



Universidad Nacional del Litoral

Facultad de Ciencias Veterinarias

Laboratorio de Ecología Molecular Aplicada
Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral
Facultad de Ciencias Veterinarias
Universidad Nacional del Litoral

Tesis presentada para optar por el grado académico de
Doctor en Ciencias Veterinarias

Implementación de la soja (*Glycine max*) como complemento
alimenticio de la dieta suministrada a yacarés overos
(*Caiman latirostris*) con fines comerciales en Argentina.

Autor: **Lic. Samuel HILEVSKI LORETO**

Director: **Dr. Pablo A. SIROSKI**

2023

Rememorando a través de estos cinco años, me vienen a la mente días donde trabaje sin descanso fuertemente, aunque también recuerdo noches donde batallaba con la incertidumbre.

En esos momentos, siempre atravesaban mi cabeza tantos pensamientos y dudas. Sin embargo, ustedes siempre estaban allí para recordarme que, aunque hay muchas razones para desistir, había más razones para seguir y alcanzar la meta.

Para ustedes son estas cientos de páginas impregnadas de su cariño, preocupación, fortaleza, risas, consejos, paz, comprensión, sabiduría y amor.

Para Trini, Wilma, Nicolas, Sarah, Gaby, Gerardo y Daniel.

Agradecimientos

Primero quiero darle gracias a Dios por ponerme en este camino.

Gracias a mis papás por todos sus sacrificios y apoyo incondicional.

A Trinidad, mi cómplice en todo siempre, a quien me respalda, me aguanta, me aconseja, me levanta y me ayuda a seguir, gracias esposa.

Álvaro, gracias por tus consejos y recomendaciones.

A mi director, Pablo. Gracias por tu apoyo durante todos estos años.

A mis compañeros del laboratorio y al Proyecto Yacaré, gracias por abrirme sus puertas y brindarme su hospitalidad.

Gracias a todas las personas que de alguna manera me ayudaron a venir e instalarme acá en Argentina. Gracias, mamá, papá, Trini, Robert, Álvaro, Pablo, Gisela, Virginia, Patricia, Soledad, Evelyn, Evangelina, Melina, Carlos, Alejandro, Alba, Ricardo, Leo, Guillermo y Hernán.

A Gaby, Gerardo, Sarah e Isabella por sus llamadas dominicales, sus extensas charlas, sus palabras de apoyo y sus chistes.

Por último, gracias a los que ya partieron y la distancia siempre me ayudaron. Abuelo Juan, Tata, Abuela Senovia, Abuelo Wladimir, tía Helena, tío Victor, Sra. María L., Sra. María F., y Sr. Lino V.

Gracias

RESUMEN

El desarrollo e implementación de una dieta artificial para una especie animal, como el yacaré overo (*Caiman latirostris*), que tradicionalmente se ha considerado "carnívora estricta" puede llegar a ser un proceso arduo, aún más cuando se tratan de incluir nutrientes de origen vegetal. La alimentación de los cocodrilianos en cautiverio plantea varios desafíos tales como disponibilidad de la materia prima, transporte, almacenamiento y manipulación. Esto genera la necesidad de dietas alternativas especializadas utilizando nuevas materias primas, procesos para el mejoramiento y desarrollo de nuevos productos que cumplan con los objetivos de los programas de manejo y requerimientos nutricionales de las especies, motivando así la evaluación y uso de ingredientes vegetales como complemento del alimento para cocodrilianos en cautiverio.

Este estudio se centró en implementar una dieta alternativa a base de soja para alimento de *C. latirostris* con fines de aprovechamiento comercial. Se determinó la digestibilidad de la soja por parte de *C. latirostris* y los efectos de diferentes cantidades de soja dentro de la dieta de neonatos y juveniles de la especie. Asimismo, se realizaron análisis del rendimiento económico de las dietas, inclusión de enzimas digestivas exógenas, así como investigaciones sobre los efectos de la soja en parámetros bioquímicos sanguíneos, morfoanatomía intestinal y hepática. Además, se realizaron análisis bioinformáticos, de filogenia y estructura de la pepsina y progastricina del yacaré overo.

Los resultados revelaron que el yacaré overo puede digerir eficientemente nutrientes provenientes de fuentes vegetales como la soja, con una digestibilidad superior al 96%. Esto sugiere que incluir entre el 20% y el 40% de soja en las dietas de estos animales mejora la absorción de nutrientes y promueve un mejor crecimiento de los ejemplares, además de ser un ingrediente palatable.

La inclusión de la soja en la dieta no afectó los niveles de lípidos, proteínas y glucosa en sangre, indicando que su uso como componente alimentario no altera el estado de salud metabólica de los yacarés. También se observó que la inclusión del 25% de soja en la dieta promovió un mayor crecimiento de las vellosidades intestinales y mejoró el metabolismo de los lípidos en el hígado, lo que sugiere una mayor eficiencia en la absorción de nutrientes.

En cuanto a la adición de enzimas digestivas, las fitasas resultaron ser una opción económica para aumentar la digestibilidad de las dietas y el crecimiento de los individuos de *C. latirostris*. Sin embargo, se destacó la importancia de considerar factores como la inmovilización de las enzimas, ya que los efectos pueden variar según diferentes condiciones.

Los análisis bioinformáticos revelaron que las enzimas pepsina y progastricina en el estómago del yacaré overo presentan un patrón estructural conservado en comparación con especies relacionadas. Aunque se observaron cambios discretos en estas enzimas, no parecen tener un impacto significativo en su actividad diferenciada entre los cocodrilianos. Esto sugiere que las enzimas digestivas en el yacaré overo están estrechamente relacionadas con su dieta, ontogenia y adaptación a diferentes recursos alimentarios. En conclusión, el estudio indica que una dieta con un 25% de harina de soja es más rentable y ofrece un mayor rendimiento en términos nutricionales para el yacaré overo. La inclusión de estas dietas podría ayudar a reducir los costos de producción y mantener el financiamiento del programa de conservación de la especie.

ABSTRACT

The development and implementation of a diet for an animal species, such as the broad-snouted caiman (*Caiman latirostris*), which has been traditionally considered a "strict carnivore," can be a difficult process, especially when trying to include plant-based nutrients. In captivity, feeding crocodylians poses challenges such as raw material availability, transport, storage, and handling. This generates the need for specialized diets that use alternative raw materials and new processes for the improvement and development of products that meet the objectives of conservation management programs and the nutritional requirements of the species. Thus, motivating the evaluation and use of plant ingredients as a complement to food for captive crocodylians.

This study focused on the implementation of an alternative soy-based diet for the commercial feeding of broad-snouted caiman. The digestibility of soybeans by *C. latirostris* and the effects of different amounts of soybeans in the diet of hatchlings and juveniles of the species were determined. At the same time, analyses of the economic performance of diets, inclusion of exogenous digestive enzymes, as well as investigations on the effects of soy on blood biochemical parameters, intestinal and hepatic morphoanatomy were carried out. In addition, bioinformatics, phylogeny, and structure analyses of pepsin and progastricin of the caiman were conducted.

The results revealed that the broad-snouted caiman can efficiently digest nutrients from plant sources such as soybeans, with a digestibility of over 96%. This suggests that including 20-40% soy in the diets of these animals improves nutrient absorption and promotes better growth of the animals while being a palatable ingredient.

The inclusion of soy in the diet did not affect blood lipid, protein, and glucose levels, indicating that its use as a dietary component does not alter the metabolic health status of the caimans. It was also observed that the inclusion of 25% soy in the diet promoted higher intestinal villus growth and improved lipid metabolism in the liver, suggesting improved efficiency of nutrient absorption.

Regarding the addition of digestive enzymes, phytases proved to be an economical option to increase the digestibility of diets and the growth of *C. latirostris* individuals. However, the importance of considering factors such as enzyme immobilization was highlighted, as the effects may vary according to different conditions.

Bioinformatic analyses revealed that pepsin and progastricin enzymes in the stomach of the broad-snouted caiman show a conserved structural pattern compared to related species. Although discrete changes in these enzymes were observed, they do not appear to have a significant impact on their differentiated activity among crocodylians. This suggests that digestive enzymes in the broad-snouted caiman are closely related to their diet, ontogeny, and adaptation to different food resources. In conclusion, the study indicates that a diet containing 25% soybean meal is more cost-effective and offers better nutritional performance for *C. latirostris*. The inclusion of these diets could help reduce production costs and maintain funding for the species conservation program.

ÍNDICE GENERAL

INTRODUCCIÓN	1
Orden Crocodylia	1
Características Físicas	1
Hábitat y Alimentación	2
Taxonomía	3
Los Crocodylia de Sudamérica	4
Yacaré overo (<i>Caiman latirostris</i>)	5
Reproducción	6
Distribución Geográfica y Hábitat	7
Dieta	8
Estatus Poblacional	8
Conservación y Uso Sustentable en Argentina, “Proyecto Yacaré”	10
Dietas para la Conservación de la Fauna	11
Soja (<i>Glycine max</i>)	12
Demanda Nutricional de los Cocodrilianos	13
Hipótesis	23
Objetivos	23
General	23
Específicos	23
METODOLOGÍA	24
Digestibilidad de la Harina de Soja por Parte de los Ejemplares de <i>Caiman latirostris</i> en Cautividad	24
Animales y Alojamiento	24
Laxado del Tracto Digestivo	25
Dietas y Frecuencia de Alimentación	26
Determinación de la Digestibilidad de las Dietas	27
Análisis Estadístico	29
Efecto Sobre la Salud y Tasa de Crecimiento a Diferentes Porcentajes de Harina de Soja en la Dieta de Neonatos de <i>Caiman latirostris</i> en Cautividad	29
Animales y Alojamiento	29
Dietas y Frecuencia de Alimentación	29
Cálculo de Consumo y Tasa de Conversión de las Dietas	30
Ganancia de Peso y Longitud en Función de la Cantidad de Harina de Soja	31
Muestras de Sangre y Procesamiento	31
Muestras de Tejidos y Procesamiento	33
Análisis de la Morfometría Intestinal y Hepática	34
Rendimiento Económico de las Dietas Experimentales	35
Análisis Estadístico	36

Efecto de la Inclusión de Enzimas Digestivas	36
Exógenas en la Dieta de <i>Caiman latirostris</i>	
Animales y Alojamiento	36
Dietas y Frecuencia de Alimentación	38
Ganancia de Peso y Longitud de Yacaré Overo	
en Función de La Enzima Suplementada	38
Análisis Estadístico	39
Análisis Bioinformático de la Pepsina y Progastricina de <i>Caiman latirostris</i>	39
Filogenia de la Pepsina y Progastricina de <i>Caiman latirostris</i>	39
Análisis de la Estructura Tridimensional de	
Pepsina y Progastricina de <i>Caiman latirostris</i>	41
Resultados	43
Digestibilidad de la Harina de Soja por Parte de los	
Ejemplares de <i>Caiman latirostris</i> en Cautividad	43
Efecto Sobre la Salud y Tasa de Crecimiento de Neonatos de <i>Caiman</i>	
<i>latirostris</i> Alimentados con Diferentes Porcentajes de Harina de Soja	47
Consumo y Tasa de Conversión Dietaria	47
Ganancia de Peso y Longitud en Función	
de la Cantidad de Harina de Soja.	48
Determinación de Parámetros Bioquímicos	51
Análisis de la Morfometría Intestinal y Hepática	52
Rendimiento Económico de las Dietas Experimentales	57
Efecto de la Inclusión de Enzimas Digestivas Exógenas, Sobre la	
Digestibilidad de la Dieta y la Tasa de Crecimiento en Neonatos y Juveniles	58
de <i>Caiman latirostris</i>.	
Efecto de la Inclusión de Enzimas Digestivas Exógenas, Sobre	
la Tasa de Crecimiento en Neonatos de <i>Caiman latirostris</i>	59
Efecto de la Inclusión de Fitasas Sobre La Tasa de	
Crecimiento en Juveniles de <i>Caiman latirostris</i>	61
Análisis Bioinformático y Filogenético de	
Enzimas Digestivas de <i>Caiman latirostris</i>.	64
Análisis Bioinformático y Filogenético de	
la Pepsina de <i>Caiman latirostris</i>.	64
Análisis Bioinformático y Filogenético de	
la Progastricina de <i>Caiman latirostris</i>	69
Discusión	75
Digestibilidad de la Harina de Soja por Parte de los	
Ejemplares de <i>Caiman latirostris</i> en Cautividad.	75
Tasa de Crecimiento a Diferentes Porcentajes de Harina de Soja	
en la Dieta de Neonatos de <i>Caiman latirostris</i> en Cautividad	78

Efecto de la Harina de Soja Sobre Parámetros Bioquímicos y Morfometría Intestinal y Hepática de <i>Caiman latirostris</i>	82
Efecto de la Inclusión de Enzimas Digestivas Exógenas, Sobre la Digestibilidad de la Dieta y la Tasa de Crecimiento en Neonatos y Juveniles de <i>Caiman latirostris</i>	89
Efecto de la Inclusión de Enzimas Digestivas Exógenas, Sobre la Tasa de Crecimiento en Neonatos de <i>Caiman latirostris</i>	89
Efecto de la Inclusión de Fitasas, Sobre la Tasa de Crecimiento en Juveniles de <i>Caiman latirostris</i>	91
Análisis Bioinformático y Filogenético de Enzimas Digestivas de <i>Caiman latirostris</i>	92
Análisis Bioinformático y Filogenético de la Pepsina y Progastricina de <i>Caiman latirostris</i>	92
Conclusiones	97
Bibliografía	100
Apéndice	131

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Algunos aspectos del cráneo de los Crocodylia	1
Figura 2. Relación filogenética de los Crocodylia con otros taxones animales	3
Figura 3. Filogenia de los Crocodylia	4
Figura 4. Patrones escutelares de <i>Caiman latirostris</i> y <i>Caiman yacare</i>	4
Figura 5. <i>Caiman latirostris</i>	6
Figura 6. Distribución geográfica de las especies de cocodrilianos de Argentina	8
Figura 7. Juveniles de <i>Caiman latirostris</i> alimentándose de <i>Philodendron selloum</i>	15
Figura 8. Bateas y condiciones de alojamiento de los individuos de <i>Caiman latirostris</i> bajo tratamientos de digestibilidad	25
Figura 9. Inmovilización de los individuos de <i>Caiman latirostris</i> e introducción de sondas bucofaríngeas	26
Figura 10. Digestión ácida de muestras de heces de <i>Caiman latirostris</i>	28
Figura 11. Ubicación del seno venoso espinal en cocodrilianos	32
Figura 12. Corte transversal del intestino de <i>Caiman latirostris</i>	34
Figura 13. Corte transversal del hígado de <i>Caiman latirostris</i>	35
Figura 14. Tanques y condiciones de alojamiento de los individuos juveniles de <i>Caiman latirostris</i>	37
Figura 15. Ganancia de longitud total de <i>Caiman latirostris</i> alimentados con dietas enriquecidas con harina de soja	49
Figure 16. Ganancia de peso de <i>Caiman latirostris</i> alimentados con dietas enriquecidas con harina de soja	50
Figura 17. Inclusión óptima de harina de soja en el alimento de <i>Caiman latirostris</i>	51
Figura 18. Intestino delgado proximal de <i>Caiman latirostris</i>	54
Figura 19. Corte transversal de intestinos de <i>Caiman latirostris</i> alimentados con dietas enriquecidas con harina de soja	55
Figura 20. Porcentaje de lípidos presente en el hígado de <i>Caiman latirostris</i> alimentado con dietas enriquecidas con harina de soja	56
Figura 21. Cortes transversales de hígados de <i>Caiman latirostris</i> alimentados con dietas enriquecidas con harina de soja	57
Figura 22. Ganancia de longitud total de neonatos de <i>Caiman latirostris</i> alimentados con dietas enriquecidas con harina de soja y enzimas digestivas	60
Figura 23. Ganancia de peso de neonatos de <i>Caiman latirostris</i> alimentados con dietas enriquecidas con harina de soja y enzimas digestivas	61
Figura 24. Ganancia de longitud total de juveniles de <i>Caiman latirostris</i> alimentados con dietas enriquecidas con harina de soja y enzimas del tipo fitasas	62
Figura 25. Ganancia de peso de juveniles de <i>Caiman latirostris</i> alimentados con dietas enriquecidas con harina de soja y enzimas del tipo fitasas	62
Figura 26. Ganancia de longitud de neonatos y juveniles de <i>Caiman latirostris</i> alimentados con dietas enriquecidas con harina de soja y enzimas del tipo fitasas	63

Figura 27. Ganancia de peso de neonatos y juveniles de <i>Caiman latirostris</i> alimentados con dietas enriquecidas con harina de soja y enzimas del tipo fitasas	64
Figura 28. MSA de ADN de pepsina de <i>Caiman latirostris</i> y otros cocodrilianos	65
Figura 29 Aproximación de la estructura tridimensional de la pepsina de <i>Caiman latirostris</i>	66
Figura 30. Alineamiento estructural de las pepsinas de <i>Caiman latirostris</i> y <i>Salmo salar</i>	67
Figura 31. Alineamiento estructural de las pepsinas de <i>Caiman latirostris</i> y <i>Xenopus tropicalis</i>	67
Figura 32. Árbol filogenético de la pepsina	68
Figura 33. MSA de ADN de progastricina de <i>Caiman latirostris</i> y otros cocodrilianos	69
Figura 34. Aproximación de la estructura tridimensional de la progastricina de <i>Caiman latirostris</i>	71
Figura 35. Alineamiento estructural de las progastricinas de <i>Caiman latirostris</i> y <i>Chelonia mydas</i>	72
Figura 36. Alineamiento estructural de las progastricinas de <i>Caiman latirostris</i> y <i>Xenopus tropicalis</i>	72
Figura 37. Árbol filogenético de la progastricina	74

ÍNDICE TABLAS

Tabla 1. Especies de cocodrilianos presentes en Sudamérica	5
Tabla 2. Familias y especies de plantas consumidas por cocodrilianos	17
Tabla 3. Composición de las dietas experimentales	26
Tabla 4. Composición de las dietas experimentales	30
Tabla 5. Información nutricional de los componentes de las dietas experimentales	30
Tabla 6. Condiciones para las determinaciones de los perfiles bioquímicos del suero de <i>Caiman latirostris</i>	32
Tabla 7. Reactivos y tiempos de pasajes para el procesado de muestras histológicas	33
Table 8. Composición de las dietas experimentales	38
Tabla 9. Coeficiente de digestibilidad de la harina de soja en cada segmento de intestino de <i>Caiman latirostris</i>.	43
Tabla 10. Coeficientes de digestibilidad de las dietas en cada segmento de intestino de <i>Caiman latirostris</i>.	45
Tabla 11. Presencia de residuos de digestión en el tracto digestivo	46
Tabla 12. Tasa de consumo de alimento (TCA) e índice de conversión de alimento (ICA) de <i>Caiman latirostris</i> alimentados con dietas enriquecidas con harina de soja	48
Tabla 13. Costos de dietas enriquecidas con harina de soja y sin ella en Argentina	52
Table 14. Perfiles bioquímicos del suero sanguíneo de <i>Caiman latirostris</i> alimentados con dietas enriquecidas con harina de soja	53
Tabla 15. Longitud y ancho de las vellosidades intestinales de <i>Caiman latirostris</i> alimentados con dietas enriquecidas con harina de soja	58
Tabla 16. Valores reportados de la bioquímica sanguínea de diferentes cocodrilianos	84

ABREVIATURAS UTILIZADAS

- ABS: Absorbancia
- AIC: Criterio de Información de Akaike
- AL: Albúmina
- CH: Colesterol
- CoGe: Comparative Genomics
- Cr: Cromo
- Cr₂O₃: Óxido crómico
- DE: Desviación estándar
- EQ: Equivalentes químicos
- GL: Glucosa
- GLT: Ganancia de longitud total
- GPC: Ganancia de peso
- H₂O: Agua destilada
- HClO₄: Ácido perclórico
- HNO₃: Ácido nítrico
- HS: Harina soja
- ICA: Índice de conversión de Alimento
- IDD: Intestino delgado distal
- IDM: Intestino delgado medio
- IDP: Intestino delgado proximal
- IG: Intestino grueso
- K: Potasio
- K₂Cr₂O₇: Dicromato de potasio
- LT: Longitud total
- MSA: Alineamiento múltiple de secuencias
- MA: Millones de años.
- N: Normalidad.
- NCBI/GenBank: National Center for Biotechnology Information/GenBank
- O: Oxígeno
- pb: Pares de bases
- PC: Peso corporal
- PM: Peso molecular
- PT: Proteínas totales
- RMSD: Valores de la desviación cuadrática media de las posiciones atómicas
- TCA: Tasa de consumo de alimento
- TG: Triglicéridos
- TMRCA: Tiempo hasta el ancestro común más reciente
- US\$: Dólares estadounidenses

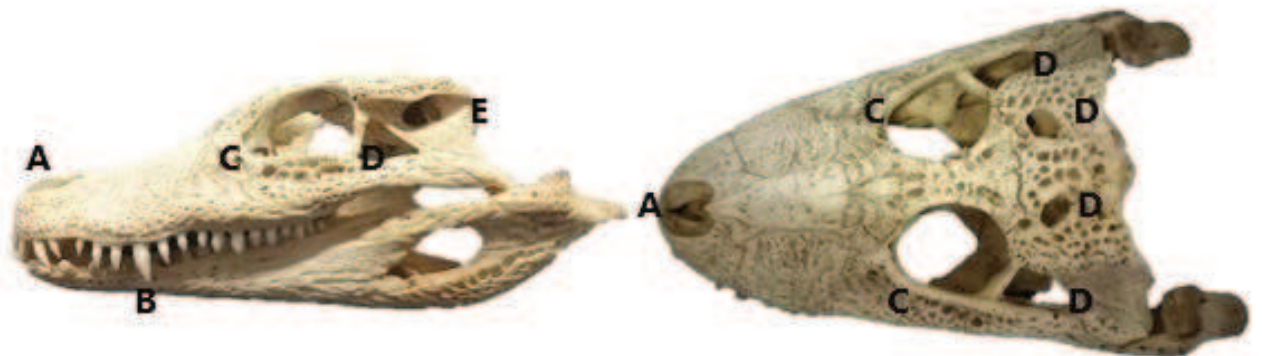
1. INTRODUCCIÓN.

1.1. ORDEN CROCODYLIA.

1.1.1. CARACTERÍSTICAS FÍSICAS.

Los Crocodylia son animales tetrápodos (dos pares de patas) con cuerpos alargados, semejantes al de los lagartos, con cola musculosa redondeada al inicio (próximo a las patas traseras) y comprimida lateralmente hacia el final. El cráneo de estos animales posee dos pares de aberturas denominadas “*fenestrae*”, las cuales se ubican detrás de las órbitas oculares y por lo cual reciben el nombre técnico de “diápsidos” (**Figura 1**). Poseen un hocico con fuertes mandíbulas armadas de numerosos dientes cónicos (entre 30 y 40 dientes en cada una) y aberturas nasales ubicadas en posición dorsal en el extremo anterior del hocico (**Figura 1**). Sus ojos poseen membranas nictitantes, la cual protege el ojo y permite la visión bajo el agua. La piel está formada por una gruesa capa dérmica cubierta por escamas epidérmicas y placas óseas intradérmicas denominadas osteodermos (Seijas, 2011).

Figura 1. Algunos aspectos del cráneo de los Crocodylia. Vistas lateral y dorsal del cráneo de *Caiman latirostris*. **A:** Narina, **B:** Dientes, **C:** Cuenca ocular, **D:** *fenestrae*, **E:** Canal auricular.



En algunos aspectos internos, los cocodrilianos se asemejan a las aves (taxón más cercano; Green et al., 2014): poseen un corazón cuatricameral (Huchzermeyer, 2003), huevos con membranas amnióticas y el desarrollo del embrión está ligado a la temperatura de incubación (Lang, 1994; Elf, 2003; van Hoek, 2014). Sin embargo, en los cocodrilianos la determinación sexual, se ve influenciada por la temperatura de incubación durante un periodo de tiempo denominado “Período Termosensible”, donde el embrión se diferencia en alguno de los dos sexos. La hembra adulta presenta un marcado cuidado parental, asistiendo el nacimiento de sus crías y protegiéndolas durante varias semanas después de éste (Lang, 1994; Elf, 2003; van Hoek, 2014).

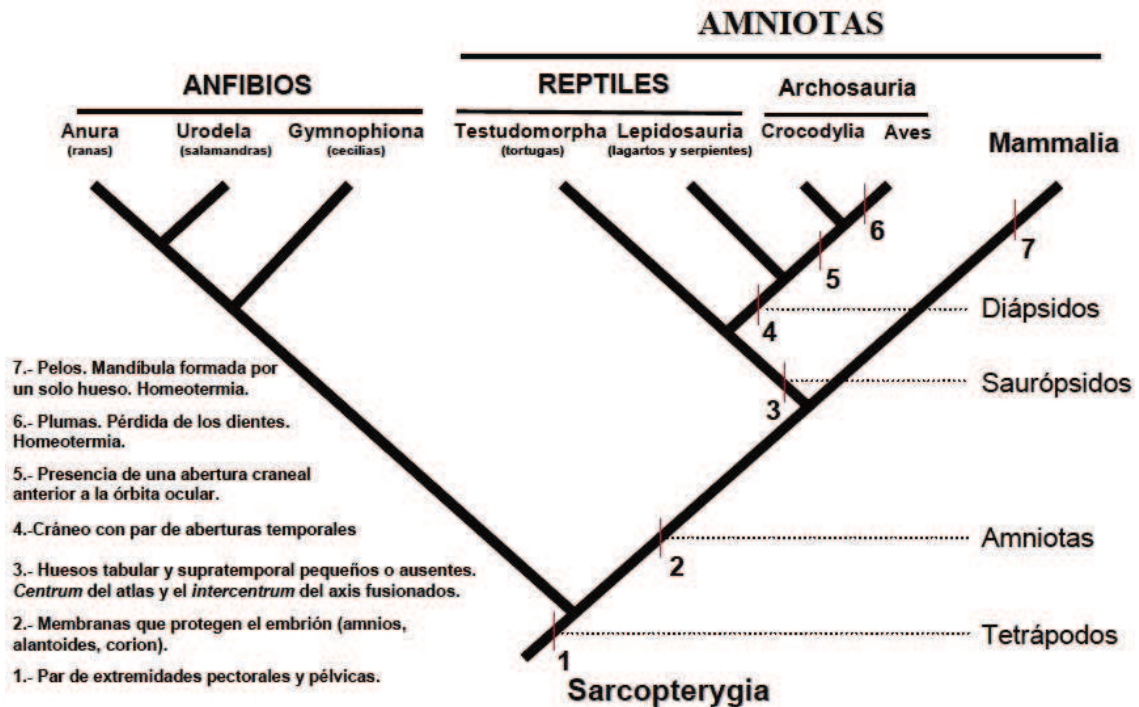
Al contrario de las aves, los cocodrilianos son animales ectotermos por lo que su temperatura corporal depende de la temperatura ambiental y su tamaño corporal (calor específico o energía necesaria para elevar en un 1 grado la temperatura de 1 kg de masa; Coulson y Herbert, 1981). Tampoco poseen mecanismos para el control de su temperatura corporal (Coulson y Herbert, 1981; Webb y Manolis, 1989; Richardson et al., 2002), por lo que los procesos fisiológicos que dependen de la temperatura corporal, como la función inmune, la alimentación, el metabolismo y la reproducción, son regulados a través de medios conductuales como la exposición al sol o sumergirse en el agua para elevar o disminuir su temperatura corporal manteniéndola entre los 25 y 35°C, y principalmente entre 30 y 33°C (Angilletta et al., 2002; Lance, 2003; Bassetti et al., 2014).

