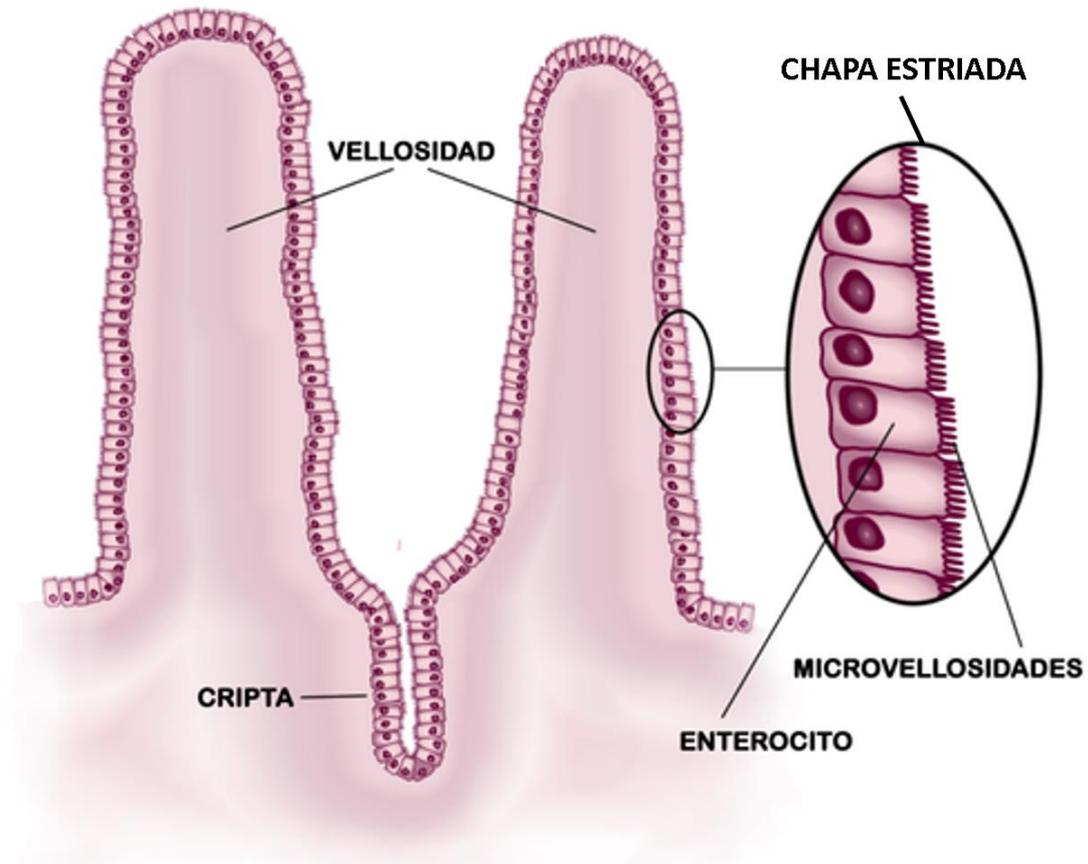


Figura 10. Vellosidades intestinales en teleosteos. Diagrama de las vellosidades intestinales que muestra la chapa estriada del epitelio que recubre las vellosidades. Obsérvense las criptas, los enterocitos con sus respectivos núcleos y las microvellosidades.

2.4.2.4. Citotipos intestinales

En este tejido epitelial del intestino se encuentran diferentes tipos celulares, los enterocitos, las células caliciformes, los linfocitos, las células enteroendocrinas, células zimógenas, células rodetes y células ciliadas, distribuidas por todo el epitelio (Fig. 11). El epitelio columnar que predomina en el epitelio intestinal, tiene una apariencia relativamente homogénea, aunque muestra diferenciación regional (Gao *et al.*, 2022, p. 2).

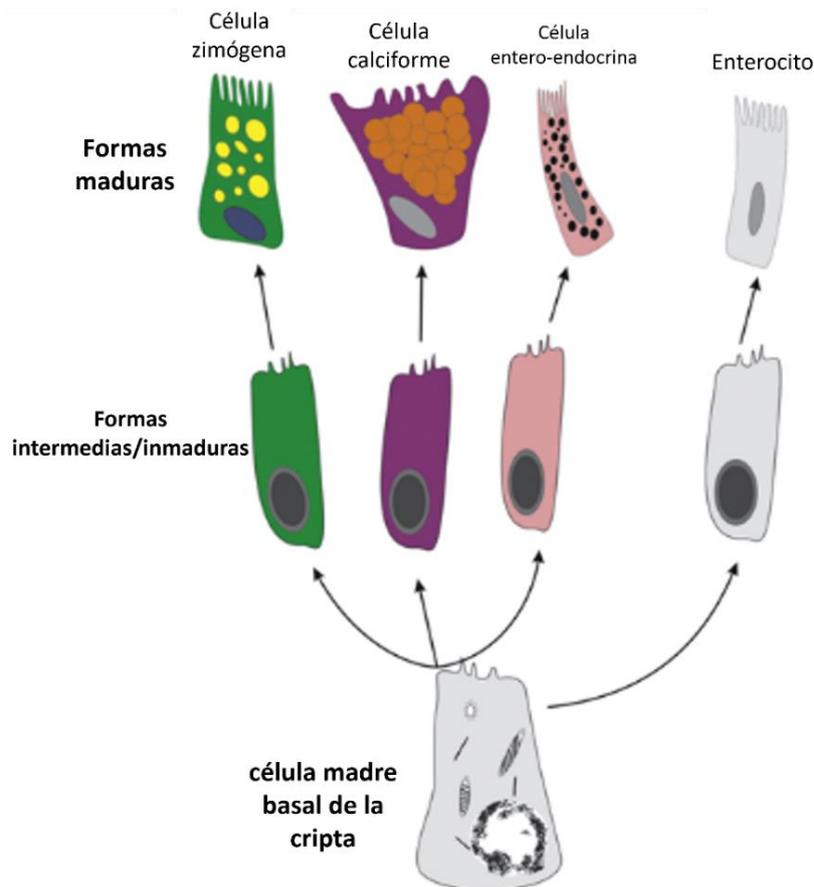


Figura 11. Tipos de células que derivan de las células madre basales en teleosteos. Las células madre basales dan lugar a cuatro líneas de células epiteliales que recubren el epitelio de los mamíferos y teleosteos, que adoptan su forma madura a medida que ascienden por las vellosidades (modificado de McMillan y Harris, 2017, p. 346).

a. Enterocitos

Los enterocitos suelen tener una morfología típica, siendo altos y estrechos con núcleos alargados situados debajo de la mitad de la célula, con mitocondrias en las regiones apical y basal, además de presentar una chapa estriada bien desarrollada y estructuras laminares paralelas a la membrana plasmática lateral (Fig. 12) (Dópido *et al.*, 2004, p. 21), que se anastomosan con la membrana basolateral, formando un laberinto basal que aumenta la superficie basolateral, como demostraron De Ruiter *et al.* (1985, p. 197), mediante microscopía electrónica de barrido de fractura por congelación. Cabe señalar que los peces en general carecen de las interdigitaciones laterales características de los enterocitos de los mamíferos (Langille y Youson, 1984, pp. 147-149).

La membrana apical de los enterocitos se caracteriza por la presencia de microvellosidades, que forman un marcado borde en cepillo visible al microscopio óptico denominada chapa

estriada la que contribuye con más del 90% de la superficie intestinal total y desempeña un papel crítico en la interfaz digestiva/absortiva (Savić *et al.*, 2012, p. 329).

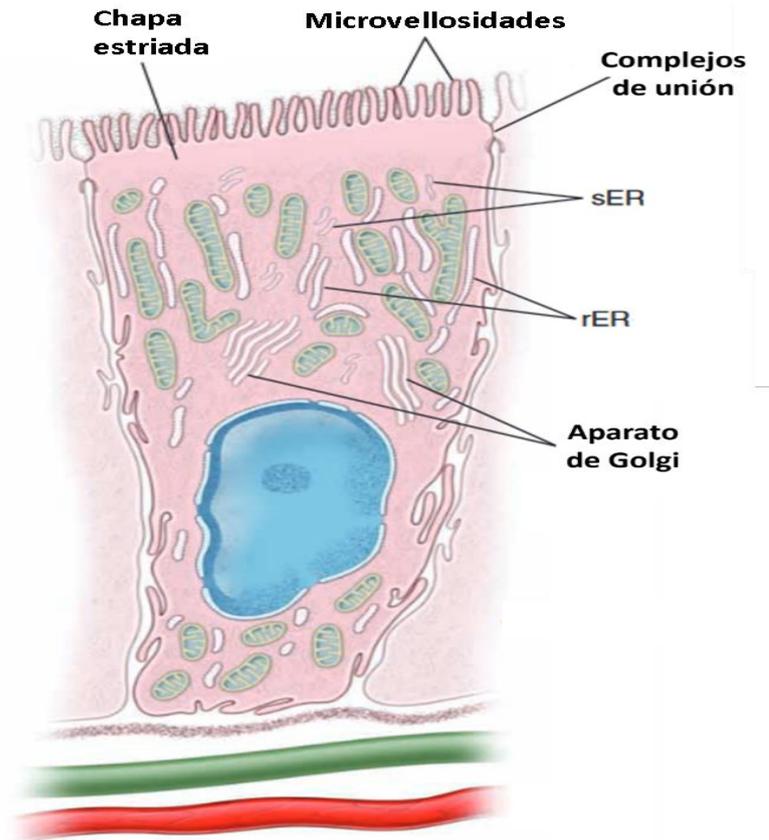


Figura 12. Diagrama de un enterocito en teleosteos. Esta célula tiene un borde estriado en su superficie apical y complejos de unión que sellan el lumen del intestino del espacio intercelular lateral. Se observan las vesículas del retículo endoplásmico liso (sER) y del retículo endoplásmico rugoso (rER) en la porción apical de la célula, y la presencia de vasos linfáticos (verde) y/o sanguíneos (rojo)

b. Células caliciforme

Las células caliciformes cuya denominación se deriva de su forma caliciforme son el tipo predominante de células mucosas que se encuentran en los intestinos de los peces. El núcleo está situado en la base cónica de la célula, que se ensancha y luego se contrae para formar un poro apical a través del cual se libera el moco (Fig. 13). Estas células se caracterizan por la abundancia de gránulos de mucina y pueden variar en densidad electrónica cuando se observan mediante microscopía electrónica de transmisión. La mayoría de las células caliciformes contienen sialomucina ácida como componente principal, aunque en menor cantidad también se encuentran sulfomucinas (Xiong *et al.*, 2011, p. 167).

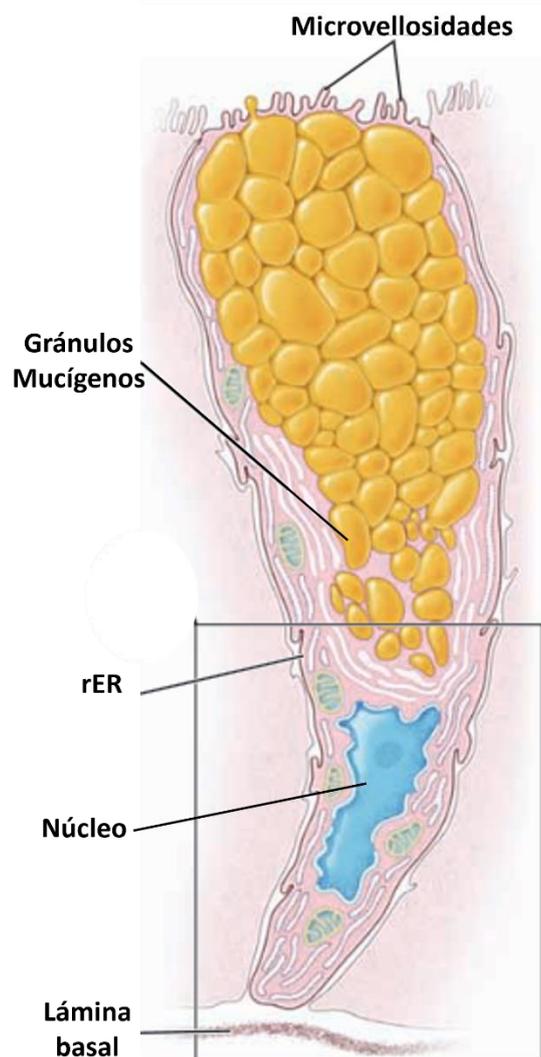


Figura 13. Diagrama de una célula caliciforme en teleosteos. La célula descansa sobre la lámina basal. La porción basal de la célula contiene el núcleo, el retículo endoplásmico rugoso (rER) y las mitocondrias. Los grandes gránulos de mucinógeno llenan la mayor parte de la porción apical de la célula y constituyen colectivamente la "copa mucosa" que se observa al microscopio óptico. El núcleo se encuentra en la parte basal de la célula (modificado de Ross y Pawlina, 2016, p. 590).

c. Células enteroendocrinas

Las células enteroendocrinas cuya identificación se da por la presencia de vesículas secretoras distintas en su citoplasma, se encuentran en el epitelio del tracto gastrointestinal de todos los peces. Los subtipos se clasifican según su posición relativa dentro del epitelio, siendo el de tipo abierto la que se extiende hasta la membrana apical, mientras que el de tipo cerrado no lo hace. Además, se clasifican según las diferencias en la morfología de los gránulos secretores (tamaño, forma y densidad electrónica) y la expresión de sustancias neuroendocrinas por inmunohistoquímica (Holmgren y Olsson, 2009, pp. 468-471).

d. Células ciliadas, zimógenas y rodetes

Las células ciliadas pueden encontrarse en los epitelios intestinales de las lampreas, los peces cartilagosos y los peces pulmonados, así como en las primeras fases del ciclo vital de ciertos peces óseos, y se consideran una condición primitiva, aunque estén ausentes en los mixinos. En las lampreas, las células ciliadas se agrupan de 3 a 5 células y, aparte de la presencia de cilios, son similares a las células absorbentes adyacentes (Smith *et al.*, 2023, p. 1).

Las células zimógenas intestinales se caracterizan por presentar gránulos de "zimógeno" de alta densidad electrónica en la región apical, así como por la presencia de mitocondrias alargadas, al igual que un retículo endoplásmico y aparato de Golgi bien desarrollados en la región supranuclear (Lee *et al.*, 2022, p. 828).

Las células rodetes son un tipo celular enigmático que se encuentra en los epitelios del tracto gastrointestinal y otros órganos en una amplia variedad de peces teleósteos, aunque la presencia no siempre es consistente entre individuos de una misma especie. Estas células tienen forma ovoidal, con un núcleo situado basalmente, con una amplia capa fibrosa bajo la membrana plasmática y grandes gránulos citoplasmáticos en forma de bastoncillos (Manera y Dezfuli, 2004, pp. 608-609; Reite, 2005, p. 263).

2.6. Ayuno y realimentación

En la naturaleza, el ayuno ocurre habitualmente en los organismos acuáticos debido a la escasez o ausencia de alimento, fenómenos meteorológicos o ciertas fases de su ciclo reproductivo, pudiendo los animales reestructurar su metabolismo al movilizar las reservas energéticas para compensar las pérdidas del catabolismo. Sin embargo, muchas especies han desarrollado la capacidad para adaptarse y resistir a una amplia gama de estrés, incluido el que produce la falta de alimento (Nebo, 2015, p. 27; Lu *et al.*, 2019, p. 18; Huanca, 2020, p. 10; Castro y Ordinola, 2021, p. 4; García, 2022, p. 6).

Las estrategias de alimentación en la acuicultura que buscan optimizar el uso de alimento y mano de obra, así como para mejorar los problemas de calidad del agua, reducir el estrés debido al manejo y minimizar los brotes de enfermedades, son utilizadas de manera empírica, ya que la información profesional no llega a la mayoría de los productores (Huanca, 2020, pp. 1; 10).

En la acuicultura, la restricción alimentaria se aplica artificialmente para inducir artificialmente un crecimiento compensatorio en los peces de cultivo, pero sin afectar su crecimiento y desarrollo (Montezor y Urbinati, 2017, p. 62). Este fenómeno representa una estrategia eficaz para controlar el contenido de grasa corporal de los animales cultivados y mejorar la calidad de su dieta, lo que resulta beneficioso para aumentar la ingesta y utilización de alimentos. Además, el ayuno puede proporcionar información sobre procesos fisiológicos sin interferencia de otros factores implicados en la digestión y absorción de nutrientes. Asimismo, ayuda a prevenir posibles daños a la salud de los peces, optimizando así su producción (García, 2022, p. 19).

En el caso del paiche, se podrá determinar si tiene un crecimiento compensatorio durante el período de realimentación, es decir, un aumento acelerado en su crecimiento después de un período de detención, resultados que para esta especie tendrían implicaciones directas en su manejo (Gómez *et al.*, 2016, p. 573).

2.7. Crecimiento compensatorio

El crecimiento somático en los vertebrados es un proceso biológico que implica un cambio de tamaño a lo largo del tiempo, abarcando tanto la masa como la longitud corporal (Beckman, 2011, p. 234; Pastor, 2021, p. 36). Aunque un aumento en la masa o longitud reflejan un crecimiento somático, son procesos biológicos distintos pero coordinados entre sí (Lavajoo *et al.*, 2020, p. 6).

Existen otros parámetros de crecimiento utilizados habitualmente, como el factor de condición (FC), que está relacionado con la longitud y el peso del animal, el cual es un indicador de la forma y el estado general de los peces. Otro indicador es la tasa de crecimiento específica (SGR), que se refiere al aumento del peso corporal en un período determinado de tiempo (generalmente en días). Sin embargo, es importante examinar previamente los supuestos en los que se basa este indicador (Ali *et al.*, 2003, p. 179).

El crecimiento compensatorio, referido al restablecimiento de las condiciones favorables luego de un período desfavorable, es una fase de crecimiento acelerado que se produce en los teleósteos y puede estar directamente influenciado por factores ambientales como cambios en el fotoperíodo, interacciones entre individuos de la misma especie y la disponibilidad de alimentos durante el período de realimentación después de un período prolongado de ayuno (Ali *et al.*, 2003, p. 158; Won y Borski, 2013, p. 6).

2.8. Eje neuroendocrino del crecimiento

El sistema endocrino junto con el sistema nervioso comprende una interacción que forma un sistema complejo y altamente regulado denominado como sistema neuroendocrino, que desempeña un papel fundamental en el control y la regulación de procesos como el crecimiento, el metabolismo, la reproducción y la homeostasis, integrando y coordinando diversos grupos celulares en un organismo; principalmente el eje hipotálamo-hipófisis-tejido somático, a través de una serie de señales y retroalimentaciones, controla la producción y liberación de hormonas y factores de crecimiento que actúan como mensajeros en el sistema, estos pueden actuar de manera local o ser transportados a través de la circulación hacia los órganos diana (Canosa *et al.*, 2007, p. 2; Cerdá y Canosa, 2009, pp. 4-5).

Entre los factores de crecimiento que desempeñan un papel destacado en la promoción del crecimiento somático en vertebrados se encuentran IGF1, IGF2 y GH. Sin embargo, las acciones de estas hormonas pueden influir en diferentes tipos celulares, lo cual tiene implicancias significativas en procesos fundamentales como el crecimiento, la diferenciación, el metabolismo y la expresión génica. El eje GH/IGF tiene una acción local a través de mecanismos autocrinos y/o paracrinos debido a la expresión de los ligandos y sus receptores en varios tejidos, además del mecanismo endocrino convencional (Sánchez, 2023, p. 102).

2.8.1. Hormona de crecimiento (GH)

GH desempeña un papel de gran relevancia en la regulación del crecimiento en los vertebrados, el cual está ligado a la presencia de GHR en los principales tejidos diana como lo son el hígado y el músculo esquelético, en donde, la interacción entre la hormona y su receptor desencadena una serie de respuestas fisiológicas y metabólicas que contribuyen al crecimiento y desarrollo adecuados del organismo (Chang y Wong, 2009, p. 154).

El crecimiento es estimulado principalmente por GH, la que presenta una regulación multifactorial; es decir, que tanto la síntesis como la liberación de GH al torrente sanguíneo por parte de la hipófisis, están sujetas a la regulación de múltiples factores hipotalámicos (Duan, 1998, p. 311; Wood *et al.*, 2005, p. 2358).

GH pertenece a la familia de hormonas hipofisarias GH/prolactina/somatolactina y en tejidos como el hígado, actúa directamente aumentando el tamaño de las células y promoviendo la mitosis. Además, indirectamente estimula la producción y liberación de IGF-I en el hígado (Fukada *et al.*, 2005, p. 2359).

2.8.2. Factor de crecimiento tipo insulina I (IGF1)

Los IGFs, estructural y funcionalmente, están relacionados con la insulina, pero tienen una mayor capacidad para promover el crecimiento (Wood *et al.*, 2005, p. 228), siendo su principal función la regulación metabólica de proteínas, lípidos, carbohidratos y minerales, así como en el crecimiento somático, la diferenciación y proliferación celular (Sadowski *et al.*, 2001, p. 3898).

La vía principal de regulación de IGF1 se lleva a cabo a través de la acción inductora de GH, que estimula su producción y liberación tanto en el hígado como en otros tejidos. Una vez que GH es secretada al torrente sanguíneo y llega al hígado, se produce la síntesis de IGF1 en los hepatocitos. Posteriormente, IGF1 es liberado en la sangre, ejerciendo su efecto en los tejidos periféricos para promover el crecimiento y la diferenciación celular (Pierce *et al.*, 2004, p. 408; Franz *et al.*, 2016, p. 6).

Aunque muchos efectos del crecimiento inducidos por GH están mediados por IGF1, existen otros factores que pueden influir, tales como las hormonas reguladoras insulina, hormona tiroidea y hormonas sexuales, la nutrición (una dieta rica en proteínas puede incrementar los niveles de IGF1), otros factores de crecimiento y citocina. Cabe destacar, que la retroalimentación negativa de IGF1, constituye otro mecanismo regulador importante ya que altos niveles de IGF1 puede inhibir la liberación de GH, provocando así su propia reducción (Fig. 14) (Frost *et al.*, 2002, p. 502).

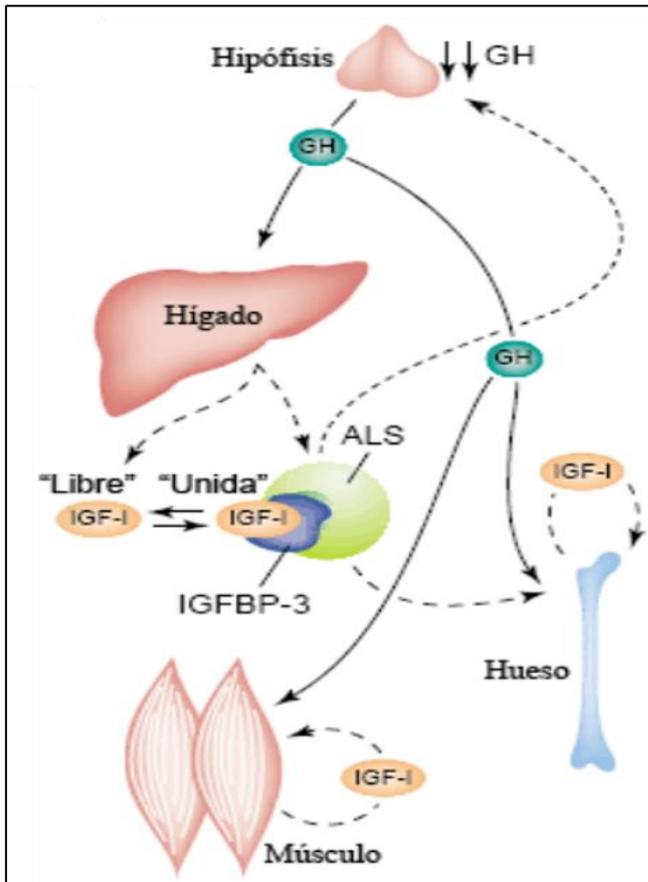


Figura 14. Eje de producción de IGF1 a partir de GH. IGF1 es sintetizado principalmente en el hígado, los músculos y los huesos, siendo GH un factor determinante en la regulación de los niveles circulantes de IGF1 derivados del hígado, así como en la cantidad de IGF1 circulante a través de la interacción con el complejo IGFBP-3-ALS (Subunidad lábil al ácido). Además de su efecto a nivel sistémico, IGF1 también puede regular su propia producción a través de retroalimentación local en diversos tejidos. Este mecanismo contribuye de manera significativa al control general del IGF1 en el proceso de crecimiento somático (modificado de Roith *et al.*, 2001).

2.8.3. Receptor de la hormona de crecimiento (GHR)

El GHR es un componente clave de la vía neuroendocrina del crecimiento y media los efectos biológicos de la GH en los tejidos blanco, como el hígado y el músculo, regulando la expresión de los IGF y otros elementos downstream, que en última instancia conducen al crecimiento somático y a la regulación del metabolismo celular (Canosa *et al.*, 2007, p. 11; Duan *et al.*, 2010, p. 348; Fuentes *et al.*, 2011, p. 1540, 2012, p. 291; Delgado, 2016, p. 86).

El GHR ha sido descrito en una variedad de vertebrados (Ellens *et al.*, 2013, p. 227; Daza y Larhammar, 2018, p. 30), pertenece a una familia de receptores citoquina tipo 1, que están involucrados en una variedad de procesos fisiológicos, incluyendo el crecimiento postnatal, corporal y tisular, así como la síntesis de proteínas (Luzania, 2012, p. 35; Brooks *et al.*, 2014, p. 4). Estos son receptores de membrana de paso único, con un dominio de unión al ligando (ECD) N-terminal, un dominio transmembrana (TMD) y un dominio intracelular (ICD) de longitud variable hacia el extremo C-terminal (Moutoussamy *et al.*, 1998, p. 5). Para los peces en general, se han identificado dos grupos de receptores para GH, conocido

como GHR1 y GHR2 (Pierce *et al.*, 2005, p. 199; Saera-Vila *et al.*, 2005, p. 198; Jiao *et al.*, 2006, p. 33; Benedito-Palos *et al.*, 2007, p. 18).

2.8.3.1. Receptor de la hormona de crecimiento tipo I - II (GHR1 – GHR2)

En los peces teleósteos, GHR1 y GHR2, son el producto de una duplicación genómica específica de peces, producida probablemente a principios de la evolución de este grupo (Saera-Vila *et al.*, 2005, p. 11; Jiao *et al.*, 2006, p. 33; Fukamachi y Meyer, 2007, p. 369).

GHR1 presenta de seis a siete residuos de cisteína en su dominio extracelular (ECD), mientras que GHR2 contiene de cuatro a cinco residuos de cisteína. Cada receptor funcional actúa como un homodímero, compuesto por dos cadenas polipeptídicas idénticas de un paso de membrana (Van Den Eijnden *et al.*, 2006, p. 3083).

Varios estudios en salmónidos han encontrado que GHR1 y GHR2, tienen propiedades similares a las del receptor tipo citoquina 1; diferenciándose por su motivo de unión al ligando (Fukamachi y Meyer, 2007, p. 370). GHR1 es en realidad el receptor para la somatolactina (Fukada *et al.*, 2005, p. 2359), mientras que GHR2 es el receptor para GH (Fukada *et al.*, 2004, p. 69). En otras especies, hay pruebas que apoyan lo encontrado en salmónidos, como la implicación de somatolactina y GHR1 en los cambios de coloración mediados por el cromatóforo (Cánepa *et al.*, 2012, p. 56). Sin embargo, estudios en *Danio rerio* y *Acanthopagrus schlegeli* han demostrado que la somatolactina no es un ligando para GHR1, sino que GH se une específicamente a GHR1 y GHR2 (Jiao *et al.*, 2006, p. 33; Chen *et al.*, 2011, p. 6). Estudios recientes en *Oryzias latipes* demuestran que la mutación bialélica de GHR1 conduce a la inhibición del crecimiento y afecta negativamente a la adaptación de la coloración del entorno (Delgadin *et al.*, 2020, p. 11).

No obstante, en *A. gigas*, hasta el momento mediante análisis bioinformáticos, solo se ha caracterizado la forma 1 del receptor de la hormona del crecimiento (Prado y Val, 2015, p. 139), a diferencia de otros teleósteos, en donde se han identificado dos formas, lo que sería posible y novedoso, dada la posición basal de esta especie entre los teleósteos (Du *et al.*, 2019, p. 2).

2.9. Factores que influyen en el eje neuroendocrino del crecimiento

Los peces pueden sobrevivir a largos períodos de restricción en la ingesta de alimentos en parte mediante la modulación de la expresión de una serie de genes relacionados con el sistema GH/IGF-I (Wood *et al.*, 2005, p. 252; Gabillard *et al.*, 2006, p. 35), desviando así la energía a procesos fisiológicos esenciales y reduciendo el crecimiento.

En los salmónidos y bagres (Pierce *et al.*, 2005, p. 200; Peterson *et al.*, 2009, p. 461; Shimizu *et al.*, 2009, p. 357), la reducción en la tasa de crecimiento causada por la inanición, se correlaciona con los niveles disminuidos de IGF1 en el plasma; sin embargo, no se observan cambios significativos en los niveles plasmáticos de GH ni en la expresión hepática de GHR e IGF1 (Fox *et al.*, 2010, p. 578). A pesar de ello, se ha observado un aumento en los niveles de GHR1 y GHR2 en el tejido muscular, al contrario de los niveles de IGF1 que se ven disminuidos. Este aumento en los receptores de GH en el músculo, fue observado en *Sparus aurata* y trucha arco iris (Saera-Vila *et al.*, 2005, p. 13; Gabillard *et al.*, 2006, p. 33), que sugiere que durante el ayuno prolongado, las reservas de energía se movilizan principalmente desde el músculo esquelético (Fox *et al.*, 2010, p. 578).