1.1.2. HÁBITAT Y ALIMENTACIÓN.

Los cocodrilianos son habitantes de ambientes acuáticos, como pantanos, lagos y ríos, aunque algunas especies pueden habitar aguas salobres o marinas, generalmente en climas tropicales o subtropicales. Dentro de estos ecosistemas, son depredadores “clave” y oportunistas, variando su dieta según su edad, la disponibilidad y diversidad de recursos en el ambiente (Brochu, 2003; Seijas, 2011; van Hoek, 2014).

Sus requerimientos alimenticios son bastante modestos, por ejemplo, un cocodrilo requiere de 2 kg de alimento para incrementar su peso en 1 kg; mientras el ganado vacuno, las ovejas o los cerdos tendrían que comer proporcionalmente de tres a cinco veces más para obtener la misma ganancia en peso (NRC, 1983).

Figura 2. Relación filogenética de los Crocodylia con otros taxones animales. Relación evolutiva de los Crocodylia con los otros vertebrados tetrápodos . Los números indican las características evolutivas que definen a cada grupo. Sarcopterygia es un antiguo linaje de peces con aletas lobuladas al que pertenecen los actuales peces pulmonados y el celacanto. (Tomado de Seijas, 2011).

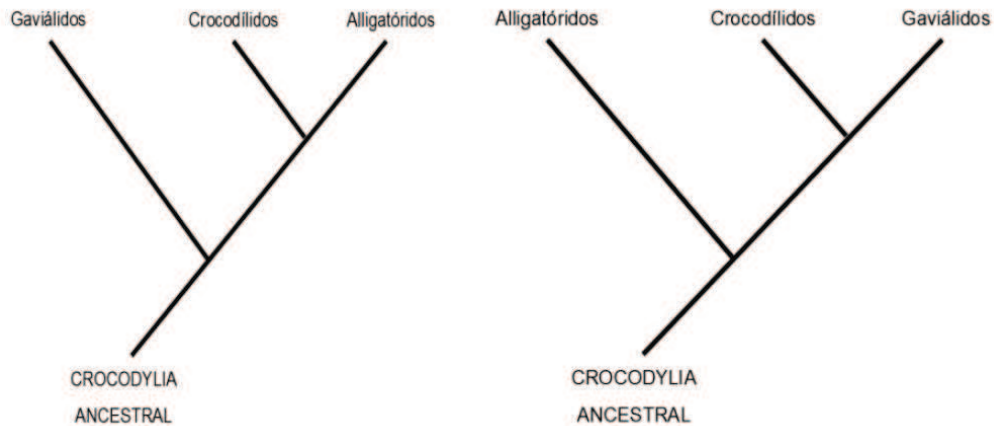


1.1.3. TAXONOMÍA.

Los cocodrilianos (Crocodylia) aparecieron sobre la tierra, hace aproximadamente 220 millones de años (MA) durante el Triásico tardío (Piña et al., 2004). Están clasificados dentro de la clase Reptilia junto a las tuataras (Sphenodontia), tortugas (Testudines), lagartos y serpientes (Squamata) (Pough et al., 2004); y junto a las aves, son los únicos representantes vivientes de la subclase Archosauria (Seijas, 2011) (**Figura 2**).

El orden Crocodylia agrupa tres familias: Crocodylidae (cocodrilos verdaderos), Alligatoridae (aligators y caimanes) y Gavialidae (Huchzermeyer, 2002; Seijas, 2011) (**Figura 3**).

Figura 3. Filogenia de los Crocodylia. Propuesta por Norell (1989), a la izquierda y Pough et al. (2004), a la derecha.



1.1.4. LOS CROCODYLIA DE SUDAMÉRICA.

Suramérica puede ser considerada como el continente de los Crocodylia, debido a que alberga la mayor diversidad de especies de este grupo. De las 28 especies de cocodrilianos (Eaton, 2010; Hekkala et al., 2011; Shirley et al., 2014; Shirley et al., 2018) un tercio de las especies habitan allí (**Tabla 1**). En la República Argentina están presentes dos especies: *Caiman yacare* y *Caiman latirostris*, diferenciándose principalmente por sus estructuras craneanas y patrones escutelares (Medem, 1983) (**Figura 4**). Ambas especies se distribuyen en el centro-norte del país, pero *C. latirostris* llega más al sur que *C. yacare* (Siroski et al., 2020).

Figura 4. Patrones escutelares y morfología craneana de *Caiman latirostris* y *Caiman yacare*.

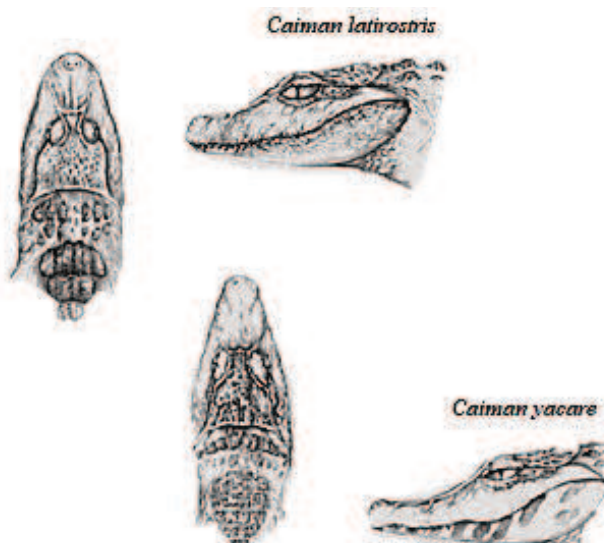


Tabla 1. Especies de cocodrilianos presentes en Sudamérica.

País	Especies de Cocodrilianos
Argentina	<i>Caiman latirostris</i> ; <i>Caiman yacare</i>
Brasil	<i>Caiman latirostris</i> ; <i>Caiman yacare</i> ; <i>Caiman crocodilus</i> ; <i>Melanosuchus niger</i> ; <i>Paleosuchus palpebrosus</i> ; <i>Paleosuchus trigonatus</i>
Bolivia	<i>Caiman yacare</i> ; <i>Melanosuchus niger</i> ; <i>Paleosuchus palpebrosus</i> ; <i>Paleosuchus trigonatus</i>
Colombia	<i>Crocodylus intermedius</i> ; <i>Crocodylus acutus</i> ; <i>Caiman crocodilus</i> ; <i>Melanosuchus niger</i> ; <i>Paleosuchus palpebrosus</i> ; <i>Paleosuchus trigonatus</i>
Ecuador	<i>Crocodylus acutus</i> ; <i>Caiman crocodilus</i> ; <i>Melanosuchus niger</i> ; <i>Paleosuchus palpebrosus</i> ; <i>Paleosuchus trigonatus</i>
Guyana	<i>Caiman crocodilus</i> ; <i>Melanosuchus niger</i> ; <i>Paleosuchus palpebrosus</i> ; <i>Paleosuchus trigonatus</i>
Guyana Francesa	<i>Caiman crocodilus</i> ; <i>Melanosuchus niger</i> ; <i>Paleosuchus palpebrosus</i> ; <i>Paleosuchus trigonatus</i>
Paraguay	<i>Caiman latirostris</i> ; <i>Caiman yacare</i> ; <i>Paleosuchus palpebrosus</i>
Perú	<i>Caiman crocodilus</i> ; <i>Crocodylus acutus</i> ; <i>Melanosuchus niger</i> ; <i>Paleosuchus palpebrosus</i> ; <i>Paleosuchus trigonatus</i>
Surinam	<i>Caiman crocodilus</i> ; <i>Paleosuchus palpebrosus</i> ; <i>Paleosuchus trigonatus</i>
Trinidad y Tobago	<i>Caiman crocodilus</i> ; <i>Paleosuchus palpebrosus</i>
Uruguay	<i>Caiman latirostris</i>
Venezuela	<i>Crocodylus intermedius</i> ; <i>Crocodylus acutus</i> ; <i>Caiman crocodilus</i> ; <i>Paleosuchus palpebrosus</i> ; <i>Paleosuchus trigonatus</i>

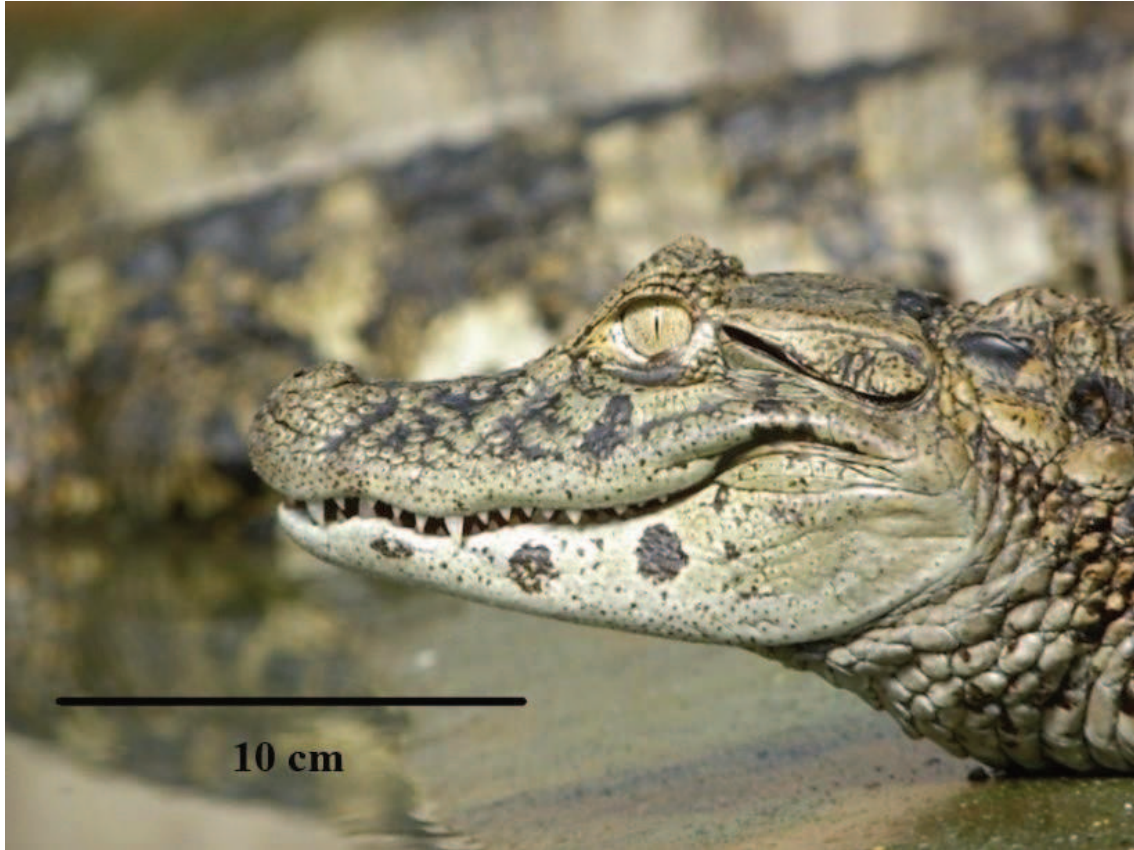
1.2. YACARÉ OVERO (*Caiman latirostris*).

Caiman latirostris también conocido como yacaré overo o ñato (**Figura 5**), es una especie de cocodriliano que pertenece a la familia Alligatoridae. Su nombre común deriva de la distribución de las manchas que lo caracteriza y su hocico robusto y corto, el cual es uno de los más anchos en proporción de entre todos los cocodrilianos.

Como se mencionó anteriormente, y al igual que otros cocodrilianos, *C. latirostris* cuenta con un cuerpo comprimido en forma dorsoventral, con una cola fusiforme, bastante musculosa y cónica (Medem, 1983). Su piel es prácticamente impermeable y con manchas de coloración que le confiere una suerte de camuflaje (Larriera e Imhof, 2006). Individuos adultos pueden medir 2.0 m de longitud y pesar 80 kg, aunque el registro histórico menciona un animal de 3.5 m de longitud, no obstante, es raro encontrar ejemplares de estas dimensiones (Verdade et al., 2010).

A causa de la dependencia de los yacarés a la temperatura del ambiente para el desarrollo de sus actividades, durante las bajas temperaturas, los yacarés limitan su actividad a asolearse y escasamente se movilizan para sumergirse. Llegadas las temperaturas más altas aumentan su actividad, movilizándose constantemente del agua a la tierra y viceversa (Larriera e Imhof, 2006).

Figura 5. *Caiman latirostris*. (Foto. Pablo Siroski).



1.2.1. REPRODUCCIÓN.

El apareamiento ocurre dentro del agua, una vez el macho logra atrapar y cubrir a la hembra. Luego de la fecundación, las hembras se alejan hacia lugares apartados para iniciar la construcción del nido (Yanosky, 1990). El nido con forma de montículo se constituye de tierra, materia vegetal y fecal, que actúa como incubadora natural, que a través del calor generado por el sol y la fermentación producen temperaturas interiores casi constantes durante todo el ciclo, que dura unos 70 días. Las posturas (entre 18 y 50 huevos) se producen entre los meses de diciembre y enero, donde la hembra puede presentar comportamientos agresivos de defensa frente a cualquier intruso que se aproxime al nido (Larriera, 1993; Montini et al., 2006; Verdade et al., 2010).

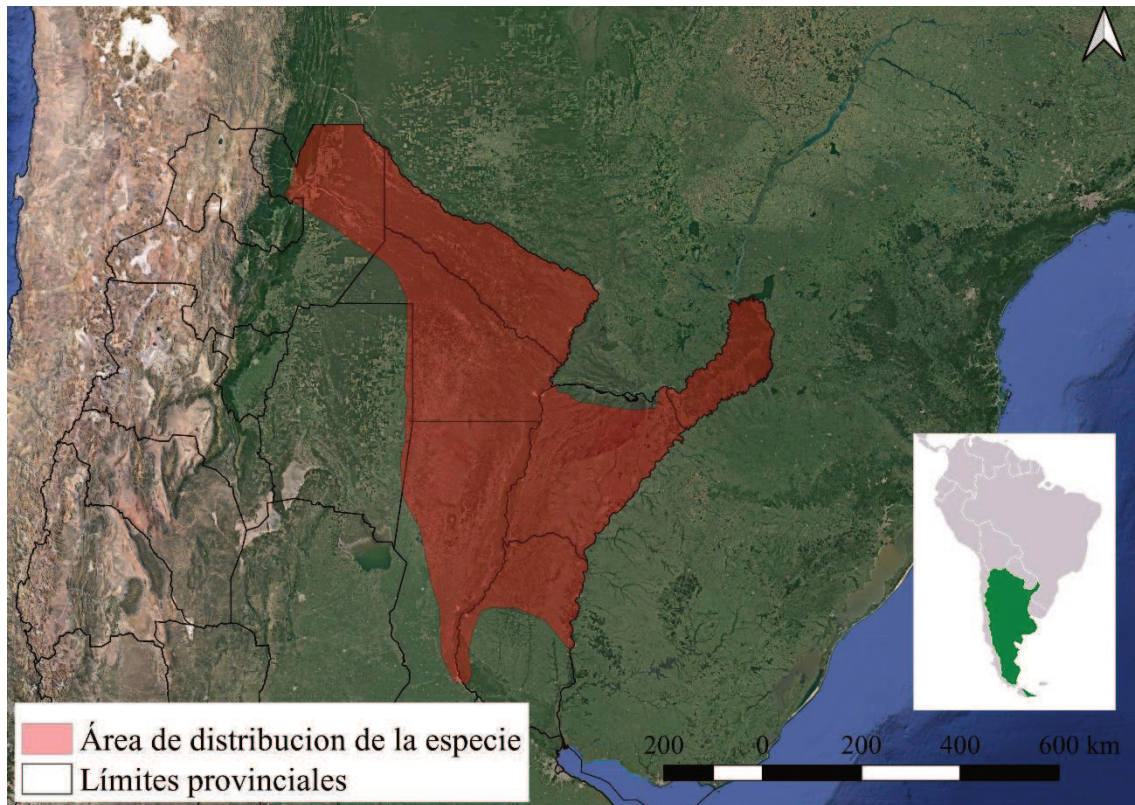
En condiciones naturales, la tasa de eclosión de los huevos varía entre el 30 y el 50% aproximadamente. Esta baja supervivencia embrionaria está relacionada a numerosos factores, como la depredación, presencia de animales domésticos, inundaciones, sequías extremas e incendios, entre otros (Larriera e Imhof, 2006). Los neonatos de *C. latirostris* en promedio pesan 40 g y miden 22 cm de longitud. Debido a su pequeña talla corporal se convierten en presas fáciles para algunos depredadores presentes en el hábitat (Larriera e Imhof, 2006). En el mismo sentido, las bajas temperaturas constituyen una amenaza importante debido a su escasa masa corporal, por lo tanto, en el caso de no encontrar refugios adecuados para evitar las heladas, difícilmente pueden superar los primeros estadios de vida (Larriera et al., 2008).

1.2.2. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA Y HÁBITAT.

El yacaré overo habita en las regiones lacustres de los ríos Paraná, Paraguay, Uruguay y San Francisco, que se extienden por el noreste de Argentina, sureste de Bolivia, Paraguay y el norte de Uruguay. También incluye un gran número de humedales de la costa atlántica en el extremo oriental de Brasil, hasta el noreste de Uruguay (Minucci y Waller, 1995; Verdade et al., 2010).

En Argentina, las poblaciones de *C. latirostris* poseen una amplia distribución que abarca el centro norte del país, estando presente en Misiones, Salta, Santiago del Estero, Jujuy, Chaco, Corrientes, Formosa, Entre Ríos y Santa Fe (Waller y Minucci, 1993; Larriera e Imhof, 2006) (**Figura 6**), habitando ambientes acuáticos de escasa profundidad, con abundante vegetación, clima subtropical-templado y abundante de alimento. En algunos casos estos lugares suelen ser de muy difícil acceso para la mayoría de los predadores (incluso para las personas). Las poblaciones más abundantes de la especie se encuentran en los grandes esteros asociados a las planicies de inundación de los ríos de llanura, como el río Paraná, el Uruguay y el Salado, aunque una fracción de las poblaciones suele permanecer cerca de los canales o cavas de erosión hídrica dentro del bosque y alejados de los espejos de aguas permanentes (Verdade et al., 2010).

Figura 6. Distribución geográfica de *Caiman latirostris* en Argentina. Tomado de Siroski et al. (2022).



1.2.3. DIETA.

El yacaré overo es un depredador oportunista con una dieta generalizada, en sus primeros estadios de vida se alimenta principalmente de insectos y arañas (Santos et al., 1996; Borteiro et al., 2009), mientras en los estadios subsiguientes consumen presas un poco más grandes como, pequeños peces e invertebrados (cangrejos, camarones y caracoles; Melo, 2002). Por último, los adultos de la especie se pueden alimentar de aves, grandes peces y vertebrados terrestres, incluso individuos de su misma especie (Mussart et al., 2006; Verdade et al., 2010).

1.2.4. ESTATUS POBLACIONAL.

Hasta mediados del siglo pasado, las poblaciones de cocodrilianos habían sido disminuidas, principalmente a causa de la caza furtiva para abastecer el comercio ilegal de sus pieles para la industria peletera. La sobreexplotación conllevó a que descendieran los niveles poblacionales críticamente, tanto que para la década de 1970 todas las especies de cocodrilianos estaban en peligro de extinción (Jenkins, 1987).

En Argentina, al igual que el resto de las especies del grupo en todo el planeta, las poblaciones de yacaré overo estaban diezmadas como consecuencia de la caza furtiva y comercio ilegal (Gruss y Waller, 1998). El yacaré overo soportó hasta la década de 1980 una presión de caza importante debido a la calidad de su piel (Siroski et al., 2020). En el presente sus poblaciones se ven afectadas por otras tensiones ambientales, tales como, el avance de la frontera agrícola, la degradación de sus ecosistemas, contaminación ambiental, modificaciones climáticas y la exposición a organismos potencialmente patógenos, entre otros (Larriera e Imhof, 2006; Moleón et al., 2023).

No obstante, con la creación de la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres (CITES) y la firma de sus tratados en 1973 y 1975, que regulan el comercio de pieles de especies en peligro de extinción, se han generado resultados positivos, logrando modificar el estatus de conservación de las poblaciones silvestres de cocodrilianos (Ross, 1998).

En la actualidad, más del 50% de estas poblaciones han mejorado o recuperado sus densidades, debido a los incentivos para la conservación creados a través del uso sostenible (King, 1999) y a la disminución progresiva del uso y el comercio ilegal (Hutton y Webb, 2002). Sin embargo, las poblaciones de cocodrilianos del mundo todavía son blanco de la cacería ilegal, además, ya no es la única razón por la cual son diezmadas, se suman la pérdida y degradación del hábitat, la contaminación del ambiente, y el calentamiento global (Bassetti et al., 2021).

Uno de los mayores desafíos que enfrenta la sociedad actual para el manejo de los recursos naturales, y de la fauna silvestre en particular, es el desarrollo de sistemas de uso sustentable que permitan el aprovechamiento económico de los recursos, sin poner en riesgo su estado de conservación para beneficio de las futuras generaciones (Larriera et al., 2008). En la república Argentina desde hace más de 30 años, se practican con éxito programas de manejo sustentable con estas características, mejorando sustancialmente el estado de las poblaciones silvestres de yacaré en las provincias de Corrientes, Formosa y Santa Fe (Prado, 2012; Larriera, 2022).

1.2.5. CONSERVACIÓN Y USO SUSTENTABLE EN ARGENTINA, “PROYECTO YACARÉ”.

En el año 1990, se inicia en la provincia de Santa Fe, Argentina, un proyecto de manejo del yacaré overo conocido con el nombre de “Programa de Monitoreo y Auto replamamiento de *Caiman latirostris*” (luego -Proyecto Yacare-PY- Convenio Gob. De Santa Fe/MUPCN), para la preservación de la especie y la explotación racional de productos de interés comercial (Larriera, 1990, 2022).

Dicho programa, se basa en el método de “ranqueo” el cual consiste en la identificación y extracción de nidos naturales. Los huevos son marcados en la parte superior de la cáscara, evitando alterar la posición en la que fueron puestos y dañar el embrión, ya que este se fija en la parte superior de la membrana amniótica. Luego son transportados junto al material del nido en recipientes plásticos hasta la estación de crianza (Larriera, 1990). Allí culmina su incubación a una temperatura controlada de $30 \pm 1^\circ \text{C}$, con una humedad del 95% (Larriera e Imhof, 2006). Al nacer, los animales son marcados a través del corte de verticilos caudales (Seija, 2011) y alojados en piletones de 4,5 x 5 m con un sistema de calefacción por losa radiante, con la mitad de la superficie cubierta por agua. La dieta es provista seis veces por semanas *ad libitum* y consiste en un 50% de cabezas de pollo y un 50% de alimento balanceado con formulado para reptiles (Larriera, 1998).

Este método permite aprovechar el potencial reproductivo de las poblaciones naturales, además evita las pérdidas de embriones y de neonatos durante los primeros estadios de vida, y refuerza el reclutamiento poblacional mediante la reintroducción de individuos en una proporción igual o mayor de animales de la que habrían sobrevivido en los mismos lugares donde fueron recolectados los huevos (Larriera, 1990). El excedente es destinado a la obtención de cuero y carne con un enfoque de producción ambientalmente sustentable (Larriera, 2022).

Todas estas actividades son realizadas en colaboración con los pobladores locales como parte de las acciones de educación ambiental y conservación, además de ser compensadas a través de incentivos económicos (Larriera e Imhof, 2006; Larriera et al., 2008). Lo que representa un aporte a la economía regional, e incide positivamente sobre la concientización y el compromiso de los pobladores locales en la preservación del recurso y del ecosistema que los contiene (Larriera, 2022).

1.3. DIETAS PARA LA CONSERVACIÓN DE LA FAUNA.

La industria de la alimentación animal desarrolla pellets para animales de compañía y de granja (Malagie et al., 1998). Ha incluido ingredientes como la glucosamina, la condroitina, la L-carnitina, las fibras, los prebióticos y los probióticos para mejorar la formulación de las dietas artificiales y ha introducido algunos cambios en los procesos de molienda, mezcla, peletización y adición de líquidos post-pellet (grasas, enzimas y/o aromas) (Ravidran, 2010). Para reducir los costos de producción de las dietas artificiales especializadas, la industria de la alimentación animal ha investigado la incorporación de materias primas procedentes de plantas, siendo las más comunes: el maíz (*Zea mays*), el trigo (*Triticum* sp) y la soja (*Glycine max*) (Luchini y Wicki, 2007), las cuales son excelentes fuentes de fibras, carbohidratos, lípidos y proteínas, necesarias para satisfacer las demandas nutricionales y metabólicas de las especies objetivo. Estas materias primas se utilizan en diferentes formas, como granos, harinas, aceites y proteínas aisladas (Rana et al., 2009).

En el caso de las dietas artificiales especializadas para especies silvestres, desde el año 2008 la demanda se ha incrementado en promedio un 11% anual y representa el 5% del total de las ventas en el mundo (Bonessi, 2012; Toledo, 2012), lo que ha provocado que la industria de alimentos para animales se enfoque en mejorar el rendimiento de las materias primas, así como mejorar los procesos y el desarrollo de nuevos productos con la misma calidad nutricional. A pesar de que estos avances satisfacen los requerimientos nutricionales de los animales, los pellets desarrollados siguen siendo costosos, abarcando gran parte del presupuesto de los programas de manejo y conservación (Caldwell, 2012; Sweeting, 2012).

Los planes de manejo sustentable de cocodrilianos suelen incorporar tres categorías de uso consuntivo: recolección en vida silvestre, cría en cautividad y/o cría en granjas (Velasco y De Sola, 1999; Larriera e Imhof, 2006). Al igual que en otras producciones, la cría en cautividad de cocodrilianos contempla el mantenimiento y alimentación de los animales, hasta que estos alcanzan ciertas tallas corporales, lo que en algunos casos representa una elevada proporción de los costos de producción, la cual llega a ser de entre el 50 y 60% del costo total (Rodríguez et al., 1996; Pinheiro y Lavorenti, 2001; Reigh y Willians, 2013, 2016).

Por esta razón, desde finales de los años 80 se han estado llevando a cabo más investigaciones donde se desarrollan y formulan nuevos suplementos alimenticios que complementan y enriquecen las dietas de diferentes especies de cocodrilianos, a través de la incorporación de materias primas y nutrientes vegetales (Staton et al., 1990a), con el objetivo de aumentar la ganancia de peso y otras dimensiones corporales de los individuos y a su vez, optimizar el balance económico-productivo de los planes de manejo sustentable de cocodrilianos (Aleixo et al., 2002).