Experimentalmente, se ha demostrado en diversas especies de peces teleósteos, que GHR1 y GHR2 están regulados de forma diferencial bajo diferentes condiciones como el ayuno prolongado (Saera-Vila *et al.*, 2005, p. 11; Delgadin, 2016, p. 89; Delgadin *et al.*, 2018, p. 8), la temperatura (Gabillard *et al.*, 2006, p. 32), la composición de la dieta (Benedito-Palos *et al.*, 2007, p. 13), la presencia de patógenos (Sitjà-Bobadilla *et al.*, 2008, p. 616) y el estrés (Saera-Vila *et al.*, 2009, p. 15), lo que sugiere que ambos receptores pueden estar implicados en diferentes procesos biológicos. Además, los estudios en cultivo celular han demostrado que la testosterona, el cortisol y el estradiol afectan diferencialmente a la expresión de GHR1 y GHR2 (Jiao *et al.*, 2006, p. 33).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Determinar el efecto del ayuno y realimentación en las características histológicas del hígado e intestino y el nivel de expresión de los genes IGF1, IGF2, GHR1 y GHR2 en juveniles de *A. gigas*.

3.2. Objetivos específicos

- Estimar las variaciones en el índice hepatosomático de *A. gigas* durante el ayuno y realimentación.
- Comparar las características histológicas del hígado de *A. gigas* frente a condiciones de ayuno y realimentación, mediante el análisis del número de núcleos, área de núcleos y área celular de los hepatocitos.
- Comparar las características histológicas del intestino de *A. gigas* frente a condiciones de ayuno y realimentación, mediante el análisis del diámetro intestinal, longitud de vellosidades, ancho de la capa muscular circular interna, longitud de los enterocitos y el número de células caliciformes.
- Evaluar los niveles de expresión de los genes GHRs e IGFs durante el ayuno y la realimentación en el hígado y músculo de *A. gigas*.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Diseño experimental

Se utilizaron juveniles de 29-32 cm y 150-250 g de *A. gigas* procedentes de la empresa Misti de Amazon Aquaculture S.A.C., ubicada en Pucallpa, Ucayali, Perú. Los peces fueron aclimatados durante un período de cuatro semanas, basado en su adaptación a la ingesta de alimento y su estado general de salud. Posteriormente, se trasladaron a un sistema de recirculación de flujo cerrado (RAS) que consta de un filtro biológico y un filtro mecánico, acondicionándose en 12 tanques de 500 L, a temperatura ambiente (26-30 °C) y un pH entre 7 y 7.5.

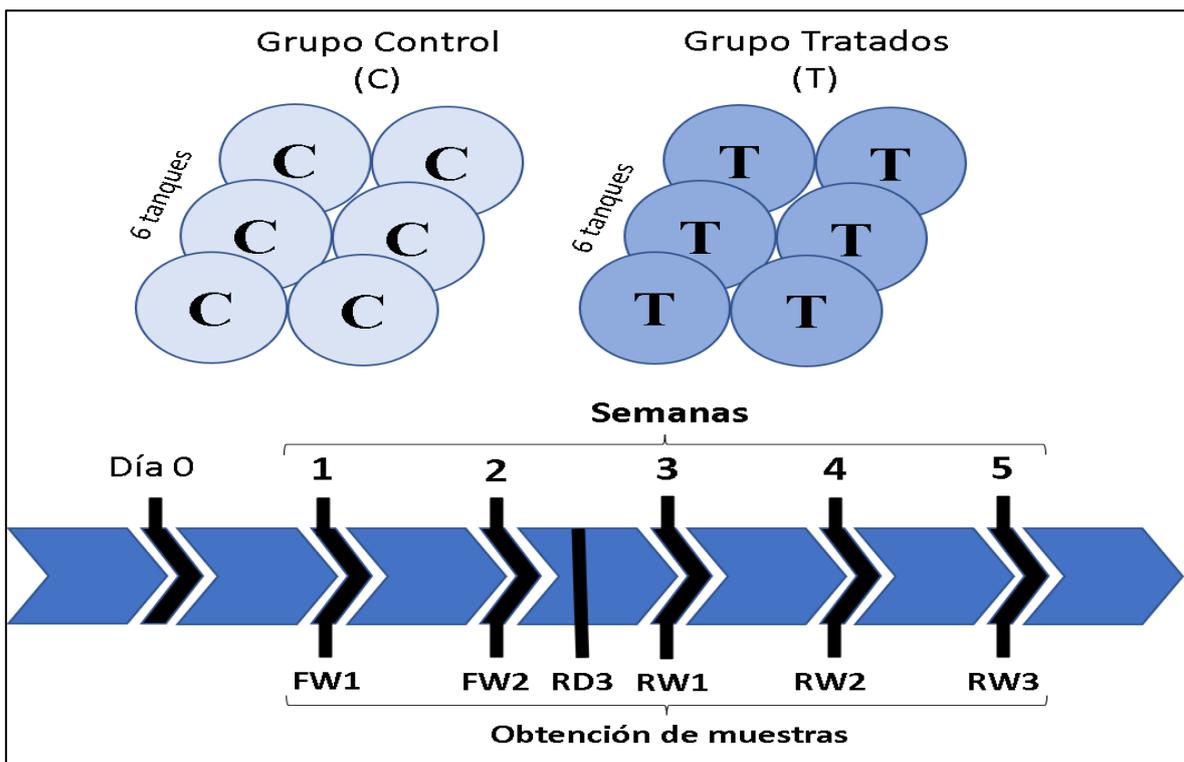


Figura 15. Diseño experimental del protocolo de ayuno y realimentación. Primera semana de ayuno (FW1), segunda semana de ayuno (FW2), tercer día de realimentación (RD3), primera semana de realimentación (RW1), segunda semana de realimentación (RW2), y tercera semana de realimentación (RW3).

En cada tanque se colocaron 8 juveniles, alimentándolos tres veces al día con pellets comerciales de la marca Truchina, hasta el inicio de la experiencia. Los tratamientos consistieron en dos grupos experimentales (Control y Tratados), cada uno con 6 réplicas (Fig. 15). Los peces del grupo Control fueron alimentados a saciedad durante las 5 semanas del experimento, mientras que los peces ayunados no recibieron alimento durante 2 semanas, y luego fueron realimentados durante las siguientes 3 semanas.

De cada tanque, se tomó semanalmente un organismo seleccionado al azar, registrando su peso y longitud total. Luego, los organismos fueron anestesiados por sumersión en recipientes con eugenol 1 g/20 L (Ross *et al.*, 2008, p. 138) durante 20 minutos, seguido de una eutanasia por decapitación.

Durante el procesamiento de los peces, se identificaron y extrajeron el hígado y el intestino, los cuales se sumergieron en solución de Bouin durante 24 horas para la fijación del tejido. Posteriormente, se transfirieron a recipientes con alcohol al 70% para su preservación y análisis histológicos posteriores. Además, se extrajeron muestras de músculo, las cuales fueron sumergidas en *RNAlater* por una hora a temperatura ambiente y luego almacenadas a 4°C. Estas muestras luego fueron trasvasadas al reactivo TRIZol, donde homogeneizaron para posteriormente realizar la extracción de ARN total para su posterior análisis.

4.2. Análisis histológico

Los tejidos se fijaron en solución de Bouin durante una hora a temperatura ambiente protegidos de la luz, y luego a 4 °C por 16 horas. Posteriormente se transfirieron a alcohol al 70%. En el caso de los intestinos se hizo un lavado del ducto intestinal. Los tejidos se deshidrataron mediante inmersión en concentraciones progresivamente crecientes de alcohol (70%, 90%, 96% y 100%) (Tabla 01). A continuación, se procedió con el aclaramiento de las muestras deshidratadas por inmersión en alcohol etílico absoluto, seguido de un doble recambio de xilol y el uso de parafina líquida a 58 °C.

Tabla 01. Diagrama del proceso de deshidratación, aclaramiento e infiltración de tejidos de *A. gigas* (modificado de Morrison *et al.*, 2007; Verdín *et al.*, 2013).

Fase	Reactivos	Tiempo
Deshidratación	Etanol 70%	20 min
	Etanol 90% I	45 min
	Etanol 90% II	45 min
	Etanol 96% I	45 min
	Etanol 96% II	45 min
	Etanol 100%	30 min
Aclaramiento	Xilol	20 min
Infiltración	Parafina I	4 horas
	Parafina II	2 horas

Dependiendo del tamaño de la muestra, se colocaron los casetes con los tejidos cortados (en intestinos se cortó el intestino posterior) en la estación de parafina, para que junto con la parafina fundida poder formar un cubo, se dejó enfriar hasta que se alcanzó una consistencia sólida. Se realizaron cortes de 6 μm de grosor en un microtomo rotatorio TS Microm HM 325, se cortaron en tiras y se extendieron en agua a 48-50 °C con 0,03 % de gelatina; los cortes se recogieron en portaobjetos y se secaron en una estufa a 40 – 45 °C por 24 horas.

Tras los cortes, se eliminó la parafina con xilol, dejando sólo el tejido en el portaobjetos, y se hidrató el tejido con concentraciones decrecientes de alcohol (100, 96, 80 y 70%) para permitir la tinción con la técnica de hematoxilina-eosina (Tabla 02). Por último, se deshidrataron los cortes para aclarar el montaje final, donde se limpió la lámina, se agregó una gota de Entellán®, colocándose el porta objeto sin provocar burbujas y se las dejó secando en temperatura ambiente por 3 días.

Las láminas se observaron mediante un microscopio óptico trinocular (Motic BA310E) acoplado con una cámara (MoticCam 10 MP). Se tomaron imágenes digitales para determinar las características de los tejidos y las células de los peces ayunados y realimentados. Para ésto, se capturaron imágenes de dos secciones de muestras del hígado e intestino. Se obtuvo una imagen panorámica a 4x de aumento, una imagen de mayor aumento a 10x y cinco campos diferentes con un aumento de 100x.

Tabla 02. Diagrama del proceso de coloración de muestras de *A. gigas* (modificado de Morrison *et al.*, 2007; Ponce, 2016)

Fase	Reactivo	Tiempo
Desparafinización	Xilol I	35 min
	Xilol II	35 min
Hidratación	Etanol 100% I	20 min
	Etanol 96% I	10 min
	Etanol 90% I	10 min
	Etanol 70% I	5 min
Coloración	Hematoxilina de Harris	5 min
	Agua corriente	1 min
	Agua destilada I	1 min
	Etanol ácido	15 seg
	Agua destilada II	1 min
	Agua amoniacal	15 seg
	Etanol 50%	1 min
	Etanol 70% II	1 min
	Eosina alcohólica	1 min
Deshidratación	Etanol 90% II	1 min
	Etanol 96% II	1 min
	Etanol 100% II	1 min
	Xilol III	2 min
	Xilol IV	Hasta montaje

Descripción histológica

Después de obtener las imágenes de los cortes histológicos, se utilizó el software ImageJ (v. 1.54d) (Schneider *et al.*, 2012), con la calibración correspondiente de cada aumento (4x, 10x o 100x) para los análisis cuantitativos de las imágenes, describiéndose detalladamente la forma y estructuras de las células presentes en cada tejido. Con la ayuda del software se compararon los peces tratados de los del control tanto cuantitativamente como cualitativamente, el análisis cualitativo se centró en las características morfológicas de las células y sus estructuras correspondientes en hígado e intestino.

En el análisis cuantitativo se midió y se comparó los siguientes indicadores por muestra:

En lo que respecta al hígado, el análisis se llevó a cabo teniendo en cuenta los siguientes factores:

- El índice hepatosomático (IHS). Fue evaluado como el peso del hígado entre el peso total del animal multiplicado por 100.

$$IHS = \frac{PH \times 100}{PT}$$

PH = peso del hígado

PT = peso total del animal

- La cantidad de núcleos de hepatocitos. Fue evaluado al tomar un campo de observación del microscopio de alrededor de 10700 μm^2 con un aumento de 10x, donde se tomó en cuenta solo los núcleos perfectamente observables, por cada repetición de muestra se obtuvo tres laminas, de cada lamina se observó tres campos distintos escogidos al azar, y por cada campo se contabilizó la cantidad de núcleos, luego se realizó un promedio simple para obtener el dato del tratamiento.
- El área de los núcleos de los hepatocitos. Se midió con el programa ImageJ, se tomó solo los hepatocitos con márgenes claros, donde se estimó el área aproximada de los núcleos contabilizados en el proceso anterior, así se uniformizó la cantidad tomada para todos los casos.
- Área celular de los hepatocitos. Se realizó el mismo procedimiento utilizado para el área de los núcleos, se tomó el hepatocito observado para el conteo y medida de los núcleos.

Con respecto al intestino, el análisis se realizó considerando lo siguiente:

- Diámetro intestinal. Estas medidas solo se realizaron con las láminas donde se observaba claramente la circunferencia del intestino, esto se realizó a un aumento de 4x.
- Longitud de las vellosidades. Este parámetro se midió al tomar al azar 9 vellosidades por tratamiento, donde se midió desde la base hasta el ápice de la vellosidad, para luego realizar un promedio simple, esto se realizó a un aumento de 10x.

- Ancho de la capa muscular circular interna. Se tomó desde la base observable de la capa muscular circular interna hasta el inicio de la submucosa, con un aumento de 10x se tomó una medición por tratamiento.
- Longitud de los enterocitos. Esta medición se tomó de las vellosidades medidas anteriormente, se tomaron solo los enterocitos del ápice de la vellosidad, se realizaron 9 repeticiones por tratamiento, todo esto a un aumento de 100x.
- Número de células calciformes por vellosidad. Como el anterior esta cantidad se contabilizó tomando las vellosidades tomadas anteriormente, se contaron solo las células claramente observables a un aumento de 10x sobre toda la superficie de la vellosidad (Rodrigues y Cargnin, 2017, p. 951; Pervin *et al.*, 2020, pp. 1402-1403).

4.3. Análisis transcriptómico

Se emplearon muestras de hígado y músculo para llevar a cabo un análisis transcriptómico con el fin de evaluar los niveles de expresión génica en respuesta a los períodos de ayuno y realimentación. Las muestras utilizadas en el estudio correspondieron a los tratamientos FW1 y FW2, que representan las semanas de ayuno. Para el tratamiento RD3, aunque no se realizó histología debido a que no se observan cambios morfológicos significativos a nivel de tejido en comparación con la primera semana de realimentación, se examinó a nivel de expresión génica para evaluar cualquier cambio inmediatamente después de la realimentación. Por último, el tratamiento RW2 representa la semana de realimentación.

4.3.1. Extracción de ARN total y digestión con DNasa

Se llevó a cabo la extracción de ARN total a partir de muestras de hígado y músculo de juveniles de *A. gigas* sometidos a tratamientos de ayuno y realimentación, así como del grupo control. Las muestras fueron sumergidas en *RNAlater* y se almacenaron a -20°C hasta el momento de la purificación del ARN total. Las muestras almacenadas fueron luego trasvasadas a 500 µL de TRIzol. La extracción del ARN total de hígado y músculo se realizó siguiendo el protocolo del kit de extracción TRIzol Reagent (véase Anexo 1). El ARN total purificado se eluyó en 50 µL de buffer de elución y se cuantificó mediante absorbancia utilizando un espectrofotómetro Epoch (BioTek, EE. UU.).

Para eliminar cualquier ADN residual presente en las muestras, se trató el ARN total de cada muestra con DNasa I (ThermoScientific), a una relación utilizada entre la DNasa I y el ARN

total de 1U/ μ g de ARN total (véase Anexo 2). La cantidad de ARN total fue verificada utilizando un fluorómetro Qubit 3.0 y el Qubit RNA Broad Range (Life Technologies, EE. UU.).

4.3.2. Preparación de bibliotecas de RNA-Seq y secuenciación

La preparación de las bibliotecas para el análisis se llevó a cabo utilizando 1 μ g de ARN total purificado de cada pool (FW1, FW2, RD3 Y RW2). Se tomaron 4 réplicas biológicas por cada ratamiento.

Las bibliotecas fueron preparadas utilizando el kit TruSeq® RNA Sample Prep v2, empleando los índices IDT for Illumina DNA/RNA UD (Illumina, San Diego, CA, USA). El proceso de preparación de las bibliotecas incluyó la purificación y fragmentación del ARNm, la síntesis de ADNc, la reparación de los extremos, la adenilación, la ligación de adaptadores, la amplificación de PCR, la validación de las bibliotecas, la normalización equimolar y la agrupación, siguiendo el protocolo detallado en la Guía TruSeq RNA-Seq Sample Prep v2 (Illumina), utilizando el Protocolo Low Sample.

La secuenciación se llevó a cabo en la plataforma Illumina NextSeq500, utilizando el kit NextSeq500 System High-Output Kit, con el objetivo de generar lecturas pareadas de 74 pb (pair-end 2 x 74).

4.3.3. Análisis bioinformático de datos de RNA-Seq

Una vez finalizada la secuenciación, las secuencias en formato fastq fueron sometidas a un análisis de calidad utilizando el programa FastQC (Andrews, 2010, p. 2), y posteriormente se realizaron consolidaciones utilizando MultiQC (Ewels *et al.*, 2016, p. 3048). Con el fin de eliminar adaptadores y lecturas de baja calidad conteniendo bases ambiguas "N" y valores de calidad Phred < 20, se empleó el software Trimmomatic v0.38 (Bolger *et al.*, 2014, p. 2115). A continuación, todas las lecturas limpias fueron ensambladas *de novo* utilizando el software Trinity (Haas *et al.*, 2013, pp. 1494-1498).

Para llevar a cabo la anotación funcional de los transcritos ensamblados, se utilizó Trinotate 3.0.1 (Das y Mykles, 2016, p. 1495), empleando la base de datos Swiss-Prot/UniProt (Alexa *et al.*, 2006, pp. 1610-1615).

Los transcritos resultantes se utilizaron como referencia para el análisis de expresión diferencial *in silico* utilizando edgeR (Robinson *et al.*, 2010, p. 139). Se buscaron los transcritos para los genes GHR1, GHR2, IGF1 e IGF2, para los cuales se analizó la expresión diferencial comparando al grupo tratado respecto del grupo control para cada tiempo de toma de muestras y para cada tejido.

4.4. Análisis estadístico

Las medidas histológicas del hígado e intestino se evaluaron por ANOVAs de medias repetidas (RM-ANOVA). Estos resultados se expresaron como media \pm desviación estándar (SD). Se comprobaron los supuestos de normalidad y homocedasticidad (igualdad de varianzas), y en el caso necesario, se realizó un supuesto de esfericidad del p-valor con las correcciones de Greenhouse-Geisser y Huynh-Feldt. Para todos los datos, la significancia estadística se fijó en $\alpha = 0.05$. El análisis estadístico se realizó con el programa JASP (v. 0.18.2) para Windows (JASP Team, 2024).

5. RESULTADOS

5.1. Hígado

El hígado de *A. gigas* es una glándula digestiva altamente vascularizada que contiene hepatocitos en su parénquima y está rodeado de vasos sanguíneos y fibras de tejido conectivo que mantienen su estructura y función. En la Figura 16 se observa la vena porta hepática, la cual se ramifica en capilares sinusoides. Estos capilares asociados con los hepatocitos, presentan forma redondeada, un núcleo excéntrico y un nucleolo basófilo bien definido. La membrana plasmática de los hepatocitos se observa levemente basófila, y el citoplasma levemente acidófilo (Fig. 17). Los hepatocitos forman cordones poco definidos, donde no se encuentran los lobulillos hepáticos típicos; sin embargo, se pueden observar espacios portales con tríadas típicas (rama de la arteria hepática, rama de la vena porta y un conducto biliar) dispersos por todo el parénquima (Fig. 17).

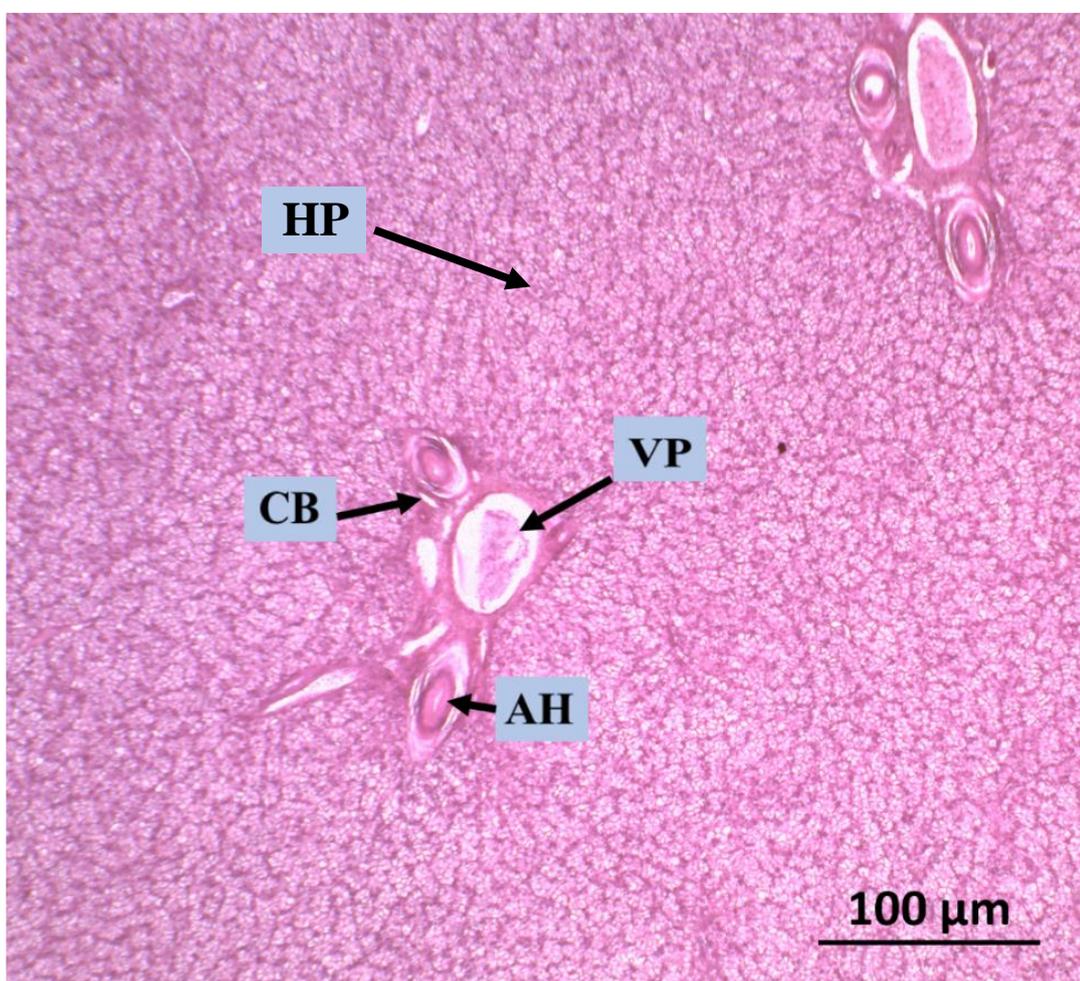


Figura 16. Detalle de un espacio portal con una tríada típica en *A. gigas* alimentado normalmente: Hepatocitos (HP), rama de la arteria hepática (AH), rama de la vena porta (VP) y conducto biliar (CB). Tinción: Hematoxilina y Eosina. Secciones 6 µm.

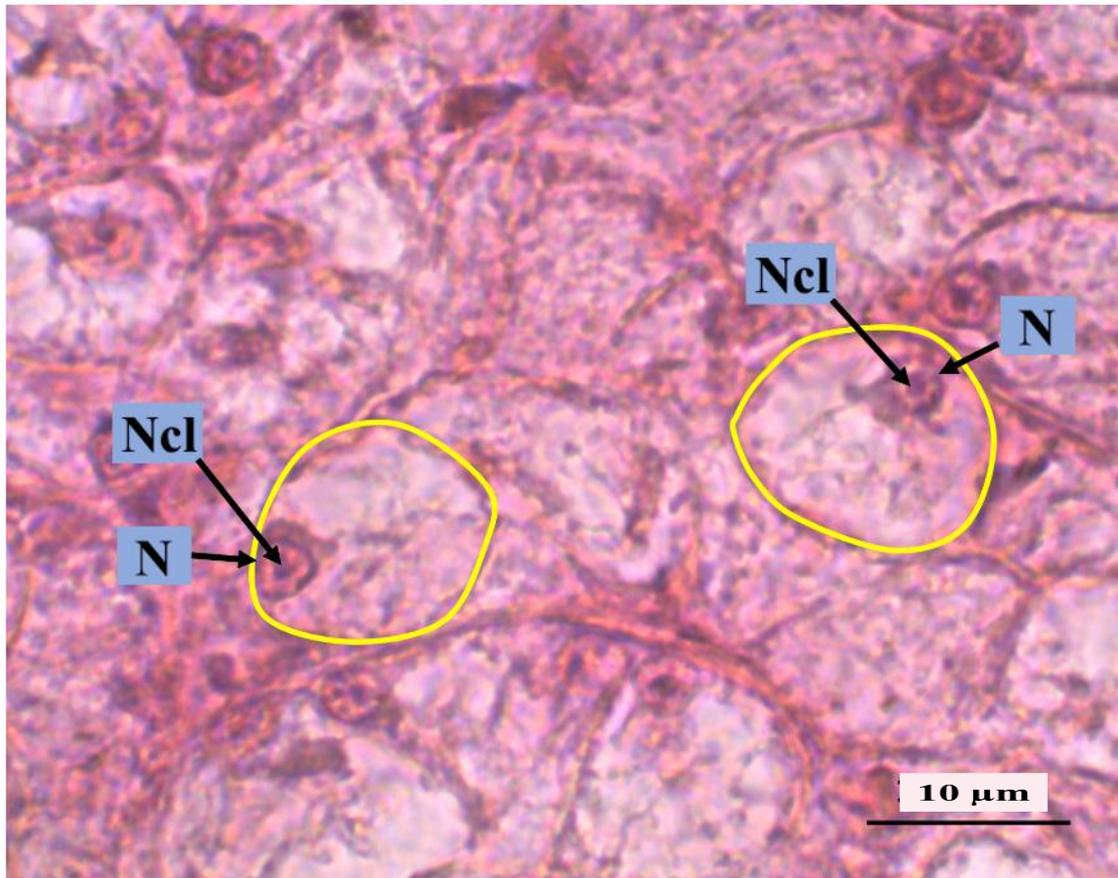


Figura 17. Microfotografías de hepatocitos de juveniles de *A. gigas* alimentado normalmente. Resaltado con bordes amarillos hepatocitos, núcleo de hepatocitos (N) y nucleolos (Ncl). Tinción: Hematoxilina y Eosina. Secciones 6 μm.

Durante la primera semana de ayuno, se observaron diferencias notables que podrían atribuirse a la reducción del área de los hepatocitos. En el grupo de control (Fig. 18a), se evidencia un mayor espacio entre hepatocitos, mientras que en el animal sometido a una semana de ayuno (Fig. 18b), se aprecia claramente una acumulación de hepatocitos. Estas diferencias se hacen más evidentes en cortes observados a mayor aumento, donde se destacan las disparidades en los núcleos de los hepatocitos. En el grupo de control (Fig. 18c), a pesar de presentar hepatocitos con formas irregulares, se observan núcleos bien definidos y con una marcada acidófila. Por el contrario, en los peces sometidos al ayuno (Fig. 18d), si bien tiene una forma celular similar, se aprecia una mayor cantidad de hepatocitos en el campo de observación del tejido, donde los núcleos como los límites de los hepatocitos son poco visibles.

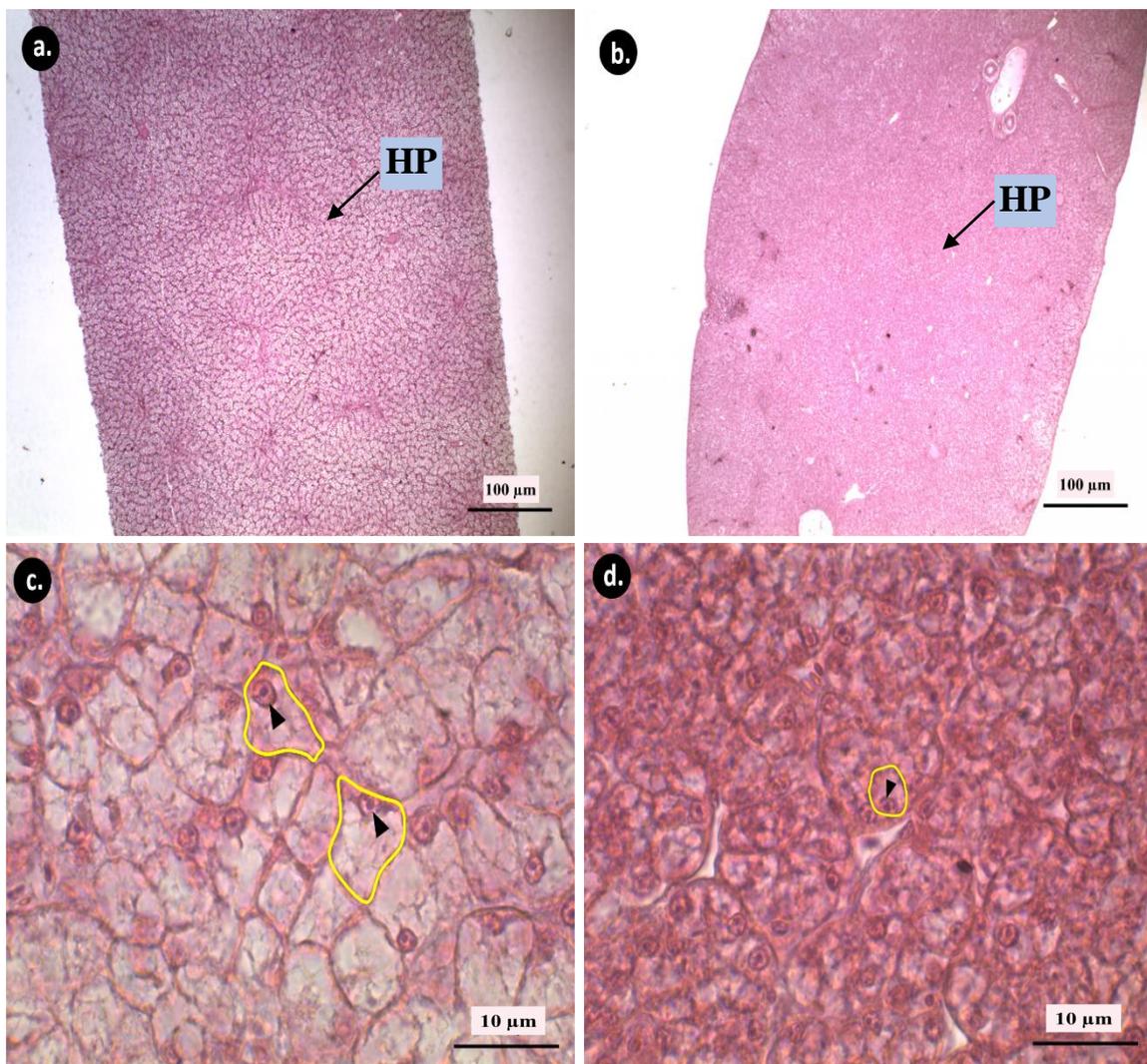


Figura 18. Microfotografías de hepatocitos en la primera semana de ayuno de juveniles de *A. gigas*. Resaltado con bordes amarillos hepatocitos (HP), ► núcleo de hepatocitos. **a, c.** Peces alimentados constantemente (C). **b, d.** Peces ayunados una semana (FW1). Tinción: Hematoxilina y Eosina. Secciones 6 µm.