Para satisfacer las anteriores consignas, varios ingredientes vegetales han sido considerados, sin embargo, dado sus características ha sido la soja la que ha predominado como la mejor opción para suplir las necesidades alimenticias de los cocodrilianos criados en cautiverio, mantener su estado de salud y conservar los costos de producción bajos.

1.3.1. SOJA (*Glycine max*).

La soja (*Glycine max*), una especie de la familia Fabaceae, al ser uno de los cultivos vegetales de mayor producción y exportación en la Argentina (Cuniberti et al., 2011; Colletti et al., 2020), se perfila como buena alternativa de complemento alimenticio, ya que sus semillas poseen ocho de los veinte aminoácidos esenciales (treonina, triptófano, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina y fenilalanina) y se componen en peso seco de: 40% proteína, 20% aceite, 35% carbohidratos y 5% ceniza (Blackman et al., 1992; Colletti et al., 2020). Además, su cultivo favorece al agroecosistema cuando se realiza por rotación estacional, ya que fija el nitrógeno en los suelos agotados por otros cultivos (Martelotto et al., 2001). El grano y los subproductos de la soja, como aceite y harina han demostrado ser excelentes sustitutos o complementos nutricionales de la dieta de otras especies criadas en cautiverio, debido a su bajo costo y polivalencia nutricional (Wicki, et al., 2003; Ortiz, 2009).

Considerando las numerosas virtudes nutricionales mencionadas de la soja, su disponibilidad en el país y el bajo costo resulta de interés evaluar su implementación como complemento alimenticio en la dieta suministrada a especies sometidas a cría intensiva tales como, peces, pollos, pavos, gansos, cerdos, ganado caprino y bovino. Incluso también para especies mantenidas en cautiverio con fines de conservación como múltiples especies de cocodrilianos.

1.4. DEMANDA NUTRICIONAL DE LOS COCODRILIANOS.

Como ya se mencionó anteriormente, los cocodrilos son animales que dependen de la temperatura ambiental para la regulación de su temperatura corporal y metabolismo. De modo tal, que las bajas temperaturas reducen la tasa de digestión de los alimentos, mientras que las altas temperaturas aceleran este proceso (Garnet y Murray, 1986), considerando que temperaturas próximas a los 32°C podían ser óptimas para la digestión y muchos otros procesos metabólicos (Coulson y Coulson, 1986; Richardson et al., 2002; Huchzermeyer, 2003).

Los requerimientos nutricionales de los cocodrilianos no se conocen con tanta profundidad como se conocen en otros taxones. No obstante, se ha observado que los cocodrilianos presentan necesidades proteicas diferentes según su estadio de vida, y que los aminoácidos esenciales para la energía metabólica, desarrollo y crecimiento de estos reptiles son los mismos que requieren los mamíferos, exceptuando la alanina y la glutamina (Coulson y Hernández, 1974). Asimismo, se conoce que la cantidad mínima de proteína necesaria para el mantenimiento del organismo se ubica 0,5 y 0,875 g por kg de peso corporal, con una digestibilidad media del 86,7% pudiendo variar con el metabolismo intrínseco de cada individuo (Coulson et al., 1987; Richardson et al., 2002; Huchzermeyer, 2003).

Históricamente, se ha asumido que la energía necesaria para el crecimiento y mantenimiento de los cocodrilianos proviene únicamente de las proteínas. Sin embargo, también son capaces de utilizar las grasas como fuente alternativa de energía (Coulson y Hernández, 1964). La digestión de las grasas requiere más tiempo que la de otros nutrientes, por lo que el paso del alimento a través del tracto digestivo se retrasa, dando lugar a una digestibilidad superior de las proteínas, por lo tanto, un mayor crecimiento y aumento de peso (Staton et al., 1990b). Para mejorar la digestibilidad proteica de la dieta y evitar problemas de hipoglucemia, se estima que los cocodrilos necesitan ingerir entre 130 y 274 g de grasa por kg de peso corporal (Coulson et al., 1987; Staton et al., 1990a, 1990b; Read, 2000; Richardson et al., 2002; Huchzermeyer, 2003), entre ellos ácidos grasos esenciales como el linoleico, el araquidónico y el docosahexaenoico, ya que un déficit de estas moléculas dentro de las dietas de los cocodrilianos puede provocarles enfermedades como dermatitis, esteatitis, hígado graso, problemas de crecimiento e infertilidad (Staton et al., 1990b).

Existe poca información acerca de las cantidades específicas de vitaminas y minerales que necesitan los cocodrilos para su mantenimiento. Algunos estudios solo indican que un exceso o una deficiencia de estos podría causar problemas (Isberg, 2007). Por otra parte, Fernández et al., (2013) afirman que la vitamina D es importante para el crecimiento de los cocodrilos, ya que interviene en la metabolización del calcio y el fósforo de la dieta en el organismo. No obstante, se ha argumentado que, con solo la inclusión de hueso en la dieta, es suficiente para cubrir la demanda fisiológica de calcio y fósforo de los cocodrilianos (Richardson et al., 2002; Huchzermeyer, 2003).

Los cocodrilianos no pueden masticar su alimento, por lo que su principal mecanismo de reducción de tamaño se produce en el estómago mediante la acción del ácido gástrico y las enzimas digestivas (Diefenbach, 1975). El pH estomacal de los cocodrilianos oscila entre 1,0 y 2,5 similar al de algunas aves de presa y mamíferos, lo que convierte al ácido gástrico en el principal agente de degradación de plumas, exoesqueletos, huesos y otras estructuras duras que forman parte de su dieta (Huchzermeyer, 2003). Asimismo, este rango de pH propicia un ambiente excepcional que potencia la actividad enzimática de endoproteasas como la pepsina, gastrina y quimosina encargadas de la lisis de proteínas, produciendo unidades más pequeñas (polipéptidos) que son más fácilmente degradadas por las enzimas secretadas en el tubo digestivo (Coulson y Hernandez, 1964; Seah et al., 2017).

A lo largo del tiempo, los cocodrilianos fueron considerados carnívoros "estrictos", por lo tanto, su capacidad de degradar y asimilar los nutrientes provenientes de las plantas sería limitada (Coulson y Hernández, 1983). Sin embargo, la fuerte acción del ácido gástrico y las enzimas estomacales, además del descubrimiento de enzimas amilolíticas sugieren que algunas especies de cocodrilos pueden degradar carbohidratos provenientes de las plantas y así aumentar su peso y longitud (Richardson et al., 2002; Huchzermeyer, 2003).

Melstrom e Irmis (2019), en un estudio reciente compararon la morfología dental entre Crocodyliformes fósiles, Crocodyliformes actuales (caimanes, cocodrilos y gaviales), mamíferos y lagartos. En sus análisis concluyen que los Crocodyliformes mesozoicos poseían una dentición "heterodonta", es decir, que sus piezas dentales diferían en tamaño, forma y función, permitiéndoles aprovechar una amplia variedad de ítems alimenticios y

explotar dietas omnívoras, incluso dietas completamente herbívoras, lo que podía resultar beneficioso en entornos hostiles. Otros estudios han informado la observación de varias especies de cocodrilianos consumiendo diferentes especies de plantas (Platt et al., 2013), inclusive deliberadamente (**Figura 7**), enfatizando la capacidad por parte de estos animales de poder digerir e incorporar nutrientes vegetales al torrente sanguíneo y tejidos (Brito et al., 2002).

Figura 7. Juveniles de *Caiman latirostris* alimentándose de *Philodendron selloum*.

Imagen tomada y modificada a partir de Brito et al., 2002.



A lo largo del tiempo se ha recopilado información sobre la dieta y los hábitos alimenticios de 18 de las 28 especies vivas de cocodrilos y se ha informado de una amplia variedad de especies vegetales consumidas, concretamente de 36 familias y 50 géneros de plantas (Tabla 2) (Borteiro et al., 2009; Platt et al., 2013; Staniewicz et al., 2018).

En 14 de estas 18 especies (77,78%), se ha reportado que individuos neonatos, juveniles y adultos consumen diferentes especies de plantas, sobre la base de restos encontrados en los estómagos u observaciones directas (Brito et al., 2002; Platt et al., 2013). Sin embargo, esta información generalmente no se considera relevante y es relegada a secciones comúnmente llamadas "material vegetal", aunque en algunos estudios las plantas representan más del 80% de los componentes hallados (Neill, 1971; McNease y Joanen, 1977; Coulson y Hernández, 1983; Leighton y Leighton, 1983; Thorbjarnarson, 1993; Platt et al., 2006).

Algunas hipótesis que podrían explicar el consumo de material vegetal por parte de algunas especies de cocodrilos son: **a)** Ingestión como "gastrolitos" para ayudar en la digestión mecánica de la dieta o a la flotación del individuo (Diefenbach, 1979); **b)** Ingestión de forma secundaria, es decir, plantas previamente consumidas por sus presas (Webb y Manolis, 1989); **c)** Ingestión accidental durante el intento de captura de alguna presa (Webb y Manolis, 1989); **d)** ingestión de material vegetal para la dispersión de semillas o "saurocoria" (Traveset, 1990), o **e)** Ingestión de material vegetal para mejorar la absorción de nutrientes de la dieta (Hilevski y Siroski, 2021).

A partir de estas observaciones y a causa del aumento de la demanda y comercio de productos derivados de cocodrilianos, la suplementación de las dietas de algunas especies de cocodrilianos con materias primas vegetales comenzó a tener mayor relevancia dentro de los planes de gestión de la conservación (Sweeting, 2012). En la actualidad, la creciente crisis financiera mundial, el exceso de oferta de pieles, los cambios en las fuerzas del mercado y las normas de clasificación más estrictas han hecho que la industria de las granjas de cocodrilos se enfrenten a problemas económicos (Velasco, 2017) y aumente la necesidad de reducir costos y generar nuevos conocimientos sobre cómo hacerlo (Rodríguez et al., 1996; Pérez, 2000; Pinheiro y Lavorenti, 2001; Aleixo et al., 2002).

Debido a que la alimentación de este grupo animal representa entre el 50% y el 60% del valor total de su producción, las investigaciones se enfocaron a mejorar la capacidad productiva de las granjas de cría (Pérez y Escobedo, 2007; Pérez et al., 2009), principalmente utilizando materias primas vegetales dentro de las formulaciones de los alimentos a fin de reducir los costos de alimentación de cocodrilidos y aligatóridos (Tracy et al., 2015; DiGeronimo et al., 2017, Hilevski y Siroski, 2021).

El desarrollo de alimentos balanceados para cocodrilianos que incluyen materias primas vegetales se produjo en la década de 1990. Esto mejoró la dieta y el crecimiento de *Alligator mississippiensis* a menor costo (Caldwell, 2012; Webb et al., 2013). Sin embargo, a principios del año 2000, el éxito en los aligatóridos no había podido ser emulada en los cocodrilidos. Debido a que los aligatóridos absorben mejor los nutrientes de origen vegetal (Tracy et al., 2015) y a que los cocodrilidos no acepten las raciones peletizadas, lo que llevó a que los estudios que evaluaban su uso fueran abandonados.

Tabla 2. Familias y especies de plantas consumidas por cocodrilianos. Información extraída de Borteiro et al. (2009), Platt et al. (2013) y Staniewicz et al. (2018).

Plantas		Especie de cocodriliano
Familia	Especie	
Annonaceae	<i>Anona glabra</i>	<i>Caiman crocodilus.</i>
	<i>Asimina triloba</i>	<i>Alligator mississippiensis.</i>
Araceae	<i>Philodendron selloum</i>	<i>Caiman latirostris.</i>
Arecaceae	<i>Sabal palmetto</i>	<i>Alligator mississippiensis.</i>
	<i>Serenoa repens</i>	<i>Alligator mississippiensis.</i>
Azollaceae	<i>Azolla filiculoides</i>	<i>Caiman latirostris.</i>
Boraginaceae	<i>Heliotropium</i> sp.	<i>Alligator mississippiensis.</i>
Cabombaceae	<i>Brasenia schreberi</i>	<i>Alligator mississippiensis.</i>
Cactaceae	<i>Opuntia</i> sp.	<i>Alligator mississippiensis.</i>
Ceratophyllaceae	<i>Ceratophyllum</i> sp.	<i>Caiman latirostris.</i>
Chrysobalanaceae	<i>Chrysobalanus icaco</i>	<i>Caiman crocodilus.</i>
Convolvulaceae	<i>Ipomoea</i> sp.	<i>Alligator mississippiensis.</i>
Cucurbitaceae	<i>Citrullus lanatus</i>	<i>Crocodylus siamensis.</i>
	<i>Cucurbita</i> sp.	<i>Alligator mississippiensis.</i> <i>Alligator sinensis.</i>
Cupressaceae	<i>Juniperus virginiana</i>	<i>Alligator mississippiensis.</i>
Cyperaceae	<i>Cladium jamaicense</i>	<i>Alligator mississippiensis.</i>
	<i>Eleocharis</i> sp.	<i>Alligator mississippiensis.</i>
	<i>Cyperus papyrus</i>	<i>Crocodylus niloticus.</i>
Fabaceae	<i>Daubentonia</i> sp.	<i>Alligator mississippiensis.</i>
	<i>Phaseolus</i> sp.	<i>Alligator mississippiensis.</i>
	<i>Sesbania macrocarpa</i>	<i>Alligator mississippiensis.</i>
	<i>Vigna luteola</i>	<i>Alligator mississippiensis.</i>
	<i>Quercus laurifolia</i>	<i>Alligator mississippiensis.</i>
Humiriaceae	<i>Sacoglottis gabonensis</i>	<i>Osteolaemus tetraspis.</i>
Hydrocharitaceae	<i>Limnobium spongia</i>	<i>Alligator mississippiensis.</i>
Juglandaceae	<i>Carya</i> spp.	<i>Alligator mississippiensis.</i>
	<i>Juglans nigra</i>	<i>Alligator mississippiensis.</i>
Lauraceae	<i>Persea americana</i>	<i>Crocodylus moreletii.</i>
Malpighiaceae	<i>Byrsonima crassifolia</i>	<i>Crocodylus acutus.</i>
Malvaceae	<i>Gossypium</i> spp.	<i>Alligator mississippiensis.</i>
Meliaceae	<i>Melia azedarach</i>	<i>Alligator mississippiensis.</i>
Moraceae	<i>Ficus racemosa</i>	<i>Crocodylus palustris.</i>
Myricaceae	<i>Myrica</i> sp.	<i>Alligator mississippiensis.</i>
Nelumbonaceae	<i>Nelumbo lutea</i>	<i>Alligator mississippiensis.</i>
Nyssaceae	<i>Nyssa</i> sp.	<i>Alligator mississippiensis.</i>
Palmae	NA	<i>Crocodylus cataphractus.</i>
Passifloraceae	<i>Passiflora incarnata</i>	<i>Alligator mississippiensis.</i>
Poaceae	<i>Echinochloa</i> sp.	<i>Alligator mississippiensis.</i>
	<i>Hydrochloa caroliniensis</i>	<i>Alligator mississippiensis.</i>
	<i>Oryza sativa</i>	<i>Alligator mississippiensis.</i> <i>Crocodylus palustris.</i>
	<i>Zea mays</i>	<i>Alligator mississippiensis.</i>

Tabla 2, continuación. Familias y especies de plantas consumidas por cocodrilianos.
 Información extraída de Borteiro et al. (2009), Platt et al. (2013) y Staniewicz et al. (2018).

Plantas		Especie de cocodriliano
Familia	Familia	
Poaceae	NA	<i>Caiman latirostris.</i>
Polygonaceae	<i>Polygonum spp.</i>	<i>Alligator mississippiensis.</i>
Ricciaceae	<i>Ricciocarpus natans</i>	<i>Caiman latirostris.</i>
Rhizophoraceae	<i>Rhizophora mangle</i>	<i>Caiman crocodilus.</i> <i>Crocodylus acutus.</i>
Rosaceae	<i>Rubus spp.</i>	<i>Alligator mississippiensis</i>
Rutaceae	<i>Citrus sp.</i>	<i>Alligator mississippiensis</i>
Vitaceae	<i>Vitis sp.</i>	<i>Alligator mississippiensis</i>
Taxodiaceae	<i>Taxodium distichum</i>	<i>Alligator mississippiensis</i>
Unidentified	NA	<i>Alligator mississippiensis.</i> <i>Crocodylus moreletii.</i> <i>Crocodylus porosus.</i> <i>Osteolaemus tetrapis.</i> <i>Paleosuchus trigonatus.</i> <i>Tomistoma schlegelii.</i>

En Estados Unidos y con *A. mississippiensis* criados en cautiverio se han llevado a cabo la mayor cantidad de investigaciones donde se han testado materias primas vegetales para mejorar la dieta para cocodrilianos y reducir su costo (Coulson y Hernández, 1964, 1974, 1983; Coulson y Coulson, 1983; Coulson et al., 1987; Staton et al., 1990a,b). En la actualidad, entre el 20 y el 30% de la dieta de *A. mississippiensis* puede consistir en proteínas de origen vegetal, principalmente en forma de concentrados y harinas.

Coulson et al. (1987) añadieron maíz, soja y trigo como complemento alimenticio de la dieta de *A. mississippiensis*, con el objetivo de desarrollar una dieta que satisfaga la demanda nutricional de esta especie. Los resultados y conclusiones obtenidos de esa investigación fueron que las proteínas vegetales como la edestina son poco digeribles, pero pueden ayudar a complementar la dieta de estos animales. Otras proteínas vegetales como la gliadina, aunque son bajas en aminoácidos y no aportan nutrientes, son capaces de dar consistencia al alimento y promover una mejor digestión.

Staton et al. (1990b) evaluaron las respuestas de *A. mississippiensis* frente a grasas, carbohidratos y proteínas vegetales, variando las proporciones de los componentes dietéticos y frecuencia de alimentación de los animales. Sus resultados indicaron que las

dietas con 12% de grasa y 36% de maíz producían ganancias de peso igual o mayor que las dietas con alto porcentaje de proteína, sin maíz ni grasa. También observaron que la ganancia de peso neutra o negativa en algunos animales alimentados con niveles altos de carbohidratos puede deberse a que las respuestas enzimáticas y de insulina de *A. mississippiensis* son limitadas frente a altos niveles de carbohidratos dietarios afectando la digestibilidad de toda la dieta. Sin embargo, un nivel significativo de grasa puede revertir este efecto, promoviendo una digestión lenta de la dieta, pero aumentando la digestibilidad.

Staton et al. (1990a) también evaluaron la respuesta de *A. mississippiensis* frente a la inclusión de proteína vegetal en la dieta, añadiendo 40% de proteína concentrada de soja. La digestibilidad del alimento superó el 96%, resultado similar al obtenido con las dietas que sólo contenían proteína de origen animal. Sustentando la teoría de que las proteínas vegetales sí son digeribles para los cocodrilianos.

En México, especies como *Crocodylus acutus*, *Crocodylus moreletii* y *Caiman crocodilus* han sido alimentados con maíz cocido y croquetas para perro (*Canis familiaris*), las cuales poseen alto porcentaje de nutrientes de origen vegetal. Estos estudios han recomendado la inclusión entre 5 - 20% de harinas vegetales, en función de la proteína animal usada en el alimento y la especie de cocodriliano (Peña-Buñuelos, 2014; Pantoja-Zamora, 2017).

En Zimbabue, algunas grandes granjas de cocodrilos del Nilo (*Crocodylus niloticus*) han utilizado harina de soja como parte del componente proteico del alimento para esta especie de cocodrilo, pero esto ha dejado de hacerse recientemente debido a que la calidad de la soja ha disminuido por problemas con la producción comercial en el país. Algunas granjas siguen utilizando maíz cocido para proporcionar los carbohidratos y aceite de soja para la fracción lipídica necesarios en la dieta (Hilevski y Siroski, 2022). Mientras que, en Papúa, Nueva Guinea, la granja más grande del país ha estado empleando material vegetal (proteínas y carbohidratos) en el alimento para *Crocodylus porosus* y *Crocodylus novaeguineae* recién nacidos y de un año desde finales de la década de 1980 (Hilevski y Siroski, 2022).

En Cuba, Sosa et al. (2011) intentaron incluir pellets de soja en la dieta del cocodrilo cubano (*Crocodylus rhombifer*), con el objetivo de mejorar la nutrición de esta especie. Los alimentaron con tres dietas diferentes, una compuesta de sólo pescado, otra de sólo pellets de soja y una mezcla de ambos. Los resultados de esta investigación fueron que los individuos alimentados con la dieta de sólo pellets de soja logran crecer, pero pesaban menos que los individuos alimentados con la dieta de pescado o la mezcla de pescado y pellet de soja. A pesar de los resultados de Staton et al. (1990a), Sosa et al. (2011) concluyen que la soja no es una fuente nutricional adecuada para complementar la dieta de *C. rhombifer*, afirmando que los nutrientes extraídos de la soja se destinan al mantenimiento del organismo, y se procesan como enzimas, anticuerpos y hormonas.

Las granjas de *C. porosus* en Australia, actualmente no utilizan materias primas vegetales dentro de la dieta de los animales criados, en parte debido a que esta especie no acepta fácilmente pellets secos o semi-húmedos, los cuales normalmente contienen harinas de maíz y soja junto a otros productos cárnicos (Read, 2000; Francis, 2014). Con el tiempo, los pellets han sido refinados, especialmente en lo que respecta a los agentes aglutinantes (véase Peucker et al., 2005; Webb et al., 2013; DiGeronimo et al., 2017). Sin embargo, debido al bajo precio y a la variedad de fuentes de proteína animal disponibles en algunos de los países donde se encuentran estas especies, la investigación no ha continuado (Isberg, 2007; Francis et al., 2017).

Otros investigadores han evaluado el efecto de la inclusión de materia prima vegetal en la salud del cocodrilo. DiGeronimo et al. (2017) alimentaron a dos grupos de *A. mississippiensis*. Un grupo fue alimentado con una dieta compuesta por un 47% de proteína aislada de soja y gluten de trigo (una formulación con requerimientos nutricionales similares a los convencionales para cocodrilianos). El otro grupo de animales fue alimentado con una dieta compuesta por un 56% de proteína de origen animal. Al final del tiempo experimental, realizaron perfiles bioquímicos de la sangre y sacrificaron algunos animales para examinar el hígado y los riñones. Ninguna de las variables evaluadas resultó significativamente diferente entre las dietas probadas. De modo tal, DiGeronimo et al. (2017) coinciden con Staton et al. (1990a; 1990b) y afirman que la asimilación de la proteína vegetal es efectiva y suficiente para cubrir los requerimientos nutricionales de *A. mississippiensis*.

En la actualidad, las materias primas vegetales no sólo son empleadas como complemento o suplemento nutricional dentro de la dieta de cocodrilianos mantenidos en cautividad. También son empleadas como aglutinante y/o aditivo de la dieta artificial para enriquecer y mejorar los perfiles nutricionales y sabor. Este es el caso del alginato, el cual es una sal derivada del ácido algínico que se encuentra en la pared celular de algunas variedades de algas (Avendaño et al., 2013). El alginato se utiliza en la industria alimenticia como espesante o emulsionante. Francis et al. (2017) utilizaron alginato dentro de la alimentación de *C. porosus* criados en cautividad con el fin de aumentar la estabilidad del alimento (pellets) frente al agua y mantener su digestibilidad, determinando la cantidad de alginato y calcio necesaria para mantener la estabilidad del pellet en el agua, sin interferir con la digestibilidad de este. Los resultados obtenidos afirmaron que el alginato añadido mejoró notablemente la digestibilidad de los nutrientes y la integridad del alimento, manteniéndose intactos más tiempo en el agua que cuando son tratados solo con cloruro de calcio. Concluyen que la adición de alginato podría reducir la pérdida de alimento por contacto con el agua y, por tanto, disminuir los costos de producción en las granjas de cocodrilianos.

Otra materia prima vegetal que se ha utilizado son las semillas de lino (*Linum usitatissimum*). Piña et al. (2016), añadieron estas semillas ricas en ácidos grasos insaturados al alimento de *C. latirostris* criados en cautiverio con el objetivo de mejorar la calidad de la carne producida en términos de perfiles lipídicos. Hallaron que la inclusión de lino en la dieta reduce las cantidades de ácidos grasos saturados y aumenta los ácidos insaturados en el músculo (principalmente ácidos grasos palmitoleico, oleico y alfa-linoleico). Estos ácidos grasos insaturados favorecen la reducción del colesterol en la sangre, disminuyendo el riesgo de enfermedades coronarias, cardiovasculares e infartos. Por ello, recomendaron la adición de semillas de lino para mejorar los parámetros de ácidos grasos en la carne de yacaré y generar un producto beneficioso para la salud humana.

Como se ha mencionado anteriormente, se han implementado diferentes materias primas de origen vegetal para el desarrollo y formulación de dietas artificiales específicas para diferentes especies de cocodrilianos, aunque las más usadas han sido el maíz (gluten y grasa), la soja (harina y proteína concentrada) y el trigo (gluten y harina) (Coulson et al., 1987; Staton et al., 1990a; Webb et al., 2013, Peucker y Jack, 2006), confirmándose que,

a pesar de necesitar varias horas para digerirlas, los cocodrilianos son capaces de aprovechar sus nutrientes. Esto basado en los resultados positivos de digestibilidad del alimento, la condición corporal, ganancia de peso y longitud de los animales (Staton et al., 1990b; Sosa et al., 2011).

Se ha estimado que la inclusión de estas materias primas dentro de la dieta de estos animales debe estar entre un 20 y 45% para garantizar su óptimo desarrollo en cautividad. Si se supera el máximo indicado es probable que disminuya la digestibilidad de las dietas y se perjudique el crecimiento, desarrollo y salud de los animales (Staton et al., 1990b; Hilevski y Siroski, 2021).

Es importante señalar que puede haber diferencias entre el consumo de material vegetal “entero” en la naturaleza y los ensayos de laboratorio, en los cuales el material vegetal es “modificado”, con paredes celulares rotas que permiten el acceso a las proteínas, los carbohidratos y los lípidos (Hilevski y Siroski, 2021). También se han evaluado los efectos de la inclusión de los nutrientes vegetales sobre la morfoanatomía intestinal y la salud de los cocodrilianos. Los resultados muestran que este tipo de dieta no perjudica la salud de los individuos. Por el contrario, aportan aminoácidos esenciales y aumentan la superficie intestinal y su tasa de absorción (Tracy et al., 2015; DiGeronimo et al., 2017; Hernández et al., 2018; Hilevski y Siroski, 2021).

1.5. HIPOTESIS

La inclusión de soja dentro de la dieta suministrada a individuos de *Caiman latirostris* criados en cautiverio mejora su desarrollo, ganancia de peso y longitud en los diferentes estadios de vida sin interferir con la salud del animal, reduciendo además los costos de su producción. Dicha hipótesis se corroboró a través de los siguientes objetivos de investigación:

1.6. OBJETIVOS

1.6.1. GENERAL

Implementar una dieta alternativa a base de harina de soja para alimento de *Caiman latirostris* de diferentes estadios etarios con fines de aprovechamiento comercial.