A medida que se transcurrió la segunda semana de ayuno, se evidenciaron características similares a las observadas en la primera semana tanto en los peces del grupo control (Fig. 19a) como en los peces sometidos al ayuno (Fig. 19b). Al realizar observaciones a mayor aumento, se mantuvo el mismo patrón en el grupo control (Fig. 19c), con la presencia de células hepáticas irregulares que presentaban núcleos claros y bien teñidos. En el caso de los peces ayunados, se observó que los hepatocitos seguían acumulados del mismo modo que la primera semana de ayuno (Fig. 19d), aunque en este caso se pudo apreciar de manera más clara los núcleos de las células hepáticas, así como en algunas células se hizo visible la delimitación celular.

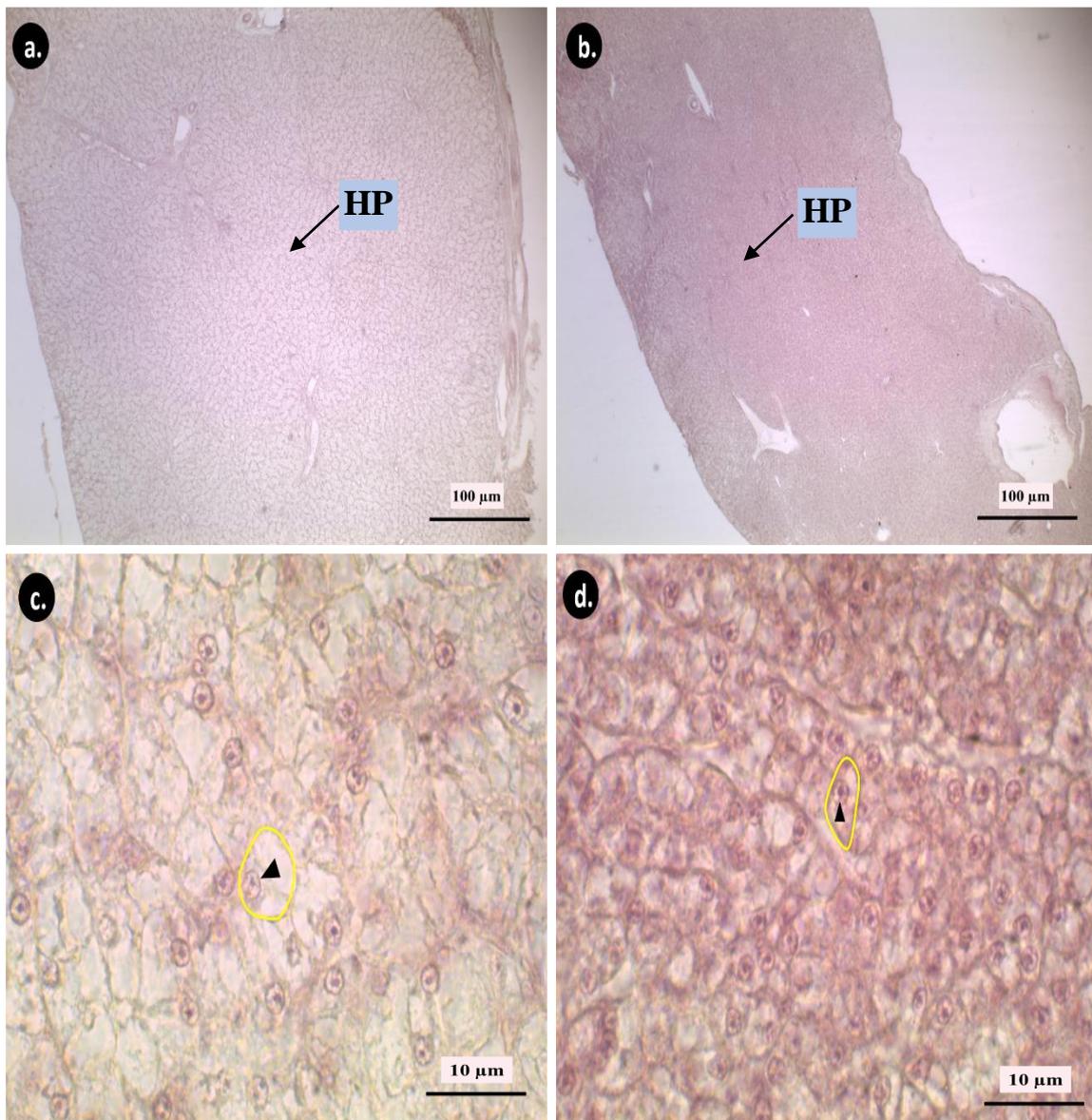


Figura 19. Microfotografías de hepatocitos en la segunda semana de ayuno de juveniles de *A. gigas*. Resaltado con bordes amarillos hepatocitos (HP), ► núcleo de hepatocitos. **a, c.** Peces alimentados constantemente (C). **b, d.** Peces ayunados dos semanas (FW2). Tinción: Hematoxilina y Eosina. Secciones 6 µm.

Durante la primera semana de realimentación, los animales del grupo control se mantenían relativamente constante en lo que respecta a la vista panorámica (Fig. 20a). Sin embargo, en los animales que salieron del ayuno (Fig. 20b), aunque aún se observa una acumulación de hepatocitos, es posible apreciar un ligero cambio en cuanto al espacio entre ellos, evidenciando un aumento en el espacio intercelular. En cuanto a las imágenes de mayor aumento, se pudo observar que tanto el grupo control (Fig. 20c) como los animales realimentados (Fig. 20d) siguieron mostrando características similares a las semanas anteriores, con márgenes difusos y núcleos ligeramente visibles. No obstante, en este caso, los hepatocitos de los animales realimentados mostraron una similitud en tamaño con respecto al grupo control.

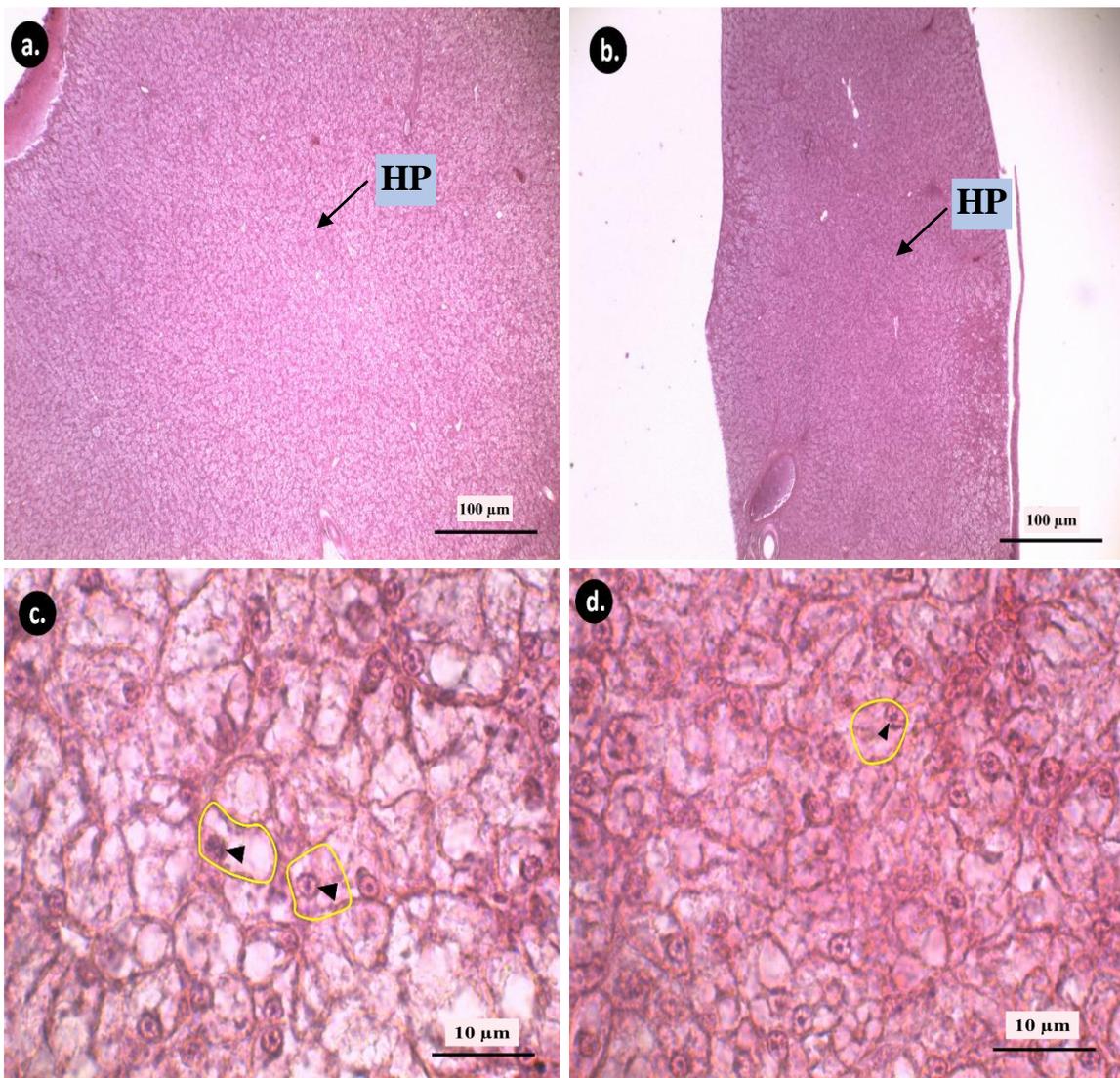


Figura 20. Microfotografías de hepatocitos en la primera semana de realimentación de juveniles de *A. gigas*. Resaltado con bordes amarillos hepatocitos (HP), ► núcleo de hepatocitos. a, c. Peces alimentados constantemente (C). b, d. Peces realimentados una semana (RW1). Tinción: Hematoxilina y Eosina. Secciones 6 µm.

Por otro lado, en la segunda semana de realimentación, se observó una similitud en las características morfológicas del citoplasma, núcleo y nucleolos de los hepatocitos en comparación con el grupo control (Fig. 21a y 21b). Casi no se apreciaron diferencias entre el grupo control y los animales realimentados en ninguno de los niveles de aumento utilizados (Fig. 21c y 21d). Sin embargo, se pudo notar una notable diferencia al compararlo con los hallazgos de la primera semana de realimentación. Estos resultados indican que, al menos en relación a estas características morfológicas de los hepatocitos, hubo una recuperación evidente durante esta segunda semana de realimentación.

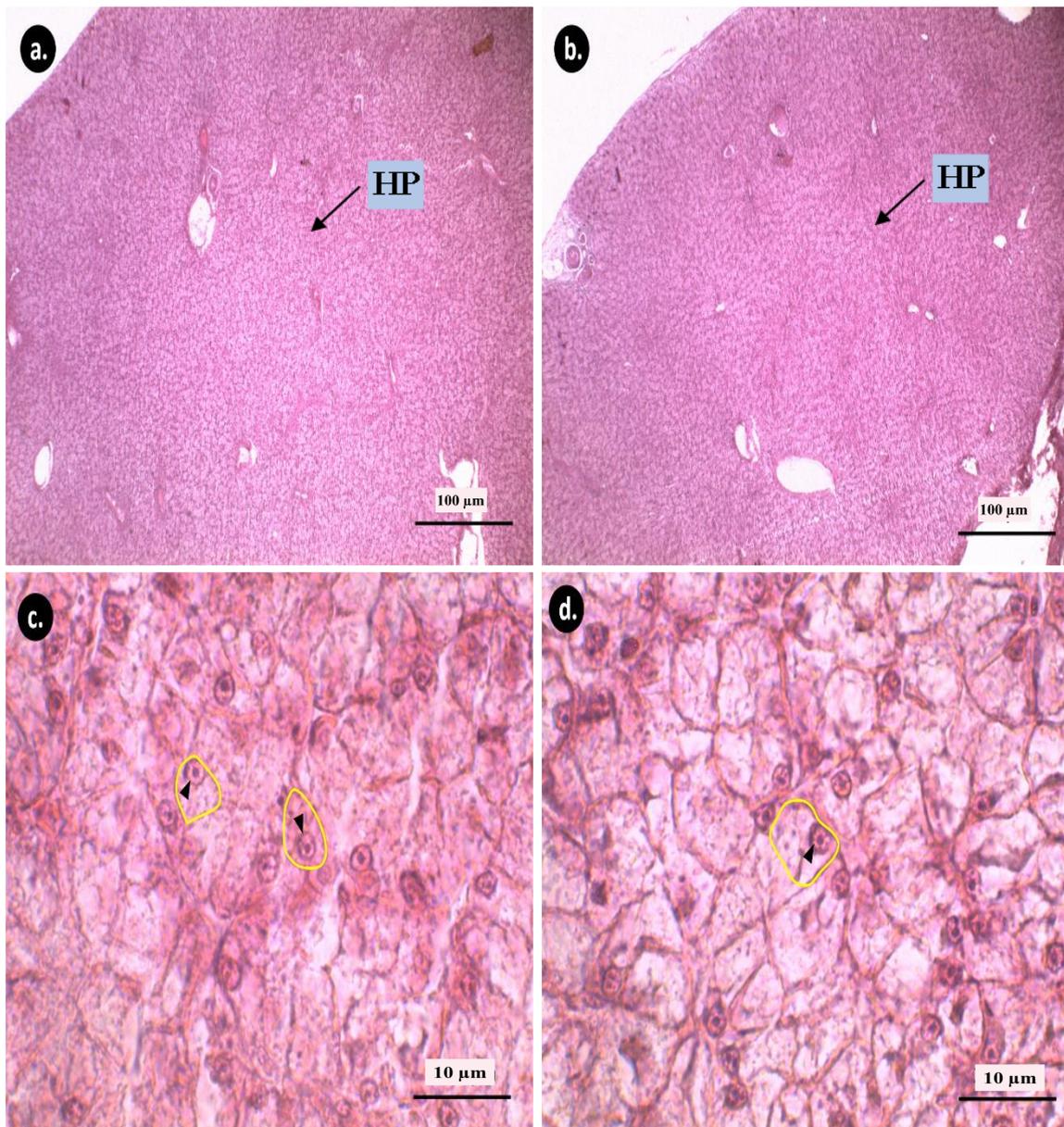


Figura 21. Microfotografías de hepatocitos en la segunda semana de realimentación de juveniles de *A. gigas*. Resaltado con bordes amarillos hepatocitos (HP), ► núcleo de hepatocitos. **a, c.** Peces alimentados constantemente (C). **b, d.** Peces realimentados dos semanas (RW2). Tinción: Hematoxilina y Eosina. Secciones 6 μm.

En el caso de la tercera semana de realimentación, los cambios observados entre el grupo control y los grupos ayunados/realimentados (Fig. 22a y 22b), que habían sido evidentes durante el transcurso de los tratamientos desde la primera semana de ayuno hasta la primera semana de realimentación, son inexistentes en esta instancia. No se evidencia ningún daño permanente o residual como resultado del período de ayuno (Fig. 22c y 22d). Estos hallazgos indican una recuperación total, al menos en lo observado cualitativamente.

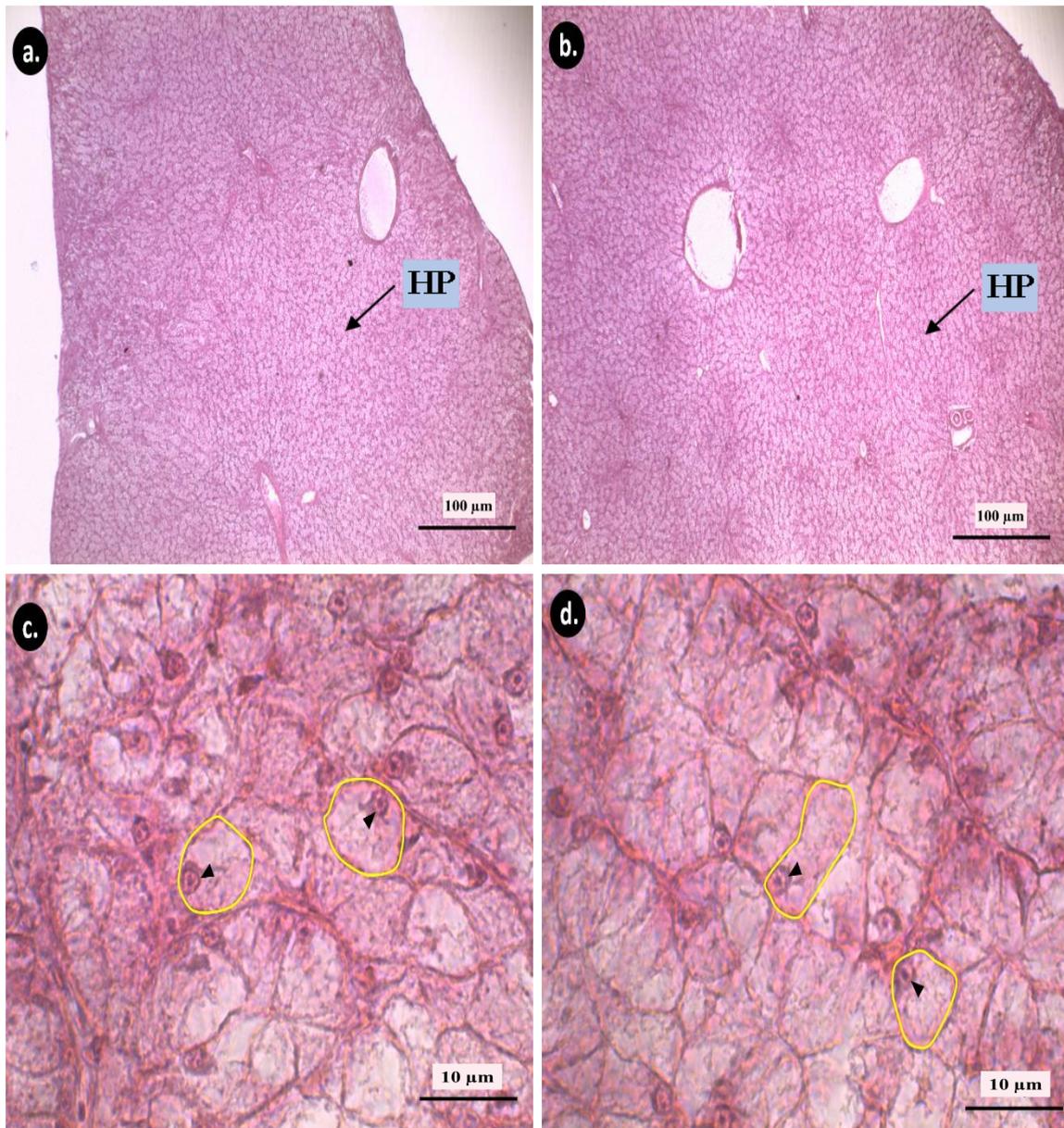


Figura 22. Microfotografías de hepatocitos en la tercera semana de realimentación de juveniles de *A. gigas*. Resaltado con bordes amarillos hepatocitos (HP), ► núcleo de hepatocitos. **a, c.** Peces alimentados constantemente (C). **b, d.** Peces realimentados tres semanas (RW3). Tinción: Hematoxilina y Eosina. Secciones 6 μm.

5.1.1. Índice hepatosomático

El índice hepatosomático (IHS), mostró ser significativamente menor en peces ayunados por una y dos semanas en comparación con los del grupo de control, observándose una recuperación gradual en el IHS a partir de la primera semana de realimentación (RW1), con valores significativamente mayores durante la segunda y tercera semana de realimentación en comparación con el grupo control, acercándose el valor del IHS al valor del grupo control (Fig. 23).

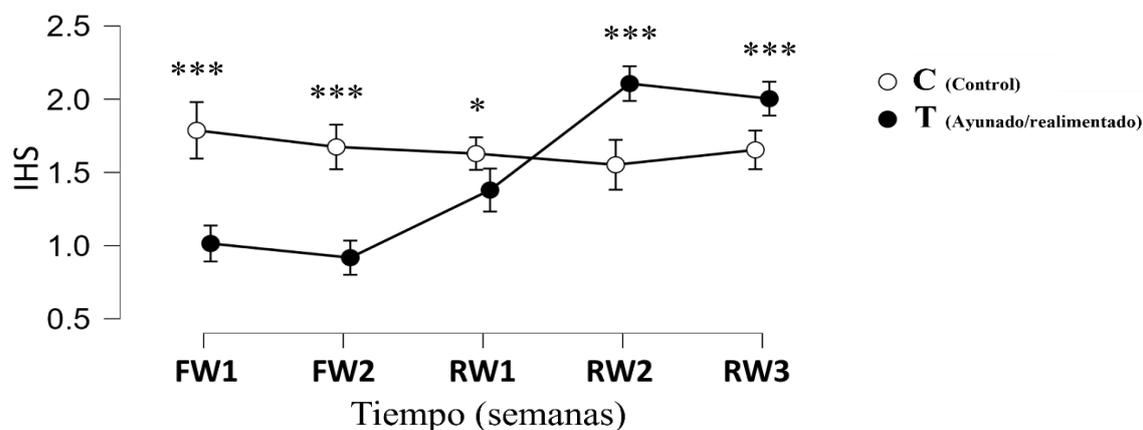


Figura 23. Índice hepatosomático (IHS), de *A. gigas* en peces alimentados (○) y peces ayunados/realimentados (●). Semana uno de ayuno (FW1), semana dos de ayuno (FW2), semana uno realimentado (RW1), semana dos realimentado (RW2), semana tres realimentado (RW3). Se muestra la media con un intervalo de confianza del 95%. * $p < .05$, *** $p < .001$.

5.1.2. La cantidad de núcleos de hepatocitos.

En cuanto al número de núcleos de hepatocitos observables, se encontró que el promedio de núcleos en el grupo control se situaba entre 13 y 15 durante las cinco semanas del estudio. Por otro lado, se observaron diferencias estadísticamente significativas en los peces tratados. En la primera semana de ayuno, se encontró un promedio de 20.8 ± 2.6 núcleos, lo cual fue significativamente mayor que en los controles ($p < 0.001$, Tabla 03; Fig. 24). Asimismo, en la segunda semana de ayuno se registró un promedio de 24.5 ± 4.7 núcleos, significativamente mayor al grupo control ($p = 0.001$). Sin embargo, desde la primera hasta la tercera semana de realimentación no se observaron diferencias significativas, y el promedio de los peces realimentados fue similar al del grupo control ($p > 0.1$, Tabla 03; Fig. 24).

Tabla 03. Número de núcleos de hepatocitos por campo en juveniles de *A. gigas* en condiciones de ayuno y realimentación. Semana 1 de ayuno (FW1), semana 2 de ayuno (FW2), semana 1 de realimentación (RW1), semana 2 de realimentación (RW2), semana 3 de realimentación (RW3).

Semanas	Número de núcleos de hepatocitos		p-valor
	Control	Tratados	
FW1	13.112 ± 2.81	20.833 ± 2.66	< .001
FW2	13.723 ± 3.40	24.555 ± 4.77	.001
RW1	14.222 ± 1.53	16.833 ± 3.21	.102
RW2	15.612 ± 1.61	14.388 ± 1.83	.247
RW3	13.055 ± 1.06	13.390 ± 1.67	.687

Los datos representan la media ± desviación estándar. Grupo control (n=6) y el grupo tratado (n=6).

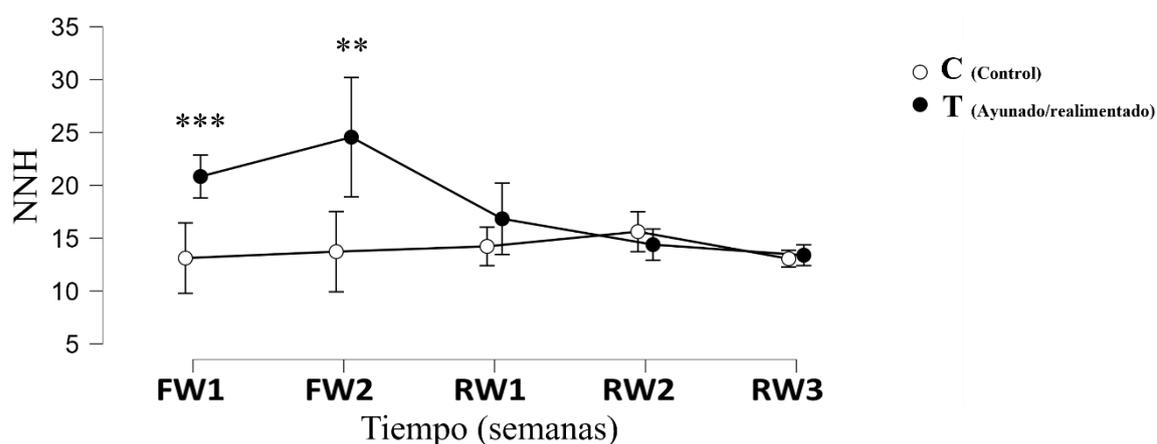


Figura 24. Número de núcleos de hepatocitos (NNH), en *A. gigas* en peces alimentados (○) y peces ayunados/realimentados (●). Semana uno de ayuno (FW1), semana dos de ayuno (FW2), semana uno realimentado (RW1), semana dos realimentado (RW2), semana tres realimentado (RW3). Se muestra la media con un intervalo de confianza del 95%. ** p< .01, *** p< .001.

5.1.3. El área de los núcleos de los hepatocitos

Para el área del núcleo de los hepatocitos, se observaron diferencias significativas entre el grupo control y el grupo experimental durante las semanas de ayuno (Fig. 25). En la primera y segunda semana de ayuno, se encontró que el área del núcleo en los peces del grupo control fue significativamente mayor, respecto de los peces ayunados ($p < 0.001$, Tabla 04). Sin embargo, durante las semanas de realimentación, aunque no se observaron diferencias significativas entre tratamientos, se observó una área mayor en los peces realimentados en comparación con el grupo control ($p > 0.05$, Tabla 04; Fig. 25).

Tabla 04. Área del núcleo de hepatocitos de juveniles de *A. gigas* en condiciones de ayuno y realimentación. Semana 1 de ayuno (FW1), semana 2 de ayuno (FW2), semana 1 de realimentación (RW1), semana 2 de realimentación (RW2), semana 3 de realimentación (RW3).

Semanas	Área del núcleo de hepatocitos (μm^2)		p-valor
	Control	Tratados	
FW1	15.752 \pm 0.45	12.122 \pm 0.70	< .001
FW2	14.763 \pm 1.03	11.628 \pm 0.94	< .001
RW1	15.913 \pm 1.02	16.003 \pm 1.81	.917
RW2	16.652 \pm 1.20	17.800 \pm 0.73	.073
RW3	16.575 \pm 0.97	17.352 \pm 1.34	.277

Los datos representan la media \pm desviación estándar. Grupo control (n=6) y el grupo tratado (n=6).

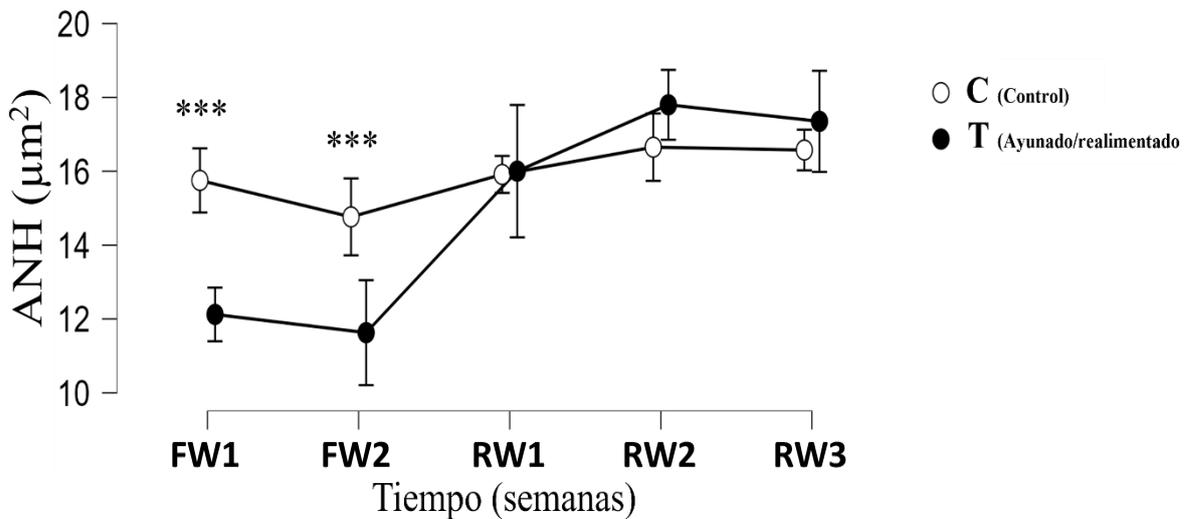


Figura 25. Área de los núcleos de los hepatocitos (ANH), en *A. gigas* en peces alimentados (○) y peces ayunados/realimentados (●). Semana uno de ayuno (FW1), semana dos de ayuno (FW2), semana uno realimentado (RW1), semana dos realimentado (RW2), semana tres realimentado (RW3). Se muestra la media con un intervalo de confianza del 95%. *** p< .001.

5.1.4. Área celular de los hepatocitos

El área de los hepatocitos mostró resultados similares al obtenido para el área de los núcleos. En la primera y segunda semana de ayuno, se observó que el área de los hepatocitos fue significativamente menor en el grupo experimental que en el control ($p < 0.001$, Tabla 5). Por otro lado, en los peces realimentados no se observaron diferencias significativas con el control, pero se evidenció un área mayor en comparación ($p > 0.01$, Tabla 05; Fig. 26).

Tabla 05. Área de los hepatocitos de juveniles de *A. gigas* en condiciones de ayuno y realimentación. Semana 1 de ayuno (FW1), semana 2 de ayuno (FW2), semana 1 de realimentación (RW1), semana 2 de realimentación (RW2), semana 3 de realimentación (RW3).

Semanas	Área de los hepatocitos (μm^2)		p-valor
	Control	Tratados	
FW1	140.393 \pm 12.03	77.137 \pm 3.67	< .001
FW2	156.327 \pm 19.61	79.092 \pm 6.85	< .001
RW1	147.437 \pm 21.41	123.965 \pm 24.31	.106
RW2	152.950 \pm 14.38	160.917 \pm 8.16	.265
RW3	160.285 \pm 13.27	170.472 \pm 10.12	.166

Los datos representan la media \pm desviación estándar. Grupo control (n=6) y el grupo tratado (n=6).

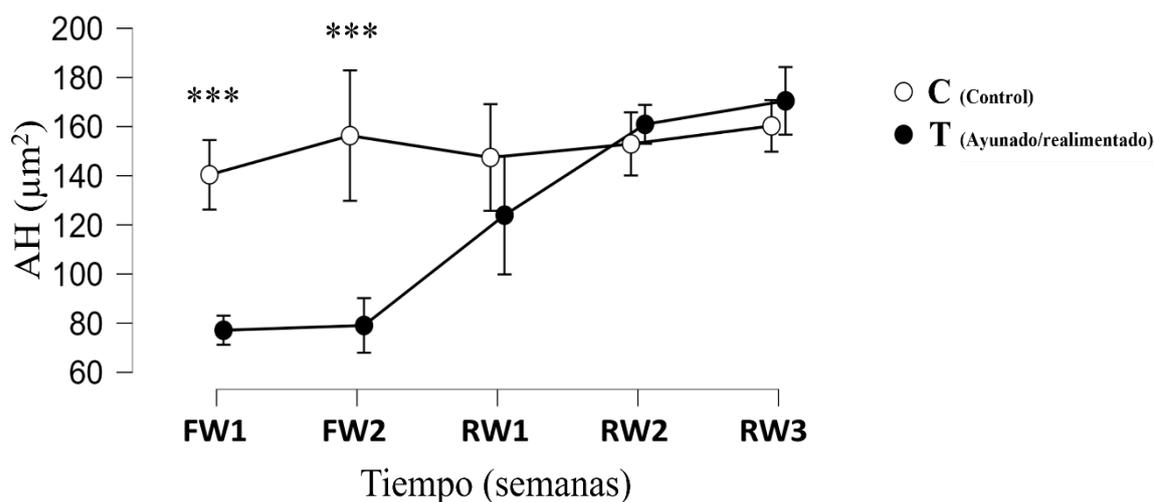


Figura 26. Área celular de los hepatocitos (AH), en *A. gigas* en peces alimentados (\circ) y peces ayunados/realimentados (\bullet). Semana uno de ayuno (FW1), semana dos de ayuno (FW2), semana uno realimentado (RW1), semana dos realimentado (RW2), semana tres realimentado (RW3). Se muestra la media con un intervalo de confianza del 95%. *** $p < .001$.

5.2. Intestino

La mucosa intestinal posterior del paiche está compuesta por un epitelio simple cilíndrico con un borde de cepillo transparente, una lámina propia y una presencia variable de células calciformes intercaladas. Los pliegues mucosos son mayormente transversales y se intercalan entre pliegues simples o complejos según sus ramificaciones.

Las vellosidades intestinales muestran un epitelio simple con células calciformes, lámina propia, una chapa estriada con microvellosidades y enterocitos con núcleos basales regulares (Fig. 27).

La submucosa está compuesta por tejido conectivo laxo poco denso, con presencia de fibras nerviosas y vasos sanguíneos, con un espesor variable. La capa muscular está formada por células musculares lisas que conforman una capa circular interna y una capa longitudinal externa, con espesores distintos.

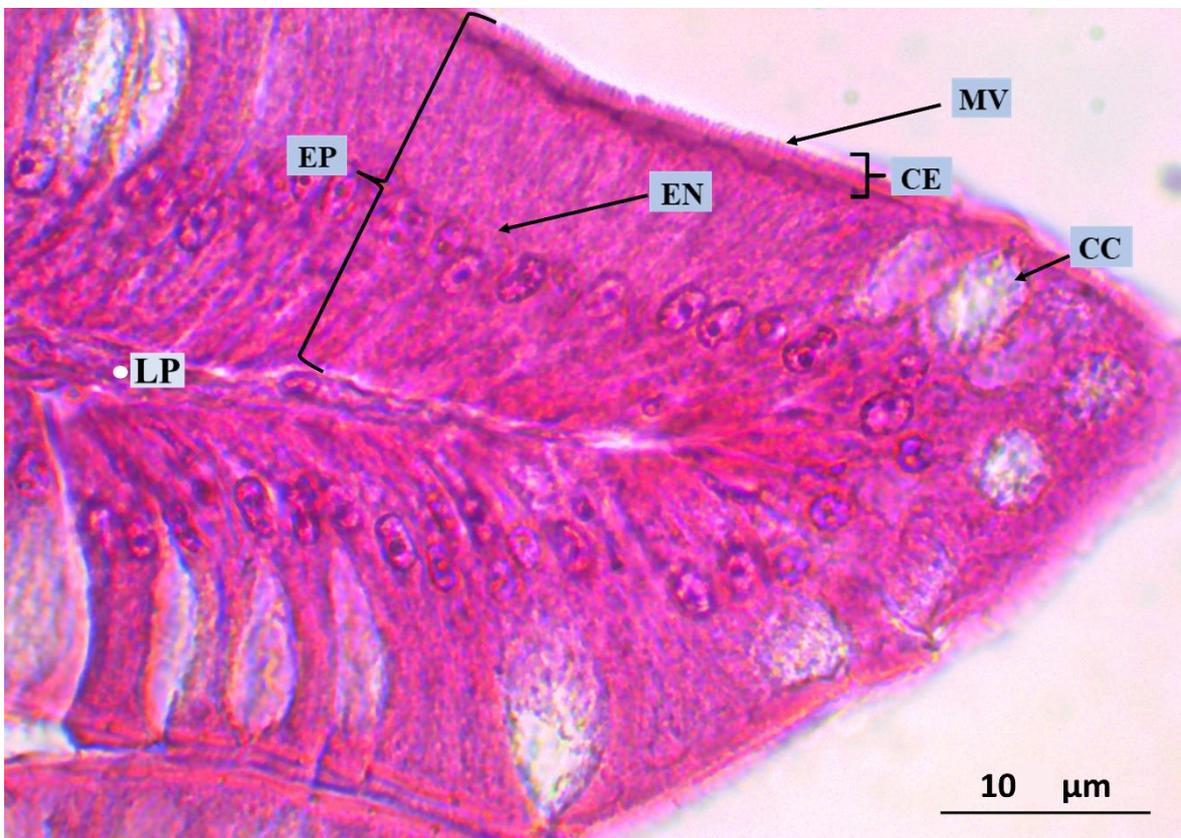


Figura 27. Microfotografía de una vellosidad intestinal de *A. gigas* alimentado normalmente. EP, Epitelio; LP, Lamina propia; CE, Chapa estriada; EN, Enterocito; MV, Microvellosidad; CC, Célula calciforme. Tinción: Hematoxilina y Eosina. Secciones 6 µm.

Una primera inspección visual de los intestinos de los peces sometidos a ayuno revela un diámetro reducido en comparación con los peces del grupo control y los peces realimentados (Fig. 28a y 28c). Además, en esta misma perspectiva se observa que los peces ayunados presentan una longitud de las vellosidades intestinal mayor, lo cual es especialmente notable en las imágenes de mayor aumento. También se evidencia una mayor presencia de células calciformes en los peces del grupo control (Fig. 28b) en comparación con los peces ayunados (Fig. 28d). Por otro lado, en cuanto a las características analizadas cualitativamente, no se observaron cambios notables ni en la capa muscular ni en la lámina propia del intestino.

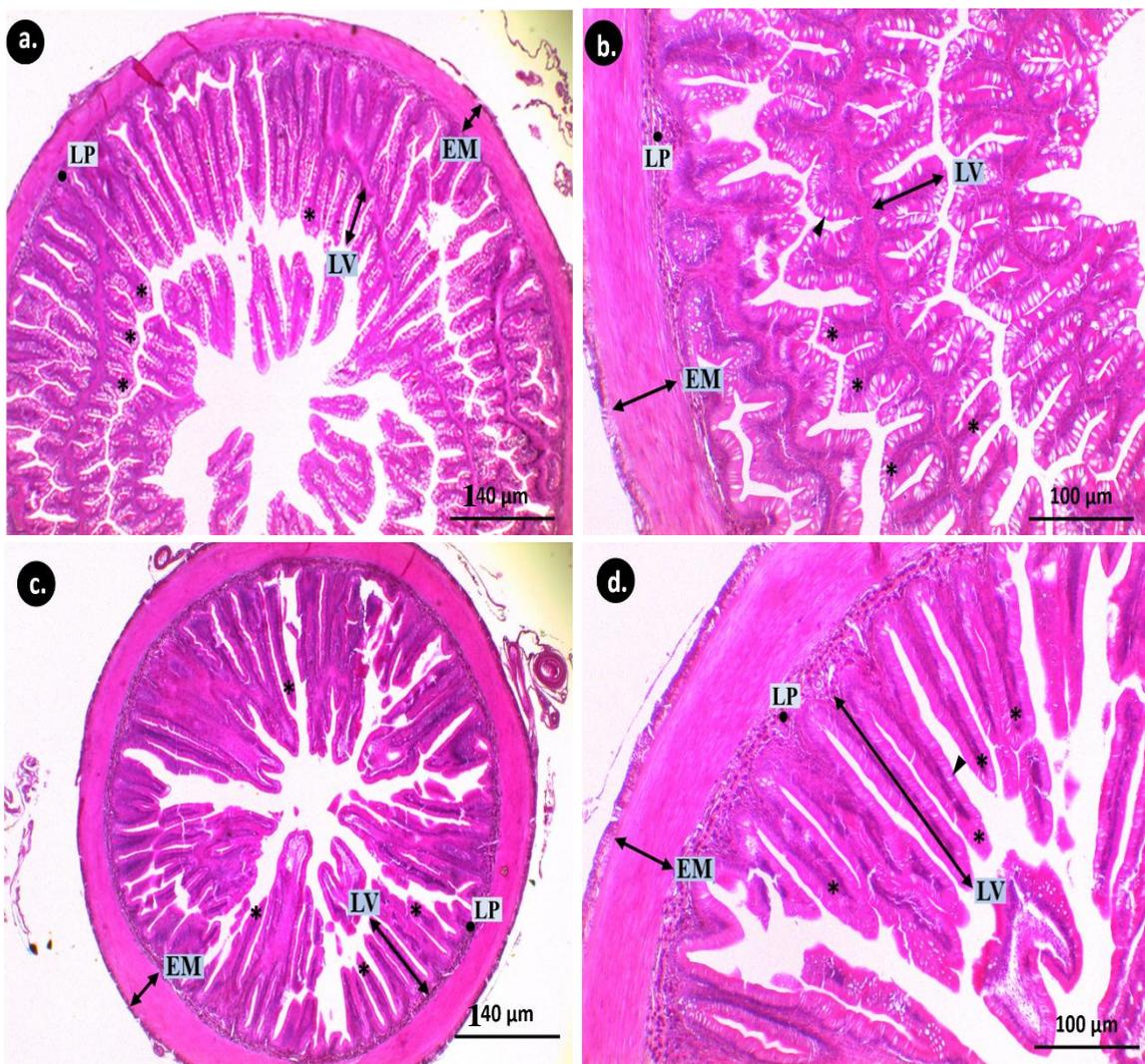


Figura 28. Microfotografías del intestino en la primera semana de ayuno de juveniles de *A. gigas*. a, b. Peces alimentados constantemente (C). c, d. Peces ayunados una semana (FW1). *, Vellosidad intestinal; •LP, Lamina propia y submucosa; ↔EM, Espesor muscular; ↔LV, Longitud de vellosidad; ▶, Célula calciforme. Tinción: Hematoxilina y Eosina. Secciones 6 μm.

Durante la segunda semana de ayuno, se observaron cambios similares a los reportados en la primera semana de ayuno. Los peces sometidos a ayuno (Fig. 29c) exhibieron un diámetro intestinal menor en comparación con el grupo control (Fig. 29a), y presentaron vellosidades intestinales con una longitud mayor. Lo mismo se apreció en las imágenes de mayor aumento, donde se evidenció una diferencia en la presencia de células calciformes, siendo más prominentes en los peces del grupo control (Fig. 29b) que en los peces ayunados (Fig. 29d). Además, se observó una ligera diferencia en el grosor de la capa muscular, siendo mayor en los peces sometidos a ayuno.

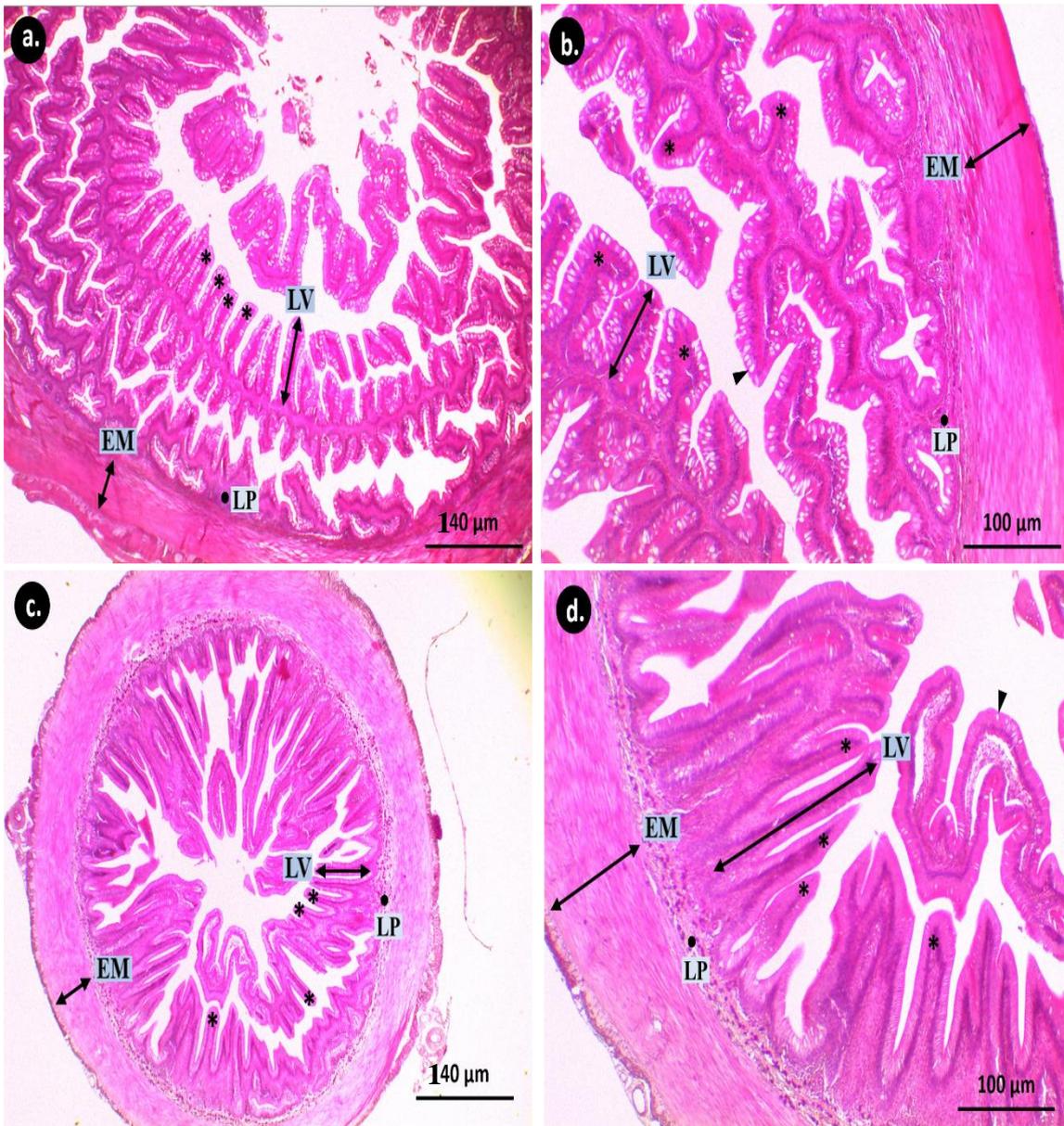


Figura 29. Microfotografías del intestino en la segunda semana de ayuno de juveniles de *A. gigas*. a, b. Peces alimentados constantemente (C). c, d. Peces ayunados dos semanas (FW2). *, Vellosidad intestinal; •LP, Lamina propia y submucosa; ↔EM, Espesor muscular; ↔LV, Longitud de vellosidad; ►, Célula calciforme. Tinción: Hematoxilina y Eosina. Secciones 6 μm.

Durante la primera semana de realimentación, se observó que los peces del grupo control (Fig. 30a) presentaban un diámetro intestinal similar al observado en los peces que fueron realimentados (Fig. 30c), lo cual contrasta con los hallazgos de las dos semanas de ayuno anteriores. En cuanto a otras características morfológicas del intestino, se observaron de manera similar en ambos grupos, aunque se notó un ligero aumento en la presencia de células calciformes en los peces del grupo control (Fig. 30b) en comparación con los peces sometidos a ayuno y realimentados (Fig. 30d).

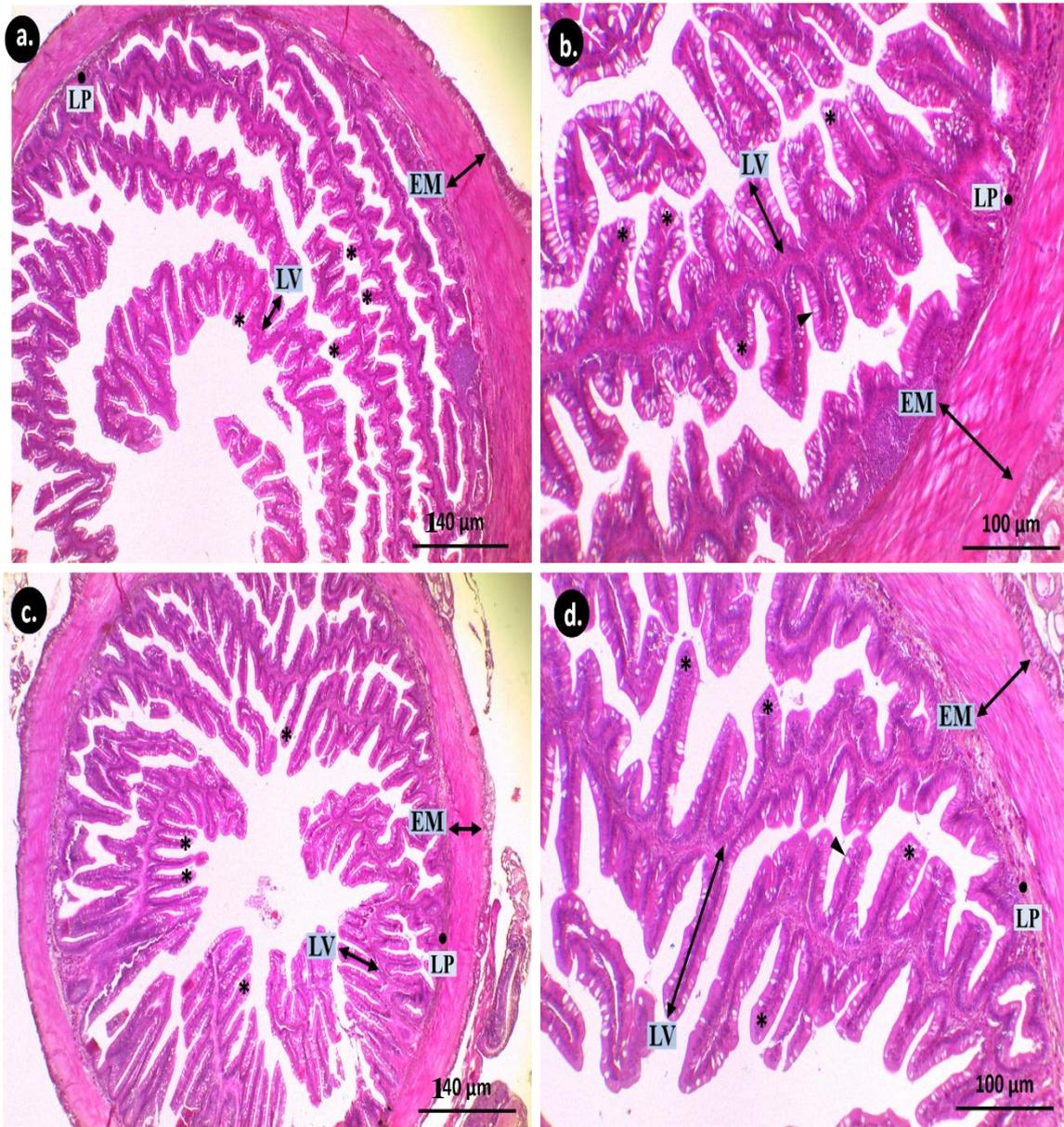


Figura 30. Microfotografías del intestino en la primera semana de realimentación de juveniles de *A. gigas*. a, b. Peces alimentados constantemente (C). c, d. Peces realimentados una semana (RW1). *, Vellosoidad intestinal; •LP, Lamina propia y submucosa; ↔EM, Espesor muscular; ↔LV, Longitud de vellosoidad; ►, Célula calciforme. Tinción: Hematoxilina y Eosina. Secciones 6 μm.

En la segunda semana de realimentación, se observaron escasos cambios tanto en los peces del grupo control (Fig. 31a y 31b) como en los peces realimentados (Fig. 31c y 31d). Estos resultados siguen la tendencia observada en la primera semana de realimentación, donde se evidenció la restauración de las características intestinales que se presentaban durante las semanas de ayuno.

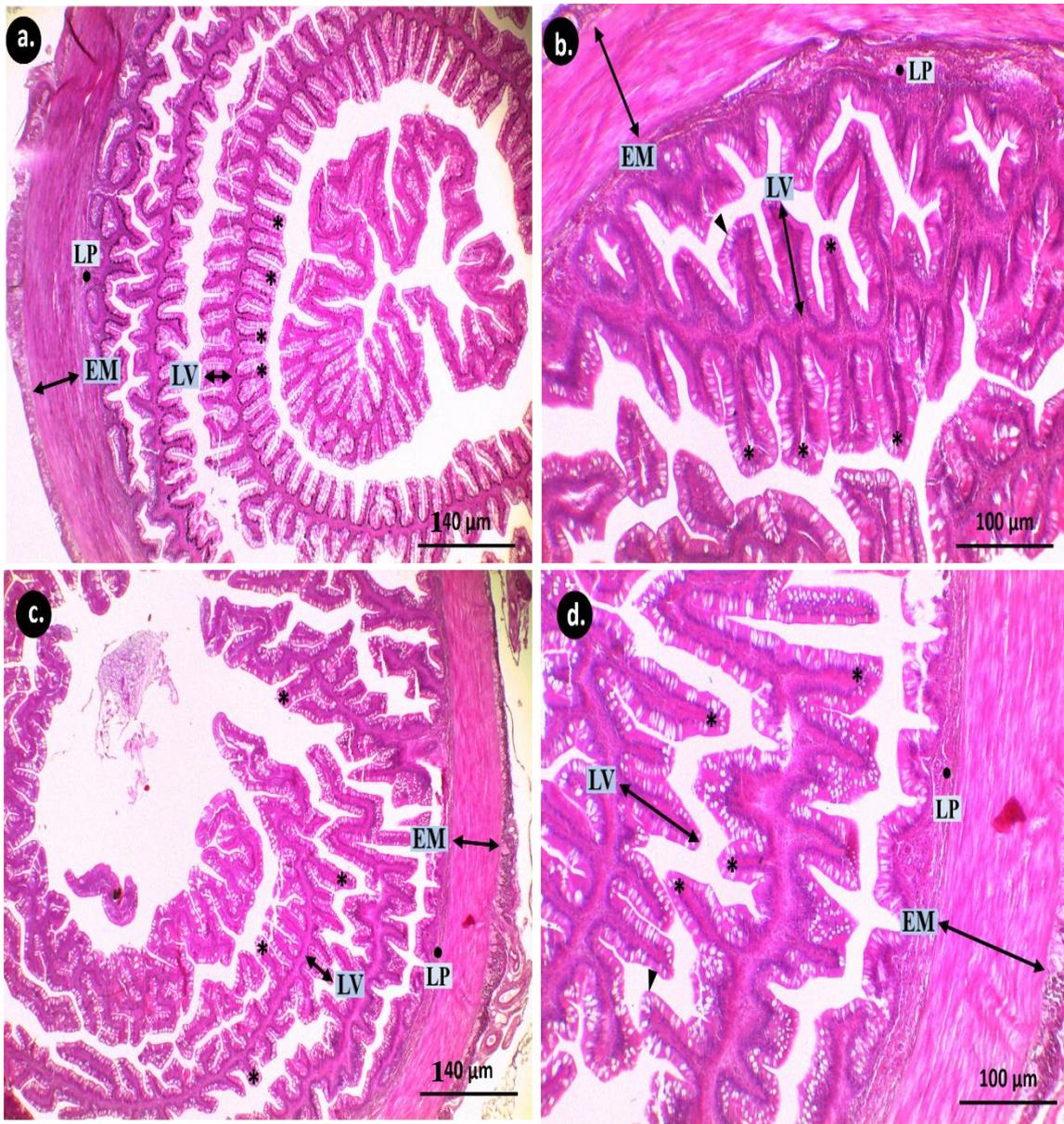


Figura 31. Microfotografías del intestino en la segunda semana de realimentación de juveniles de *A. gigas*. a, b. Peces alimentados constantemente (C). **c, d.** Peces realimentados dos semanas (RW2). *, Vellosoidad intestinal; •LP, Lamina propia y submucosa; ↔EM, Espesor muscular; ↔LV, Longitud de vellosoidad; ►, Célula calciforme. Tinción: Hematoxilina y Eosina. Secciones 6 μm.

Finalmente, durante la tercera semana de realimentación de los juveniles de *A. gigas*, no se observaron cambios significativos en las características morfológicas del intestino (Fig. 32). Estos hallazgos sugieren una recuperación de posibles daños o problemas que pudieron haber ocurrido durante el período de ayuno.

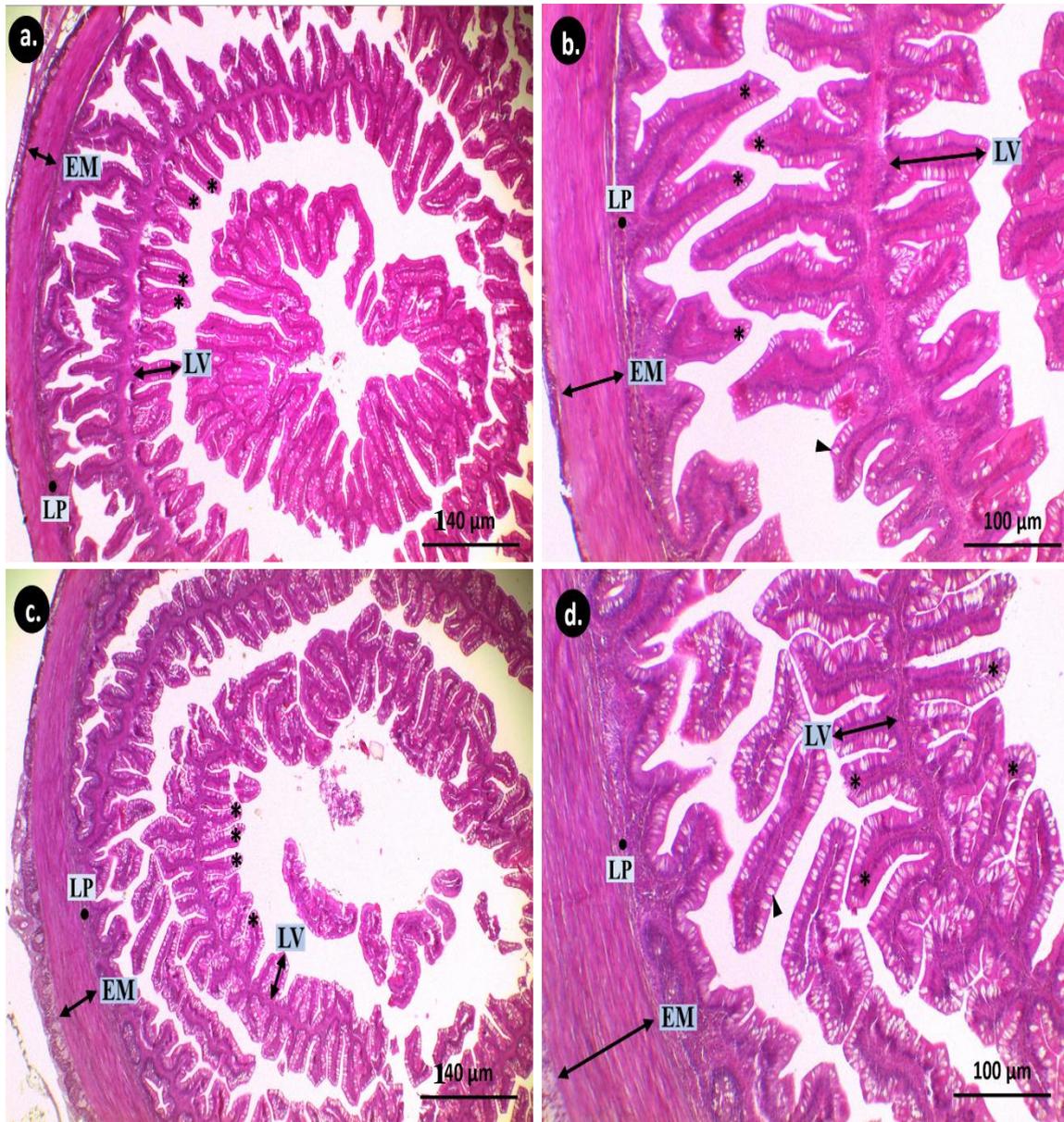


Figura 32. Microfotografías del intestino en la tercera semana de realimentación de juveniles de *A. gigas*. a, b. Peces alimentados constantemente (C). c, d. Peces realimentados tres semanas (RW3). *, Vellosidad intestinal; •LP, Lamina propia y submucosa; ↔EM, Espesor muscular; ↔LV, Longitud de vellosidad; ▶, Célula calciforme. Tinción: Hematoxilina y Eosina. Secciones 6 μm.