1.6.2. ESPECÍFICOS

- Determinar la digestibilidad de la soja en los ejemplares de *C. latirostris*.
- Fijar los porcentajes adecuados de harina soja para el desarrollo óptimo de *C. latirostris* en cautiverio.
- Monitorear el efecto de la nueva dieta propuesta para *C. latirostris* a través de la toma de indicadores nutricionales, histológicos, bioquímicos, medidas morfométricas y de peso.
- Constituir la suplementación de enzimas digestivas exógenas como aditivo del alimento para yacarés a base de harina de soja.
- Establecer la influencia de la dieta a base de soja en los neonatos y juveniles de *C. latirostris*.
- Caracterización bioinformática y filogenética de la pepsina y progastricina de *C. latirostris*.

2. METODOLOGÍA

Para el desarrollo de esta investigación, se emplearon individuos de yacaré overo que provenían de huevos cosechados en la naturaleza, los cuales fueron incubados artificialmente y criados en cautiverio en las instalaciones de "Proyecto Yacaré" (PY- Laboratorio de Zoología Aplicada-Anexo – Vertebrados – UNL/Gob. Santa Fe).

Dentro del Laboratorio de Zoología Aplicada se encuentran las instalaciones del PY en el que existe la población permanente de aproximadamente 1500 animales de diferentes edades y tamaños en ambientes acondicionados para la crianza y realización de ensayos experimentales.

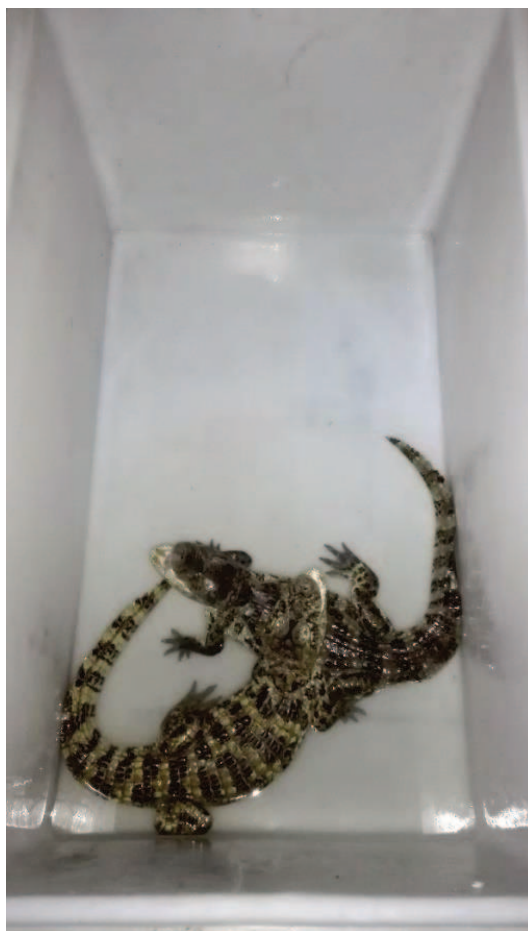
Los protocolos descritos y desarrollados en este estudio fueron evaluados y aprobados por el Comité Asesor de Ética y Seguridad de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina (resolución "FCV 0966480-19"). Además, se contempló la manipulación de los individuos minimizando el estrés y sufrimiento de los individuos, siguiendo las recomendaciones de la Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio (NRC, 2011).

2.1. DIGESTIBILIDAD DE LA HARINA DE SOJA POR PARTE DE LOS EJEMPLARES DE *Caiman latirostris* EN CAUTIVIDAD.

2.1.1. ANIMALES Y ALOJAMIENTO.

Para esta primera instancia experimental, se seleccionaron un total de 24 individuos juveniles de *C. latirostris* de 18 meses de edad, con una media de peso corporal (PC) de 2662,5 g \pm 236,72 DE (desviación estándar); y de longitud desde el extremo de la narina hasta la punta de la cola (Longitud Total - LT) igual a 835,54 mm \pm 50,1 DE. Estos fueron distribuidos al azar, por parejas dentro bateas plásticas de 55 cm de ancho, 95 cm de largo y de 0,5 m de altura. La superficie de vivienda de estas bateas fue dividida en un área seca (33%) y una con agua (67%; 6-10 cm de profundidad) (**Figura 8**). La temperatura del aire y del agua fue mantenida a 31 \pm 1°C, así mismo, las bateas fueron aseadas diariamente antes de alimentar a los animales y luego se agregó agua a temperatura entre 27-30°C.

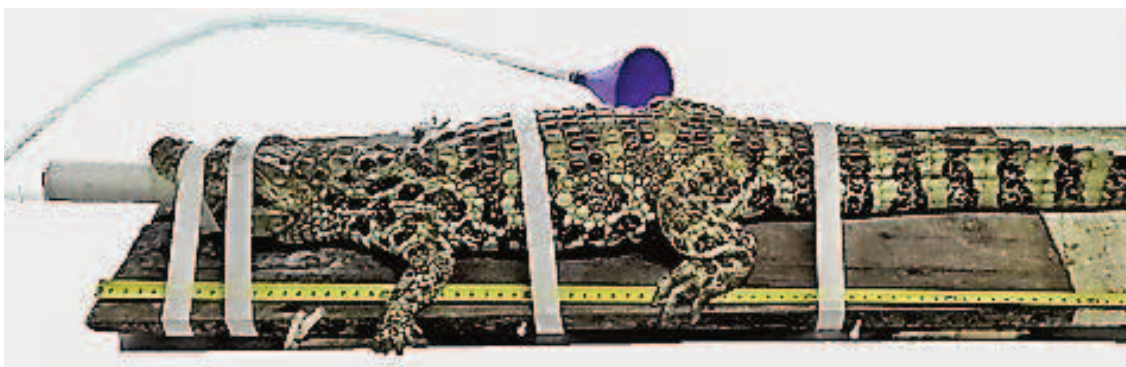
Figura 8. Bateas y condiciones de alojamiento de los individuos *Caiman latirostris* bajo tratamientos de digestibilidad.



2.1.2. LAXADO DEL TRACTO DIGESTIVO

Previo al inicio del ensayo de digestibilidad, cada yacaré fue sometido a un tratamiento laxante, garantizándose que el tracto digestivo estuviese libre de contenido. Típicamente, los animales son mantenidos en ayunas entre 5 y 7 días para lograrlo. Sin embargo, esto puede no ser 100% efectivo para purgar el sistema digestivo, lo cual es requerido para asegurar confiabilidad en los resultados de digestibilidad (Hilevski y Siroski, 2021). Los animales fueron físicamente inmovilizados y se les colocó un tubo de PVC en la boca para mantenerla abierta (Ayarzaguena, 1983) y así poder introducir una sonda bucofaríngea hasta el estómago (**Figura 9**). A través de la sonda fue proporcionado un laxante comercial a base de lactulosa (Lactulon®; 0.65 g de lactulosa por mL), un isómero de lactosa que promueve la acumulación de agua y la disminución del pH en el lumen del colon, lo que a su vez fomenta los movimientos peristálticos del este (Plumb, 2010). Lactulon® fue suministrado una vez al día, durante dos días, en dosis de 1,5 mL por kg de peso del animal (Hilevski y Siroski, 2021).

Figura 9. Inmovilización de los individuos de *Caiman latirostris* e introducción de sondas bucofaríngeas.



2.1.3. DIETAS Y FRECUENCIA DE ALIMENTACIÓN.

Veinticuatro horas después de la segunda dosis de Lactulon®, se procedió a iniciar con las pruebas de digestibilidad. Los animales eran inmovilizados (como se explicó anteriormente; **Figura 9**) y alimentados de manera forzada a través de una sonda bucofaríngea (Ayarzagüena, 1983), tomando todas las precauciones para evitar heridas al esófago debido al diámetro de la sonda.

Los animales fueron divididos en cuatro grupos experimentales. Los yacarés sometidos al tratamiento control (0HS) fueron alimentados con un suplemento comercial que contenía un 100% de proteína bruta derivada de la albúmina de huevo. Los animales sometidos a los tratamientos 20HS, 40HS y 60HS fueron alimentados con dietas experimentales que contenían proteína bruta derivada de la albúmina de huevo y 20%, 40% o 60% de harina de soja (HS). Se añadió óxido crómico (Cr_2O_3) al 0,1%, el cual funciona como marcador indigestible de la dieta (Bolin et al., 1952; Scott y Boldaji, 1997). Los porcentajes de cada componente en cada dieta son mostrados en la **Tabla 3**. Los animales eran alimentados diariamente a razón del 1% de su peso corporal (de acuerdo con lo propuesto por Tracy et al., 2015; Francis et al., 2017) con la dieta correspondiente durante 7 días continuos.

Tabla 3. Composición de las dietas experimentales.

Componente	0HS	20HS	40HS	60HS
Proteína cruda de albúmina de huevo (%)	99,9	79,9	59,9	39,9
Harina de soja (%)	0	20	40	60
Marcador indigestible (Cr_2O_3)	0,1	0,1	0,1	0,1

2.1.4. DETERMINACIÓN DE LA DIGESTIBILIDAD DE LAS DIETAS.

Pasadas veinticuatro horas desde la última alimentación forzada, los animales fueron sacrificados usando el método recomendado por el Grupo de Especialistas en Cocodrilos de la Comisión de Supervivencia de Especies de la Unión Mundial para la Conservación (CSG/SSC/UICN) el cual consta del corte de la médula espinal a través de la región post-occipital del cráneo, seguido inmediatamente del descerebrado y desmedulación del individuo (Martelli et al., 2020). Este método está diseñado en base a las normas internacionales de trato humanitario a los animales y ha sido validado por el Servicio Nacional de Sanidad Animal (SENASA).

Se realizó la necropsia correspondiente a cada yacaré, extrayéndose el sistema digestivo de los animales, y colectando los intestinos. Siguiendo el método de Tracy et al. (2015), el intestino grueso fue separado del intestino delgado y este último fue medido (longitud) y dividido en tres segmentos iguales. Los residuos fecales de cada segmento de intestino fueron colectados, pesados e inmediatamente almacenados en freezer a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su análisis, para minimizar la lixiviación y contaminación de la muestra (Lawrence and Loveridge, 1988).

La digestibilidad de las dietas se pudo conocer a través de la determinación del marcador dietético (óxido crómico) en los residuos fecales de cada individuo (Brisson, 1956) mediante la técnica de digestión ácida (Furukawa y Tsukahara, 1966). Se pesaron 100 mg de heces en un beaker y adicionaron 5 ml de ácido nítrico (HNO_3), dejándose reposar unos minutos. Dentro de una cámara de extracción se transfirió la solución a un balón aforado y se colocó sobre una plancha con calor, agitando con frecuencia durante 20 minutos aproximadamente, hasta que se percibió un viraje de color de las muestras (de amarillo a verde claro). Se dejó enfriar durante 15 minutos y se adicionaron 3 ml de ácido perclórico (HClO_4), virando a un tono marrón y decolorándose poco a poco. Nuevamente se colocó el balón aforado sobre la plancha con calor, agitando con frecuencia durante 10 minutos aproximadamente, hasta lograr un cambio de color (de verde a amarillo limón). Luego se retiró el balón aforado del calor y se dejó enfriar, observándose la formación de un anillo rojizo en el borde del líquido, entonces se adicionó agua destilada (H_2O) a la solución hasta aforar y se agitó en el vórtex (**Figura 10**).

Figura 10. Digestión ácida de muestras de heces de *Caiman latirostris*. Se aprecian dos balones aforados sobre un plancha de calor durante el primer viraje de color de las muestras (de amarillo a verde claro).



Las absorbancias (ABS) de las muestras se midieron en un espectrofotómetro a 350 nm. Estas lecturas se sustituyeron dentro de la fórmula de regresión lineal (**Ecuación 1**) que se obtuvo mediante la curva de calibración (**Apéndice 1**), para determinar las concentraciones de Cr_2O_3 tanto en las dietas, como en heces.

Ecuación 1.

$$y = ax + b$$

y: Concentración de Cr_2O_3 ; **a:** Pendiente de la curva; **x:** ABS; **b:** Ordenada en el origen.

Asimismo, la digestibilidad de la harina de soja se determinó empleando la **Ecuación 2** (NRC, 1983):

Ecuación 2.

$$\% \text{ de Digestibilidad} = 100 - \left[100 \times \left(\frac{\% \text{Cr}_2\text{O}_3 \text{ Heces}}{\% \text{Cr}_2\text{O}_3 \text{ Dieta}} \right) \times \left(\frac{\% \text{Harina de soja Heces}}{\% \text{Harina de soja Dieta}} \right) \right]$$

2.1.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

La distribución de los datos fue determinada a través de la prueba de Shapiro-Wilk. Las diferencias en la digestibilidad total de la harina de soja entre las dietas tratamientos fueron determinadas a través de las pruebas de Kruskal-Wallis y Mann-Whitney, mientras que la presencia/ausencia de alimento en el tracto digestivo se evaluó con un test de Fisher. Estos análisis se realizaron con el programa estadístico SPSS (versión 25, IBM Corporation, Armonk, Nueva York 10504, EE.UU.), y la significación estadística se fijó en alfa 0,05.

2.2. EFECTO SOBRE LA SALUD Y TASA DE CRECIMIENTO A DIFERENTES PORCENTAJES DE HARINA DE SOJA EN LA DIETA DE NEONATOS DE *Caiman latirostris* EN CAUTIVIDAD.

A partir de los resultados obtenidos en el experimento anteriormente expuesto, se evaluó el porcentaje adecuado de inclusión de harina de soja dentro de la dieta de yacaré overo.

2.2.1. ANIMALES Y ALOJAMIENTO.

En esta segunda etapa experimental, fueron seleccionados 48 individuos neonatos de *C. latirostris* de 6 meses de edad, con un peso medio de $62,51 \text{ g} \pm 7,40 \text{ DE}$ y LT media de $274,8 \text{ mm} \pm 11,52 \text{ DE}$. Los yacarés se mantuvieron alojados bajo las condiciones descritas anteriormente en el punto **2.1.1**. Los animales provinieron de 4 nidos diferentes (12 individuos por nido), y fueron distribuidos equitativa y homogéneamente en 3 tratamientos (cada uno por duplicado) de 8 individuos cada uno (4 yacarés de cada nido en cada tratamiento) a fin de controlar el denominado “efecto nido” el cual se define como la influencia de la carga genética transmitida por los parentales al embrión asociado también a la influencia del entorno de incubación de los huevos (Bagatto et al., 2012).

2.2.2. DIETAS Y FRECUENCIA DE ALIMENTACIÓN.

Las dietas experimentales empleadas en esta instancia consistieron en carcasas de pollo molido mezcladas con harina de soja, diferenciándose entre ellas en función de las proporciones de pollo y soja (**Tabla 4**; ver en la **Tabla 5** la información nutricional de los ingredientes de la dieta).

Tabla 4. Composición de las dietas experimentales.

Componente	Dieta		
	0HS	25HS	40HS
Soja (%)	0	25	40
Carcasa de pollo (%)	100	75	60

Los yacarés fueron alimentados con la dieta experimental correspondiente tres veces por semana durante 90 días, con raciones iguales al 1% de su peso corporal (de acuerdo con lo propuesto por Tracy et al., 2015; Francis et al., 2017).

Tabla 5. Información nutricional de los componentes de las dietas experimentales.

Tomado de Ibañez et al., 2020.

Composición	Harina de soja	Carcasa de pollo
Materia seca (%)	84,1	32,8
Humedad (%)	12,1	65,1
Proteína cruda (%)	44,0	56,7
Extracto etéreo (%)	1,9	23,3
Fibra cruda (%)	5,9	0
Ceniza (%)	6,2	20,0
Fibra detergente ácida (%)	7,2	-
Fibra detergente neutra (%)	12,8	-
Lípidos (%)	1,33	-
Carbohidratos (%)	7,1	-
Ácido fítico (%)	0,40	-
Energía metabolizable (kcal/kg)	2240	28
Fosforo (P) (%)	0,61	33
Calcio (Ca) (%)	0,29	32,8

2.2.3. CÁLCULO DE CONSUMO Y TASA DE CONVERSIÓN DE LAS DIETAS.

Para cada una de las dietas experimentales se calculó la tasa de consumo de alimento (TCA) y el respectivo índice de conversión (ICA), para lo cual una ración de cada dieta experimental fue puesta a secar en estufa a 65 °C durante 24 h, a fin de conocer el peso seco de las mismas. Asimismo, el alimento no consumido de las diferentes dietas fue retirado de las bateas y puesto a secar bajo las mismas condiciones mencionadas anteriormente. Esto se hizo para evitar los posibles errores en donde el peso de las muestras puedan contener diferentes cantidades de agua y generar valores erróneos en los cálculos de la TCA y ICA.

Los primeros 30 días del experimento se consideraron como un período de adaptación a las dietas, por lo que los datos de alimento no consumido se colectaron desde el día 31 hasta el día 60. El cálculo del TCA de cada dieta experimental se realizó restando de la ración inicial otorgada y la cantidad de alimento no consumido. Del mismo modo, el ICA se calculó dividiendo el peso ganado de cada animal entre la TCA de la dieta.

2.2.4. GANANCIA DE PESO Y LONGITUD EN FUNCIÓN DE LA CANTIDAD DE HARINA DE SOJA.

En los días 0, 30, 60 y 90 del experimento los animales fueron pesados y medidos (LT) a fin de determinar la eficacia de las dietas.

A fin de determinar el valor óptimo de inclusión de harina de soja en el alimento se realizaron modelos matemáticos empleando los valores promedios obtenidos para la ganancia de peso (GPC) y ganancia longitud total (GLT) (eje de las ordenadas). También se usaron los valores de inclusión de harina de soja en el alimento (eje de las abscisas). Estos valores permitieron generar ecuaciones parabólicas ($y = ax^2 + bx + c$), las cuales se utilizaron para estimar los valores máximos de GP y GLT en función del porcentaje de HS presente en el alimento.

2.2.5. MUESTRAS DE SANGRE Y PROCESAMIENTO

En esta instancia experimental, a cada yacaré le fue extraído 1000 μ L de sangre entera, mediante venopunción del seno venoso espinal, detrás del hueso post-occipital del cráneo (**Figura 11**; Martelli et al., 2020). La sangre fue centrifugada a 3500 rpm durante 15 min, luego se separó el suero y se almacenó a -20 °C hasta la determinación de los niveles séricos de proteínas totales (PT), albúmina (AL), glucosa (GL), colesterol (CH) y triglicéridos (TG). Estos análisis se realizaron siguiendo el protocolo de microtécnica propuesta por Santiago et al. (2021) y realizada en *C. latirostris* por Moleón et al. (2023) utilizando los kits colorimétricos de Wiener lab (Rosario, Argentina) y leídos en el lector de microplacas "nano - CLARIOstar (BMG LABTECH)".

La aplicación de la microtécnica ha demostrado ser eficaz para determinar diferentes parámetros de la bioquímica sanguínea de *C. latirostris*. La posibilidad de utilizar pequeños volúmenes de muestra para llevar a cabo estas determinaciones en individuos de menor porte ofrece la ventaja de complejizar los estudios y aumentar la información a generar para la comprensión de la fisiología de la especie.

En la **Tabla 6** se muestran las condiciones bajo las cuales fueron realizadas las determinaciones bioquímicas (los volúmenes de muestra y reactivos empleados, el tiempo y temperatura de incubación, así como, el rango de absorbancia (ABS) a la cual se midieron las muestras) al suero sanguíneo de los yacarés alimentados con las diferentes dietas experimentales (ver **Tabla 4**).

Figura 11. Ubicación del seno venoso espinal en cocodrilianos. Vista dorsal de la región post-occipital del cráneo de *Crocodylus niloticus*. Los puntos de referencia son la línea media dorsal y los bordes craneales (línea) de los primeros osteodermos dorsales (flechas). El hueso triangular situado cranealmente (flecha 1) y los huesos laterales del atlas (flechas 2) cubren parcialmente el canal intravertebral. La abertura entre el atlas y el axis a través de la cual se accede al seno venoso post-occipital, se indica con la flecha 3. (Tomada de de Myburgh et al., 2014).



Tabla 6. Condiciones para las determinaciones de los perfiles bioquímicos del suero sanguíneo de *Caiman latirostris*.

Condiciones	Parámetros sanguíneos				
	Glucosa	Proteínas Totales	Albúmina	Colesterol	Triglicéridos
Cantidad de suero (µL)	2	2,5	1	2	10
Cantidad de reactivo (µL)	200	175	350	200	100
Tiempo de incubación (min)	10	10	10	10	10
Temperatura de incubación (°C)	37	37	25	37	37
ABS (nm)	505	540	625	505	505

2.2.6. MUESTRAS DE TEJIDOS Y PROCESAMIENTO.

Veinticuatro horas después de la última alimentación, los animales fueron sacrificados usando el método antes descrito en el punto 2.1.4. Luego se realizó la necropsia correspondiente a cada yacaré, extrayéndosele los intestinos y el hígado. El intestino delgado se separó del intestino grueso y fue dividido en tres segmentos iguales (Tracy et al., 2015). Secciones del hígado e intestino fueron sumergidas en formol bufferado 4% v/v, durante 12 horas a fin de fijar las estructuras celulares.

Seguido de esto, las secciones de tejido se lavaron por 10 min en agua y 10 min en buffer PBS para eliminar posibles restos de formol y se conservaron en alcohol etílico 70°. Posteriormente, los tejidos fueron deshidratados en una serie ascendente de etanol, aclarados con xileno e incrustados en bloques de parafina. Por último, mediante el uso de un microtomo los bloques fueron cortados en secciones de 4 µm de grosor, las cuales fueron montadas en portaobjetos y teñidas con hematoxilina y eosina (Sigma-Aldrich) (Tabla 7) para observar todas las estructuras intestinales y hepáticas.

Tabla 7. Reactivos y tiempos de pasajes para el procesado muestras histológicas.

Paso	Reactivo	Tiempo	Paso	Reactivo	Tiempo
1	Alcohol 96°	2 h	19	Alcohol 96°	2 min
2	Alcohol 96°	1 h	20	Alcohol 96°	2 min
3	Alcohol 96°	1 h	21	Alcohol 70°	2 min
4	Alcohol 100°	1 h	22	Agua destilada	5 min
5	Alcohol 100°	1 h	23	Hematoxilina	1-2 min
6	Alcohol 100°	24 h	24	Agua destilada	1 min
7	Xileno	1 h	25	Agua corriente	—
8	Xileno	1 h	26	Agua destilada	1 min
9	Xileno	1 h	27	Eosina	1-2 min
10	Parafina	2 h	28	Agua destilada	15 s
11	Parafina	1,5 h	29	Alcohol 70°	30 s
12	Parafina	1,5 h	30	Alcohol 96°	1 min
13	Entacado	—	31	Alcohol 96°	1 min
14	Montaje	—	32	Alcohol 100°	1 min
15	Xilol	15 min	33	Alcohol 100°	1 min
16	Xilol	10 min	34	Xilol	3 min
17	Alcohol 100°	2 min	35	Xilol	5 min
18	Alcohol 100°	2 min	36	Observación	—

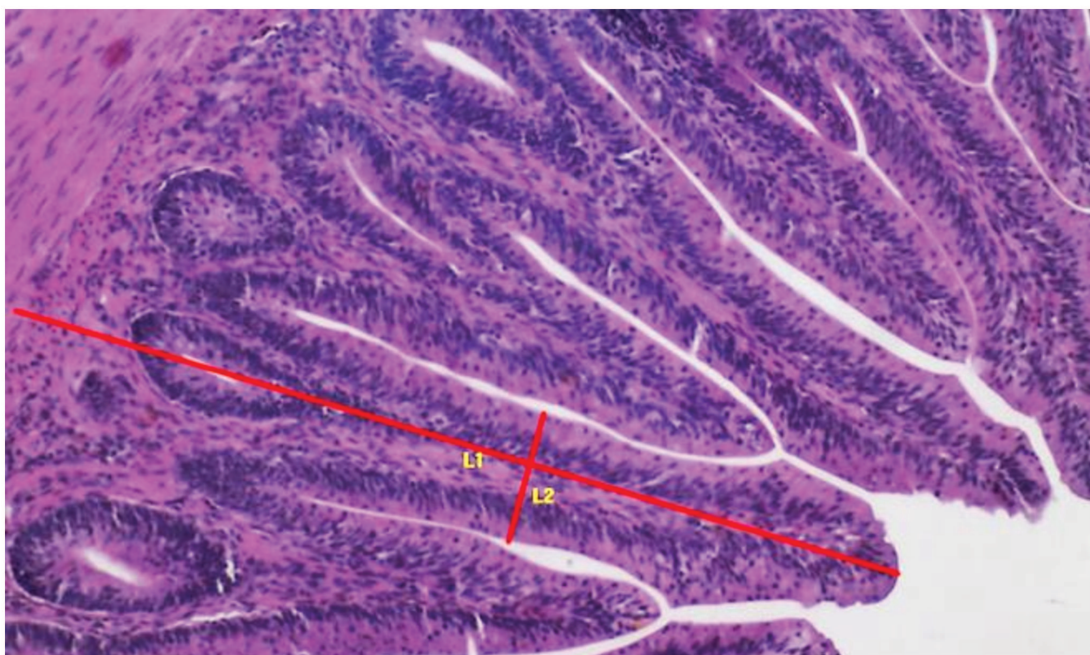
2.2.7. ANÁLISIS DE LA MORFOMETRÍA INTESTINAL Y HEPÁTICA.

Una vez realizados los montajes de las diferentes secciones histológicas, estas fueron evaluadas mediante la digitalización de imágenes microscópicas, tomadas con una cámara fotográfica Nikon DS-Fi2 montada en un microscopio de luz convencional Nikon Eclipse Ci-L Ni (Tokio, Japón), con un aumento objetivo de 40X. Una vez tomadas las imágenes, fueron analizadas con el software Image Pro-Plus 6.0 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA).

Para el estudio morfométrico del intestino proximal, medio, distal y grueso, se midió el crecimiento de la vellosidad intestinal, definido como la superficie epitelial sobre la base de la capa muscular circular interna del intestino hasta la punta de la vellosidad. Por individuo, al azar se seleccionaron un total de cinco vellosidades que estuviesen completas desde su base hasta la punta.

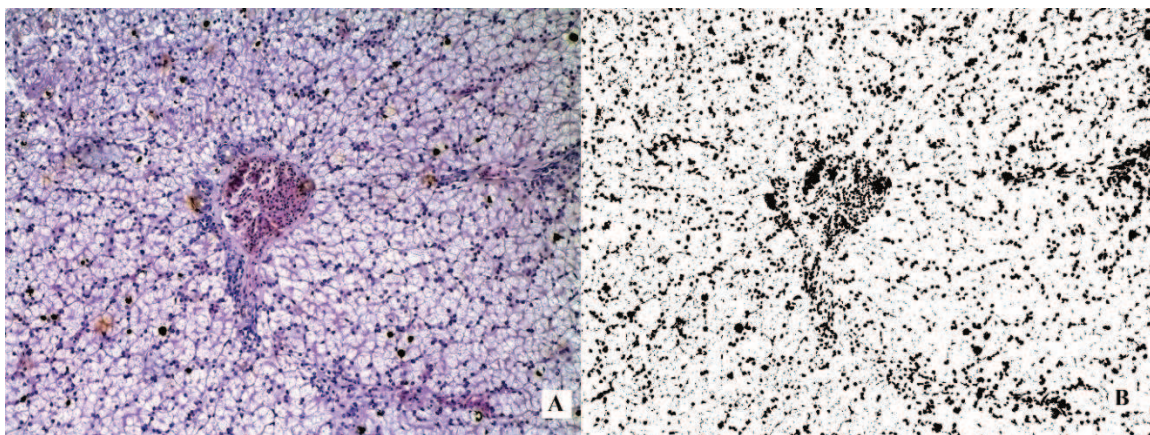
Las mediciones de largo se realizaron trazando una línea recta desde la base de la capa muscular circular interna hasta la punta de las vellosidades, mientras que el ancho se midió en la mitad de la vellosidad, trazando una línea recta del extremo izquierdo al derecho (**Figura 12**).