5.2.1. Diámetro intestinal

Con respecto al diámetro del intestino, se observó que durante la primera y segunda semana de ayuno fue significativamente menor con respecto al grupo de control ($p = 0.02$ y $p < 0.01$ respectivamente, Tabla 06; Fig. 33). Aunque no se encontraron diferencias estadísticamente significativas, se observó un ligero aumento en el diámetro del intestino durante la segunda y tercera semana de realimentación (RW2/RW3), con valores medios de $4.1 \pm 0.5 \mu\text{m}$ y $4.5 \pm 0.4 \mu\text{m}$, respectivamente (Tabla 06). Esto evidenció una recuperación en el diámetro del intestino después de las semanas de ayuno (Fig. 33).

Tabla 06. Diámetro del intestino de juveniles de *A. gigas* en condiciones de ayuno y realimentación. Semana 1 de ayuno (FW1), semana 2 de ayuno (FW2), semana 1 de realimentación (RW1), semana 2 de realimentación (RW2), semana 3 de realimentación (RW3).

Semanas	Diámetro intestinal (mm)		p-valor
	Control	Tratados	
FW1	3.172 ± 0.81	1.278 ± 0.08	.002
FW2	3.982 ± 0.39	1.150 ± 0.06	< .001
RW1	3.420 ± 0.46	2.965 ± 0.75	.264
RW2	3.825 ± 0.31	4.160 ± 0.55	.248
RW3	4.265 ± 0.22	4.525 ± 0.42	.230

Los datos representan la media \pm desviación estándar. Grupo control (n=6) y el grupo tratado (n=6).

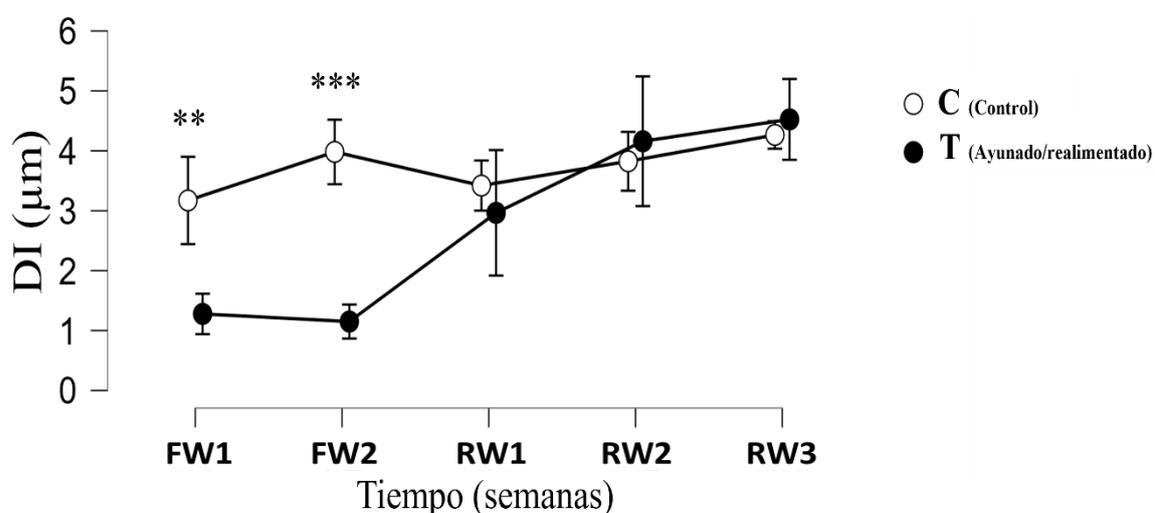


Figura 33. Diámetro intestinal (DI), en *A. gigas* en peces alimentados (○) y peces ayunados/realimentados (●). Semana uno de ayuno (FW1), semana dos de ayuno (FW2), semana uno realimentado (RW1), semana dos realimentado (RW2), semana tres realimentado (RW3). Se muestra la media con un intervalo de confianza del 95%. ** $p < .01$, *** $p < .001$.

5.2.2. Longitud de las vellosidades

En relación a la longitud de las vellosidades intestinales, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos experimentales en ninguna de las semanas de tratamiento ($p = 0.053$, Tabla 07; Fig. 34). Sin embargo, se observó un aumento en la longitud de las vellosidades durante la primera semana ($190.3 \pm 50.4 \mu\text{m}$) y la segunda semana ($162.4 \pm 53.1 \mu\text{m}$) de ayuno en comparación con el grupo control, aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa ($p > 0.05$, Tabla 08). Por otro lado, los peces realimentados mostraron resultados similares al grupo control, con longitudes aproximadas de entre 100 - 118 μm (Fig. 34).

Tabla 07. Longitud de las vellosidades intestinales de juveniles de *A. gigas* en condiciones de ayuno y realimentación. Semana 1 de ayuno (FW1), semana 2 de ayuno (FW2), semana 1 de realimentación (RW1), semana 2 de realimentación (RW2), semana 3 de realimentación (RW3).

Semanas	Longitud Vellosidades (μm)	
	Control	Tratados
FW1	114.02 ± 66.1	190.37 ± 50.4
FW2	104.32 ± 59.6	162.46 ± 53.1
RW1	114.89 ± 25.9	107.79 ± 40.0
RW2	99.57 ± 13.8	118.63 ± 52.7
RW3	118.88 ± 20.9	107.75 ± 22.2

Los datos representan la media \pm desviación estándar.

Tabla 08. Resultado del efecto principal e interacción del RM-ANOVA de la longitud de las vellosidades intestinales.

Efecto	RM-ANOVA				
	Cuadrado medio	F	p	p^{GG}	p^{HF}
Tratamientos	10987.4	4.821	.053		
Semanas	4138.3	2.219	.084	.124	.103
Tratamiento/Semana	4563.7	2.447	.062	.100	.079

Valor-p corregido de Greenhouse-Geisser (GG). Valor-p corregido de Huynh-Feldt (HF). $p < .05$. Muestran diferencias significativas.

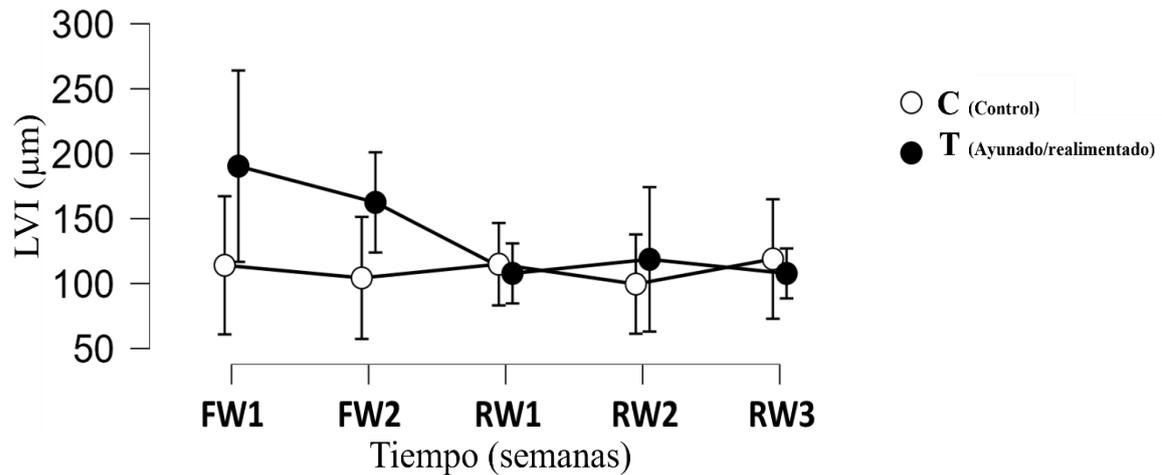


Figura 34. Longitud vellosidades (LVI), en *A. gigas* en peces alimentados (○) y peces ayunados/realimentados (●). Semana uno de ayuno (FW1), semana dos de ayuno (FW2), semana uno realimentado (RW1), semana dos realimentado (RW2), semana tres realimentado (RW3). Se muestra la media con un intervalo de confianza del 95%.

5.2.3. Ancho de la capa muscular circular interna

En relación al ancho de la capa muscular circular interna del intestino, aunque se observó un aumento en el ancho durante la primera semana de ayuno (FW1), no se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$; Tabla 09). Sin embargo, durante la segunda semana de ayuno (FW2) se observó que los peces ayunados presentaban una capa muscular significativamente más ancha que los del grupo control ($p = 0.08$, Fig. 35). Durante las dos primeras semanas de realimentación (RW1/RW2), no se encontraron diferencias significativas en el grosor de la capa muscular (Tabla 09). Sin embargo, en la tercera semana de realimentación (RW3) los peces realimentados tuvieron una capa muscular circular interna más ancha que los peces control ($p < 0.001$, Tabla 09; Fig. 35).

Tabla 09. Ancho de la capa muscular circular interna del intestino de juveniles de *A. gigas* en condiciones de ayuno y realimentación. Semana 1 de ayuno (FW1), semana 2 de ayuno (FW2), semana 1 de realimentación (RW1), semana 2 de realimentación (RW2), semana 3 de realimentación (RW3).

Semanas	Ancho de la capa muscular (µm)		p-valor
	Control	Tratados	
FW1	103.955 ± 13.15	116.508 ± 21.58	.252
FW2	96.803 ± 9.22	126.400 ± 20.11	.008
RW1	110.835 ± 15.06	96.145 ± 16.03	.133
RW2	110.762 ± 10.21	114.002 ± 18.88	.719
RW3	99.715 ± 12.67	135.637 ± 12.82	< .001

Los datos representan la media ± desviación estándar. Grupo control (n=6) y el grupo tratado (n=6).

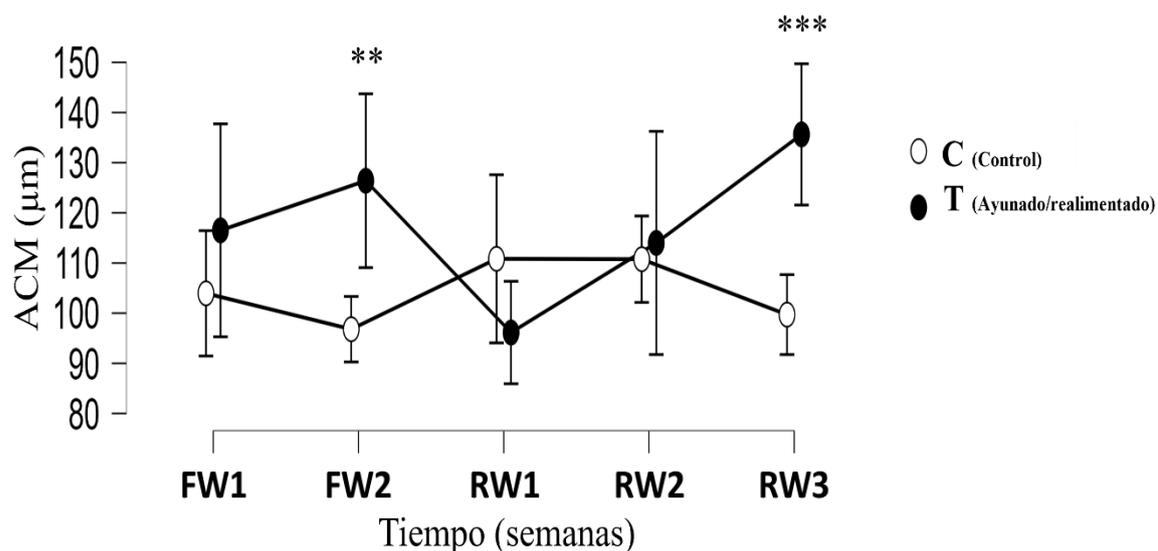


Figura 35. Ancho de la capa muscular circular interna (ACM), de *A. gigas* en peces alimentados (○) y peces ayunados/realimentados (●). Semana uno de ayuno (FW1), semana dos de ayuno (FW2), semana uno realimentado (RW1), semana dos realimentado (RW2), semana tres realimentado (RW3). Se muestra la media con un intervalo de confianza del 95%. ** $p < .01$, * $p < .001$.**

5.2.4. Longitud de los enterocitos

La longitud de los enterocitos mostró valores similares entre el grupo control y el grupo experimental, esto demostró que no se encontraron diferencias significativas en la relación entre los grupos experimentales con las semanas de tratamiento (Tabla 11). No obstante, se observó un ligero aumento en todas las semanas del grupo experimental en comparación con el grupo control, siendo más pronunciado en la tercera semana de realimentación ($13.8 \pm 3.6 \mu\text{m}$), que en el grupo control ($10.1 \pm 1.4 \mu\text{m}$) (Tabla 10; Fig. 36).

Tabla 10. Longitud de los enterocitos de juveniles de *A. gigas* en condiciones de ayuno y realimentación. Semana 1 de ayuno (FW1), semana 2 de ayuno (FW2), semana 1 de realimentación (RW1), semana 2 de realimentación (RW2), semana 3 de realimentación (RW3).

Semanas	Longitud Enterocitos (µm)	
	Control	Tratados
FW1	10.32 ± 1.7	11.42 ± 3.1
FW2	10.52 ± 0.3	11.19 ± 5.1
RW1	9.66 ± 0.8	10.62 ± 3.1
RW2	10.04 ± 0.9	10.90 ± 3.5
RW3	10.11 ± 1.4	13.83 ± 3.6

Los datos representan la media \pm desviación estándar.

Tabla 11. Resultado del efecto principal e interacción del RM-ANOVA de la longitud de los enterocitos.

Efecto	RM-ANOVA				
	Cuadrado medio	F	p	p ^{GG}	p ^{HF}
Tratamientos	32.076	1.487	.251		
Semanas	5.699	1.309	.283	.292	.287
Tratamiento/Semana	4.880	1.121	.360	.352	.358

Valor-p corregido de Greenhouse-Geisser (GG). Valor-p corregido de Huynh-Feldt (HF).
p < .05.

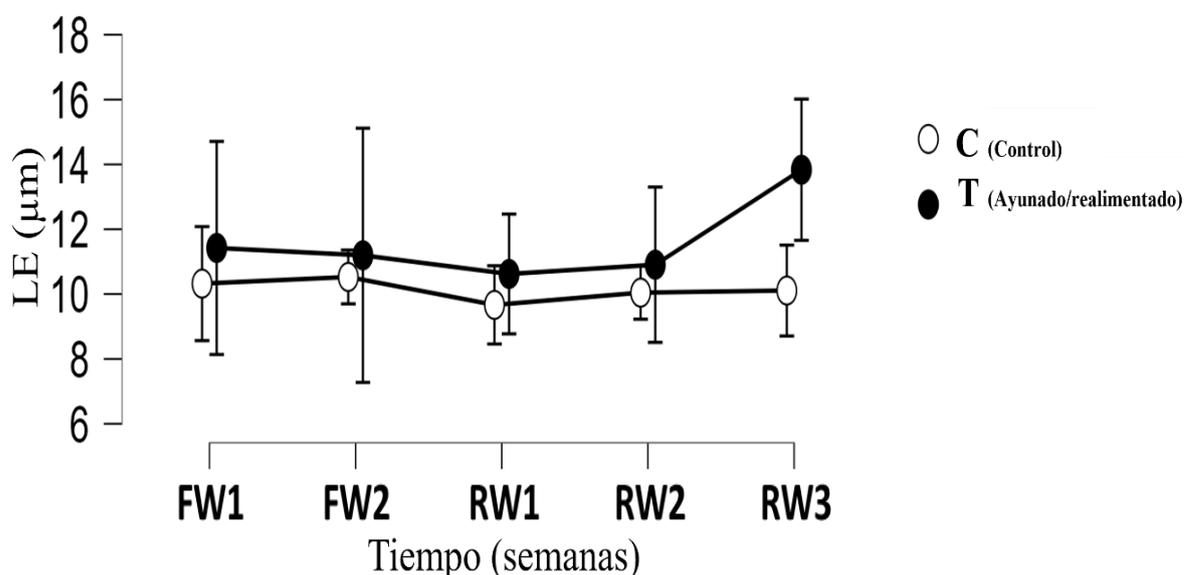


Figura 36. Longitud de los enterocitos (LE), en juveniles de *A. gigas*. Peces alimentados (○) y peces ayunados/realimentados (●). Semana uno de ayuno (FW1), semana dos de ayuno (FW2), semana uno realimentado (RW1), semana dos realimentado (RW2), semana tres realimentado (RW3). Se muestra la media con un intervalo de confianza del 95%.

5.2.5. Número de células calciformes por vellosidad

El análisis del número de células calciformes, así como la longitud de los enterocitos y las vellosidades, no reveló diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos (Ayunado/Control) con las semanas del estudio (FW1 – RW3) ($p = 0.94$; Tabla 13). Sin embargo, la media de células calciformes aumento con el tiempo para ambos tratamientos ($p < 0.0011$; Tabla 12; Fig. 37). Notablemente, siempre el grupo de peces tratados tuvo en promedio una menor cantidad de células calciformes ($p < 0.001$; Tabla 12; Fig. 37).

Tabla 12. Número de células calciformes en juveniles de *A. gigas* en condiciones de ayuno y realimentación. Semana 1 de ayuno (FW1), semana 2 de ayuno (FW2), semana 1 de realimentación (RW1), semana 2 de realimentación (RW2), semana 3 de realimentación (RW3).

Semanas	Número de células calciformes	
	Control	Tratados
FW1	12.83 ± 2.4	9.36 ± 1.8
FW2	16.66 ± 1.9	12.94 ± 3.4
RW1	15.77 ± 1.1	12.39 ± 1.7
RW2	19.50 ± 2.7	15.66 ± 2.3
RW3	21.83 ± 3.9	19.61 ± 2.6

Los datos representan la media ± desviación estándar.

Tabla 13. Resultado del efecto principal e interacción del RM-ANOVA del número de células calciformes.

Efecto	RM-ANOVA				
	Cuadrado medio	F	p	p ^{GG}	p ^{HF}
Tratamientos	166.1	25.83	< .001		
Semanas	160.1	24.88	< .001	< .001	< .001
Tratamiento/Semana	1.245	0.194	.940	.892	.940

Valor-p corregido de Greenhouse-Geisser (GG). Valor-p corregido de Huynh-Feldt (HF).

p < .05.

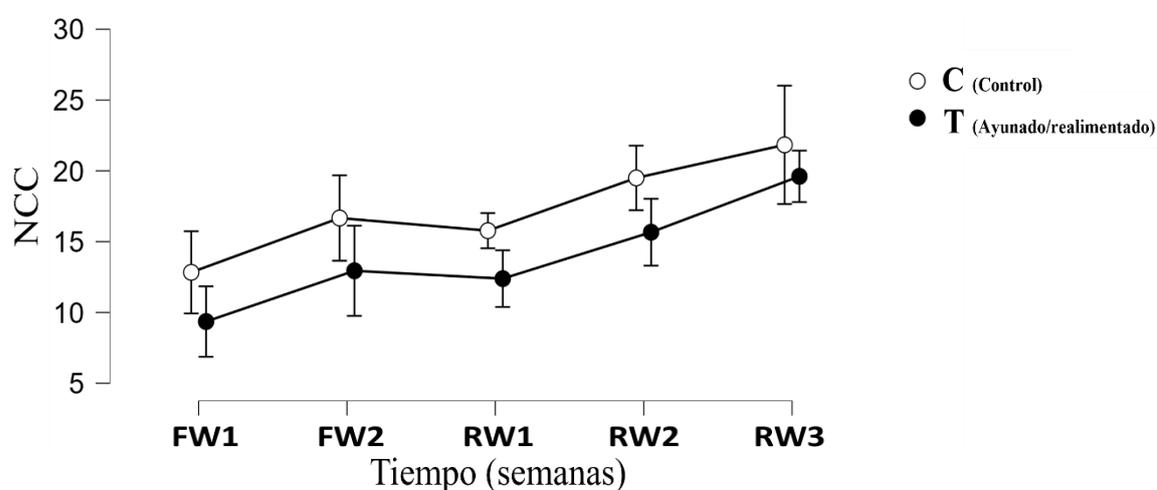


Figura 37. Número de células calciformes por vellosidad (NCC), en juveniles de *A. gigas*. Peces alimentados (○) y peces ayunados/realimentados (●). Semana uno de ayuno (FW1), semana dos de ayuno (FW2), semana uno realimentado (RW1), semana dos realimentado (RW2), semana tres realimentado (RW3). Se muestra la media con un intervalo de confianza del 95%.

5.3. Análisis transcriptómico

5.3.1. Hígado

Los niveles de expresión de IGF1 hepáticos fueron más altos en los peces ayunados tanto en la primera ($p = 0.0449$) como en la segunda semana ($p = 0.0045$; Tabla 14; Fig. 38). A partir del tercer día de realimentación la expresión génica de IGF1 no difiere entre los peces control y realimentados ($p > 0.05$, Tabla 14). No se observaron diferencias estadísticamente significativas en los niveles del transcrito de IGF2 para ninguna semana entre los peces ayunados y controles ($p > 0.05$; Tabla 14). En cuanto a los receptores para la hormona de crecimiento, no se detectó expresión diferencial para GHR1 entre peces tratados y control a lo largo de todo el experimento ($p > 0.05$; Tabla 14). Sin embargo, los niveles del transcrito para GHR2 fueron significativamente menores en los peces ayunados por 2 semanas respecto del control ($p > 0.0001$; Tabla 14), aumentando de manera significativa al tercer día de iniciada la realimentación los niveles de GHR2 fueron significativamente mayores en el grupo realimentado ($p = 0.0029$; Tabla 14). No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos experimentales para GHR2 a la semana de comenzado el ayuno ni luego de 2 semanas de realimentación (Tabla 14).

Tabla 14. Estadística básica de la expresión de los transcritos en hígado de *A. gigas* bajo condiciones de ayuno/realimentación. Primera semana de ayuno (FW1), segunda semana de ayuno (FW2), tercer día de realimentación (RD3), semana de realimentación (RW2).

Semanas	Gen de interés	log2FoldChange	p-valor
FW1	IGF1	0.861	0.045
	IGF2	-0.077	0.914
	GHR1	-0.239	0.788
	GHR2	NA	1
FW2	IGF1	1.218	0.005
	IGF2	0.203	0.771
	GHR1	0.944	0.292
	GHR2	-34.891	0.000
RD3	IGF1	-0.293	0.500
	IGF2	0.090	0.904
	GHR1	-0.175	0.845
	GHR2	17.416	0.003
RW2	IGF1	-0.431	0.316
	IGF2	-0.084	0.903
	GHR1	-0.095	0.915
	GHR2	-3.055	0.597

Valor de significancia $p < 0.05$. Valores positivos de log2FoldChange indican sobreexpresión/ Valores negativos de log2FoldChange indican subexpresión.

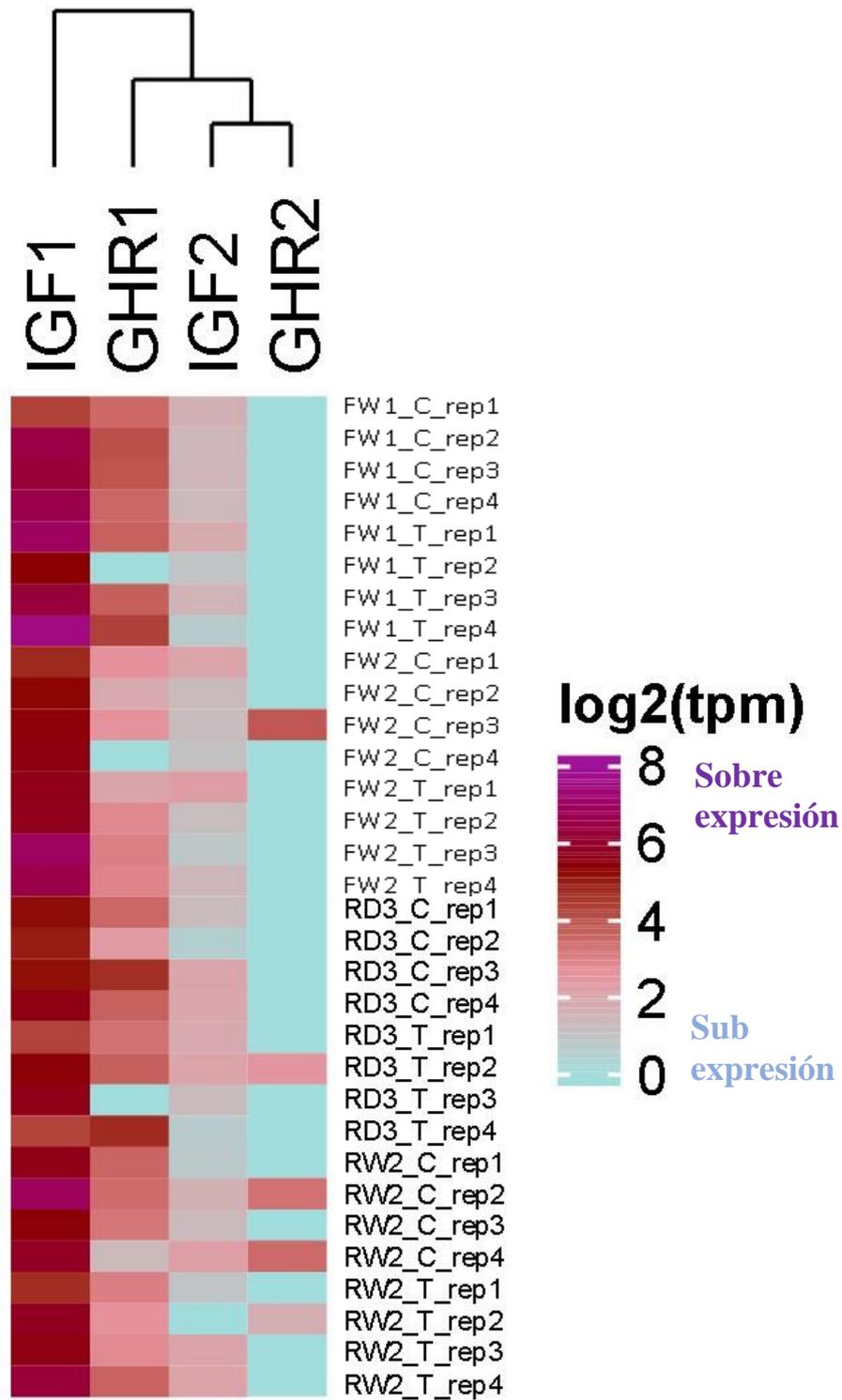


Figura 38. Mapa de calor mostrando la agrupación de los tratamientos con base en los transcritos expresados diferencialmente en el hígado de juveniles de *A. gigas*. La agrupación de las réplicas biológicas indica la consistencia del experimento durante el esquema de ayuno realimentación. Púrpura - Rojo: Transcritos sobreexpresados, Celeste: Transcritos subexpresados. Semana uno de ayuno (FW1_T), semana uno control (FW1_C), semana dos de ayuno (FW2_T), semana dos control (FW2_C), tercer día de realimentación (RD3_T), tercer día de realimentación control (RD3_C), semana dos de realimentación (RW2_T), semana dos de realimentación control (RW2_C).

5.3.2. Músculo

No se observaron diferencias estadísticamente significativas en la expresión de IGF1 e IGF2 en músculo ni durante ayuno ni la realimentación (Tabla 15; Fig. 39). Por otra parte, los niveles de transcritos de GHR1 fueron mayores en peces ayunados por una y dos semanas respecto de los controles ($p = 0.029$ y $p = 0.006$, respectivamente; Tabla 15), pero no difirieron entre ambos grupos experimentales en la realimentación a RD3 y RW2 (Tabla 15). Similarmente, GHR2 fue sobre expresado en peces ayunados por una y dos semanas, aunque esta diferencia respecto del control fue estadísticamente significativa únicamente para W1 ($p = 0.037$ y $p = 0.144$, respectivamente; Tabla 15).

Tabla 15. Estadística básica de la expresión de los transcritos en músculo de *A. gigas* bajo condiciones de ayuno/realimentación. Primera semana de ayuno (FW1), segunda semana de ayuno (FW2), tercer día de realimentación (RD3), segunda semana de realimentación (RW2).