Figura 12. de Corte transversal del intestino de *Caiman latirostris* (40X). Línea L1 indica la longitud y L2 indica el ancho de la vellosidad intestinal.



Asimismo, para el análisis hepático, para cada individuo se estimó el porcentaje de lípidos presentes en un campo de visión por corte histológico siguiendo el protocolo propuesto por Boursier et al. (2014) con ligeras modificaciones. Primero se marcó positivamente un adipocito (vacuola lipídica de color blanco) y luego se marcó el total de células presentes en el campo de visión. Por último, la imagen fue transformada a blanco y negro para así determinar el porcentaje de adipocitos (blanco) (**Figura 13**).

Figura 13. Corte transversal del hígado de *Caiman latirostris* (40X). En la Figura 12A se observa el corte hepático sin marcar. En la Figura 12B se aprecia marcado de blanco las vacuolas lipídicas del hígado.



2.2.8. RENDIMIENTO ECONÓMICO DE LAS DIETAS EXPERIMENTALES.

Se realizaron entrevistas no estructuradas a múltiples granjas de cría y proyectos de uso sustentable de cocodrilianos como: Caimanes de Formosa S.R.L, Yacaré Pora S.R.L, Yacarés Santafesino (Argentina), Caimasul (Brasil), y Fundo Pecuario Masaguaral (Venezuela), así como a proveedores de materias primas [(Agroservicios Humboldt S.A) Argentina], acerca de los factores [materias primas (cantidades y tipos), transporte, almacenamiento y manejo (preparación del alimento)] y costos de los mismos que influyen sobre el precio final de las dietas de estos animales. Los valores se obtuvieron promediando el consumo mensual de alimento a y bajo la premisa de que el alimento es el mismo en todos los estadios de la especie. Los valores de cada uno de los rubros fueron obtenidos en las monedas del país correspondientes y transformados a dólares estadounidenses (US\$).

2.2.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

La distribución de los datos fue determinada a través de las pruebas de Shapiro-Wilk, Levene y esfericidad de Mauchly. Se aplicaron pruebas de ANOVA de una vía, Kruskal-Wallis, Tukey, y Mann-Whitney para identificar diferencias en el peso y la longitud entre los animales provenientes de los distintos nidos, así como para la TCA, el ICA, las diferentes determinaciones de la bioquímica sanguínea, y la morfometría del hígado de los animales de los distintos tratamientos experimentales.

A fin de detectar variaciones en la ganancia de peso, longitud, bioquímica sanguínea y morfometría del intestino de los animales tratados se emplearon pruebas de ANOVA de dos vías, ANOVA de medidas repetidas y test de Tukey. Estos análisis se realizaron con un programa informático comercial (SPSS versión 25, IBM Corporation, Armonk, Nueva York 10504, EE.UU.), y la significación estadística se fijó en alfa 0,05.

2.3. EFECTO DE LA INCLUSIÓN DE ENZIMAS DIGESTIVAS EXÓGENAS EN LA DIETA DE *Caiman latirostris*.

En conexión con los resultados obtenidos del ensayo anterior, fue evaluada la inclusión de enzimas digestivas en suplementación con la harina de soja dentro de la dieta de neonatos y juveniles de *Caiman latirostris* criados en cautiverio. Este experimento se desarrolló bajo el supuesto de que enzimas digestivas exógenas mejorarían la disponibilidad y absorción de nutrientes provenientes de la harina de soja, y en consecuencia aumentaría la ganancia de peso y de longitud de los yacarés.

2.3.1. ANIMALES Y ALOJAMIENTO.

Fue seleccionado un primer grupo de 54 individuos neonatos de *C. latirostris* de 6 meses de edad, con una media de peso igual a 53,45 g \pm 1,37 DE; y LT media de 253,7 mm \pm 3,3 DE. Estos fueron alojados en bateas plásticas bajo las condiciones descritas anteriormente en el punto 2.1.1. Los animales provinieron de 3 nidos diferentes (18 individuos por nido), y fueron distribuidos equitativa y homogéneamente en 3 tratamientos (cada uno por duplicado) de 9 individuos cada uno (tres yacarés de cada nido en cada tratamiento) a fin de controlar el “efecto nido” (Bagatto et al., 2012).

Un segundo grupo de animales fue seleccionado, 55 individuos juveniles de *C. latirostris* de 18 meses de edad, con una media de peso igual a $3003,22 \text{ g} \pm 504,34 \text{ DE}$; y LT media de $866 \text{ mm} \pm 57,7 \text{ DE}$. Se distribuyeron al azar en dos tratamientos (22 y 23 individuos respectivamente). Fueron alojados en tanques de concreto de 4,50 m de ancho, 4,70 m de largo y de 1 m de alto. La superficie de vivienda de estos tanques fue dividida en un área seca (33%) y una con agua (67%; 25 cm de profundidad) (**Figura 14**). La temperatura del aire y del agua fue mantenida a $29 \pm 2^\circ\text{C}$, así mismo, los tanques eran aseados diariamente antes de alimentar a los animales y vueltas a llenar con agua a temperatura entre $25\text{-}28^\circ\text{C}$.

Figura 14. Tanques y condiciones de alojamiento de los individuos juveniles de *Caiman latirostris*. (Foto de Pablo Siroski).



El diseño experimental de esta segunda etapa, donde se evaluó el desempeño de animales juveniles, se desarrolló de la manera antes explicada debido a características propias de la biología y comportamiento de la especie. En el caso específico de este experimento se debe principalmente a una limitante de espacio, ya que el tamaño de las bateas plásticas usadas en los experimentales previos (punto **2.1.1**), solo aceptan un máximo de dos individuos juveniles de *C. latirostris*.

La densidad de individuos es un factor limitante dentro de la cría de *C. latirostris*, actúa como un estresor de los individuos, lo que a su vez incide sobre el apetito de los yacarés e interfiere directamente con la evaluación y prueba de las dietas (Poletta et al., 2008; Parachú-Marco et al., 2009)

2.3.2. DIETAS Y FRECUENCIA DE ALIMENTACIÓN.

Los yacarés empleados durante este experimento fueron alimentados con la dieta correspondiente tres veces por semana durante 60 días, con raciones iguales al 1% de su peso corporal (de acuerdo con lo propuesto por Tracy et al., 2015; Francis et al., 2017). Las dietas experimentales consistieron en carcasas de pollo molido mezcladas con harina de soja. Las dietas experimentales diferían entre ellas, en función de la enzima contenida (**Tabla 8**), la cual era añadida en una proporción de 150 g de enzima por tonelada de alimento. Las enzimas empleadas fueron AXTRA[®] XAP y AXTRA[®] PHY. La primera es una mezcla comercial de enzimas del tipo xilanasas, amilasas y proteasas, las cuales tienen como sustratos arabinosilanos (fibra vegetal), amilasas (almidón) y proteínas (de origen vegetal). La segunda contiene enzimas del tipo fitasas, las cuales hidrolizan el ácido fítico, un antinutriente presente en la soja que es secuestrante de fósforo, calcio y otros nutrientes (Martínez et al., 2013).

Table 8. Composición de las dietas experimentales.

Componente	Dieta			
	Control	XAP	PHY	XAP+PHY
Harina de soja (%)	25	25	25	25
Carcasa de pollo (%)	75	75	75	75
Enzima (AXTRA [®])	-	XAP	PHY	XAP+PHY

2.3.3. GANANCIA DE PESO Y LONGITUD DE YACARÉ OVERO EN FUNCIÓN DE LA ENZIMA EXÓGENA SUPLEMENTADA.

Durante los días 0, 30 y 60 de este experimento, los neonatos de yacarés overos alimentados con las distintas dietas (**Tabla 8**) fueron pesados y medidos (LT) a fin de determinar la eficacia de las enzimas dentro de las dietas en términos de ganancia de peso y longitud. Del mismo modo, se colectaron los datos de crecimiento de los individuos juveniles, aunque esto se realizó solo antes de iniciar el experimento y al momento de su finalización. Esto a fin de evitar la manipulación excesiva de los animales, ya que los individuos juveniles de *C. latirostris* se estresan fácilmente (Poletta et al., 2008) y esto puede incidir sobre el apetito de los yacarés e interferir directamente con la evaluación de las dietas.

2.3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

La distribución de los datos fue determinada a través de las pruebas de Shapiro-Wilk, Levene y esfericidad de Mauchly. Se aplicaron pruebas de ANOVA de una vía, Kruskal-Wallis, Tukey, y Mann-Whitney para identificar diferencias en el peso y la longitud entre los animales provenientes de los distintos nidos, pruebas de ANOVA de medidas repetidas y Tukey para detectar variaciones en la ganancia de peso y longitud en el tiempo. Estos análisis se realizaron con un programa informático comercial (SPSS versión 25, IBM Corporation, Armonk, Nueva York 10504, EE.UU.), y la significación estadística se fijó en alfa 0,05.

2.4. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE LA PEPSINA Y PROGASTRICINA DE *Caiman latirostris*.

La bioinformática es una herramienta que ayuda a comprender cómo funcionan los sistemas biológicos a nivel molecular y celular a gran escala. En particular, la genómica y proteómica son áreas donde esta herramienta es particularmente útil para identificar mutaciones y variaciones. La bioinformática junto a la filogenética pueden facilitar el entendimiento de los procesos evolutivos de distintas especies y de cómo han resuelto ciertos procesos biológicos, tales como la digestión de materia vegetal en el caso particular de *C. latirostris*.

2.4.1. FILOGENIA DE LA PEPSINA Y PROGASTRICINA DE *Caiman latirostris*.

Para el estudio, caracterización y análisis filogenético de las enzimas digestivas de *C. latirostris* y otros cocodrilianos se practicó un BLAST con las secuencias genéticas de la pepsina y progastricina de *A. mississippiensis* y *C. latirostris*, obteniéndose secuencias correspondientes con la pepsina y progastricina de otras especies según las bases de datos CoGe (Comparative Genomics; <https://genomevolution.org/coge/>) y NCBI/GenBank (National Center for Biotechnology Information/GenBank; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

Las secuencias de pepsina de *A. sinensis*, *C. yacare*, *C. latirostris*, *C. porosus*, *C. rhombifer*, se obtuvieron de la base de datos CoGe, mientras que las secuencias de pepsina pertenecientes a *Salmo salar* (GenBank ID: XM_045692911.1), *Xenopus laevis* (GenBank ID: XM_041586392.1), *Xenopus tropicalis* (GenBank ID: XM_031895194.1), *Crotalus tigris* (GenBank ID: XM_039344276.1), *Protobothrops mucrosquamatus*

(GenBank ID: XM_015821752.1), *Gallus gallus* (GenBank ID: NM_204878.1), *A. mississippiensis* (GenBank ID: XM_019485280.1) se obtuvieron del GenBank.

Del mismo modo, las secuencias de progastricina de *C. yacare*, *C. latirostris*, y *C. rhombifer* se obtuvieron de CoGe, mientras que las secuencias de progastricina pertenecientes a *G. gallus* (GenBank ID: NM_204877.2), *Gavialis gangeticus* (GenBank ID: XM_019514231.1), *A. mississippiensis* (GenBank ID: KYO34227.1), *A. sinensis* (GenBank ID: KY799383.1), *C. porosus* (GenBank ID: XM_019546661.1), *X. laevis* (GenBank ID: XM_018248725.2), *X. tropicalis* (GenBank ID: NM_001015682.1), *Chelonia mydas* (GenBank ID: XM_043533440.1) se obtuvieron del GenBank.

Todas las secuencias estudiadas se alinearon mediante software en línea MAFFT (Multiple Alignment using Fast Fourier Transform; Katoh et al., 2019) y se editaron mediante el software MEGA X (Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms; Kumar et al., 2018). Los modelos de sustitución de nucleótidos mejor ajustados para el análisis de las secuencias de pepsina (TPM3uf+I+G) y progastricina (HKY+G) fueron obtenidos usando el programa JModelTest 2.1.7 (Darriba et al., 2012) considerando el Criterio de Información de Akaike (AIC) (Akaike, 1974).

Para establecer el marco temporal en el que los cocodrilos pueden haber adquirido las proteínas pepsina, progastricina o una secuencia ancestral similar, se estimaron los tiempos de divergencia (tiempo hasta el ancestro común más reciente, TMRCA) entre las secuencias analizadas. El análisis de pepsina y progastricina se realizó utilizando Constant Size como prioridad del árbol y una datación de reloj estricta implementada en el software BEAST 1.8.2 (Drummond et al., 2012), que permitió estimar los tiempos de divergencia incorporando simultáneamente la heterogeneidad de la tasa y la incertidumbre de los parámetros de sustitución, la topología del árbol y las edades de calibración considerando un marco bayesiano (Drummond et al., 2006; Brandley et al., 2010). La secuencia de pepsina y progastricina de *G. gallus* fue seleccionada como raíz de los árboles generados.

Se utilizaron haplotipos únicos, tanto para el análisis de la pepsina, como para el de la progastricina; incorporando los mismos puntos de calibración, división entre 1) grupo externo (*G. gallus*), cocodrilianos, tortugas, lagartos, serpientes y aves; 2) cocodrilianos, tortugas, lagartos, serpientes y aves; 3) cocodrilianos, lagartos, serpientes y aves; 4) cocodrilianos, tortugas, serpientes y aves; 5) cocodrilianos, tortugas, lagartos, y aves; 6) cocodrilianos, tortugas, lagartos, y serpientes.

La calibración de los tiempos de divergencia se realizó tomando como referencia la divergencia entre las aves y los cocodrilianos, datada aproximadamente 240 millones de años (Green et al., 2014). En base a esta referencia, se estimó el TMRCA mediante la distribución normal y una media de 240 MA con una desviación estándar de 5,0 MA. La estimación final para la pepsina y progastricina incluyó 10 millones de generaciones muestreadas.

La convergencia y la estacionalidad fueron evaluadas con el software Tracer v.1.6 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer/>) (Rambaut et al., 2018). Por último, el 10% de las generaciones se descartó como *burn-in* y se resumió la distribución posterior utilizando un árbol consenso de regla mayoritaria y árboles de probabilidades posteriores. Los cladogramas se visualizaron utilizando el programa FigTree v.1.4.4 (Rambaut, 2009).

2.4.2. ANÁLISIS DE LA ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DE PEPSINA Y PROGASTRICINA DE *Caiman latirostris*.

A fin de generar las estructuras tridimensionales de las enzimas digestivas de *C. latirostris*, se tradujo la secuencia genética de la pepsina de *A. mississippiensis* (GenBank ID: XM_019485280.1) a aminoácidos y se realizó un BLAST en UniProt (repositorio donde se preservan y organizan las estructuras tridimensionales de un gran número de proteínas). Esto con el objetivo de hallar la estructura tridimensional de la pepsina de esta especie (UniProt ID: AF-A0A151NXZ1-F1).

La secuencia genética de la pepsina de *C. latirostris* (proveniente de CoGe) también fue traducida a aminoácidos y se introdujo en el servidor automatizado de modelización homológica de estructuras proteicas SWISS-MODEL a fin de generar una aproximación a la estructura tridimensional de la pepsina de *C. latirostris*, tomando como “molde” el modelo tridimensional de la pepsina de *A. mississippiensis* (UniProt ID: AF-A0A151NXZ1-F1)

Para la obtención de la estructura tridimensional de la progastricina se realizaron los pasos anteriormente descritos. En este caso se empleó la secuencia aminoacídica de la progastricina de *C. latiorstris* y como “molde” la estructura tridimensional de la progastricina de *A. mississippiensis* (UniProt ID: AF-A0A151NBR5-F1).

A través PyMol, el cual es un visor molecular de código abierto, se realizaron diferentes alineamientos estructurales entre las enzimas (pepsina y progastricina) de *C. latirostris* y especies de peces, anfibios, serpientes, tortugas y cocodrilianos antes mencionadas, obtenidas a partir de UniProt y SWISS-MODEL. Dado la gran similitud estructural observada entre la pepsina y progastricina de las diferentes especies analizadas, solo se consideraron los alineamientos estructurales de la pepsina entre *C. latirostris/S. salar* (UniProt ID: AF-A0A1S3LFZ3-F1) y *C. latirostris/X. tropicalis* (modelo tridimensional construido en SWISS-MODEL).

Del mismo modo, para la progastricina se consideraron los alineamientos entre *C. latirostris/C. mydas* (modelo tridimensional construido en SWISS-MODEL) y *C. latirostris/X. tropicalis* (UniProt ID: AF-F7ADN3-F1). De los alineamientos estructurales fue extraído el valor de la desviación cuadrática media de las posiciones atómicas (RMSD, expresado en Angstroms). Esta es la métrica comúnmente usada cuando se comparan dos estructuras proteicas, cuanto menor fue el valor del RMSD, mejor fue la alineación entre el par de estructuras.

3. RESULTADOS

3.1. DIGESTIBILIDAD DE LA HARINA DE SOJA POR PARTE DE LOS EJEMPLARES DE *Caiman latirostris* EN CAUTIVIDAD.

Se evaluaron los valores iniciales de las variables peso y longitud total de los animales pertenecientes a los diferentes grupos tratamientos (**Tabla 3**) y no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en estas variables de interés entre los diferentes tratamientos.

La digestibilidad de la harina de soja por parte de *C. latirostris* fue evaluada en cada uno de los segmentos del intestino tanto dentro, como entre cada una de las dietas tratamiento (**Tabla 9**). La digestibilidad total fue calculada promediando los coeficientes de digestibilidad obtenidos de cada sección del intestino delgado, ubicándose entre 89-95 % y siendo diferente entre las dietas tratamientos ($K = 8$; $p = 0,018$; $N = 18$). La digestibilidad total de la dieta 20HS fue ligeramente menor a la digestibilidad de las dietas 40HS y 60HS ($U = 3$; $p = 0,0202$; $N = 18$).

Tabla 9. Coeficiente de digestibilidad de la harina de soja en cada segmento de intestino de *Caiman latirostris*. IDP: Intestino Delgado Proximal; IDM: Intestino Delgado Medio; IDD: Intestino Delgado Distal; IG: Intestino Grueso. Valores expresados como la media \pm desviación estándar (DE). Numerales (#) señalan diferencias entre dietas y letras entre segmentos de intestino ($p < 0,05$).

Dieta	Segmento de intestino				
	IDP	IDM	IDD	IG	Total
20HS	94,29 \pm 6,72 ^A	90,82 \pm 8,77	84,37 \pm 8,96	28,34 \pm 38,93	89,94 \pm 2,87 [#]
40HS	98,73 \pm 0,51 ^B	96,68 \pm 2,14 ^B	90,90 \pm 3,78	74,65 \pm 17,54	95,44 \pm 1,85
60HS	94,83 \pm 4,82	95,63 \pm 3,63	95,60 \pm 3,03 [#]	87,11 \pm 13,02	95,52 \pm 1,73

No se encontraron diferencias significativas entre los coeficientes de digestibilidad de la harina de soja de las dietas 20HS, 40HS, y 60HS en el segmento de intestino IDP, observándose resultados similares en los segmentos IDM e IG. Sin embargo, en el segmento intestinal IDD de la dieta 60HS, el coeficiente de digestibilidad de la harina fue igual a 95,602 % siendo mayor a los obtenidos en el mismo segmento intestinal de las dietas 20HS ($U = 2$; $p = 0,0224$; $N = 17$) y 40HS ($U = 4$; $p = 0,0306$; $N = 17$) (**Tabla 9**).

Los coeficientes de digestibilidad de la soja dentro de la dieta 20HS fueron diferentes en al menos uno de los segmentos de intestino ($K = 10,85$; $p = 0,0125$; $N = 20$). No se encontraron diferencias en los coeficientes de digestibilidad de la dieta 20HS entre los segmentos de intestino IDP e IDM. Sin embargo, el coeficiente de digestibilidad del IDP fue significativamente mayor al del IDD ($U = 3$; $p = 0,0357$; $N = 20$) y al del IG ($U = 0$; $p = 0,0281$; $N = 20$), mientras que los coeficientes de digestibilidad de los segmentos IDM, IDD e IG fueron similares entre ellos (**Tabla 9**).

Un comportamiento parecido fue hallado dentro de la dieta 40HS. Los coeficientes de digestibilidad de la soja dentro de esta dieta fueron diferentes entre al menos uno de los segmentos de intestino ($K = 15,28$; $p = 0,0016$; $N = 21$). El coeficiente de digestibilidad del segmento IDP fue de 98,731% siendo superior a los coeficientes obtenidos en los segmentos IDM ($U = 5$; $p = 0,0453$; $N = 21$), IDD ($U = 0$; $p = 0,0050$; $N = 21$) e IG ($U = 0$; $p = 0,0281$; $N = 21$). Asimismo, la digestibilidad del segmento IDM fue igual a 96,683% siendo mayor a los coeficientes de los segmentos IDD e IG ($U = 2$; $p = 0,0130$; $N = 21$), mientras que los coeficientes de digestibilidad del IDD e IG no difirieron entre sí. Por su parte, la dieta 60HS no exhibió diferencias significativas entre los coeficientes de digestibilidad hallados en los segmentos de intestino evaluados (**Tabla 9**).

Del mismo modo, fue evaluada la digestibilidad de la dieta completa (ovoalbúmina + harina de soja; **Tabla 3**) otorgada a los animales durante el experimento. Como se explicó anteriormente, la digestibilidad total de la dieta fue calculada promediando los coeficientes de digestibilidad obtenidos de cada sección del intestino delgado, ubicándose el promedio entre 97–99 % y siendo diferente la digestibilidad de al menos una de las dietas tratamientos ($K = 17,3$; $p = 0,0006$; $N = 24$). En este caso, la dieta 0HS fue 2% menor al resto de las dietas ($U = 0$; $p = 0,0050$; $N = 24$) (**Tabla 10**).

De manera similar ocurre con la digestibilidad de las dietas en los diferentes segmentos intestinales. En el segmento de intestino IDP el coeficiente de digestibilidad fue diferente entre las dietas ($K = 15,07$; $p = 0,0017$; $N = 24$). El coeficiente de la dieta 0HS fue de 97,658% siendo significativamente menor que el de las dietas 20HS ($U = 0$; $p = 0,0082$; $N = 24$); 40HS ($U = 1$; $p = 0,0050$; $N = 24$) y 60HS ($U = 0$; $p = 0,0081$; $N = 24$) (**Tabla 10**).

Tabla 10. Coeficientes de digestibilidad de las dietas en cada segmento de intestino de *Caiman latirostris*. IDP: Intestino Delgado Proximal; IDM: Intestino Delgado Medio; IDD: Intestino Delgado Distal; IG: Intestino Grueso. Valores expresados como la media \pm desviación estándar (DE). Numerales (#) señalan diferencias entre dietas y letras entre segmentos de intestino ($p < 0,05$).

Dieta	Segmento de intestino				
	IDP	IDM	IDD	IG	Total
0HS	97,65 \pm 1,53 ^A	97,75 \pm 1,61 ^B	95,82 \pm 1,39 ^C	53,11 \pm 35,27	97,07 \pm 0,76 [#]
20HS	99,77 \pm 0,29	99,41 \pm 0,75	98,37 \pm 1,56	59,630 \pm 22,98	99,22 \pm 0,44
40HS	99,96 \pm 0,03	99,79 \pm 0,21	99,96 \pm 0,57	78,88 \pm 32,72	99,57 \pm 0,24
60HS	99,78 \pm 0,18	99,80 \pm 0,17	99,71 \pm 0,23	93,31 \pm 8,17	99,77 \pm 0,10

El coeficiente de digestibilidad en el segmento IDM también fue diferente entre las dietas ($K = 11,85$; $p = 0,0079$; $N = 22$), siendo el coeficiente de digestibilidad de la dieta 0HS igual al 97,750% y menor que el de las dietas 20HS ($U = 4$; $p = 0,0306$; $N = 22$), 40HS ($U = 0$; $p = 0,0050$; $N = 22$) y 60HS ($U = 0$; $p = 0,0142$; $N = 22$) (**Tabla 10**).

Los coeficientes de digestibilidad del segmento de intestino IDD también difirieron entre las dietas tratamientos ($K = 16,05$; $p = 0,0011$; $N = 22$), siendo el coeficiente de la dieta 0HS igual a 95,827% y menor al de las dietas 20HS ($U = 3$; $p = 0,0357$; $N = 22$), 40HS y 60HS ($U = 0$; $p = 0,0050$; $N = 22$). Asimismo, el coeficiente de digestibilidad del segmento de intestino IDD de la dieta 60HS fue igual a 99,718% siendo superior al de las dietas 20HS ($U = 0$; $p = 0,0224$; $N = 22$) y 40HS ($U = 0$; $p = 0,0202$; $N = 22$). Por otra parte, los coeficientes de digestibilidad del intestino grueso no fueron diferentes entre las dietas tratamiento (**Tabla 10**).

La digestibilidad de la dieta 0HS fue diferente entre los segmentos de intestino ($K = 14,99$; $p = 0,0018$; $n = 24$). La digestibilidad de esta dieta en el IG es de 53,113% siendo menor a la de los segmentos IDP ($U = 0$; $p = 0,0050$; $N = 24$), IDM e IDD ($U = 1$, $p = 0,0082$, $N = 24$). A su vez, la digestibilidad del segmento IDP fue significativamente mayor a la digestibilidad del segmento IDD ($U = 5$; $p = 0,0453$; $N = 24$) (**Tabla 10**).

Respecto a la digestibilidad de la dieta 20HS, también fue diferente entre los segmentos intestinales ($K = 14,57$; $p = 0,0022$; $N = 22$). La digestibilidad de esta dieta en el IG fue de 59,630% y significativamente menor a la digestibilidad obtenida para los segmentos IDP, IDM ($U = 0$, $p = 0,0050$, $N = 22$) e IDD ($U = 0$, $p = 0,0121$, $N = 22$).

La digestibilidad de la dieta 20HS en el segmento de intestino IDP fue igual a 99,774%, siendo similar a la digestibilidad en el IDM, pero significativamente superior a la del segmento IDD ($U = 0, p = 0,0357; N = 22$), mientras que entre los segmentos IDM e IDD no se hallaron diferencias (**Tabla 10**).

La digestibilidad de la dieta 40HS también fue diferente entre los segmentos de intestino ($K = 16,29; p = 0,0009; N = 22$), donde la digestibilidad en el intestino grueso fue de 78,884% e igual estadísticamente a la del segmento de intestino IDD y significativamente menor a la de los segmentos IDP ($U = 0; p = 0,0142; N = 22$) e IDM ($U = 1; p = 0,0251; N = 22$). Similarmente, la digestibilidad de la dieta 40HS en el segmento IDD fue igual a 99,965% y menor que en los segmentos IDP ($U = 0; p = 0,0056; N = 22$) e IDM ($U = 1; p = 0,0082; N = 22$). Asimismo, los segmentos de intestino IDP e IDM obtuvieron valores de digestibilidad similares entre ellos. Por último, la digestibilidad de la dieta tratamiento 60HS no varió entre ninguno de los segmentos de intestino (**Tabla 10**).

La **Tabla 11** muestra los datos correspondientes a la presencia o ausencia de restos de alimento en el tracto digestivo (estómago, segmentos de intestino delgado e intestino grueso) de *C. latirostris* tratados con las diferentes dietas (**Tabla 3**). Se encontraron restos de alimento en todos los segmentos del intestino en cada animal bajo los tratamientos dietarios, pero sólo los animales alimentados con la dieta 60HS mantenían restos de alimento en el estómago, siendo esta diferencia significativa ($p < 0,0001; gl = 3$).

Tabla 11. Presencia de residuos de digestión en el tracto digestivo. +: Presencia de residuos de alimento; -: Ausencia de residuos de alimento. IDP: Intestino Delgado Proximal; IDM: Intestino Delgado Medio; IDD: Intestino Delgado Distal; IG: Intestino Grueso. Numerales (#) señalan diferencias entre dietas ($p < 0,05$).

Dieta	Segmento del Sistema Digestivo				
	Estomago	IDP	IDM	IDD	IG
0HS	-	+	+	+	+
20HS	-	+	+	+	+
40HS	-	+	+	+	+
60HS	+ [#]	+	+	+	+

3.2. EFECTO SOBRE LA SALUD Y TASA DE CRECIMIENTO DE NEONATOS DE *Caiman latirostris* ALIMENTADOS CON DIFERENTES PORCENTAJES DE HARINA DE SOJA.

Se realizaron pruebas indagatorias entre los valores iniciales de las variables peso y longitud total de los animales pertenecientes a los diferentes nidos empleados y los grupos tratamientos (**Tabla 4**). No se encontraron diferencias significativas entre los diferentes grupos tratamientos, así como tampoco entre los diferentes nidos empleados, por lo que se descartó la influencia del “efecto nido” sobre los resultados obtenidos relativos a la ganancia de peso y longitud de *C. latirostris* alimentados con dietas enriquecidas con harina de soja.

3.2.1. CONSUMO Y TASA DE CONVERSIÓN DIETARIA.

El promedio de la tasa de consumo de alimento (TCA) fue de 37,86 g/día \pm 10,93 DE (desviación estándar), siendo igual entre las dietas experimentales (**Tabla 12**). Sin embargo, la TCA de los animales alimentados con las dietas 25HS y 40HS tendió a ser ligeramente superior a la TCA de la dieta 0HS.

El promedio del índice de conversión de alimento (ICA) fue igual a 45,69%. Sin embargo, el ICA no fue distinto entre los animales tratados con las diferentes dietas tratamientos (**Tabla 12**). Los yacarés overos alimentados con la dieta 25HS, obtuvieron un ICA 23,72% y 13,14% más eficiente que la de los yacarés alimentados con las dietas 0HS y 40HS respectivamente. Del mismo modo, el ICA de los animales alimentados con la dieta 40HS fue un 10,38% más eficiente que la ICA de los animales alimentados con la dieta 0HS (**Tabla 12**). El grupo de animales de la dieta 0HS necesito más alimento en comparación a los alimentados con 25HS y 40HS. Los yacarés overo alimentado con la dieta 0HS debieron comer 6950 g de alimento para ganar 1000 g de peso, mientras que los animales de los grupos 25HS y 40HS debieron comer 2890 g y 3270 g, respectivamente, para ganar 1000 g de peso.

Tabla 12. Tasa de consumo de alimento (TCA) e índice de conversión de alimento (ICA) de *Caiman latirostris* alimentados con dietas enriquecidas con harina de soja.

Valores expresados como la media \pm desviación estándar (DE).

Dieta experimental	TCA (g/día)	ICA (%)
0HS	34,98 \pm 2,08	34,30 \pm 34,99
25HS	38,49 \pm 2,97	58,02 \pm 34,91
40HS	40,11 \pm 3,85	44,68 \pm 22,99

3.2.2. GANANCIA DE PESO Y LONGITUD EN FUNCIÓN DE LA CANTIDAD DE HARINA DE SOJA.

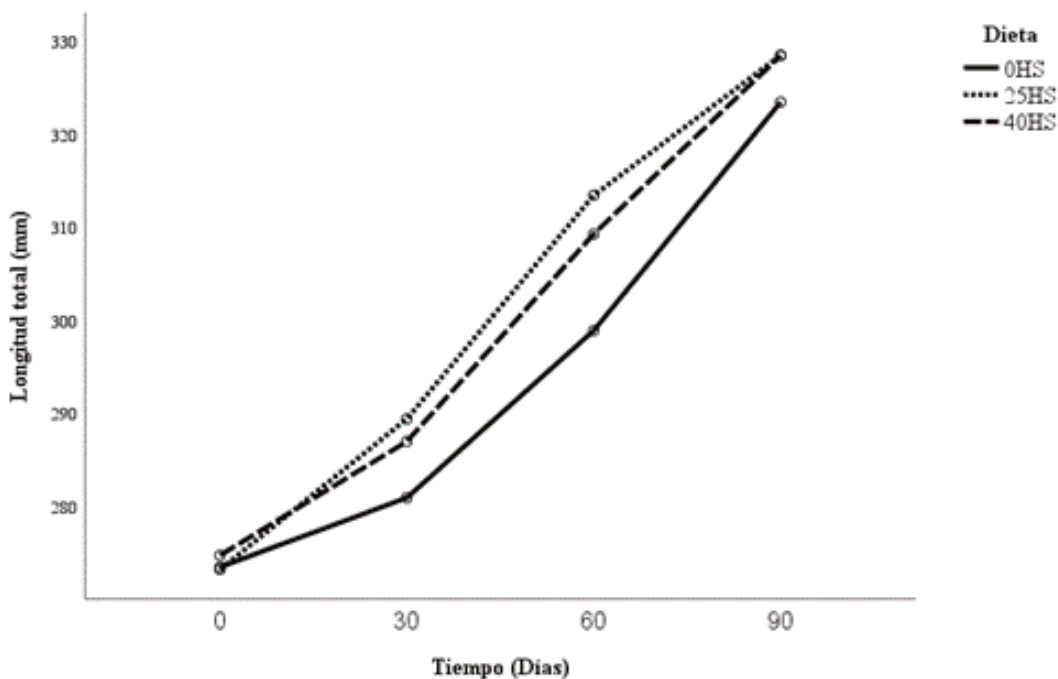
Los datos de crecimiento de los grupos tratados con las diferentes dietas durante el tiempo experimental con relación a las variables LT ($W = 0,022$; $df = 5$; $p < 0,0001$; $N = 44$) y PC ($W = 0,028$; $df = 5$; $p < 0,0001$; $N = 44$) no cumplen con el principio de esfericidad de Mauchly, por lo que los resultados fueron analizados con pruebas estadísticas univariadas.

La ganancia de peso y crecimiento de los animales fue determinada a través de la evaluación de dietas enriquecidas con diferentes cantidades de harina de soja (**Tabla 4**), en función de estas dietas experimentales (**Figura 15 y 16**) se logró establecer la cantidad óptima de soja a incluir en la alimentación de *C. latirostris* criados en cautiverio

Al principio del estudio (0 días), no se encontraron diferencias entre las LT de los animales pertenecientes a los distintos grupos tratamientos. Asimismo, durante el tiempo experimental, los animales tratados mostraron un aumento significativo de la LT ($df = 1,159$; $p < 0,0001$). De esta manera, en el día 30 la LT (285,787 mm \pm 2,134) fue mayor que en el día 0 (273,805 mm \pm 1,674); en el día 60 la LT (307,256 mm \pm 3,349) fue mayor que en los días 0 y 30. Por último, en el día 90 la LT (326,979 mm \pm 4,563) fue mayor que en los días 0, 30 y 60 ($p < 0,0001$) (**Figura 15**).

Las dietas tratamientos no fueron diferentes entre sí a través del tiempo en función de la variable LT. El tratamiento 0HS tuvo una GLT de 2,73%; 6,41% y 8,23% en los días 0-30; 31-60 y 61-90 respectivamente. El tratamiento 25HS tuvo una GLT en los días 0-30 y 31-60 igual a 5,93% y 8,32% respectivamente, mientras que en los días 61-90 su GLT fue igual a 4,81%. Por último, el tratamiento 40HS tuvo una GLT de 4,52%; 7,78% y 6,21% en los días 0-30; 30-60 y 60-90 respectivamente (**Figura 15**).

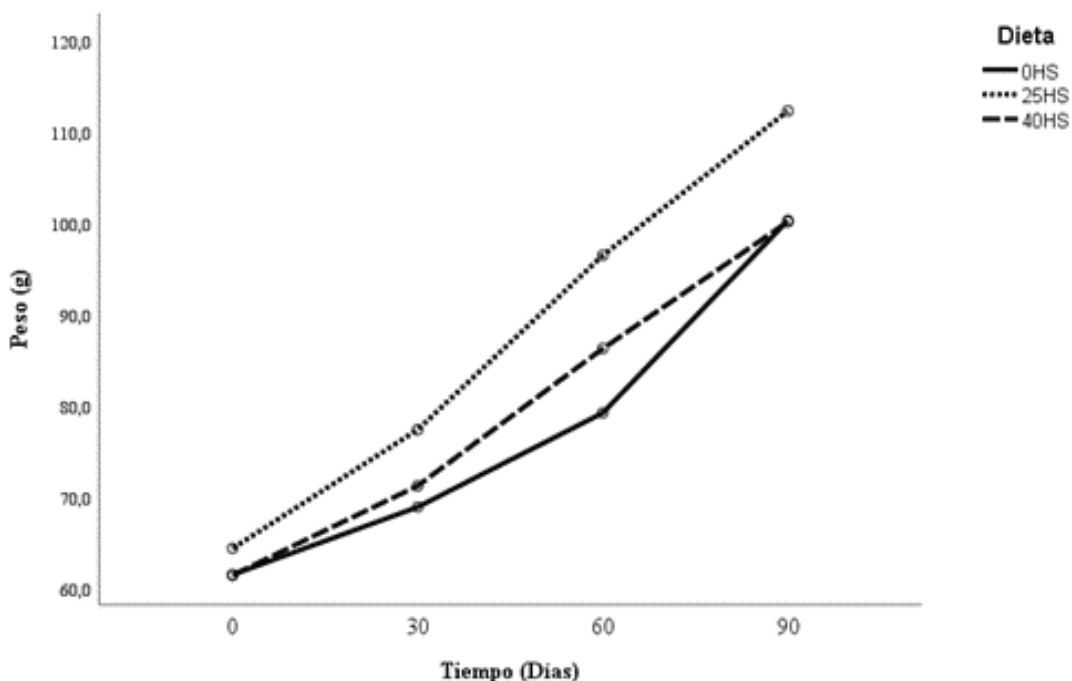
Figura 15. Ganancia de longitud total de *Caiman latirostris* alimentados con dietas enriquecidas con harina de soja.



En cuanto al PC, al inicio del estudio (0 días), no se encontraron diferencias entre los animales pertenecientes a los distintos grupos tratamientos, aunque a través del tiempo experimental, los animales tratados mostraron un aumento significativo de PC ($df = 1,204$; $p < 0,0001$). El PC de los animales en el día 30 ($72,611 \text{ g} \pm 1,949$) fue mayor que en el día 0 ($62,517 \text{ g} \pm 1,085$); en el día 60 el PC ($87,459 \text{ g} \pm 3,551$) fue mayor que en los días 0 y 30. Por último, en el día 90 el PC ($104,433 \text{ g} \pm 5,353$) fue mayor que en los días 0, 30 y 60 ($p < 0,0001$) (**Figura 16**).

El tratamiento 0HS tuvo una GPC de 12,06%; 14,98% y 26,64% en los días 0-30; 31-60 y 61-90 respectivamente. Mientras que el tratamiento 25HS tuvo una GPC en los días 0-30 y 31-60 de 20,24% y 24,70% respectivamente, mientras que en los días 61-90 la GPC fue igual a 16,40%. Por último, el tratamiento 40HS tuvo una GPC de 15,95%, 21,12% y 16,13% en los días 0-30, 30-60 y 60-90 respectivamente (**Figura 16**).

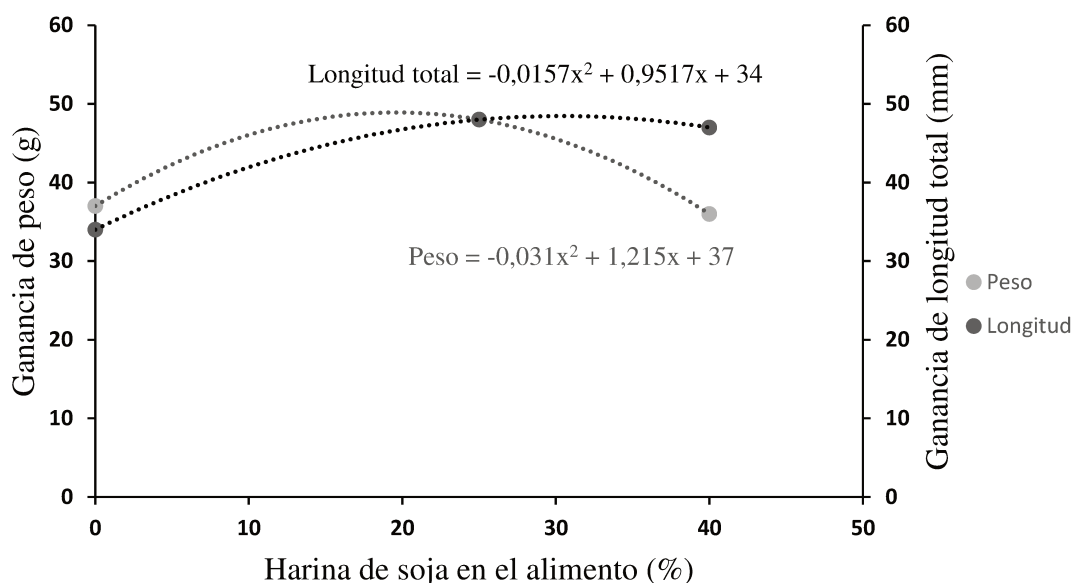
Figura 16. Ganancia de peso de *Caiman latirostris* alimentados con dietas enriquecidas con harina de soja.



Se puede observar en las **Figuras 15 y 16** que la LT y el PC mostraron formas similares entre los animales alimentados con las diferentes dietas. Los animales alimentados con la dieta tratamiento 25HS muestran una tendencia de GLT y GPC superiores a la de los animales alimentados con las dietas 40HS y 0HS en los días 30 y 60.

La **Figura 17** muestra los valores estimados de GLT y GPC a diferentes porcentajes de inclusión de harina de soja en el alimento después de tres meses de alimentación. Se pueden observar las ecuaciones parabólicas que se utilizaron para estimar el resto de los valores que construyen la curva. El valor máximo esperado de GPC fue de 48,9 g al 20% de inclusión de harina de soja. Mientras que el valor máximo previsto de GLT fue de 48,4 mm al 30% de inclusión de harina de soja. Ambas curvas se interceptan al 25%, lo que sugiere que es el valor óptimo de inclusión de harina de soja dentro de la dieta, coincidiendo con los resultados de este estudio (**Figura 15 y 16; Tabla 10 y 12**).

Figura 17. Inclusión óptima de harina de soja en el alimento de *Caiman latirostris*.



3.2.3. DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS BIOQUÍMICOS.

La **Tabla 13** muestra los resultados obtenidos en los análisis del suero sanguíneo de *C. latirostris* alimentados con las diferentes dietas. Es posible apreciar que los valores de Proteínas Totales, Albúmina y Colesterol no se ven alterados por el contenido de harina de soja de las diferentes dietas. Sin embargo, los niveles de Glucosa ($F = 37,2889$; $gl = 2$; $p \leq 0,0001$; $N = 44$;) y Triglicéridos ($F = 12,61$; $gl = 2$; $p \leq 0,0018$; $N = 44$) fueron diferentes entre los animales alimentados con las diferentes dietas.

Los niveles de glucosa presentes en el suero sanguíneo de los yacarés alimentados con las dietas 0HS y 25HS eran similares entre sí. Sin embargo, los animales alimentados con la dieta 40HS presentaron niveles de glucosa iguales a 0,6294 g/L, siendo significativamente inferiores a los hallados en los animales alimentados con las dietas 0HS ($p < 0,001$) y 25HS ($p < 0,001$) (**Tabla 13**).

Del mismo modo, las concentraciones de triglicéridos en el suero sanguíneo de los yacarés alimentados con las dietas 0HS y 25HS no presentaron diferencias entre ellas. No obstante, los animales alimentados con la dieta 40HS obtuvieron una concentración de triglicéridos en sangre igual a 0,1458 g/L, siendo menor a las concentraciones de los animales alimentados con las dietas 0HS ($U = 33$; $p < 0,0010$) y 25HS ($U = 47$; $p < 0,0120$) (**Tabla 13**).

Tabla 13. Perfiles bioquímicos del suero sanguíneo de *Caiman latirostris* alimentados con dietas enriquecidas con harina de soja. Los valores son expresados como la media \pm desviación estándar (DE). Numerales (#) indican diferencias significativas entre las cantidades de harina de soja en el alimento ($p < 0.05$).

Parámetros bioquímicos del Suero sanguíneo	Dieta		
	0HS	25HS	40HS
Proteínas Totales (g/dL)	3,6407 \pm 0,7994	4,2021 \pm 0,9507	3,8347 \pm 0,6806
Albúminas (g/dL)	1,8353 \pm 0,1016	1,8629 \pm 0,1934	1,8227 \pm 0,1652
Glucosa (g/L)	1,2677 \pm 0,1720	1,2517 \pm 0,2633	0,6294 \pm 0,24601 [#]
Colesterol (g/L)	2,1420 \pm 0,5259	2,0586 \pm 0,5604	1,8865 \pm 0,7356
Triglicéridos (g/L)	0,4101 \pm 0,4286	0,2333 \pm 0,0842	0,1458 \pm 0,0783 [#]

3.2.4. ANÁLISIS DE LA MORFOMETRÍA INTESTINAL Y HEPÁTICA.

La longitud de las vellosidades intestinales de *C. latirostris* variaron en función de la dieta suministrada a los animales ($F = 18,651$; $p \leq 0,0001$; $N = 93$), el segmento de intestino ($F: 171,880$; $p \leq 0,0001$; $N = 93$) y la interacción entre estas dos variables ($F = 5,353$; $p = 0,002$; $N = 93$) (**Tabla 14**). La longitud de las vellosidades de los animales alimentados con las dieta 0HS y 40HS no variaron significativamente entre ellas. Sin embargo, los animales alimentados con la dieta 25HS obtuvieron vellosidades más largas que las de los yacarés alimentados con las dietas 0HS ($p = 0.005$) y 40HS ($p \leq 0.0001$).

En función de los segmentos intestinales, el largo de las vellosidades no fue diferente entre los segmentos IDP (86,99 μm) e IDM (81,29 μm). Sin embargo, ambas fueron más largas que las de los segmentos IDD e IG ($p \leq 0,0001$) (**Tabla 14**).

Del mismo modo, la longitud de las vellosidades varió con el segmento intestinal y la dieta con la que fueron alimentados los animales. En el segmento IDP, la longitud de las vellosidades de los yacarés alimentados con las dietas 0HS y 40HS no fueron diferentes entre ellas, mientras que las de los animales alimentados con la dieta 25HS fueron más largas que las de los animales de las dietas 0HS y 40HS ($p \leq 0,0001$). En los segmentos IDM e IDD la longitud de las vellosidades de los animales alimentados con la dieta 0HS no fueron diferentes a las de los yacarés alimentados con las dietas 25HS y 40HS. Sin embargo, la longitud de las vellosidades de los animales de la dieta 25HS fue mayor que la de los animales de la dieta 40HS ($p = 0,022$ y $p = 0,046$ respectivamente). Por último, la longitud de las vellosidades del IG fue igual entre todas las dietas.

Tabla 14. Longitud y ancho de las vellosidades intestinales de *Caiman latirostris* alimentados con dietas enriquecidas con harina de soja. IDP: Intestino Delgado Proximal; IDM: Intestino Delgado Medio; IDD: Intestino Delgado Distal; IG: Intestino Grueso; Promedio total: Promedio de los 4 segmentos. Los valores son expresados como la media \pm desviación estándar (DE). Numerales (#) señalan diferencias entre dietas y letras entre segmentos de intestino ($p < 0,05$).

Dieta	Segmento Intestinal	Medidas morfométricas de la vellosidad	
		Longitud (μm)	Ancho (μm)
0HS	IDP	81,4433 \pm 6,4365 ^A	15,5724 \pm 1,5945
	IDM	82,7778 \pm 14,2205 ^B	12,1611 \pm 2,0241
	IDD	52,4888 \pm 11,9990	9,7489 \pm 2,0959
	IG	15,8966 \pm 4,4420	11,0171 \pm 3,5375
	Promedio total	57,3572 \pm 29,3003	12,1237 \pm 3,2186
25HS	IDP	104,8897 \pm 9,3603 ^A	15,8654 \pm 1,7680
	IDM	87,6048 \pm 5,9799 ^B	12,5252 \pm 1,9893
	IDD	64,9156 \pm 15,5185	11,1333 \pm 0,7662
	IG	11,7683 \pm 4,9853	9,3591 \pm 4,0638
	Promedio total	66,0819 \pm 36,7398 [#]	12,1032 \pm 3,3388
40HS	IDP	76,8798 \pm 11,1810	12,5886 \pm 2,3288
	IDM	72,5908 \pm 15,5023	11,3913 \pm 1,8478
	IDD	51,8036 \pm 13,4342	10,0757 \pm 1,9258
	IG	16,0006 \pm 5,1525	8,6534 \pm 2,5154
	Promedio total	53,7293 \pm 27,0563	10,6542 \pm 2,5635 [#]
Total	IDP	86,9918 \pm 15,0717	14,6237 \pm 2,3897 ^A
	IDM	81,2917 \pm 13,3983	12,0485 \pm 1,9235 ^B
	IDD	56,4027 \pm 14,4891	10,3193 \pm 1,7345
	IG	14,5551 \pm 5,0698	9,6765 \pm 3,4329
	Promedio total	59,0561 \pm 31,4004	11,6270 \pm 3,1040

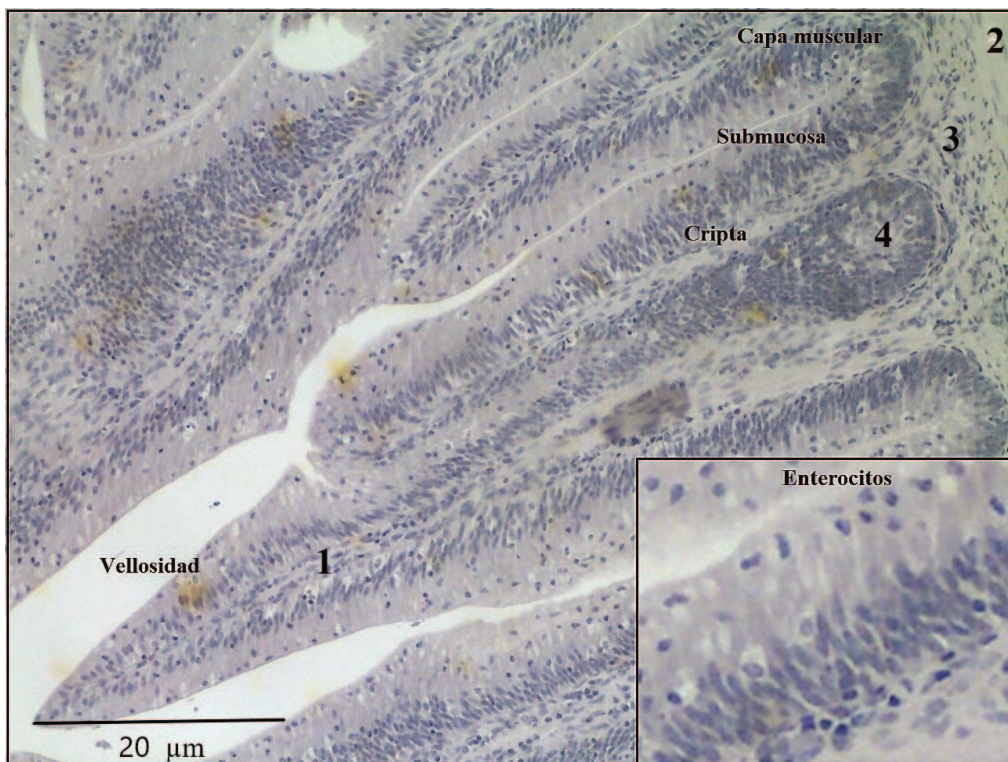
En tanto al ancho de las vellosidades intestinales varió en función de la cantidad de soja en el alimento ($F = 4,108$, $p = 0,020$, $N = 93$) (**Tabla 14**). El ancho de las vellosidades no varió significativamente entre los yacarés alimentados con las dietas 0HS y 25HS, aunque las vellosidades de estos fueron más anchas que las de los animales alimentados con la dieta 40HS ($p = 0,044$ y $p = 0,048$ respectivamente).

De manera similar, el ancho de las vellosidades varió en función del segmento intestinal ($F: 20,666, p \leq 0,0001, N = 93$), siendo las del segmento IDP significativamente más anchas que las de los segmentos IDM, IDD, e IG ($p \leq 0.003$). Las vellosidades del segmento IDM no variaron significativamente de las del IDD, pero si fueron más anchas que las del IG ($p = 0.006$). Por último, el ancho de las vellosidades intestinales no varió entre los segmentos IDD e IG (**Tabla 14**).

El ancho de las vellosidades también varió en función de las dietas y el segmento intestinal. En el segmento IDP, las vellosidades de los animales alimentados con los tratamientos 0HS y 25HS no variaron significativamente entre ellas, pero ambas fueron más anchas que las de los yacarés alimentados con la dieta 40HS ($p = 0,042$ y $p = 0,028$ respectivamente).