Semanas	Gen de interés	log2FoldChange	p-valor
FW1	IGF1	-0.099	0.970
	IGF2	0.216	0.828
	GHR1	3.698	0.029
	GHR2	2.123	0.038
FW2	IGF1	1.130	0.666
	IGF2	0.449	0.649
	GHR1	4.485	0.006
	GHR2	1.858	0.144
RD3	IGF1	0.001	0.943
	IGF2	-0.002	0.958
	GHR1	0.036	0.173
	GHR2	0.022	0.596
RW2	IGF1	1.109	0.675
	IGF2	0.285	0.807
	GHR1	0.990	0.595
	GHR2	1.170	0.411

Valor de significancia $p < 0.05$. Valores positivos de log2FoldChange indican sobreexpresión/ Valores negativos de log2FoldChange indican subexpresión.

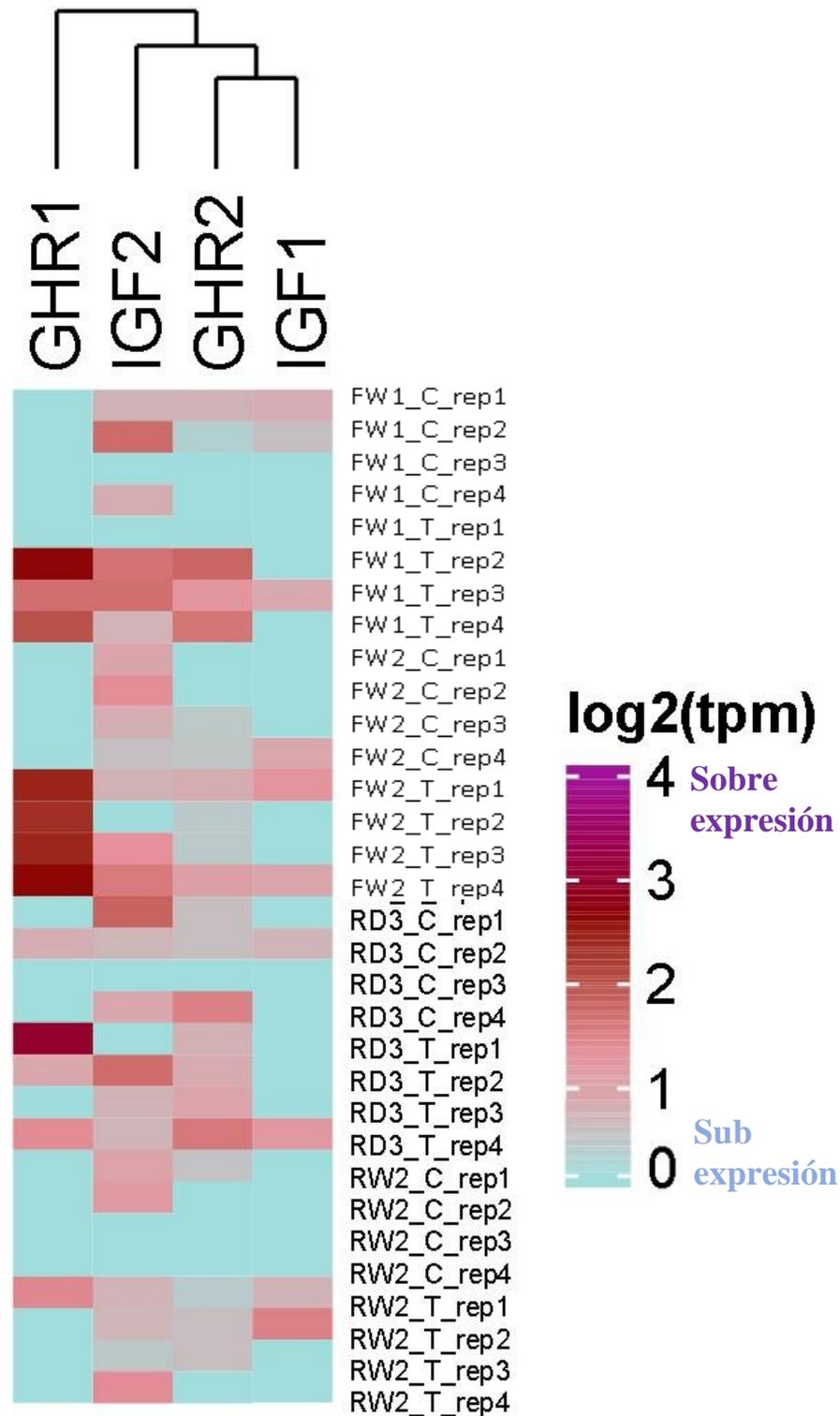


Figura 39. Mapa de calor mostrando la agrupación de los tratamientos con base en los transcritos expresados diferencialmente en el músculo de juveniles de *A. gigas*. La agrupación de las réplicas biológicas indica la consistencia del experimento durante el esquema de ayuno realimentación. Púrpura - Rojo: Transcritos sobreexpresados, Celeste: Transcritos subexpresados. Semana uno de ayuno (FW1_T), semana uno control (FW1_C), semana dos de ayuno (FW2_T), semana dos control (FW2_C), tercer día de realimentación (RD3_T), tercer día de realimentación control (RD3_C), semana dos de realimentación (RW2_T), semana dos de realimentación control (RW2_C).

6. DISCUSIÓN

El efecto de las aplicaciones ayuno seguido de la realimentación en el crecimiento compensatorio de *A. gigas* fue evaluado en dos órganos fundamentales en el hígado para comprender la salud y el estado nutricional de los animales, ya que los cambios en la alimentación pueden alterar la estructura y función hepática (Rocha *et al.*, 1994, p. 214; Hipolito *et al.*, 2004, p. 151; Vicentini *et al.*, 2005, p. 213). La condición hepática es crucial, ya que cualquier trastorno en la alimentación puede tener un impacto negativo en el crecimiento del animal, dado que en el hígado se sintetizan hormonas fundamentales en la regulación de crecimiento (Beckman, 2011, p. 239).

El análisis del índice hepatosomático en esta investigación reveló diferencias significativas entre los peces ayunados y realimentados respecto de la situación control de alimentación continua. Durante las semanas de ayuno, el tamaño del hígado se redujo considerablemente en los juveniles de paiche no alimentados. Sin embargo, es de notar su rápida recuperación durante la realimentación, donde a partir de la primera semana se observa un acercamiento a los valores del control, que incluso supera desde la segunda semana de realimentación el IHS de los peces juveniles del grupo control. Esto indica que la recuperación hepática y nutricional del animal ocurre mucho antes que la recuperación a nivel de crecimiento somático, pues a la RW2 el hígado ya se ha recuperado completamente mientras que el peso y la talla (Datos no presentados) de los animales ayunados/realimentados aún están por debajo de la curva de crecimiento de los controles.

Investigaciones previas en juveniles de pez ángel (*Pterophyllum scalare*) han demostrado que durante los períodos de ayuno se produce una reducción en el peso del hígado (Motta *et al.*, 2021, p. 133). Esta disminución en el tamaño del hígado puede deberse a la movilización de reservas de grasa y glucógeno, utilizadas para mantener las funciones vitales durante temporadas de restricción alimentaria (Torfi Mozanzadeh *et al.*, 2017, p. 6; Karatas *et al.*, 2021, p. 1125).

La movilización de lípidos durante etapas de ayuno ha sido reportada previamente, para algunas especies por ejemplo, en el paco (*Piaractus mesopotamicus*), donde se determinó que la reducción de lípidos estaba relacionada con los valores bajos del IHS durante el ayuno (Favero *et al.*, 2020, pp. 3-4). En la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), se ha observado una movilización lipídica entre el hígado y los tejidos perivasculares, utilizando estas

reservas para satisfacer las necesidades energéticas durante el ayuno (Karatat, 2018, p. 1726). De manera similar, en el bacalao del Atlántico (*Gadus morhua*), se movilizan primero las reservas lipídicas y luego las reservas de glucógeno en músculo e hígado en respuesta al ayuno (Guderley *et al.*, 2003, p. 351). Asimismo, en el salmón (*Salmo salar*), se utilizan inicialmente los lípidos como principal fuente de energía en respuesta a períodos de ayuno debido a su mayor tasa de consumo de oxígeno (Cook *et al.*, 2000, pp. 54-56). Si bien en la presente tesis no se realizó un análisis del contenido de lípidos y glucógeno en hígado y músculo, los estudios llevados a cabo en dichas especies sugieren que en el paiche la caída en el IHS en el ayuno podría deberse, al menos en parte, a la movilización de reservas lipídicas y de glucógeno, que tras dos semanas de realimentación se reestablecen completamente. En este sentido, es importante tener en cuenta la histología hepática y el comportamiento de los hepatocitos durante estos procesos de ayuno/realimentación.

Con respecto a las características morfológicas de hígado, los hepatocitos son células hepáticas especializadas que desempeñan múltiples funciones vitales en el metabolismo, la desintoxicación, la producción de proteínas y la regulación de diversos procesos fisiológicos. El correcto funcionamiento de los hepatocitos es esencial para mantener la salud general del organismo. En el paiche, los hepatocitos no presentan variaciones en comparación con otros teleósteos. Tienen formas poligonales, núcleo redondo y central, nucleolos y citoplasma granular (Aziza *et al.*, 2015, p. 334; Scadeng *et al.*, 2020, p. 15).

Referente al efecto causado por el ayuno/realimentación en el área de los hepatocitos se observó una reducción abrupta y significativa en los animales sometidos a ayuno (Fig. 25); por ello, a partir de los cambios en los índices somáticos y la histología inducidos por la restricción de alimento, se puede inferir que los peces sometidos a ayuno utilizaron las reservas lipídicas como una fuente de energía importante para sobrellevar la inanición. La movilización de lípidos en respuesta a la restricción alimentaria ha sido previamente reportada en diversas especies. Por ejemplo, el bacalao del Atlántico (*Gadus morhua*) moviliza sus reservas lipídicas primero, seguidas de las reservas de glucógeno en el músculo y el hígado, y finalmente utiliza las proteínas musculares como último recurso energético (Guderley *et al.*, 2003, p. 351). Esta movilización de lípidos y glucógeno, también fue reportado por Elbially *et al.* (2022, p. 983), quienes encontraron una disminución del tamaño de los hepatocitos en tilapia (*Oreochromis niloticus*) después de una semana de ayuno, reducción que según los autores podría ser proporcional a la duración de los períodos de ayuno.

Asimismo un estudio realizado por Aziza *et al.* (2015, p. 334) demostró una disminución significativa en el área y volumen celular de los hepatocitos después de un ayuno de ocho semanas, acompañado de la aparición de una red de fibras de colágeno, cambios en la forma y posición del núcleo, reducción de los espacios intercelulares y desorganización celular. Estos cambios también se observaron en el hígado de la carpa (*Cyprinus carpio*), donde además de la reducción en el tamaño de los hepatocitos, se reflejó un rápido agotamiento de los nutrientes almacenados en el hígado (Al-Niaeem *et al.*, 2010, p. 5). Estudios similares en la trucha (*Oncorhynchus mykiss*) también han mostraron estos cambios en el hígado (Liu *et al.*, 2018, p. 397).

Dado que el IHS se recupera completamente durante la realimentación, nos preguntamos si ocurre lo mismo a nivel celular en los hepatocitos. En el presente estudio observamos que efectivamente el tamaño de los hepatocitos, medidos como el área en secciones histológicas, se recupera totalmente en la realimentación, siguiendo el perfil de la recuperación del IHS. De hecho, se observa una restauración parcial en el área de los hepatocitos y sus núcleos a partir de la primera semana de realimentación, logrando recuperar los valores previos a los períodos de ayuno, a partir de esta restauración se mostró una relación proporcional con el tiempo de realimentación, evidenciando un ligero aumento en comparación con los valores del grupo control (Fig. 24 y 25).

Estos resultados coinciden con lo observado en los hepatocitos de *Oreochromis niloticus*, donde después de 30 días de realimentación, el volumen celular y nuclear se restablecieron a los niveles anteriores a la restricción, lo que se atribuyó a la disminución de los procesos anabólicos y al aumento de los catabolitos durante el ayuno (Aziza *et al.*, 2015, p. 335). De manera similar, observaron que en *Oncorhynchus mykiss*, donde después de 28 días de realimentación se obtuvieron resultados similares (Liu *et al.*, 2018, p. 397). Sin embargo, estos resultados no concuerdan con los estudios realizados por Elbially *et al.* (2022, p. 985), quienes no observaron una recuperación después de los períodos de ayuno, aunque señalaron que períodos de ayuno prolongados requerirían períodos de realimentación más extensos para lograr una compensación en el crecimiento en *O. niloticus*.

Luego de haber analizado los cambios estructurales del hígado debido al ayuno y la realimentación, se procedió a estudiar los posibles cambios morfológicos en el intestino del paiche.

Con respecto al intestino, *A. gigas* presenta plegamientos, una característica distintiva de la mayoría de los teleosteos carnívoros y que pueden ser muy útiles para evaluar los cambios rápidos en la dieta, incluidos los períodos de ayuno (Vidal *et al.*, 2019, pp. 79-80). En este estudio, se observó que el ayuno afecta las estructuras intestinales, lo que podría implicar disfunciones en la absorción y el transporte de nutrientes. Acorde a eso, Liu *et al.* (2018, p. 397) demostraron que los cambios estructurales e histológicos difieren según la duración del período de restricción alimentaria, y que estos pueden restaurarse hasta cierto punto mediante la realimentación, siempre y cuando los períodos de ayuno sean cortos, ya que períodos prolongados de ayuno pueden provocar cambios irreversibles.

En los mamíferos, el intestino es afectado por varias hormonas relacionadas con el estado nutricional y el metabolismo, como la hormona de crecimiento, el factor de crecimiento tipo insulina I, la leptina y la grelina, que desempeñan un papel importante en la regulación del recambio de los enterocitos (Ersoy *et al.*, 2009, p. 5422). El ayuno y la realimentación pueden alterar la proliferación de las células epiteliales y la apoptosis en el intestino (Takahashi *et al.*, 2014, p. 256).

Así tenemos que el diámetro del intestino de *A. gigas* se muestra disminuido en animales ayunados en comparación con los controles (Tabla 06; Fig. 32). Karasov *et al.* (2004, p. 158) mencionan que, dado que el tracto gastrointestinal representa aproximadamente el 40% del peso total de los animales, los peces tienden a regular negativamente la estructura de sus órganos como mecanismo de conservación de energía durante el ayuno. Esto coincide con lo reportado por Motta *et al.* (2021, p. 132), quienes al someter a *Pterophyllum scalare* a 12 y 15 días de ayuno no lograron recuperar las características intestinales, aun después de 30 días de realimentación; lo que corrobora que los animales priorizan la normalización del estado de otros órganos. En contraste, en el caso del paiche y el salmón del Atlántico, el diámetro del intestino durante el ayuno mostró cambios notables desde los primeros días de ayuno, disminuyendo aún más a los 7 días, mostrando daños en los pliegues simples y la transformación del citoplasma supranuclear de notablemente vacuolado a finamente granular (Krogdahl y Bakke-McKellep, 2005, p. 457).

Scadeng *et al.* (2020, p. 15), en un estudio previo, describieron que la mucosa intestinal presenta pliegues longitudinales muy evidentes y simples. Esto concuerda con el presente estudio, donde se pudo observar que el intestino posterior presenta pliegues longitudinales ramificados y vellosidades simples. También se demostró que el ayuno puede afectar estas estructuras, mostrando ligeras degeneraciones y un aumento en la longitud de las

vellosidades, aunque sin diferencias estadísticamente significativas al compararlas con los animales control. Esto podría deberse a la incidencia de los cortes realizados, lo que explicaría la dispersión encontrada en el análisis de datos (Fig. 33).

Sin embargo, otra razón del aumento observable en la longitud de las vellosidades podría ser que estas estructuras necesitan incrementar su superficie para mejorar la absorción de nutrientes, ya que se ven afectadas por el escaso flujo de alimento en períodos de ayuno (Honorato *et al.*, 2011, p. 286; Mariano *et al.*, 2021, pp. 8-9). Por el contrario, Day *et al.* (2014, pp. 506-508) reportaron una notable reducción de las vellosidades y microvellosidades intestinales poco después del inicio del período de ayuno en peces. Esto resalta la importancia de esta adaptación fisiológica a los obstáculos en su medio natural.

En este sentido, se observó que las tres semanas de realimentación lograron normalizar la longitud de las vellosidades de *A. gigas*, siendo similares tanto en los peces control como en los realimentados. Sin embargo, aún se observaba una longitud notablemente menor en los animales que salieron del período de ayuno (Fig. 33). Estos resultados contrastan con lo descrito en tilapia, se observó un aumento en la altura, el perímetro y el área de las vellosidades intestinales en los grupos que fueron realimentados después de 30 días. Este aumento en la superficie implicaba una mayor capacidad de absorción para los nutrientes disponibles (Aziza *et al.*, 2015, p. 334).

Por otro lado, la capa muscular circular interna del intestino del paiche mostró un aumento en su grosor en los animales ayunados en comparación con los del grupo control, aunque no significativo. En el caso de *Oncorhynchus mykiss*, se observó una disminución en el grosor de la capa muscular intestinal a partir de los 14 días de ayuno, empeorando a los 21 y 28 días, donde la reducción fue aún más pronunciada y el estriado también se había desprendido, lo que indica daños severos en las estructuras intestinales (Liu *et al.*, 2018, p. 395). De manera similar, en adultos de *Hoplias malabaricus* sometidos a 30 días de ayuno, se reportó una disminución en el grosor de la capa muscular del intestino (Rios *et al.*, 2004, p. 687).

Durante el período de realimentación, la capa muscular del intestino se restableció en comparación con los animales control, aunque se registraron algunas diferencias observables, pero no significativas en algunos casos. Esto corrobora la teoría de Liu *et al.* (2018, p. 395), que sugiere que después del ayuno se prioriza el restablecimiento estructural de otros órganos antes que los del tracto gastrointestinal como mecanismo de conservación de energía.

En cuanto a la cuantificación de las células calciformes, se obtuvieron valores menores en cada etapa de los tratamientos, ya sea durante las semanas de ayuno o las semanas de realimentación. No se observó una recuperación de este parámetro en comparación con el grupo control (Fig. 36).

En estudios previos, Pinto *et al.* (2022, p. 353) describieron que las células calciformes de *A. gigas* tienden a tener una mayor incidencia en la parte posterior del intestino, lo cual puede estar relacionado con la producción y asimilación de iones y fluidos, que facilitarían la eliminación de desechos. Además, la presencia de un mayor número de células calciformes en el intestino está relacionada con una mejor producción de moco, lo que contribuye con la protección del epitelio intestinal contra los alimentos provenientes del estómago, que son ricos en enzimas digestivas con un pH marcadamente ácido, y también ayuda a mantener un entorno intestinal saludable (Honorato *et al.*, 2011, p. 287; Silva *et al.*, 2017, p. 969). En la investigación realizada por Liu *et al.* (2018, p. 395) observaron una reducción marcada en la cantidad de células calciformes en cada etapa de ayuno, ya sea en el día 7, 14, 21 o 28, donde obtuvieron constantemente valores menores en comparación con el grupo control en la trucha arcoíris.

Estudios de crecimiento llevados a cabo en *A. gigas* indican que el ayuno puede inducir respuestas de crecimiento compensatorio. Tanto una como dos semanas de ayuno son suficientes para provocar una respuesta hiperfágica en los peces cuando son alimentados nuevamente. Esta hiperfagia puede aumentar la tasa de crecimiento de los peces, durante este período, donde los peces tratados mostraron una mejor eficiencia de conversión alimenticia en comparación con el grupo control, aunque esta tasa sólo se reflejó por un tiempo acotado.

Estos resultados son consistentes con estudios realizados en otras especies de peces. Por ejemplo, en el cíclido *Cichlasoma dimerus*, se observó una respuesta de crecimiento compensatorio tres semanas después de la realimentación, acompañada de una mayor eficiencia alimentaria y niveles elevados de GH en plasma y de su ARNm en hipófisis (Delgadin *et al.*, 2018, p. 6). Otra especie donde se obtuvieron resultados similares fue en *Cyrtocara moori*, aunque en este caso no hubo una mejora significativa en la eficiencia alimenticia y el crecimiento compensatorio, que después de una y dos semanas de ayuno fue parcial (Yılmaz *et al.*, 2018, p. 4). Montserrat *et al.*, (2007, p. 193) también informaron una respuesta de crecimiento compensatorio parcial en la dorada (*Sparus aurata*) al cabo de un mes de realimentación después de tres semanas de ayuno. En *Hippoglossus hippoglossus*, la

inducción parcial del crecimiento compensatorio se logró mediante diferentes protocolos de ayuno y realimentación (Heide *et al.*, 2006, p. 116). De manera similar, en juveniles de *Lutjanus guttatus* se observó un crecimiento compensatorio después de tres semanas de realimentación, luego de dos semanas de ayuno, aunque no alcanzaron el crecimiento de los organismos del grupo de control, esto evidencio el potencial de crecimiento mientras mayor sea el período de realimentación (Escalante, 2019, p. 87).

Estos hallazgos demuestran que la inanición puede inducir crecimiento compensatorio en *A. gigas*, lo que brinda oportunidades a los productores para desarrollar estrategias que reduzcan costos. Sin embargo, podrían ser necesarios diferentes esquemas de ayuno-realimentación para obtener un rendimiento óptimo.

El crecimiento de los vertebrados está regulado en gran medida por el eje de la hormona del crecimiento/factor de crecimiento tipo insulina, donde además intervienen de manera necesaria los receptores de la hormona del crecimiento, los cuales desempeñan un papel clave en este sistema al mediar los efectos de GH (Brooks *et al.*, 2014, p. 2). En la presente tesis mostramos que el ayuno y la realimentación afectan diferencialmente la expresión de algunos de los componentes del eje de crecimiento en juveniles de *A. gigas*: IGF1, IGF2, GHR1 y GHR2.

El estado nutricional tiene un impacto significativo en la expresión de los receptores de la hormona del crecimiento en teleósteos, aunque los estudios publicados hasta la fecha dan cuenta de que las respuestas pueden variar entre las distintas especies. Por ejemplo, en el salmón masu, se observó una reducción en la expresión del ARNm de GHR1 en el hígado de peces que estuvieron en ayuno durante tres semanas (Fukada *et al.*, 2004, p. 69). En la lubina rayada híbrida, la expresión del ARNm de GHR2 en el músculo aumentó significativamente después de tres semanas de ayuno, mientras que los niveles de ARNm de GHR1 y GHR2 en el hígado (Picha *et al.*, 2008, p. 199). Por otro lado, en la tilapia durante el ayuno no se observaron cambios en los niveles de transcripción de GHR1 en el hígado (Pierce *et al.*, 2007, pp. 37-38).

Otros trabajos previos han descrito también una disminución en los niveles de ARNm de GHR1 y GHR2 en el hígado y un aumento en los niveles de ARNm de GHR1 y GHR2 en el músculo en condiciones de ayuno, con un retorno parcial de los niveles de expresión de esos genes durante la realimentación, lo que respalda un mecanismo de “recuperación”. Entre las especies estudiadas fueron *Siniperca chuatsi* (Lu *et al.*, 2016, p. 166), *Acanthopagrus*

schlegeli (Deng *et al.*, 2004, p. 428), *Oreochromis mossambicus* (Fox *et al.*, 2010, p. 575), *Paralichthys adspersus* (Fuentes *et al.*, 2012, p. 288) y *Ictalurus furcatus* (Small *et al.*, 2006, p. 353). Estas respuestas pueden deberse a diferencias entre los tejidos y especies de peces, así como a los diferentes tiempos de los muestreos. Además, se ha planteado la posibilidad de que el GHR2 esté involucrado en la reparación y supervivencia de los tejidos, lo que podría explicar la expresión de GHR2 regulada por el ayuno en el músculo (Saera-Vila *et al.*, 2005, p. 202). En contraste, Reindl y Sheridan, (2012, p. 236) proponen que la alta expresión de GHR en el músculo puede estar relacionada con la movilización de lípidos.

En este sentido, los resultados de la expresión de GHR1 y GHR2 en el hígado de *A. gigas* se condicen con lo reportado en estudios previos en varias especies. A las dos semanas de ayuno el nivel de expresión de GHR2 en hígado es menor en los peces ayunados, mientras que en músculo la expresión tanto de GHR1 como GHR2 se encuentra elevada. La menor expresión de GHR2 en el hígado es parte del mecanismo denominado resistencia a GH, dado que se ha observado que muchas veces durante el ayuno los niveles plasmáticos de GH se encuentran elevados mientras que los niveles de IGF1 disminuidos. Como se menciona en el estudio de Won y Borski (2013, p. 4), la reducción de la expresión de GHR y por tanto la disminución de la tasa de traducción de este gen es al menos uno de los mecanismos responsables de la resistencia a la hormona de crecimiento durante el ayuno, lo cual por consiguiente se asocia con una reducción en la producción de los factores de crecimiento IGF1 e IGF2. Por lo tanto, niveles de expresión reducidos del receptor para GH podrían dar cuenta de que a pesar de elevados niveles de GH los niveles plasmáticos de IGF1 se encuentren disminuidos.

Sin embargo, en este estudio observamos que, si bien los niveles de ARNm de GHR2 caen en el ayuno, IGF1 se encuentra sobre expresado. En este sentido, sería necesario corroborar estos resultados mediante la cuantificación de IGF1 circulante o mediante la medición de su ARNm por PCR en tiempo real. Por otra parte, la sobre expresión de los GHRs en músculo es coincidente con lo que se ha reportado en muchas especies de peces teleósteos. Una posible explicación no siempre tenida en cuenta, es la posibilidad de que lo que se esté sobre expresando sea la o las variantes truncadas del receptor. Un aumento en la cantidad de receptor truncado podría actuar como dominante negativo, dado que el su ligando GH se uniría a estos receptores anclados a membrana no funcionales, disminuyendo en consecuencia la unión de GH al receptor completo funcional y por tanto regulando negativamente las vías río debajo de GHR.

Después de considerar los aspectos anteriores, se observó consistentemente que la realimentación de los peces tiende a restaurar los cambios que ocasiona el ayuno. Esto quedó demostrado por la recuperación de los niveles de ARNm de GHR en el hígado y de los niveles de ARNm de GHR muscular a niveles similares a los observados previo al ayuno. Estos resultados indican que la realimentación induce respuestas de regulación molecular que revierten los efectos negativos asociados con el ayuno y permiten la restauración de la expresión normal de los componentes del eje neuroendocrino del crecimiento en los peces (Walock *et al.*, 2014, p. 292).

Se ha descrito ampliamente que la expresión de los factores de crecimiento IGFs son reguladas negativamente en condiciones de restricción alimentaria, el cual posteriormente es restaurada durante el proceso de realimentación, tal como lo indican investigaciones previas en diversas especies de peces, como la trucha arcoíris (Chauvigné *et al.*, 2003, p. 213), el robalo rayado híbrido (Picha *et al.*, 2008, p. 198) y *Paralichthys adspersus* (Fuentes *et al.*, 2012, p. 288). Sin embargo, como ya se ha mencionado, en el presente estudio no se pudo observar el patrón de expresión esperado para IGF1 e IGF2, es decir, una disminución durante la restricción seguida de un aumento significativo durante la realimentación. Más aun, IGF1 es sobre expresado en el ayuno. Esta discrepancia podría deberse, al menos en parte, al proceso de normalización para el cálculo de los valores de expresión génica (Picha *et al.*, 2008, p. 199). En cuanto a la expresión hepática de IGF2, no se observó un efecto claro debido al ayuno o la realimentación. En el tejido muscular, la expresión de ambos genes no mostró patrones de expresión significativos, aunque se observó una sobreexpresión que disminuyó durante la realimentación.

Estudios anteriores han reportado diferencias en los niveles de expresión de IGF asociados con el ayuno. Por ejemplo, en la lubina híbrida, se observó un aumento en la expresión de IGF1 después de un ayuno de cuatro semanas, seguido de una disminución significativa después de la realimentación (Picha *et al.*, 2008, p. 197). En el bagre de canal, se observó que 30 días de ayuno causaron una disminución en la expresión de IGF1 tanto en el tejido muscular como en el hígado, mientras que los niveles de expresión de IGF2 se mantuvieron sin cambios. Durante la realimentación, la expresión de IGF1 se restableció en el músculo y el hígado, mientras que la expresión de IGF2 aumentó solo en el hígado (Peterson *et al.*, 2009, p. 80). En *Labeo rohita*, la restricción parcial de alimentos durante 30 días resultó en un aumento en la expresión de IGF1 tanto en el músculo como en el hígado, y este aumento aumentó después de 15 días de realimentación, pero después de 30 días de realimentación

esta empezó a disminuir (Ahmad Dar *et al.*, 2018, p. 83). En *Cyrtocara moori*, los niveles de expresión de IGF1 e IGF2 no mostraron cambios significativos durante la realimentación después del ayuno, excepto por un aumento en la expresión de IGF2 muscular después de tres semanas (Delgadin *et al.*, 2018, p. 7).

Los resultados obtenidos en relación a la expresión de los genes IGF1 e IGF2 en *A. gigas* indican que estos genes están regulados diferencialmente. Además, se ha observado que la síntesis y liberación de los factores de crecimiento IGF en el hígado y en el músculo se produce de forma diferente en condiciones de restricción alimentaria. Estos resultados sugieren la existencia de mecanismos de control específicos que modulan la expresión y actividad de los genes IGF1 e IGF2 en diferentes tejidos en respuesta a la disponibilidad de alimento. La regulación diferencial de estos genes y la respuesta diferencial en la síntesis y liberación de IGF en hígado y músculo desempeñan un papel fundamental en la adaptación y la optimización de la utilización de los recursos energéticos de *A. gigas* períodos de ayuno.

7. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en la presente investigación, permitieron concluir en:

- Los efectos ocasionados por el ayuno en los parámetros examinados en los juveniles de *A. gigas* durante dos semanas, son reversibles al momento de la realimentación, lo que sugiere su viabilidad para su implementación en la acuicultura.
- Dos semanas de ayuno, modificaron las características histológicas y morfológicas del hígado e intestino de *A. gigas*.
- Tres semanas de realimentación se demostraron suficientes para lograr una recuperación progresiva y completa de los cambios generados en el hígado e intestino por el ayuno en *A. gigas*.
- La reducción del tamaño de los hepatocitos durante el ayuno y su rápida recuperación en la realimentación fue el atributo más conspicuo observado en el hígado de *A. gigas*.
- La disminución del diámetro intestinal durante el período de ayuno, seguida de una pronta recuperación durante la fase de realimentación, constituyeron las diferencias más prominentes observadas en el intestino de *A. gigas*.
- El ayuno y la realimentación afectaron diferencialmente la expresión génica de IGF1, IGF2, GHR1 y GHR2 tanto a nivel hepático como muscular de *A. gigas*.
- A diferencia de lo observado en otras especies, IGF1 hepático es sobre expresado durante el ayuno en *A. gigas*.
- La expresión del receptor tipo 1 para GH muestra un perfil muy marcado: disminuye abruptamente en el ayuno, aumenta pronunciadamente durante los tres primeros días de la realimentación y se reestablecer a valores control a las dos semanas de realimentación en *A. gigas*.
- El patrón de cambio en el IHS y en el área de los hepatocitos sigue al perfil de expresión de GHR2 durante el ayuno y la realimentación en *A. gigas*.

8. RECOMENDACIONES

- ❖ Encontrar un mayor rango de tiempo para las condiciones de ayuno y realimentación para corroborar el punto crítico de recuperación de los parámetros morfológicos obtenidos en este estudio.

- ❖ Realizar un análisis de expresión de genes mediante RT-qPCR para validar la expresión diferencial de IGF1, IGF2, GHR1 y GHR2 en la respuesta durante condiciones de ayuno y realimentación.

- ❖ Realizar posteriores estudios sobre la expresión de muchos más genes involucrados en el crecimiento y factores que influyan en este proceso

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahmad Dar, S., Srivastava, P. P., Varghese, T., Irfan Rasool, S., Anand, G., Gupta, S., Gireesh-Babu, P., & Krishna, G. (2018). Regulation of compensatory growth by molecular mechanism in *Labeo rohita* juveniles under different feeding regimes. *General and Comparative Endocrinology*, 261, 89-96. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2018.01.029>
- Alexa, A., Rahnenführer, J., & Lengauer, T. (2006). Improved scoring of functional groups from gene expression data by decorrelating GO graph structure. *Bioinformatics*, 22(13), 1600-1607. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btl140>
- Ali, M., Nicieza, A., & Wootton, R. J. (2003). Compensatory growth in fishes: A response to growth depression. *Fish and Fisheries*, 4(2), 147-190. <https://doi.org/10.1046/j.1467-2979.2003.00120.x>
- Al-Niaeem, K. S., Al-Hamadany, Q. H., & Al-Tameemi, R. A. (2010). Histopathological changes in the intestine, liver and pancreas of the common carp, *Cyprinus carpio*, during starvation. *Proc. 6th Int. Con. Biol. Sci. Zool*, 6, 1-6.
- Alvan, M. A., Chu-Koo, F. W., Baluarte Monge, G. C., Collado Panduro, L. Á., & Velarde Ríos, D. A. (2017). Análisis de las estadísticas de producción de carne y semilla de paiche *Arapaima gigas* en Loreto y Ucayali (Perú). *Folia Amazónica*, 25(2), 183. <https://doi.org/10.24841/fa.v25i2.404>
- Andrews, S. (2010). FastQC: A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data. *ONLINE*. <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>
- Arantes, C. C., Castello, L., Cetra, M., & Schilling, A. (2013). Environmental influences on the distribution of arapaima in Amazon floodplains. *Environmental Biology of Fishes*, 96(10-11), 1257-1267. <https://doi.org/10.1007/s10641-011-9917-9>

- Arantes, C. C., Castello, L., Stewart, D. J., Cetra, M., & Queiroz, H. L. (2010). Population density, growth and reproduction of arapaima in an Amazonian river-floodplain. *Ecology of Freshwater Fish*, 19(3), 455-465. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0633.2010.00431.x>
- Aziza, A., Awadin, W., Zahran, E., & Mohamed, T. (2015). Effect of starvation and refeeding diets containing different protein levels on compensatory growth and histopathological changes of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Egyptian Journal of Nutrition and Feeds*, 18(2), 331-341. <https://doi.org/10.21608/ejnf.2015.105822>
- Baratta, J. L., Ngo, A., Lopez, B., Kasabwalla, N., Longmuir, K. J., & Robertson, R. T. (2009). Cellular organization of normal mouse liver: A histological, quantitative immunocytochemical, and fine structural analysis. *Histochemistry and Cell Biology*, 131(6), 713-726. <https://doi.org/10.1007/s00418-009-0577-1>
- Beckman, B. R. (2011). Perspectives on concordant and discordant relations between insulin-like growth factor 1 (IGF1) and growth in fishes. *General and Comparative Endocrinology*, 170(2), 233-252. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2010.08.009>
- Benedito-Palos, L., Saera-Vila, A., Caldúch-Giner, J.-A., Kaushik, S., & Pérez-Sánchez, J. (2007). Combined replacement of fish meal and oil in practical diets for fast growing juveniles of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.): Networking of systemic and local components of GH/IGF axis. *Aquaculture*, 267(1-4), 199-212. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.01.011>
- Bergleiter, S. (2002). Arapaima (*Arapaima gigas*) Aquaculture in the Iquitos Región. *Mission Report – SIPPO*.
- Bočina, I., Šantić, Ž., Restović, I., & Topić, S. (2017). Histology of the digestive system of the garfish *Belone belone* (Teleostei: Belonidae). *The European Zoological Journal*, 84(1), 89-95. <https://doi.org/10.1080/11250003.2016.1276977>

- Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15), 2114-2120. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>
- Brooks, A. J., Dai, W., O'Mara, M. L., Abankwa, D., Chhabra, Y., Pelekanos, R. A., Gardon, O., Tunny, K. A., Blucher, K. M., Morton, C. J., Parker, M. W., Sierrecki, E., Gambin, Y., Gomez, G. A., Alexandrov, K., Wilson, I. A., Doxastakis, M., Mark, A. E., & Waters, M. J. (2014). Mechanism of Activation of Protein Kinase JAK2 by the Growth Hormone Receptor. *Science*, 344(6185), 1249783. <https://doi.org/10.1126/science.1249783>
- Caballero, M. J., Izquierdo, M. S., Kjørsvik, E., Montero, D., Socorro, J., Fernández, A. J., & Rosenlund, G. (2003). Morphological aspects of intestinal cells from gilthead seabream (*Sparus aurata*) fed diets containing different lipid sources. *Aquaculture*, 225(1-4), 325-340. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00299-0](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00299-0)
- Campos Baca, L. (2001). Historia biológica del paiche o pirarucu (*Arapaima gigas*, cuvier) y bases para su cultivo en la Amazonía, Iquitos-Perú. *Instituto de Investigaciones de la Amazonia Peruana Programa de Biodiversidad*, 1-27. <https://hdl.handle.net/20.500.12921/184>
- Cánepa, M. M., Zhu, Y., Fossati, M., Stiller, J. W., & Vissio, P. G. (2012). Cloning, phylogenetic analysis and expression of somatolactin and its receptor in *Cichlasoma dimerus*: Their role in long-term background color acclimation. *General and Comparative Endocrinology*, 176(1), 52-61. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2011.12.023>
- Canosa, L. F., Chang, J. P., & Peter, R. E. (2007). Neuroendocrine control of growth hormone in fish. *General and Comparative Endocrinology*, 151(1), 1-26. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2006.12.010>

- Cao, H., Krueger, E. W., & McNiven, M. A. (2011). Hepatocytes internalize trophic receptors at large endocytic “Hot Spots”. *Hepatology*, 54(5), 1819-1829. <https://doi.org/10.1002/hep.24572>
- Carotti, S., Morini, S., Carpino, G., & Gaudio, E. (2020). Liver Histology. *Department of Medicine and Surgery, University Campus Bio-Medico of Rome, Rome, Italy*, 17-28. https://doi.org/10.1007/978-3-030-24432-3_2
- Castello, L., Chaves Arantes, C., Gibbs Mcgrath, D., Stewart, D. J., & De Sousa, F. S. (2015). Understanding fishing-induced extinctions in the Amazon. *Aquatic Consevation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 25(5), 587-598. <https://doi.org/10.1002/aqc.2491>
- Castro, J. J., & Ordinola, A. (2021). La estrategia de ayuno y realimentación, una alternativa viable para optimizar el consumo de alimento balanceado en el cultivo semi-intensivo de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 32(5), e19546. <https://doi.org/10.15381/rivep.v32i5.19546>
- Cavole, L. M., Arantes, C. C., & Castello, L. (2015). How illegal are tropical small-scale fisheries? An estimate for arapaima in the Amazon. *Fisheries Research*, 168, 1-5. <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2015.03.012>
- Cerdá, J. M., & Canosa, L. F. (2009). Chapter 1 Neuroendocrine Systems of the Fish Brain. En *Fish Physiology* (Vol. 28, pp. 3-74). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S1546-5098\(09\)28001-0](https://doi.org/10.1016/S1546-5098(09)28001-0)
- Chang, J. P., & Wong, A. O. (2009). Growth hormone regulation in fish: A multifactorial model with hypothalamic, peripheral and local autocrine/paracrine signals. *Fish neuroendocrinology*. 1st ed, Vol. 28, 151-195. [https://doi.org/10.1016/S1546-5098\(09\)28004-6](https://doi.org/10.1016/S1546-5098(09)28004-6)

- Chauvigné, F., Gabillard, J. C., Weil, C., & Rescan, P. Y. (2003). Effect of refeeding on IGF1, IGFII, IGF receptors, FGF2, FGF6, and myostatin mRNA expression in rainbow trout myotomal muscle. *General and Comparative Endocrinology*, 132(2), 209-215. [https://doi.org/10.1016/S0016-6480\(03\)00081-9](https://doi.org/10.1016/S0016-6480(03)00081-9)
- Chen, M., Huang, X., Yuen, D. S. H., & Cheng, C. H. K. (2011). A study on the functional interaction between the GH/PRL family of polypeptides with their receptors in zebrafish: Evidence against GHR1 being the receptor for somatolactin. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 337(1-2), 114-121. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.02.006>
- Chu Koo, F., Fernández Mendez, C., Rebaza Alfaro, C., Darías, M. J., García Dávila, C., García Vásquez, A., Tello Martín, S., Campos Baca, L., Alvan Aguilar, M., Ayarza Rengifo, J., Arévalo Llerena, L., Renno, J. F., & Arbildo, H. (2017). El cultivo del paiche biología, procesos productivos, tecnologías y estadísticas. *Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana*, 1, 1-110.
- Chu-Koo, F., Dugué, R., Alván Aguilar, M., Casanova Daza, A., Alcántara Bocanegra, F., Chávez Veintemilla, C., Duponchelle, F., Renno, J. F., Salvador Tello, & Nuñez, J. (2009). Gender determination in the Paiche or Pirarucu (*Arapaima gigas*) using plasma vitellogenin, 17 β -estradiol, and 11-ketotestosterone levels. *Fish Physiol Biochem*, 35, 125-136. <https://doi.org/10.1007/s10695-008-9211-8>
- Coimbra, A. M., Figueiredo-Fernandes, A., & Reis-Henriques, M. A. (2007). Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), liver morphology, CYP1A activity and thyroid hormones after Endosulfan dietary exposure. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 89(3), 230-236. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2007.07.001>

- Cook, J. T., Sutterlin, A. M., & McNiven, M. A. (2000). Effect of food deprivation on oxygen consumption and body composition of growth-enhanced transgenic Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 188(1-2), 47-63.
- Czaja, M. J. (2011). Functions of Autophagy in Hepatic and Pancreatic Physiology and Disease. *Gastroenterology*, 140(7), 1895-1908.
<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.04.038>
- Dantas Filho, J. V., Freitas, C. D. O., & Cavali, J. (2021). Viabilidade econômica e aspectos produtivos de peixes nativos da Amazônia (1.^a ed.). Brazilian Journals Editora.
<https://doi.org/10.35587/brj.ed.0000886>
- Das, S., & Mykles, D. L. (2016). A Comparison of Resources for the Annotation of a *De Novo* Assembled Transcriptome in the Molting Gland (Y-Organ) of the Blackback Land Crab, *Gecarcinus lateralis*. *Integrative and Comparative Biology*, 56(6), 1103-1112. <https://doi.org/10.1093/icb/icw107>
- Day, R. D., Tibbetts, I. R., & Secor, S. M. (2014). Physiological responses to short-term fasting among herbivorous, omnivorous, and carnivorous fishes. *Journal of Comparative Physiology B*, 184(4), 497-512. <https://doi.org/10.1007/s00360-014-0813-4>
- Daza, D., & Larhammar, D. (2018). Evolution of the receptors for growth hormone, prolactin, erythropoietin and thrombopoietin in relation to the vertebrate tetraploidizations. *General and Comparative Endocrinology*, 257, 143-160.
<https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2017.06.021>
- De Ruiter, A. J. H., Hoogeveen, Y. L., & Wendelaar Bonga, S. E. (1985). Ultrastructure of intestinal and gall-bladder epithelium in the teleost *Gasterosteus aculeatus* L. , as related to their osmoregulatory function. *Cell and Tissue Research*, 240(1), 191-198.
<https://doi.org/10.1007/BF00217574>

- Del Carpio, O. (2020). Estudio de prospectiva: La cadena de valor del paiche. *Programa Nacional de Innovación en Pesca y Acuicultura*, 1-174.
- Delgadin, T. H. (2016). Respuesta del eje hormona de crecimiento (GH)/factor de crecimiento tipo insulina-I (IGF-I) a alteraciones en la ingesta en el pez cíclido *Cichlasoma dimerus*. (Doctoral dissertation, Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales).
http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n5962_Delgadin
- Delgadin, T. H., Castañeda-Cortés, D. C., Sacks, C., Breccia, A., Fernandino, J. I., & Vissio, P. G. (2020). Morphological colour adaptation during development: Involvement of Growth Hormone Receptor 1. *Developmental Biology*.
<https://doi.org/10.1101/2020.06.01.128538>
- Delgadin, T. H., Simó, I., Pérez Sirkin, D. I., Di Yorio, M. P., Arranz, S. E., & Vissio, P. G. (2018). *Cichlasoma dimerus* responds to refeeding with a partial compensatory growth associated with an increment of the feed conversion efficiency and a rapid recovery of GH/IGFs axis. *Aquaculture Nutrition*, 24(4), 1-10.
<https://doi.org/10.1111/anu.12661>
- Delgado, G. G. (2019). Oportunidad de inversión en la producción de cuero a partir de piel de Paiche con fines de exportación, en la Región Ucayali 2018. *Universidad Nacional de Ucayali*, 1-92.
- Deng, L., Zhang, W. M., Lin, H. R., & Cheng, C. H. K. (2004). Effects of food deprivation on expression of growth hormone receptor and proximate composition in liver of black seabream *Acanthopagrus schlegeli*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 137(4), 421-432.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2004.01.008>

- Ding, B.-S., Nolan, D. J., Butler, J. M., James, D., Babazadeh, A. O., Rosenwaks, Z., Mittal, V., Kobayashi, H., Shido, K., Lyden, D., Sato, T. N., Rabbany, S. Y., & Rafii, S. (2010). Inductive angiocrine signals from sinusoidal endothelium are required for liver regeneration. *Nature*, *468*(7321), 310-315. <https://doi.org/10.1038/nature09493>
- Dópido, R., Rodríguez, C., Gómez, T., Acosta, N. G., & Díaz, M. (2004). Isolation and characterization of enterocytes along the intestinal tract of the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, *139*(1), 21-31. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2004.06.013>
- Du, K., Wuertz, S., Adolphi, M., Kneitz, S., Stöck, M., Oliveira, M., Nóbrega, R., Ormanns, J., Kloas, W., Feron, R., Klopp, C., Parrinello, H., Journot, L., He, S., Postlethwait, J., Meyer, A., Guiguen, Y., & Scharl, M. (2019). The genome of the arapaima (*Arapaima gigas*) provides insights into gigantism, fast growth and chromosomal sex determination system. *Scientific Reports*, *9*(1), 5293. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41457-x>
- Duan, C. (1998). Nutritional and Developmental Regulation of Insulin-like Growth Factors in Fish. *The Journal of Nutrition*, *128*(2), 306S-314S. <https://doi.org/10.1093/jn/128.2.306S>
- Duan, C., Ren, H., & Gao, S. (2010). Insulin-like growth factors (IGFs), IGF receptors, and IGF-binding proteins: Roles in skeletal muscle growth and differentiation. *General and Comparative Endocrinology*, *167*(3), 344-351. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2010.04.009>
- Elbially, Z. I., Gamal, S., Al-Hawary, I. I., Shukry, M., Salah, A. S., Aboshosha, A. A., & Assar, D. H. (2022). Exploring the impacts of different fasting and refeeding regimes on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): Growth performance, histopathological

- study, and expression levels of some muscle growth-related genes. *Fish Physiology and Biochemistry*, 48(4), 973-989. <https://doi.org/10.1007/s10695-022-01094-0>
- Ellens, E. R., Kittilson, J. D., Hall, J. A., Sower, S. A., & Sheridan, M. A. (2013). Evolutionary origin and divergence of the growth hormone receptor family: Insight from studies on sea lamprey. *General and Comparative Endocrinology*, 192, 222-236. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2013.05.008>
- Ersoy, B., Ozbilgin, K., Kasirga, E., Inan, S., Coskun, S., & Tuglu, I. (2009). Effect of growth hormone on small intestinal homeostasis relation to cellular mediators IGF-I and IGFBP-3. *World Journal of Gastroenterology*, 15(43), 5418-5424. <https://doi.org/10.3748/wjg.15.5418>
- Escalante R., M., E. (2019). Mecanismos moleculares involucrados en el crecimiento muscular del pargo flamenco *Lutjanus guttatus*. *Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C.*, 1-105. <http://ciad.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1006/1185>
- Evans, D. H., & Claiborne, J. B. (2005). *The Physiology of Fishes*. CRC Press.
- Ewels, P., Magnusson, M., Lundin, S., & Källér, M. (2016). MultiQC: Summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. *Bioinformatics*, 32(19), 3047-3048. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw354>
- Falk-Petersen, I. B., & Hansen, T. K. (2001). Organ differentiation in newly hatched common wolffish. *Journal of Fish Biology*, 59(6), 1465-1482. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2001.tb00212.x>
- FAO. (2012). El estado mundial de la pesca y la acuicultura: 2012.
- Farias, I. P., Willis, S., Leão, A., Verba, J. T., Crossa, M., Foresti, F., Porto-Foresti, F., Sampaio, I., & Hrbek, T. (2019). The largest fish in the world's biggest river: Genetic connectivity and conservation of *Arapaima gigas* in the Amazon and Araguaia-

- Tocantins drainages. *PLOS ONE*, 14(8), e0220882.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220882>
- Favero, G., Gimbo, R. Y., Montoya, L. N. F., Carneiro, D. J., & Urbinati, E. C. (2020). A fasting period during grow-out make juvenile pacu (*Piaractus mesopotamicus*) leaner but does not impair growth. *Aquaculture*, 524, 1-7.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735242>
- Fogaça, F. H. D. S., Oliveira, E. G. D., Carvalho, S. E. Q., & Santos, J. F. D. S. (2011). Yield and composition of pirarucu fillet in different weight classes. *Acta Scientiarum. Animal Sciences*, 33(1), 95-99. <https://doi.org/10.4025/actascianimsci.v33i1.10843>
- Fox, B. K., Breves, J. P., Davis, L. K., Pierce, A. L., Hirano, T., & Grau, E. G. (2010). Tissue-specific regulation of the growth hormone/insulin-like growth factor axis during fasting and re-feeding: Importance of muscle expression of IGF-I and IGF-II mRNA in the tilapia. *General and Comparative Endocrinology*, 166(3), 573-580.
<https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2009.11.012>
- Franz, A.-C., Faass, O., Köllner, B., Shved, N., Link, K., Casanova, A., Wenger, M., D'Cotta, H., Baroiller, J.-F., Ullrich, O., Reinecke, M., & Eppler, E. (2016). Endocrine and Local IGF-I in the Bony Fish Immune System. *Biology*, 5(1), 9.
<https://doi.org/10.3390/biology5010009>
- Friedman, S. L. (2008). Hepatic Stellate Cells: Protean, Multifunctional, and Enigmatic Cells of the Liver. *Physiological Reviews*, 88(1), 125-172.
<https://doi.org/10.1152/physrev.00013.2007>
- Frost, R. A., Nystrom, G. J., & Lang, C. H. (2002). Regulation of IGF-I mRNA and Signal Transducers and Activators of Transcription-3 and -5 (Stat-3 and -5) by GH in C2C12 Myoblasts. *Endocrinology*, 143(2), 492-503.
<https://doi.org/10.1210/endo.143.2.8641>

- Fuentes, E. N., Björnsson, B. T., Valdés, J. A., Einarsdottir, I. E., Lorca, B., Alvarez, M., & Molina, A. (2011). IGF-I/PI3K/Akt and IGF-I/MAPK/ERK pathways in vivo in skeletal muscle are regulated by nutrition and contribute to somatic growth in the fine flounder. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 300(6), 1532-1542. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00535.2010>
- Fuentes, E. N., Einarsdottir, I. E., Valdes, J. A., Alvarez, M., Molina, A., & Björnsson, B. T. (2012). Inherent Growth Hormone Resistance in the Skeletal Muscle of the Fine Flounder Is Modulated by Nutritional Status and Is Characterized by High Contents of Truncated GHR, Impairment in the JAK2/STAT5 Signaling Pathway, and Low IGF-I Expression. *Endocrinology*, 153(1), 283-294. <https://doi.org/10.1210/en.2011-1313>
- Fukada, H., Ozaki, Y., Pierce, A. L., Adachi, S., Yamauchi, K., Hara, A., Swanson, P., & Dickhoff, W. W. (2004). Salmon growth hormone receptor: Molecular cloning, ligand specificity, and response to fasting. *General and Comparative Endocrinology*, 139(1), 61-71. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2004.07.001>
- Fukada, H., Ozaki, Y., Pierce, A. L., Adachi, S., Yamauchi, K., Hara, A., Swanson, P., & Dickhoff, W. W. (2005). Identification of the Salmon Somatolactin Receptor, a New Member of the Cytokine Receptor Family. *Endocrinology*, 146(5), 2354-2361. <https://doi.org/10.1210/en.2004-1578>
- Fukamachi, S., & Meyer, A. (2007). Evolution of Receptors for Growth Hormone and Somatolactin in Fish and Land Vertebrates: Lessons from the Lungfish and Sturgeon Orthologues. *Journal of Molecular Evolution*, 65(4), 359-372. <https://doi.org/10.1007/s00239-007-9035-7>

- Funkenstein, B., Almuly, R., & Chan, S. J. (1997). Localization of IGF-I and IGF-I Receptor mRNA in *Sparus aurata* Larvae. *General and Comparative Endocrinology*, 107(3), 291-303. <https://doi.org/10.1006/gcen.1997.6935>
- Gabillard, J.-C., Yao, K., Vandeputte, M., Gutierrez, J., & Le Bail, P.-Y. (2006). Differential expression of two GH receptor mRNAs following temperature change in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Endocrinology*, 190(1), 29-37. <https://doi.org/10.1677/joe.1.06695>
- Gao, Y., Jin, Q., Gao, C., Chen, Y., Sun, Z., Guo, G., & Peng, J. (2022). Unraveling Differential Transcriptomes and Cell Types in Zebrafish Larvae Intestine and Liver. *Cells*, 11(20), 3290. <https://doi.org/10.3390/cells11203290>
- García, A. C., & Sugaya, J. C. (2015). Analisis de viabilidad de la comercialización de paiches (*Arapaima gigas*) del «Fundo Furia» carretera Iquitos—Nauta, San Juan Bautista—2014. *Universidad Científica del Perú*, 1-55.
- García, M. (2022). Evaluación del proceso de ayuno y realimentación en la seriola (*Seriola dumerili*). *Universidad de Cádiz*, 1-37. <http://hdl.handle.net/10498/28441>
- García, M. P., Lozano, M. T., Elbal, M. T., & Agulleiro, B. (2001). Development of the digestive tract of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). Light and electron microscopic studies. *Anatomy and Embryology*, 204(1), 39-57. <https://doi.org/10.1007/s004290100173>
- Genten, F., Terwinghe, E., & Danguy, A. (2009). Digestive system. Atlas of fish histology. 1st ed., 1. 75-76. <https://www.taylorfrancis.com/books/mono/10.1201/9780367803599/atlas-fish-histology-andr%C3%A9-danguy-franck-genten-eddy-terwinghe>
- Giorgini, E., Randazzo, B., Gioacchini, G., Cardinaletti, G., Vaccari, L., Tibaldi, E., & Olivotto, I. (2018). New insights on the macromolecular building of rainbow trout

- (*O. mykiss*) intestine: FTIR Imaging and histological correlative study. *Aquaculture*, 497, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.07.032>
- Gomez, E., Klapproth, K., Schulz, C., Busch, K., Azzoni, E., Crozet, L., Garner, H., Trouillet, C., De Bruijn, M. F., Geissmann, F., & Rodewald, H.-R. (2015). Tissue-resident macrophages originate from yolk-sac-derived erythro-myeloid progenitors. *Nature*, 518(7540), 547-551. <https://doi.org/10.1038/nature13989>
- Gómez, J., Vásquez-Gamboa, L., & Valencia, D. (2016). The effect of different feeding and starvation frequencies on growth utilization and nutrients, for *Piaractus brachypomus* (Cuvier, 1818). *Latin American Journal of Aquatic Research*, 44(3), 569-575. <https://doi.org/10.3856/vol44-issue3-fulltext-15>
- Govoni, J. J., Boehlert, G. W., & Watanabe, Y. (1986). The physiology of digestion in fish larvae. *Env. Biol. Fish.*, 16, 59-77.
- Guderley, H., Lapointe, D., Bédard, M., & Dutil, J.-D. (2003). Metabolic priorities during starvation: Enzyme sparing in liver and white muscle of Atlantic cod, *Gadus morhua* L. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 135(2), 347-356. [https://doi.org/10.1016/S1095-6433\(03\)00089-8](https://doi.org/10.1016/S1095-6433(03)00089-8)
- Guerra, H., Alcántara, F., Padilla, P., Tella, S., Ismiño, R., Rebaza, C., Deza, S., Ascon, G., Iberico, J., Montreuil, V., & Limachi, L. (2002). Manual de producción y manejo de alevinos de paiche; Instituto De Investigaciones De La Amazonia Peruana. IIAP 20 años. *EdiT. Pueblo Libre*, 1-98.
- Haas, B. J., Papanicolaou, A., Yassour, M., Grabherr, M., Blood, P. D., Bowden, J., Couger, M. B., Eccles, D., Li, B., Lieber, M., MacManes, M. D., Ott, M., Orvis, J., Pochet, N., Strozzi, F., Weeks, N., Westerman, R., William, T., Dewey, C. N., ... Regev, A. (2013). De novo transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity

- platform for reference generation and analysis. *Nature Protocols*, 8(8), 1494-1512.
<https://doi.org/10.1038/nprot.2013.084>
- Heide, A., Foss, A., Stefansson, S. O., Mayer, I., Norberg, B., Roth, B., Jenssen, M. D., Nortvedt, R., & Imsland, A. K. (2006). Compensatory growth and fillet crude composition in juvenile Atlantic halibut: Effects of short term starvation periods and subsequent feeding. *Aquaculture*, 261(1), 109-117.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.06.050>
- Hellberg, H., & Bjerkås, I. (2000). The Anatomy of the Oesophagus, Stomach and Intestine in Common Wolffish (*Anarhichas lupus* L.): A Basis for Diagnostic Work and Research. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 41(3), 283-297.
<https://doi.org/10.1186/BF03549637>
- Hipolito, M., Martins, A. M., C. R., P. F., & Bach. (2004). Aspectos bioquímicos em fígado de rãs-touro (*Rana catesbeiana shaw*, 1802) sadias e doentes. *Arq. Inst. Biol., Sao Paulo*, 71(2), 147-153.
- Holmgren, S., & Olsson, C. (2009). Chapter 10 The Neuronal and Endocrine Regulation of Gut Function. En *Fish Physiology* (Vol. 28, pp. 467-512). Elsevier.
[https://doi.org/10.1016/S1546-5098\(09\)28010-1](https://doi.org/10.1016/S1546-5098(09)28010-1)
- Honorato, C. A., Cruz, C. D., Carneiro, D. J., & Machado, M. R. F. (2011). Histologia e histoquímica do intestino anterior de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentadas com dietas contendo silagem de peixe. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 48(4), 281-288. <https://doi.org/10.11606/S1413-95962011000400002>
- Huanca, Y. E. (2020). Efecto de la restricción alimentaria intermitente en el crecimiento de juveniles de la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*).
<http://repositorio.unsa.edu.pe/handle/UNSA/11044>

- Hurtado Alvarado, J. (2009). Descripción anatómica e histológica del sistema digestivo de juveniles de paiche (*Arapaima gigas* cuvier, 1829) criados en jaulas y sometidos a dos tipos de alimentación, en tingo maría. Universidad Nacional Agraria de la Selva.
- Hussein, M. M., Sayed, R. K. A., & Mokhtar, D. M. (2023). Structural and immunohistochemical analysis of the cellular compositions of the liver of molly fish (*Poecilia sphenops*), focusing on its immune role. *Zoological Letters*, 9(1), 1. <https://doi.org/10.1186/s40851-022-00200-7>
- Imbiriba, E. P. (2001). Potencial de criação de pirarucu, *Arapaima gigas*, em cativeiro. *Acta Amazonica*, 31(2), 299-316. <https://doi.org/10.1590/1809-43922001312316>
- Iwamatsu, T. (2004). Stages of normal development in the medaka *Oryzias latipes*. *Mechanisms of Development*, 121(7-8), 605-618. <https://doi.org/10.1016/j.mod.2004.03.012>
- JASP Team. (2024). *JASP (Version 0.18.2) for Windows*. <https://jasp-stats.org/>
- Jiao, B., Huang, X., Chan, C. B., Zhang, L., Wang, D., & Cheng, C. H. K. (2006). The co-existence of two growth hormone receptors in teleost fish and their differential signal transduction, tissue distribution and hormonal regulation of expression in seabream. *Journal of Molecular Endocrinology*, 36(1), 23-40. <https://doi.org/10.1677/jme.1.01945>
- Karasov, W. H., Pinshow, B., Starck, J. M., & Afik, D. (2004). Anatomical and Histological Changes in the Alimentary Tract of Migrating Blackcaps (*Sylvia atricapilla*): A Comparison among Fed, Fasted, Food-Restricted, and Refed Birds. *Physiological and Biochemical Zoology*, 77(1), 149-160. <https://doi.org/10.1086/381465>
- Karatas, T. (2018). Effect of Short-Term Starvation on Serum Metabolites, Antioxidant Enzymes and Endogenous Reserves of Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*.