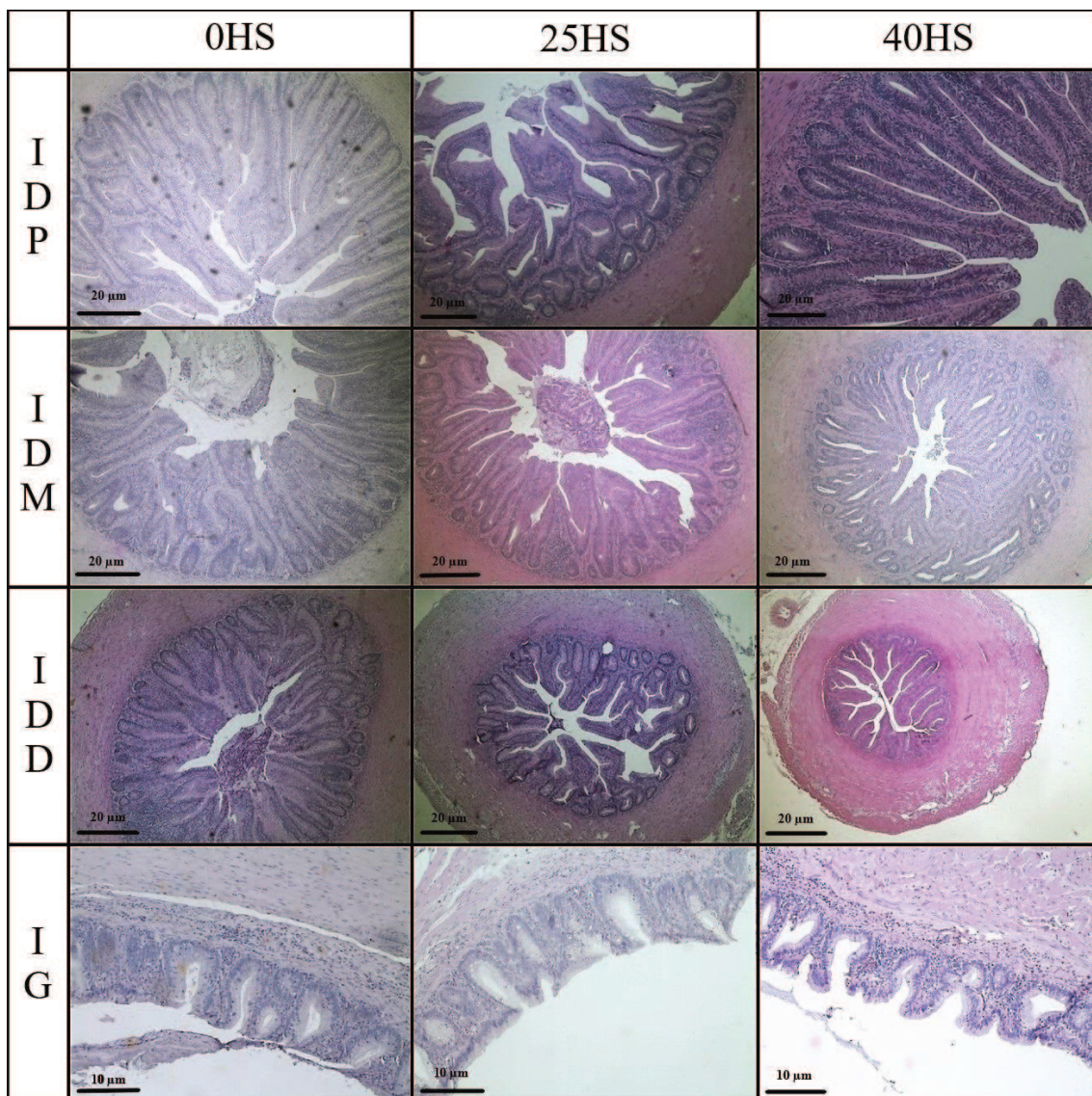
En la **Figura 18** se muestra un corte transversal del intestino delgado de *C. latirostris*, en el cual se observa la mucosa intestinal diferenciándose claramente las vellosidades intestinales (1) y algunas criptas de Lieberkühn (2). También se distingue la capa muscular externa (3) y la submucosa (4). En el recuadro inferior derecho se destaca la presencia de abundante cantidad de enterocitos dentro del epitelio de las vellosidades.

Figura 18. Intestino delgado proximal de *Caiman latirostris*. (400X).



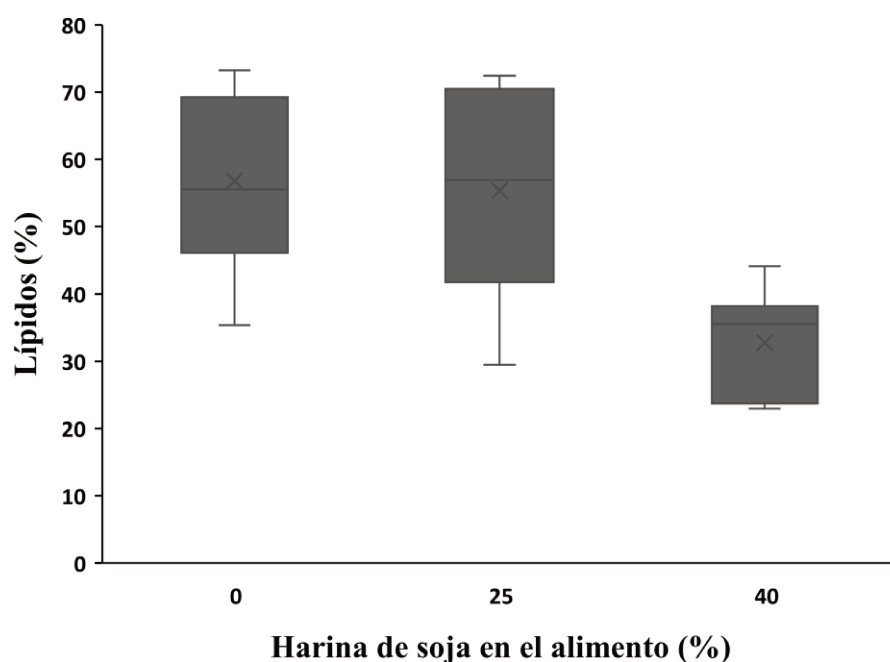
Por otra parte, en la **Figura 19** son presentados algunos de los cortes transversales de intestinos de *C. latirostris* obtenidos durante el desarrollo y testeo de las dietas experimentales (**Tabla 4**). En tal sentido, las imágenes están dispuestas en filas y columnas. Las filas corresponden a cada una de las secciones intestinales [Intestino Delgado Proximal (IDP), Intestino Delgado Medio (IDM), Intestino Delgado Distal (IDD), e Intestino Grueso (IG)]; y las columnas indican las diferentes dietas con las que fueron tratados los animales (0HS, 25HS, y 40HS).

Figura 19. Cortes transversales de intestinos de *Caiman latirostris* alimentados con dietas enriquecidas con harina de soja.



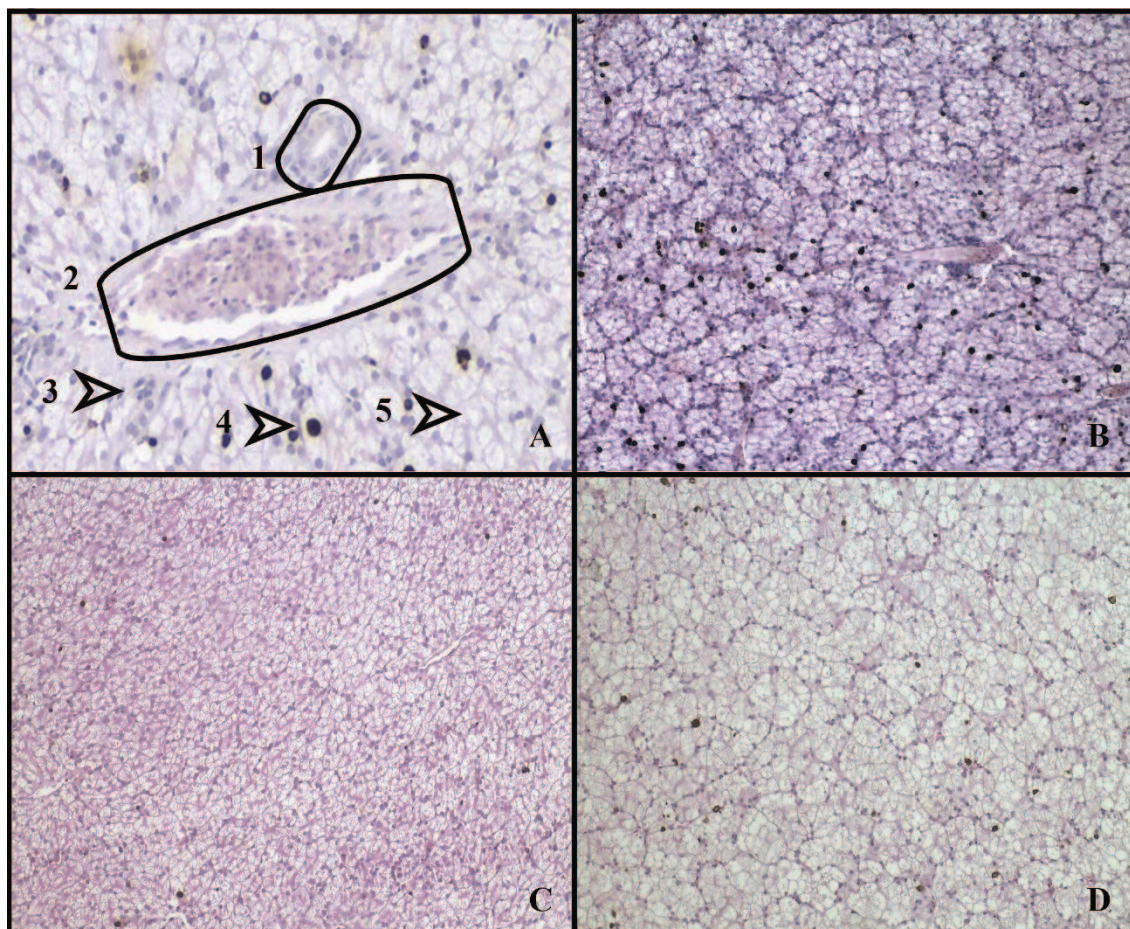
En la **Figura 20** se puede observar el porcentaje de lípidos presentes en el hígado de *C. latirostris* de acuerdo con la cantidad de harina de soja contenida dentro de las dietas tratamiento ($F = 9,032$; $gl\ 2$; $p = 0,001$; $N = 24$). Los yacarés alimentados con las dietas 0HS y 25HS contenían cantidades similares de lípidos en el hígado. Sin embargo, los yacarés alimentados con la dieta 40HS presentaron menor cantidad de lípidos en el hígado que los animales alimentados con las dietas 0HS ($p = 0.003$) y 25HS ($p = 0.005$).

Figura 20. Porcentaje de lípidos presente en el hígado de *Caiman latirostris* alimentados con dietas enriquecidas con harina de soja.



Por otra parte, en la **Figura 21** se muestran algunos de los cortes transversales de hígados de *C. latirostris* obtenidos al final de los testeos de las dietas experimentales (**Tabla 4**). En la **Figura 21A** se puede observar un corte de hígado con la presencia de hepatocitos (3), una arteria hepática (2) y dos conductos biliares (1). También se pueden apreciar cantidades moderadas de hemosiderina (4) y múltiples espacios claros discretos [macro y micro vacuola lipídicas (5)] que representan una lipidosis severa en el hígado. La **Figura 21B** pertenece al hígado de un animal tratado con la dieta 0HS, mientras las **Figuras 21C** y **Figura 21D** corresponden a los hígados de animales tratados con las dietas 25HS y 40HS respectivamente.

Figura 21. Cortes transversales de hígados de *Caiman latirostris* alimentados con dietas enriquecidas con harina de soja (100X).



3.2.5. RENDIMIENTO ECONÓMICO DE LAS DIETAS EXPERIMENTALES.

La **Tabla 15** muestra un análisis del costo de producción de un tipo de alimento para el yacaré overo en Argentina. Estos costos se estimaron en base a la cantidad de alimento consumido por los animales criados en cautiverio en el Proyecto Yacaré, el cual es de una tonelada mensual en promedio. Se compararon los costos de dos tipos de alimento, uno sin harina de soja (100% carcasas de pollo) y otra con harina de soja (75% carcasas de pollo y 25% de harina de soja), siendo el valor de la materia prima para elaborar la dieta sin harina de soja 24% más alto que el valor de la dieta con harina de soja.

Otro de los costos asociados son el del transporte de la materia prima desde el distribuidor hasta las instalaciones de cría. Los valores asociados a este son variables según sea la distancia entre ambas instalaciones. En Argentina, representa el costo más alto dentro de la elaboración de ambas dietas. Sin embargo, el transporte de las materias primas para preparar la dieta con harina de soja es 25 % más económico que el transporte de materias primas para preparar la dieta sin harina.

Tabla 15. Costos de dietas enriquecidas con y sin harina de soja en Argentina.

Valores para preparar una tonelada de alimento.

Costos	Dietas		
	Sin harina de soja	Con harina de soja	
	Carcasas de pollo	Carcasas de pollo	Harina de soja
Materia prima	1000 US\$	750 US\$	10,05 US\$
Transporte	100 US\$	50 US\$	25 US\$
Almacenaje	22 US\$	22 US\$	0 US\$
Manejo	11,22 US\$	8,22 US\$	0,35 US\$
Total	1133,22 US\$	865,62 US\$	

Por otra parte, el almacenamiento y refrigeración de las materias primas para preparar ambas dietas acarrear el mismo costo. Asimismo, la preparación de las dietas, la alimentación de los animales y el exceso de alimento brindado a los animales conlleva pérdidas económicas asociadas a la manipulación de los ingredientes y a factores humanos, los cuales representan aproximadamente el 1% de la sumatoria de los costos de la materia prima, el transporte y almacenamiento, siendo hasta un 23,62% menor este valor en la dieta con harina de soja. Finalmente, la dieta con harina de soja es hasta un 23, 61% más económica que la dieta compuesta solo de carcasas de pollo.

3.3. EFECTO DE LA INCLUSIÓN DE ENZIMAS DIGESTIVAS EXÓGENAS, SOBRE LA DIGESTIBILIDAD DE LA DIETA Y LA TASA DE CRECIMIENTO EN NEONATOS Y JUVENILES DE *Caiman latirostris*.

Los valores iniciales de las variables peso y longitud total de los animales pertenecientes a los diferentes nidos y grupos de tratamiento (**Tabla 8**) se sometieron a pruebas indagatorias. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos de tratamiento ni entre los nidos utilizados, lo que sugiere que el "efecto nido" tampoco fue influyente en los resultados obtenidos en relación con la ganancia de peso y longitud de *C. latirostris* alimentados con dietas enriquecidas con harina de soja y enzimas digestivas.

3.3.1. EFECTO DE LA INCLUSIÓN DE ENZIMAS DIGESTIVAS EXÓGENAS, SOBRE LA TASA DE CRECIMIENTO EN NEONATOS DE *Caiman latirostris*.

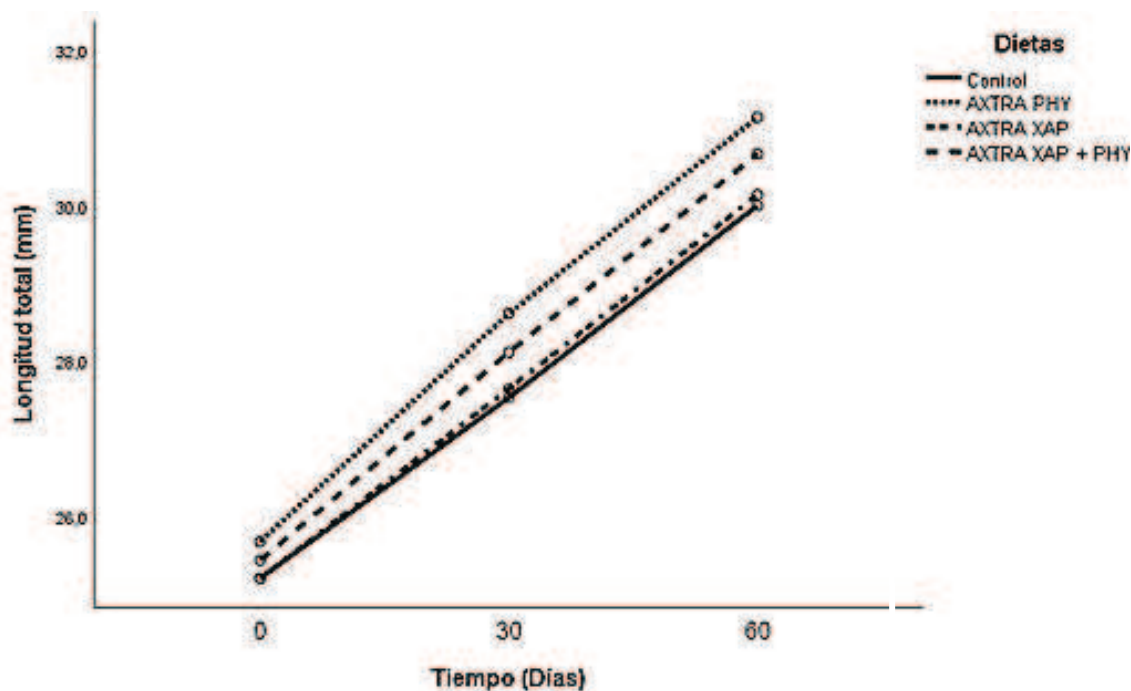
Los datos de crecimiento de los grupos tratados con las diferentes dietas durante el tiempo experimental con relación a las variables LT ($W = 0,273$; $df = 2$; $p < 0,0001$; $N = 72$) y PC ($W = 0,118$; $df = 2$; $p < 0,0001$; $N = 72$) no cumplen con el principio de esfericidad de Mauchly, por lo que los resultados fueron analizados con pruebas estadísticas univariadas.

La inclusión de enzimas digestivas exógenos dentro de la dieta para yacarés overos criados en cautiverio fue establecida mediante una dietas a base de carcasas de pollo suplementadas con 25% de harina de soja y enzimas digestivas AXTRA® XAP y AXTRA® PHY (**Tabla 8**), evaluando la ganancia de peso y longitud total de los animales en función de estas dietas experimentales (**Figura 22 y 23**).

En el inicio del estudio (día 0), no se observaron diferencias en la LT de los animales pertenecientes a los diferentes grupos de tratamiento. Sin embargo, a medida que avanzó el tiempo experimental, los animales tratados mostraron un aumento significativo en su LT ($df = 1,158$; $p < 0,0001$). En el día 30, la LT ($279,720 \text{ mm} \pm 2,480$) fue mayor que en el día 0 ($253,760 \text{ mm} \pm 1,610$). Asimismo, la LT ($304,860 \text{ mm} \pm 3,420$) en el día 60 fue mayor que en los días 0 y 30 ($p < 0,0001$) (**Figura 22**).

No se observaron diferencias en la variable LT entre las dietas de tratamiento a lo largo del tiempo. Durante los días 0-30 y 31-60, el tratamiento control tuvo una tasa de crecimiento de LT (GLT) del 9,24% y 8,98%, respectivamente. El tratamiento que incluyó la enzima AXTRA® XAP tuvo una GLT del 9,68% en los días 0-30 y 9,04% en los días 31-60, mientras que la dieta con la enzima AXTRA® PHY mostró una GLT del 11,45% en los días 0-30 y 8,83% en los días 31-60. Finalmente, la dieta que contenía la mezcla de ambas enzimas tuvo una GLT del 10,53% y 8,33% en los días 0-30 y 31-60, respectivamente (**Figura 22**).

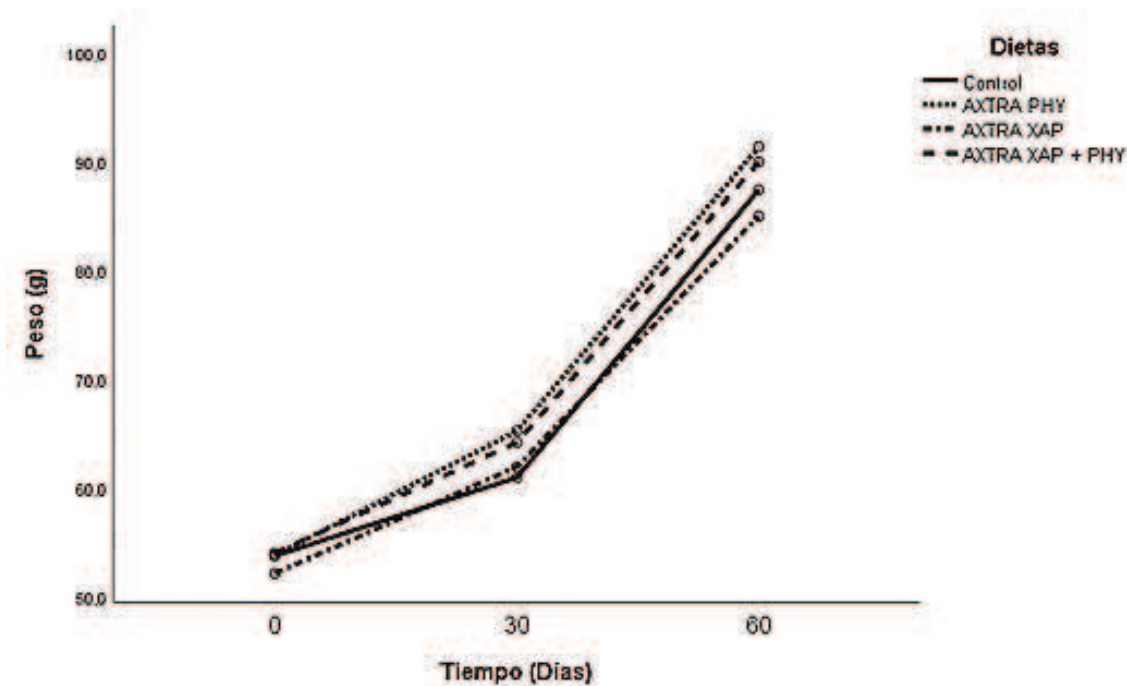
Figura 22. Ganancia de longitud total de neonatos de *Caiman latirostris* alimentados con dietas enriquecidas con harina de soja y enzimas digestivas.



Por otra parte, el PC al día 0 ($53,390 \text{ g} \pm 0,699$), no fue diferente entre los animales pertenecientes a los distintos tratamientos. Sin embargo, todos los individuos experimentaron una GPC significativa a lo largo del tiempo experimental (30 y 60 días) ($df = 1,063$; $p < 0,0001$). En el día 30, el PC ($63,063 \text{ g} \pm 1,240$) fue mayor que en el día 0 ($253,760 \text{ mm} \pm 1,610$). Asimismo, el PC ($88,458 \text{ g} \pm 2,676$) en el día 60, fue mayor que en los días 0 y 30 (*Bonferroni*: $p < 0,0001$) (**Figura 23**).

No se encontraron diferencias en la variable de peso entre las dietas de tratamiento a lo largo del tiempo. Durante los días 0-30 y 31-60, la dieta control registró una GPC del 13,42% y 43,51%, respectivamente. La dieta que incluyó la enzima AXTRA® XAP mostró una GPC del 18,85% en los días 0-30 y 37,26% en los días 31-60, mientras que la dieta con la enzima AXTRA® PHY tuvo una GPC del 21,30% en los días 0-30 y 40,12% en los días 31-60. Por último, la dieta que contenía la mezcla de ambas enzimas registró una GPC del 18,90% en los días 0-30 y 40,26% en los días 31-60 (**Figura 23**).

Figura 23. Ganancia de peso de neonatos de *Caiman latirostris* alimentados con dietas enriquecidas con harina de soja y enzimas digestivas.



3.3.2. EFECTO DE LA INCLUSIÓN DE FITASAS SOBRE LA TASA DE CRECIMIENTO EN JUVENILES DE *Caiman latirostris*.

Del mismo modo que en el estudio de enzimas digestivas en las dietas para neonatos de *C. latirostris*, también se incluyeron enzimas digestivas dentro de la dieta para individuos juveniles de la especie criados en cautiverio. En este caso, la dieta se compuso de 75% carcasas de pollo molidas; 25% de harina de soja y la enzima digestiva AXTRA® PHY. Esto debido a que previamente, esta fue la dieta que generó mejores resultados respecto a la ganancia de peso y de longitud total en los individuos de 6 meses de edad (**Figura 22 y 23**).

Transcurrido el periodo experimental, la GLT y el GPC de los juveniles de *C. latirostris* tratados con las dietas con y sin enzimas no fueron diferentes entre los grupos. La GLT de los animales alimentados con la dieta con la enzima AXTRA® PHY fue de 79 mm \pm 39,26; mientras que la GPC fue de 737,08 g \pm 350,79. Por otra parte, la GLT de los animales alimentados con la dieta sin enzimas fue de 85 mm \pm 24,38; mientras que la GPC fue de 700,67 g \pm 264,74 (**Figuras 24 y 25**).

Figura 24. Ganancia de longitud total de juveniles de *Caiman latirostris* alimentados con dietas enriquecidas con harina de soja y enzimas del tipo fitasas.

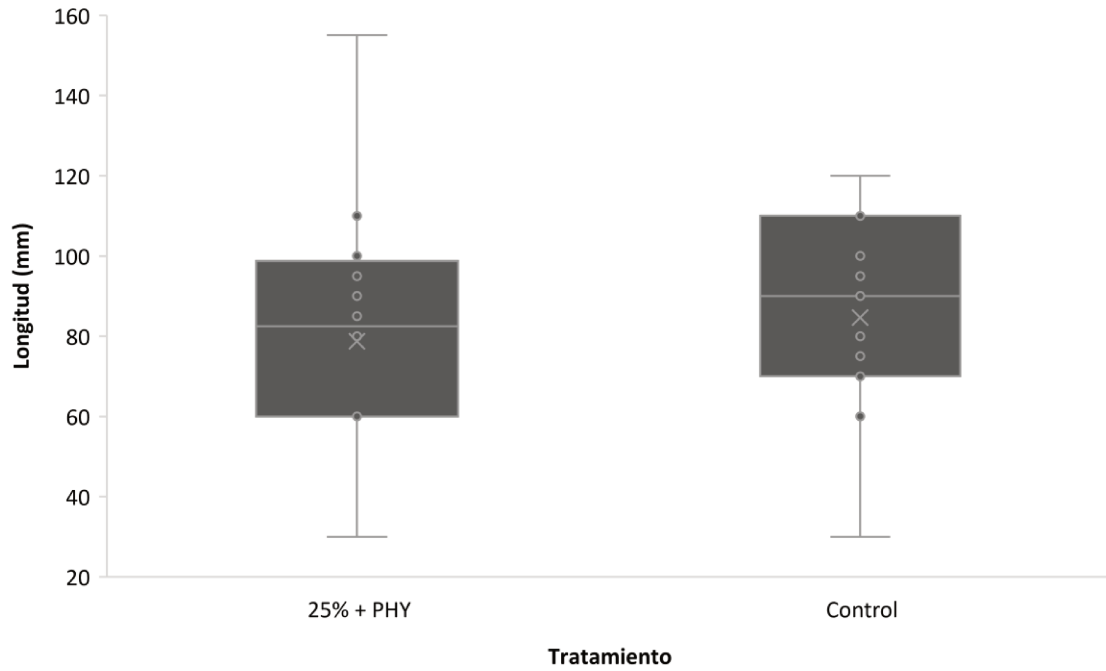
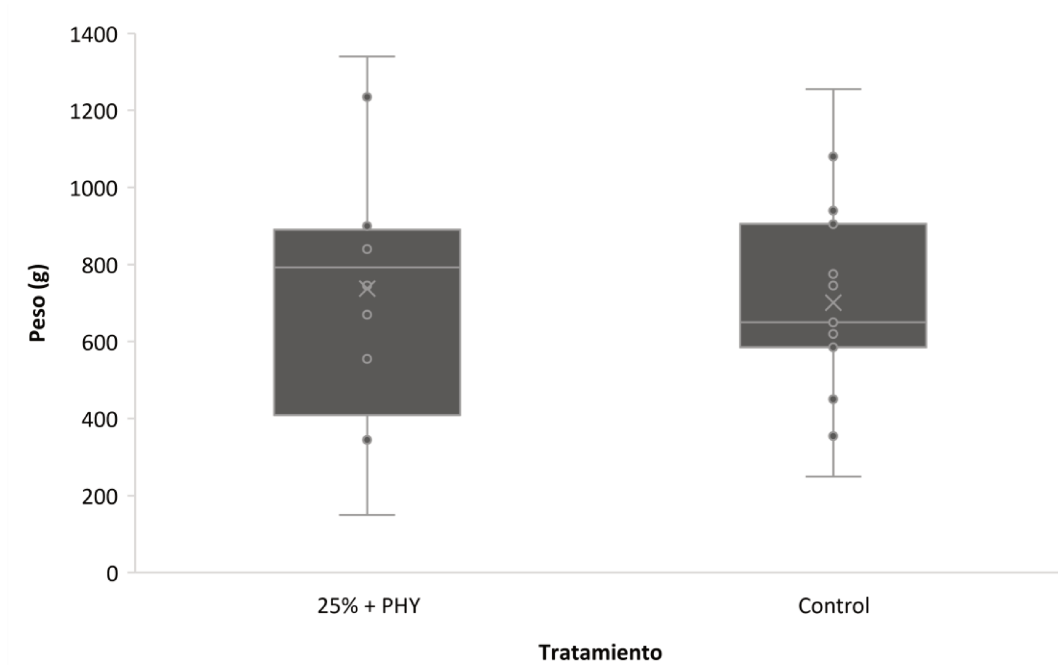


Figura 25. Ganancia de peso de juveniles de *Caiman latirostris* alimentados con dietas enriquecidas con harina de soja y enzimas del tipo fitasas.