Pakistan Journal of Zoology, 50(5), 1723-1729.

<https://doi.org/10.17582/journal.pjz/2018.50.5.1723.1729>

Karatas, T., Onalan, S., & Yildirim, S. (2021). Effects of prolonged fasting on levels of metabolites, oxidative stress, immune-related gene expression, histopathology, and DNA damage in the liver and muscle tissues of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 47(4), 1119-1132. <https://doi.org/10.1007/s10695-021-00949-2>

Karlmark, K. R., Weiskirchen, R., Zimmermann, H. W., Gassler, N., Ginhoux, F., Weber, C., Merad, M., Luedde, T., Trautwein, C., & Tacke, F. (2009). Hepatic recruitment of the inflammatory Gr1⁺ monocyte subset upon liver injury promotes hepatic fibrosis. *Hepatology*, 50(1), 261-274. <https://doi.org/10.1002/hep.22950>

Kobayashi, D., Jindo, T., Naruse, K., & Takeda, H. (2006). Development of the endoderm and gut in medaka, *Oryzias latipes*. *Development, Growth & Differentiation*, 48(5), 283-295. <https://doi.org/10.1111/j.1440-169X.2006.00870.x>

Krogdahl, Å., & Marie Bakke-McKellep, A. (2005). Fasting and refeeding cause rapid changes in intestinal tissue mass and digestive enzyme capacities of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 141(4), 450-460. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2005.06.002>

Langille, R. M., & Youson, J. H. (1984). Morphology of the intestine of prefeeding and feeding adult lampreys, *Petromyzon marinus* (L): The mucosa of the posterior intestine and hindgut. *Journal of Morphology*, 182(2), 137-152. <https://doi.org/10.1002/jmor.1051820203>

Lavajoo, F., Perelló-Amorós, M., Vélez, E. J., Sánchez-Moya, A., Balbuena-Pecino, S., Riera-Heredia, N., Fernández-Borràs, J., Blasco, J., Navarro, I., Capilla, E., & Gutiérrez, J. (2020). Regulatory mechanisms involved in muscle and bone

- remodeling during refeeding in gilthead sea bream. *Scientific Reports*, 10(1), 184.
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-57013-6>
- Lee, J.-H., Kim, S., Han, S., Min, J., Caldwell, B., Bamford, A.-D., Rocha, A. S. B., Park, J., Lee, S., Wu, S.-H. S., Lee, H., Fink, J., Pilat-Carotta, S., Kim, J., Josserand, M., Szep-Bakonyi, R., An, Y., Ju, Y. S., Philpott, A., ... Kim, J. K. (2022). p57Kip2 imposes the reserve stem cell state of gastric chief cells. *Cell Stem Cell*, 29(5), 826-839.e9. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2022.04.001>
- Lemus, M. R., Chávez, R. M., Medina, A. D., Nevares, P. B., Gutiérrez, G. C., Cafaggi, D., & Yépez, S. C. (2017). El hepatocito como un ejemplo de la interacción entre la biología celular y las rutas metabólicas. *Revista de la Facultad de Medicina (México)*, 60(2), 52-58. <https://doi.org/biblio-896854>
- Liu, K., & Czaja, M. J. (2013). Regulation of lipid stores and metabolism by lipophagy. *Cell Death & Differentiation*, 20(1), 3-11. <https://doi.org/10.1038/cdd.2012.63>
- Liu, X., Hegab, I. M. M., Su, J., Du, X., Fan, X., Zhang, Q., Gao, Y., & Wang, H. (2018). Effects of different durations of fasting/re-feeding bouts on growth, biochemical and histological changes in the digestive tract of Gansu golden trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Czech Journal of Animal Science*, 63(10), 389-398.
<https://doi.org/10.17221/107/2017-CJAS>
- López, J., Garrido, N., Núñez, H., & Vilaxa-Olcay, A. (2020). Descripción Morfológica e Histológica del Tejido Hepático de *Gambusia holbrooki* (Pisces: Poeciliidae) que Habita en la Provincia de Arica—Chile. *International Journal of Morphology*, 38(3), 645-649. <https://doi.org/10.4067/S0717-95022020000300645>
- Lu, D., Ma, Q., Wang, J., Li, L., Han, S., Limbu, S. M., Li, D., Chen, L., Zhang, M., & Du, Z. (2019). Fasting enhances cold resistance in fish through stimulating lipid

- catabolism and autophagy. *The Journal of Physiology*, 597(6), 1585-1603.
<https://doi.org/10.1113/JP277091>
- Lu, X., Gu, Y., Hou, X., Wang, H., Wang, P., Xu, P., Zeng, L., Zhou, L., & Li, G. (2016). Molecular characterization, tissue distribution, and expression regulation from fasting and re-feeding of two growth hormone receptors in mandarin fish *Siniperca chuatsi*. *Fisheries Science*, 82(1), 155-169. <https://doi.org/10.1007/s12562-015-0941-0>
- Luzania, R. (2012). The effects of fasting and re-feeding on growth and glucose metabolism and the neuroendocrine control of appetite in the tilapia, *Oreochromis mossambicus*. (*Doctoral Dissertation, California State University, Fresno*).
- Mahony, C. B., Fish, R. J., Pasche, C., & Bertrand, J. Y. (2016). Tfec controls the hematopoietic stem cell vascular niche during zebrafish embryogenesis. *Blood*, 128(10), 1336-1345. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-04-710137>
- Manera, M., & Dezfuli, B. S. (2004). Rodlet cells in teleosts: A new insight into their nature and functions. *Journal of Fish Biology*, 65(3), 597-619.
<https://doi.org/10.1111/j.0022-1112.2004.00511.x>
- Mariano, W. S., Oliveira-Lima, J., Santuci, M. A., Lima, L. B. D., Moron, S. E., & Tavares-Dias, M. (2021). Can a biopesticide based on *Bacillus thuringiensis* affect the physiology and histomorphology of *Arapaima gigas*? *Anais Da Academia Brasileira de Ciências*, 93(suppl 4), e20201715. <https://doi.org/10.1590/0001-3765202120201715>
- McMillan, D. B., & Harris, R. J. (2017). *An atlas of comparative vertebrate histology: Diagnostic and translational research guide*. Academic press, an imprint of Elsevier.
- Miandare, H. K., Farahmand, H., Akbarzadeh, A., Ramezanpour, S., Kaiya, H., Miyazato, M., Rytönen, K. T., & Nikinmaa, M. (2013). Developmental transcription of genes

- putatively associated with growth in two sturgeon species of different growth rate. *General and Comparative Endocrinology*, 182, 41-47. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2012.11.013>
- Miranda Chumacero, G., Terrazas, A., & Wallace, R. (2011). Importancia económica de la ictiofauna para comunidades indígenas Takanas del río Beni. Los peces de la Amazonía boliviana. Hábitats, potencialidades y amenazas. *Edit. INIA*, 235-246.
- Montezor, L. H., & Urbinati, E. C. (2017). Feed restriction and insulin-like growth factor-I (IGF-I) affect the oocyte maturation in matrinxã *Brycon amazonicus*. *Zygote*, 25(1), 56-64. <https://doi.org/10.1017/S0967199416000344>
- Montserrat, N., Gómez-Requeni, P., Bellini, G., Capilla, E., Pérez-Sánchez, J., Navarro, I., & Gutiérrez, J. (2007). Distinct role of insulin and IGF-I and its receptors in white skeletal muscle during the compensatory growth of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*, 267(1-4), 188-198. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.04.024>
- Morrison, J., Smith, C., Heidel, J., Mumford, S., Blazer, V., & MacConnell, E. (2007). Fish Histology and Histopathology Manual. *National Conservation Training Center. West Virginia*.
- Motta, J. H., Glória, L., De Souza, A. B., Fosse Filho, J. C., Polese, M., & Vidal Jr., M. (2021). Effect of fasting on freshwater angelfish *Pterophyllum scalare* (Lichtenstein; Pisces: Cichlidae) development. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 49(1), 125-135. <https://doi.org/10.3856/vol49-issue1-fulltext-2499>
- Moutoussamy, S., Kelly, P. A., & Finidori, J. (1998). Growth hormone receptor and cytokine receptor family signaling. *European Journal of Biochemistry*, 255(1), 1-11. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1998.2550001.x>

- Narváez, M. V., Leones, T. M., Perozo, Z. M., Allison, A. M., & Rivero, A. B. (2012). *Estructura histológica de hígado de Mylossoma acanthogaster (Valenciennes 1850) y Cynopotamus venezuelae (schultz 1944) (characiformes, characidae)*. 46(3), 245-261.
- Nebo, C. (2015). Respostas metabólicas, morfologia do tecido muscular e expressão dos genes relacionados ao crescimento e à atrofia muscular, durante o jejum e realimentação em juvenis de tilápia-do-nilo.
- Ortiz, M., López-Flórez, C., Castro-Rebolledo, M. I., Baldisserotto, B., & Gómez-Ramírez, E. (2024). Anatomy, histology and ultrastructure of the digestive tract in Andean fish (*Trichomycterus bogotensis*) and ecological implications. *Zoomorphology*. <https://doi.org/10.1007/s00435-023-00634-3>
- Pastor, A. (2021). Variabilidad del crecimiento larvario entre atún rojo y melva en la costa levantina española (so mediterráneo): Implicaciones de la segregación de sus nichos tróficos. *Universidad de Cádiz*.
- Pervin, Mst. A., Jahan, H., Akter, R., Omri, A., & Hossain, Z. (2020). Appraisal of different levels of soybean meal in diets on growth, digestive enzyme activity, antioxidation, and gut histology of tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 46(4), 1397-1407. <https://doi.org/10.1007/s10695-020-00798-5>
- Peterson, B. C., Bilodeau-Bourgeois, A. L., & Small, B. C. (2009). Response of the somatotropic axis to alterations in feed intake of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 153(4), 457-463. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2009.04.614>
- Picha, M. E., Turano, M. J., Beckman, B. R., & Borski, R. J. (2008). Endocrine Biomarkers of Growth and Applications to Aquaculture: A Minireview of Growth Hormone, Insulin-Like Growth Factor (IGF)-I, and IGF-Binding Proteins as Potential Growth

- Indicators in Fish. *North American Journal of Aquaculture*, 70(2), 196-211.
<https://doi.org/10.1577/A07-038.1>
- Pierce, A. L., Dickey, J. T., Larsen, D. A., Fukada, H., Swanson, P., & Dickhoff, W. W. (2004). A quantitative real-time RT-PCR assay for salmon IGF-I mRNA, and its application in the study of GH regulation of IGF-I gene expression in primary culture of salmon hepatocytes. *General and Comparative Endocrinology*, 135(3), 401-411.
<https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2003.10.010>
- Pierce, A. L., Fox, B. K., Davis, L. K., Visitacion, N., Kitahashi, T., Hirano, T., & Grau, E. G. (2007). Prolactin receptor, growth hormone receptor, and putative somatolactin receptor in Mozambique tilapia: Tissue specific expression and differential regulation by salinity and fasting. *General and Comparative Endocrinology*, 154(1-3), 31-40. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2007.06.023>
- Pierce, A. L., Shimizu, M., Beckman, B. R., Baker, D. M., & Dickhoff, W. W. (2005). Time course of the GH/IGF axis response to fasting and increased ration in chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *General and Comparative Endocrinology*, 140(3), 192-202. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2004.10.017>
- Pinto, K. S., Melo, L. F. D., Aquino, J. B. D., Dantas Filho, J. V., Schons, S. D. V., Miglino, M. A., & Rici, R. E. G. (2022). Macro, micromorphological and histological aspects of the intestine pirarucu *Arapaima gigas* (SCHINZ, 1822) (Osteoglossiformes: Arapaimidae). *Acta Veterinaria Brasilica*, 16(4), 351-357.
<https://doi.org/10.21708/avb.2022.16.4.10728>
- Ponce, B. S. (2016). Histología básica: Fundamentos de biología celular y del desarrollo humano. *México: Editorial Médica Panamericana*.

- Prado, M., & Val, A. (2015). Differentially expressed genes in the pituitary of the Amazonian fish *Arapaima gigas*. *International Journal of Fisheries and Aquaculture*, 7(8), 132-141. <https://doi.org/10.5897/IJFA15.0473>
- PRODUCE. (2016). Anuario Estadístico pesquero y acuícola 2016: La actividad productiva del sector en números. *Ministerio de la Producción*.
- Radu, F., Pirsopoulos, N. T., Jinga, M., Tintoiu, I. C., Sun, Z., & Bontas, E. (Eds.). (2020). *Liver Diseases: A Multidisciplinary Textbook*. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-24432-3>
- Rebaza, A. M., Alcántara, B. F., & Valdivieso, M. (1999). Manual de piscicultura del paiche (*Arapaima gigas* Cuvier). *Tratado de Cooperación Amazónica. Secretaria pro tempore.*, 71, 1-76. <http://dx.doi.org/10.24841/FA.V25I2.404>
- Reindl, K. M., & Sheridan, M. A. (2012). Peripheral regulation of the growth hormone-insulin-like growth factor system in fish and other vertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 163(3-4), 231-245. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2012.08.003>
- Reite, O. B. (2005). The rodlet cells of teleostean fish: Their potential role in host defence in relation to the role of mast cells/eosinophilic granule cells. *Fish & Shellfish Immunology*, 19(3), 253-267. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2005.01.002>
- Ríos, F. S., Kalinin, A. L., Fernandes, M. N., & Rantin, F. T. (2004). Changes in gut gross morphology of traíra, *Hoplias malabaricus* (Teleostei, Erythrinidae) during long-term starvation and after refeeding. *Brazilian Journal of Biology*, 64(3b), 683-689. <https://doi.org/10.1590/S1519-69842004000400017>
- Ríos, L. R. (2012). Estado de la acuicultura en el Perú. *Revista AquaTIC*, 37, 99-106.

- Robinson, M. D., McCarthy, D. J., & Smyth, G. K. (2010). edgeR: A Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*, 26(1), 139-140. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp616>
- Rocha, E., Monteiro, R. A. F., & Pereira, C. A. (1994). The liver of the brown trout, *Salmo trutta fario*: A light and electron microscope study.
- Rodrigues, A. P. O., & Cargnin, E. (2017). Morphology and Histology of the Pirarucu (*Arapaima gigas*) Digestive Tract. *International Journal of Morphology*, 35(3), 950-957. <https://doi.org/10.4067/S0717-95022017000300025>
- Roith, D. L., Scavo, L., & Butler, A. (2001). What is the role of circulating IGF-I? *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 12(2), 48-52. [https://doi.org/10.1016/S1043-2760\(00\)00349-0](https://doi.org/10.1016/S1043-2760(00)00349-0)
- Ross, L. G., Ross, B., & Ross, B. (2008). Anaesthesia of Fish: III. Parenteral and Oral Anaesthesia. En *Anaesthetic and Sedative Techniques for Aquatic Animals* (pp. 137-149). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781444302264.ch10>
- Ross, M. H., & Pawlina, W. (Eds.). (2016). *Histology: A text and atlas; with correlated cell and molecular biology* (7. ed). Wolters Kluwer.
- Ruiz, L. (2010). Morfología del tracto digestivo y hábitos alimentarios de *Thalassophryne maculosa* (pisces: Batrachoididae) en la bahía de mochima, Venezuela. *Boletín del centro de investigaciones biológicas*, 44(1), 51-61.
- Sadowski, C. L., Wheeler, T. T., Wang, L.-H., & Sadowski, H. B. (2001). GH Regulation of IGF-I and Suppressor of Cytokine Signaling Gene Expression in C2C12 Skeletal Muscle Cells. *Endocrinology*, 142(9), 3890-3900. <https://doi.org/10.1210/endo.142.9.8365>
- Saera-Vila, A., Calduch-Giner, J. A., Prunet, P., & Pérez-Sánchez, J. (2009). Dynamics of liver GH/IGF axis and selected stress markers in juvenile gilthead sea bream (*Sparus*

- aurata*) exposed to acute confinement. Differential stress response of growth hormone receptors. *Nutrition and Fish Growth Endocrinology*, 154(2), 197-203. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2009.06.004>
- Saera-Vila, A., Calduch-Giner, J.-A., & Pérez-Sánchez, J. (2005). Duplication of growth hormone receptor (GHR) in fish genome: Gene organization and transcriptional regulation of GHR type I and II in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *General and Comparative Endocrinology*, 142(1-2), 193-203. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2004.11.005>
- Sales, C. F., Silva, R. F., Amaral, M. G. C., Domingos, F. F. T., Ribeiro, R. I. M. A., Thomé, R. G., & Santos, H. B. (2017). Comparative histology in the liver and spleen of three species of freshwater teleost. *Neotropical Ichthyology*, 15(1). <https://doi.org/10.1590/1982-0224-20160041>
- Sánchez, M. (2023). Significado biológico del eje hormona de crecimiento (GH)/ factor de crecimiento similar a la insulina (IGF). *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 30(114), 101-108. [https://doi.org/10.18257/raccefyn.30\(114\).2006.2218](https://doi.org/10.18257/raccefyn.30(114).2006.2218)
- Santos, K. B. D., Pieta, R. D. S., Cunha, H. P. D. F., Silva, N. A. D., & Ferreira, G. J. B. D. C. (2024). Descrição histológica de segmentos do tubo digestório do pirarucu (*Arapaima gigas*) proveniente de produção comercial. *Semina: Ciências Agrárias*, 45(3), 855-868. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2024v45n3p855>
- Savić, N., Marković, Z., & Poleksić, V. (2012). Intestinal histology and enterocytes height variation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) grown in cages: Effects environmental conditions. *Institute for Animal Husbandry, Belgrade-Zemun*, 28(2), 323-332. <https://doi.org/10.2298/BAH1202323S>

- Scadeng, M., McKenzie, C., He, W., Bartsch, H., Dubowitz, D. J., Stec, D., & St. Leger, J. (2020). Morphology of the Amazonian Teleost Genus *Arapaima* Using Advanced 3D Imaging. *Frontiers in Physiology*, *11*, 1-19. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00260>
- Schaefer, S., Kloas, W., & Würtz, S. (2012). Arapaima: Candidate for intensive freshwater culture. *Global Aquaculture Advocate*, *15*(6), 50-51.
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, *9*(7), 671-675. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>
- Shimizu, M., Cooper, K. A., Dickhoff, W. W., & Beckman, B. R. (2009). Postprandial changes in plasma growth hormone, insulin, insulin-like growth factor (IGF)-I, and IGF-binding proteins in coho salmon fasted for varying periods. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, *297*(2), R352-R361. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.90939.2008>
- Silva, T., R. Petrillo, T., Yunis-Aguinaga, J., Fernandes Marcusso, P., Da Silva Claudiano, G., Ruas De Moraes, F., & Engrácia De Moraes, J. R. (2017). Effects of the probiotic *Bacillus amyloliquefaciens* on growth performance, hematology and intestinal morphometry in cage-reared Nile tilapia. *Latin American Journal of Aquatic Research*, *43*(5), 963-971. <https://doi.org/10.3856/vol43-issue5-fulltext-16>
- Sitjà-Bobadilla, A., Caldach-Giner, J., Saera-vila, A., Palenzuela, O., Alvarez-Pellitero, P., & Perez-Sánchez, J. (2008). Chronic exposure to the parasite *Enteromyxum leei* (Myxozoa: Myxosporidia) modulates the immune response and the expression of growth, redox and immune relevant genes in gilthead sea bream, *Sparus aurata* L. *Fish & Shellfish Immunology*, *24*(5), 610-619. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2008.01.014>

- Small, B. C., Murdock, C. A., Waldbieser, G. C., & Peterson, B. C. (2006). Reduction in channel catfish hepatic growth hormone receptor expression in response to food deprivation and exogenous cortisol. *Domestic Animal Endocrinology*, *31*(4), 340-356. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2005.12.003>
- Smith, E. T., Sun, P., Yu, S. K., Raible, D. W., & Nicolson, T. (2023). Differential expression of mechanotransduction complex genes in auditory/vestibular hair cells in zebrafish. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, *16*, 1274822. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2023.1274822>
- Srivastava, A. S., Kurokawa, T., & Suzuki, T. (2002). mRNA expression of pancreatic enzyme precursors and estimation of protein digestibility in first feeding larvae of the Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, *132*(3), 629-635. [https://doi.org/10.1016/S1095-6433\(02\)00107-1](https://doi.org/10.1016/S1095-6433(02)00107-1)
- Stewart, D. J. (2013). A New Species of *Arapaima* (Osteoglossomorpha: Osteoglossidae) from the Solimões River, Amazonas State, Brazil. *Copeia*, *2013*(3), 470-476. <https://doi.org/10.1643/CI-12-017>
- Takahashi, H., Hyodo, S., Abe, T., Takagi, C., Grau, G. E., & Sakamoto, T. (2014). Effects of fasting and refeeding on intestinal cell proliferation and apoptosis in hammerhead shark (*Sphyrna lewini*). *Journal of Coastal Life Medicine*, *2*(4), 253-258. <https://doi.org/10.12980/JCLM.2.201414J17>
- Torfi Mozanzadeh, M., Marammazi, J. G., Yaghoubi, M., Yavari, V., Agh, N., & Gisbert, E. (2017). Somatic and physiological responses to cyclic fasting and re-feeding periods in sobaity sea bream (*Sparidentex hasta*, Valenciennes 1830). *Aquaculture Nutrition*, *23*(1), 181-191. <https://doi.org/10.1111/anu.12379>

- Torres, G. A., González P, S., & Peña S, E. (2010). Descripción Anatómica, Histológica y Ultraestructural de la Branquia e Hígado de Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *International Journal of Morphology*, 28(3). <https://doi.org/10.4067/S0717-95022010000300008>
- Van Den Eijnden, M. J. M., Lahaye, L. L., & Strous, G. J. (2006). Disulfide bonds determine growth hormone receptor folding, dimerisation and ligand binding. *Journal of Cell Science*, 119(15), 3078-3086. <https://doi.org/10.1242/jcs.03036>
- Verdín, S. L., Moreno, L., Rojo, N. R., García, A. L., Omaña, M., Meneses, A., & Nieto, O. D. J. (2013). Histología e inmunohistoquímica. *México: Gamboa*.
- Vicentini, C. A., Franceschini-Vicentini, I. B., Bombonato, M. T. S., Bertolucci, B., Lima, S. G., & Santos, A. S. (2005). Morphological Study of the Liver in the Teleost *Oreochromis niloticus*. *International Journal of Morphology*, 23(3). <https://doi.org/10.4067/S0717-95022005000300003>
- Vidal, N., González-Bergonzoni, I., & Naya, D. E. (2019). The effect of fasting on nutritional status, organs size and isotopic composition in a Neotropical fish species (*Jenynsia multidentata*). *Hydrobiologia*, 828(1), 73-82. <https://doi.org/10.1007/s10750-018-3803-9>
- Wallace, K. N., & Pack, M. (2003). Unique and conserved aspects of gut development in zebrafish. *Developmental Biology*, 255(1), 12-29. [https://doi.org/10.1016/S0012-1606\(02\)00034-9](https://doi.org/10.1016/S0012-1606(02)00034-9)
- Walock, C. N., Kittilson, J. D., & Sheridan, M. A. (2014). Characterization of a novel growth hormone receptor-encoding cDNA in rainbow trout and regulation of its expression by nutritional state. *Gene*, 533(1), 286-294. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2013.09.046>

- Watson, L. C. (2011). Ecology and conservation of Arapaima in Guyana: Recovery of a giant fish in distress. *Thesis submitted for the Doctor of Philosophy Degree, State University of New York, USA.*, 153.
<https://experts.esf.edu/esploro/outputs/99872714604826>
- Wilson, J. M., & Castro, L. F. C. (2010). Morphological diversity of the gastrointestinal tract in fishes. En *Fish Physiology* (Vol. 30, pp. 1-55). Elsevier.
[https://doi.org/10.1016/S1546-5098\(10\)03001-3](https://doi.org/10.1016/S1546-5098(10)03001-3)
- Won, E. T., & Borski, R. J. (2013). Endocrine Regulation of Compensatory Growth in Fish. *Frontiers in Endocrinology*, 4. <https://doi.org/10.3389/fendo.2013.00074>
- Wood, A. W., Duan, C., & Bern, H. A. (2005). Insulin-Like Growth Factor Signaling in Fish. En *International Review of Cytology* (Vol. 243, pp. 215-285). Elsevier.
[https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(05\)43004-1](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(05)43004-1)
- Xiong, D., Zhang, L., Yu, H., Xie, C., Kong, Y., Zeng, Y., Huo, B., & Liu, Z. (2011). A study of morphology and histology of the alimentary tract of *Glyptosternum maculatum* (Sisoridae, Siluriformes): The alimentary tract of *Glyptosternum maculatum*. *Acta Zoologica*, 92(2), 161-169. <https://doi.org/10.1111/j.1463-6395.2010.00458.x>
- Yang, B.-Y., Greene, M., & Chen, T. T. (1999). Early embryonic expression of the growth hormone family protein genes in the developing rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Molecular Reproduction and Development*, 53(2), 127-134.
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2795\(199906\)53:2<127::AID-MRD1>3.0.CO;2-H](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2795(199906)53:2<127::AID-MRD1>3.0.CO;2-H)
- Yılmaz, E., Arık, R. O., Arı, B., Yılmaz, A., & Gök, A. (2018). The investigation of the effects of different feeding strategies on the growth of dolphin cichlid (*Cyrtocara moori* Boulenger, 1902) fish. *Aquaculture Research*, 49(9), 1-7.
<https://doi.org/10.1111/are.13761>

10. ANEXOS

Anexo 1. Extracción de ARN de hemolinfa de *L. vannamei* - protocolo: TRIzol Reagent.

Lista de reactivos necesarios previos a la extracción:

- ❖ Cloroformo ultrapuro, Panreac AppliChem
- ❖ Isopropanol (2-Propanol), Sigma-Aldrich
- ❖ Acetato de Sodio 3M, 5.2 pH, Panreac AppliChem
- ❖ Etanol absoluto grado molecular al 75%, Serva
- ❖ Agua libre de nucleasas, Panreac AppliChem

Protocolo:

- 1) Descongelar las muestras en hielo a 4°C.
- 2) Agregar 100 uL de Cloroformo por cada 500 uL de TRIzol usado para la lisis, asegurándose de cerrar la tapa del tubo e invertir el tubo para mezclar.
- 3) Incubar por 5 min en hielo.
- 4) Centrifugar la muestra por 15 min a 12,000 rpm a 4°C.

NOTA: La mezcla se separa, abajo fenol-cloroformo con una tonalidad rojiza, una interface y arriba la fase acuosa incolora.

- 5) Transferir la fase acuosa que contiene el RNA a un tubo nuevo. Cuantificar el volumen recuperado.

NOTA: Evitar acarrear la interface u otro compuesto orgánico ya que contienen inhibidores y contaminantes. Alinear el tubo 45° y con ayuda de una micropipeta aspirar la fase acuosa.

- 6) Agregar 500 uL de isopropanol y 1/10 de acetato de sodio 3M, 5.2 pH. Mezclar invirtiendo el tubo.
- 7) Incubar 2 hrs o toda la noche a -20°C.
- 8) Centrifugar por 15 min a 12,000 rpm a 4°C.

NOTA: El RNA se precipita formado un botón de gel translucido en el fondo del tubo.

9) Descartar el sobrenadante con una micropipeta o decantando. En ambos casos, cuidar que el botón no se desprenda del tubo y se pierda.

10) Resuspender el botón en 500 uL de etanol al 75% por cada 500 uL de TRIzol usado para la lisis.

11) Dar vortex brevemente y centrifugar por 10 min entre 7,500–10,000 rpm a 4°C.

12) Descartar el sobrenadante con una micropipeta o decantar.

13) Eliminar los residuos de etanol dejando que este se evapore. No dejar que el botón se seque.

14) Resuspender el botón en 20-50 uL de agua libre de nucleasas y mezcle con ayuda de una micropipeta. Lavar las paredes del tubo.

15) Almacenar el RNA a -70°C o proceder con otras aplicaciones.

Control de calidad de RNA:

Para evaluar la integridad, pureza y concentración del RNA realizar lo siguiente:

Determinar la pureza y concentración mediante espectrofotometría.

1) Leer 1-2 uL de RNA en el espectrofotómetro de microplaca EPOCH (Biotek) para obtener la razón de absorbancia A260/A280 y la concentración en ng/uL.

NOTA: Una razón A260/A280 aceptable oscila entre 1.8 y 2; mientras que la razón A260/A230 entre 1.8 y 2.2 (Thermo-Scientific, 2010 a y b).

Integridad:

1) Correr un gel de agarosa al 1% y cargar mínimo 200 ng totales.

2) Realizar la electroforesis a 80 V por 65 min con TAE 1X.

Anexo 2. Limpieza de ARN total con DNasa I, RNase-free (Thermo scientific).

1. Agregar a un tubo de 1.5 mL sin ARNasa, los siguientes componentes:

Componentes	Cantidad
ARN	1 µg
10 x Buffer de reacción con MgCl ₂	1 µL
DNase I, RNase-free	1 µL (1U)
Agua tratada con DEPC	10 µL

2. Incubar la mezcla anterior a 37°C durante 30 min.

3. Añadir 1 µL de EDTA 50 mM e incubar a 65°C durante 10 minutos.

Nota: No usar más de 1 U de DNasa I, por 1 µg de ARN.