A pesar de que la GLT y GPC de los animales neonatos y juveniles alimentados con la dieta con 25% de soja + enzimas AXTRA PHY no fueron estadísticamente significativa en ninguno de los casos, igualmente se decidió comparar los porcentajes de ganancia de GLT y GPC entre ambas clases etarias del yacaré overo alimentados con dicha dieta. Esto con el objetivo de determinar en cual etapa del ciclo de vida de *C. latirostris* es mejor implementar dietas con 25% de soja + enzimas AXTRA PHY a fin de optimizar la nutrición de la especie en cautiverio (**Figuras 26 y 27**).

La ganancia de longitud de los individuos fue diferente según la clase etaria ($F = 31,08$; $P \leq 0,0001$; $n = 29$), siendo significativamente mayor el 22,05% de GLT obtenido por los individuos neonatos al 9,27% obtenido por los individuos juveniles (**Figura 26**). Del mismo modo, la ganancia de peso también fue diferente según la clase etaria ($F = 20,57$; $p \leq 0,0001$; $N = 29$). La GPC de los individuos neonatos fue igual a un 73,29%, siendo significativamente superior al 27,34% obtenido por los individuos juveniles (**Figura 27**).

Figura 26. Ganancia de longitud de neonatos y juveniles de *Caiman latirostris* alimentados con dietas enriquecidas con harina de soja y enzimas del tipo fitasas.

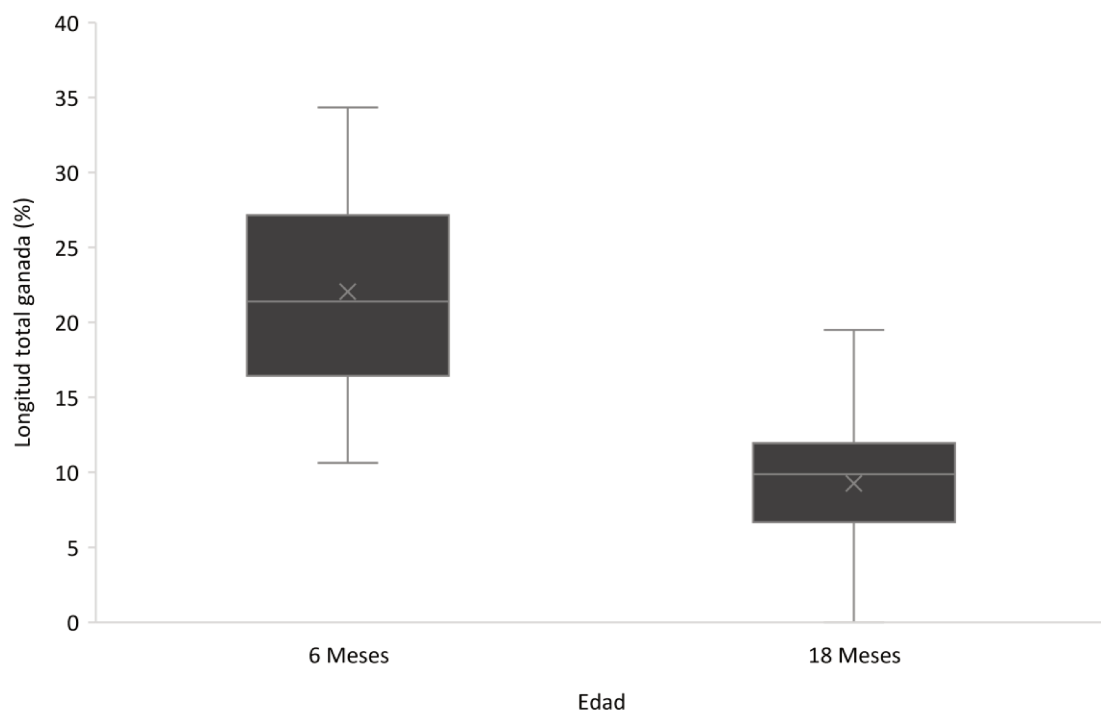
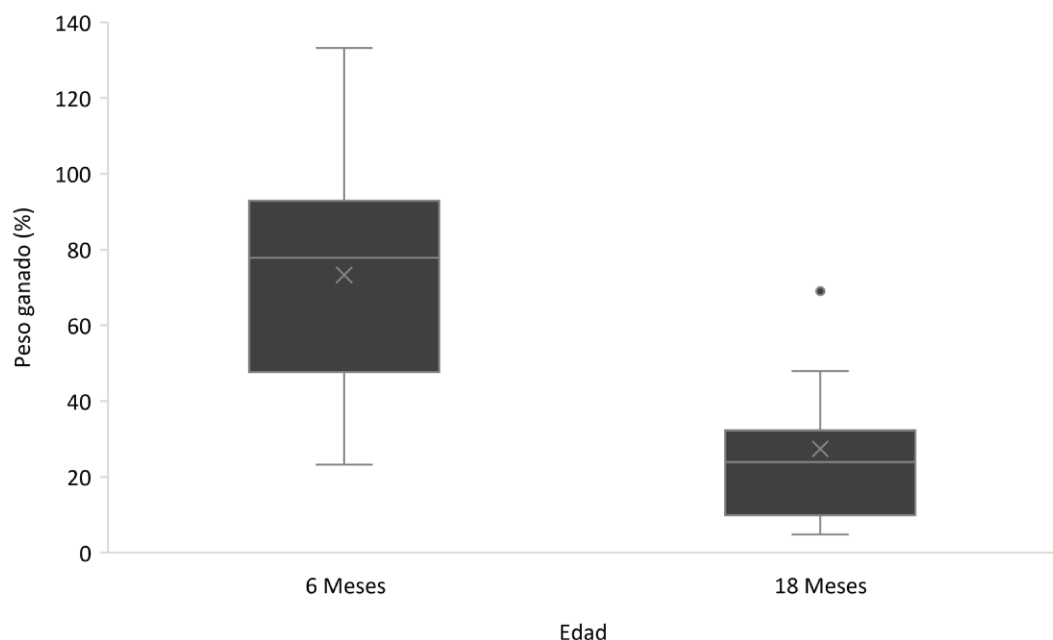


Figura 27. Ganancia de peso de neonatos y juveniles de *Caiman latirostris* alimentados con dietas enriquecidas con harina de soja y enzimas del tipo fitasas.



3.4. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO Y FILOGENÉTICO DE ENZIMAS DIGESTIVAS DE *Caiman latirostris*.

3.4.1. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO Y FILOGENÉTICO DE LA PEPSINA DE *Caiman latirostris*.

La secuencia de ADN de la pepsina de *C. latirostris* es característicamente lineal y de doble cadena con una longitud de 1146 bp. La composición general de la cadena L es 24,3% A; 27,3% C; 22,9% G; y 25,5% T. En relación con otras especies de cocodrilianos, la longitud de la secuencia de ADN de la pepsina de *C. latirostris* es: igual a la de *C. yacare*, mayor a la de *C. porosus* (1136 pb) y más corta que la de *A. mississippiensis* y *A. sinensis* (1268 pb). El alineamiento entre estas secuencias de cocodrilianos muestra un 90,5% de igualdad entre pares de bases (pb) y un 82,1% de identidad entre secuencias.

En la **Figura 28** se presenta el alineamiento múltiple de secuencias (MSA) de ADN de pepsina entre las diferentes especies de cocodrilianos. En éste se observó la presencia de GAPS; en *C. porosus*, desde 524-530 pb; y en las secuencias de *C. latirostris*, *C. yacare* y *C. porosus* se encontraron regiones donde no ocurrió correspondencia de bases, desde 297-417 pb, con el resto de las secuencia evaluadas.

Figura 28. MSA de ADN de pepsina de *Caiman latirostris* y otros cocodrilianos.

Alligator sinensis	ACATCCCTGGTATCATCAATGAGGATGCCACTGAGCCCATGAAAAACAGTCTCGATCTTC	300
Caiman yacare	ACATCCCTGGTATCATCAACGAGGATGCCACTGAGCCCATGAAAAACAGTCTCGAT----	296
Caiman latirostris	ACATCCCTGGTATCATCAACGAGGATGCCACTGAGCCCATGAAAAACAGTCTCGAT----	296
Crocodylus Porosus	ACATCCCTGGTATCATCAACGAGGATGCCACTGAGCCCATGAAAAACAGTCTGGAT----	294
Alligator mississippiensis	ACATCCCTGGTATCATCAACGAGGATGCCACTGAGCCCATGAAAAACAGTCTCGATCTTC	300
Alligator sinensis	AGTATTTTGGGACCATCTCCATCGGCACCCCAGCCAGGAGTTACCGTCCTCTTTGACA	360
Caiman yacare	-----A-----	297
Caiman latirostris	-----A-----	297
Crocodylus Porosus	-----A-----	295
Alligator mississippiensis	AGTATTTTGGGACCATCTCCATTGGCACCCCAGCCAGGAGTTACCGTCCTCTTTGACA	360
Alligator sinensis	CTGGCTCCTCAACCTGTGGGTGCCCTCTGTGTAAGTCTCCAGCCAGCCTGCAAAAACC	420
Caiman yacare	-----A-----AACC	302
Caiman latirostris	-----A-----AACC	302
Crocodylus Porosus	-----A-----AACC	300
Alligator mississippiensis	CCGGCTCCTCAACCTGTGGGTGCCCTCTGTGTAAGTCTCCAGCCAGCCTGCAAAAACC	420
Alligator sinensis	ACCACAGCTTCAACCCAAAGAAGTCATCCACCTACCAGGCCACCAATGAGAGCATCTCCA	480
Caiman yacare	ACCACAGCTTCAACCCAAAGAAGTCGTCACCTACCAGGCCACCAATGAGAGCATCTCCA	362
Caiman latirostris	ACCACAGCTTCAACCCAAAGAAGTCGTCACCTACCAGGCCACCAATGAGAGCATCTCCA	362
Crocodylus Porosus	ACCACACCTTCAACCCAAAGATGTCGTCACCTACCAGGCCACCAATGAGAATCTCCA	360
Alligator mississippiensis	ACCACAGCTTCAACCCAAAGAAGTCGTCACCTACCAGGCCACCAATGAGAGCATCTCCA	480
Alligator sinensis	TCCAGTACGGCACTGGCAGCATGACTGGATTCTGGCTTATGACATCATCCATGTTGGAG	540
Caiman yacare	TCCAGTACGGCACTGGCAGCATGACTGGATTCTGGCTTATGACATCATCCATGTTGGAG	422
Caiman latirostris	TCCAGTACGGCACTGGCAGCATGACTGGATTCTGGCTTATGACATCATCCATGTTGGAG	422
Crocodylus Porosus	TCCAGTACGGCACTGGCAGCATGACTGGATTCTGGCTTATGA-----CATGTTGGAA	413
Alligator mississippiensis	TCCAGTACGGCACTGGCAGCATGACTGGATTCTGGCTTATGACATCATCCATGTTGGAG	540

Por otra parte, en la **Figura 29** se presenta la aproximación de la estructura tridimensional de la pepsina de *C. latirostris*, la cual no presenta una arquitectura caracterizada. Esta posee, en los fragmentos aminoacídicos: 1-16 una secuencia señal, 17-382 una cadena en la que se encuentra anidado el dominio “Peptidasa A1” (residuos 71-379), en los residuos 102-107 y 262-266 múltiples enlaces disulfuro.

Respecto a los alineamientos estructurales entre la pepsina de yacaré overo y otras especies, en la **Figura 30** se puede observar el alineamiento correspondiente a la pepsina de *C. latirostris* y *S. salar*, mientras que en la **Figura 31** se aprecia el alineamiento entre la pepsina de *C. latirostris* y *X. tropicalis*. También debajo de cada figura, se pueden detallar los alineamientos secuenciales, donde se aprecia con mayor facilidad las regiones donde hubo o no correspondencia entre los aminoácidos de cada enzima.

El valor RMSD obtenido para el alineamiento estructural entre las pepsinas de *C. latirostris* y *S. salar* fue de 0,576 (268-268 átomos alineados). Por otra parte, el valor RMSD hallado para el alineamiento estructural entre las pepsinas de *C. latirostris* y *X. tropicalis* fue de 0,214 (291-291 átomos alineados).

Figura 29. Aproximación de la estructura tridimensional de la pepsina de *Caiman latirostris*, visualizada en PyMol, de acuerdo con su estructura secundaria: α hélices rojas, β hojas amarillas, y bucles verdes



La **Figura 32** muestra el árbol filogenético más probable, resultante del análisis de las secuencias de ADN de pepsina de cocodrilianos y el resto de los grupos. El árbol obtenido a través de BEAST se organizó en una topología de cuatro clados o ramas: el clado superior corresponde a las serpientes (*P. mucrosquamatus* y *C. tigris*), le sigue el clado de los cocodrilianos (*A. sinensis*, *A. mississippiensis*, *C. latirostris*, *C. yacare*, y *C. porosus*), luego el clado de las ranas (*X. tropicalis* y *X. laevis*), y por último los peces (*S. salar*). También se puede apreciar que el ancestro común más cercano entre cocodrilianos y serpientes es diferente al de ranas y peces. Del mismo modo, la divergencia entre los cocodrilianos y el ancestro común en serpientes y ranas ocurrió en un tiempo reciente.

Con relación al clado de los cocodrilianos en el árbol filogenético de la pepsina, éste se separa en dos ramas, que corresponden a las especies que pertenecen a la familia Alligatoridae (*A. sinensis*, *A. mississippiensis*, *C. latirostris*, *C. yacare*) y la familia Crocodylidae (*C. porosus*). Es importante señalar que la tasa de sustitución de nucleótidos del árbol es de 0.04. Siendo en los clados de peces y ranas donde se acumulan mayor cantidad de cambios nucleotídicos en comparación a serpientes y cocodrilianos.

Por último, los números que se observan en la base de cada rama del árbol se refiere a las probabilidades posteriores, las cuales indican que el árbol está adecuadamente sustentado debido a que los valores de las ramas son superiores a 0.97 (**Figura 32**).

Figura 30. Alineamiento estructural de las pepsinas de *Caiman latirostris* y *Salmo salar*. Pepsina de *C. latirostris* (verde); pepsina de *S. salar* (verde cian).



Figura 31. Alineamiento estructural de las pepsinas de *Caiman latirostris* y *Xenopus tropicalis*. Pepsina de *C. latirostris* (verde); de pepsina *X. tropicalis* (magenta).

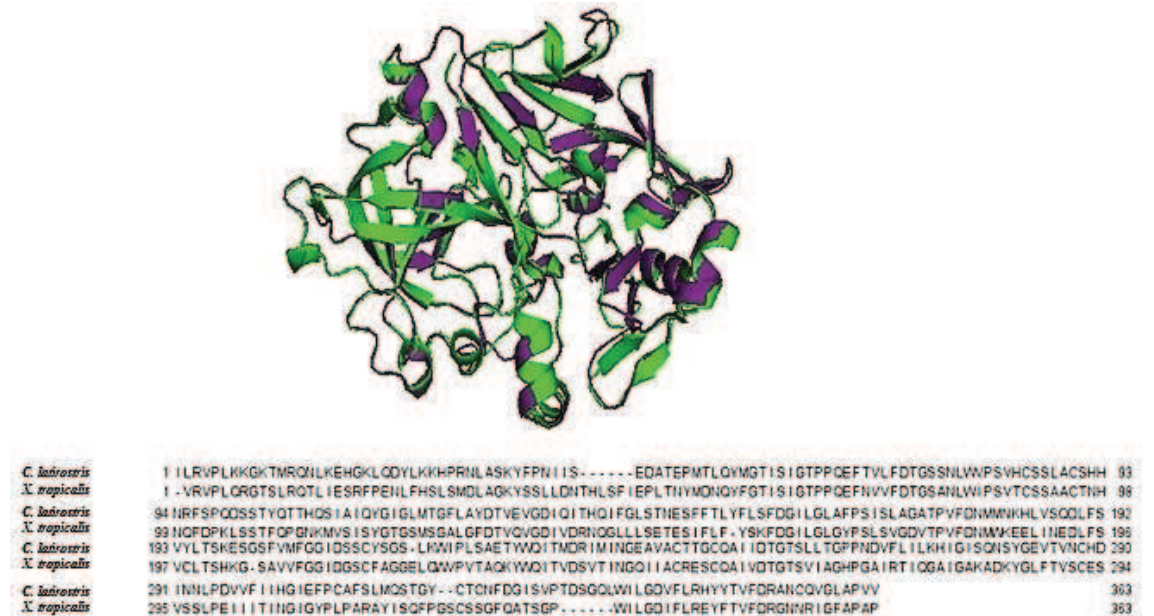
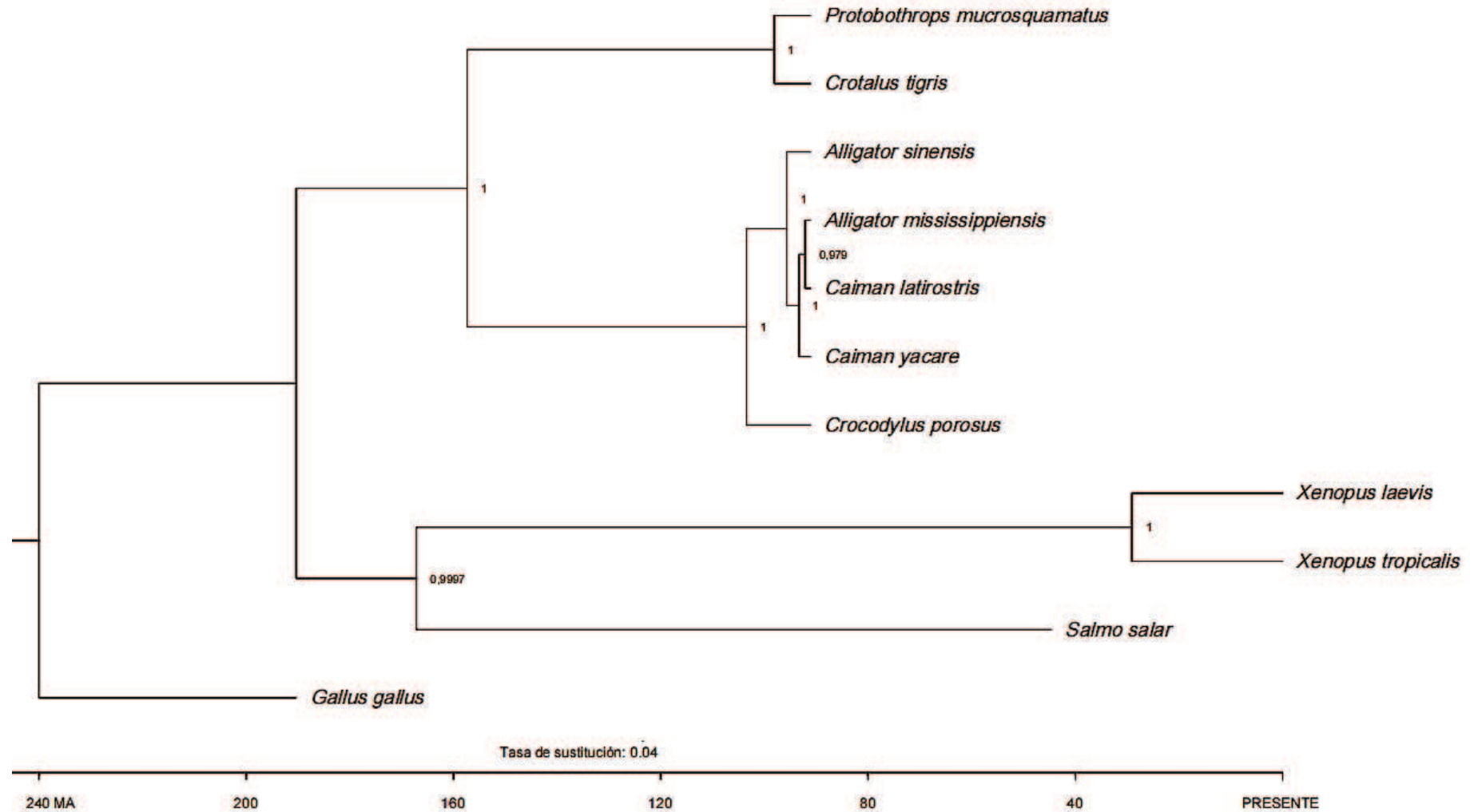


Figura 32. Árbol filogenético de la pepsina. Incluye secuencias de serpientes, cocodrilianos, ranas, y peces; utilizando *Gallus. gallus* como outgroup. La barra inferior muestra el tiempo de divergencia en una escala temporal (MA)



3.4.2. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO Y FILOGENÉTICO DE LA PROGASTRICINA DE *Caiman latirostris*

La secuencia ADN de la progastricina del yacaré overo posee una longitud genómica de 1578 pb. La composición general de la cadena L es 23.4% A, 28.2% C, 23.2% G, y 25.3% T. La secuencia de ADN de la progastricina de *C. latirostris* posee la misma longitud que la secuencia de la misma enzima en *A. mississippiensis*, *C. yacare*, y *C. rhombifer* (1576 pb). Igualmente, es más larga que la secuencia de *G. gangeticus* (1508 pb) y *C. porosus* (1483 pb) y un par de bases más corta que la secuencia en *A. sinensis* (1583 pb). El alineamiento entre estas secuencias de cocodrilianos mostró un 91,6% de igualdad entre pares de bases y un 80,7 % de identidad entre las secuencias.

En la **Figura 33** se presenta el MSA de ADN de progastricina entre las diferentes especies de cocodrilianos. Es posible apreciar la presencia de una región variable desde el pb 1100 hasta 1106 en todas las especies analizadas. También presentan una cola poli T desde el pb 1396 hasta el 1430, además de múltiples GAPs (de pequeñas longitudes) en todas las secuencias evaluadas: *C. rhombifer* (pb 33-134; 403-404; 483-524; 726-727; 978-991; y 1074-1077), *C. porosus* (pb 482-497), *A. sinensis* (pb 567-570 y 1084-1088), *A. mississippiensis* (pb 567-570; 843-846; y 1084-1088), *C. latirostris* (pb 567-570; 843-846; y 1084-1088), *C. yacare* (pb 567-570 y 1084-1088), y *G. gangeticus* (pb 567-570).

Figura 33. MSA de ADN de progastricina de *Caiman latirostris* y otros cocodrilianos.

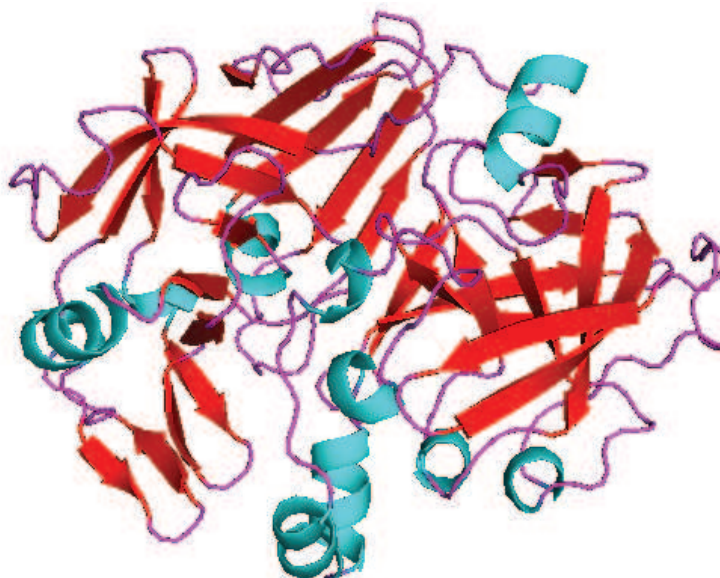
Alligator mississippiensis	-----TTTCAGCCCCGTGTCCAGGACTGAACTGCAGTGACCGGAGGACCCTTTGGGA	55
Alligator sinensis	TGTGTTTTTCAGCCCCGTGTCCAGGACTGAACTGCAGTGACCGGAGGACCCTTTGGGA	60
Caiman latirostris	-----TTTCAGCCCCGTGTCCAGGACTGAACTGCAGTGACCGGAGGACCCTTTGGGA	55
Caiman yacare	-----TTTCAGCCCCGTGTCCAGGACTGAACTGCAGTGACCGGAGGACCCTTTGGGA	55
Crocodylus porosus	TCCCATGTCAGCCCCGTGTCCAGGACTGAACTGCAGTGACCGGAGGACCCTTTGGGA	60
Crocodylus rhombifer	-----TCAGCCCCGTGTCCAGGACTGAACTGCAGTGACCGGAGGACCCTTTGGGA	53
Gavialis gangeticus	TCCCATGTCAGCCCCGTGTCCAGGACTGAACTGCAGTGACCGGAGGACCCTTTGGGA	60
Alligator mississippiensis	TGAGGGGTGGTGAGAGTCCCTTGAAAAGATTCAAGTCCATGCGGGAGGTGATGAGGGA	175
Alligator sinensis	TGAGGGGATGGTGAGAGTCCCTTGAAAAGATTCAAGTCCATGCGGGAGGTGATGAGGGA	180
Caiman latirostris	TGAGGGGTGGTGAGAGTCCCTTGAAAAGATTCAAGTCCATGCGGGAGGTGATGAGGGA	175
Caiman yacare	TGAGGGGTGGTGAGAGTCCCTTGAAAAGATTCAAGTCCATGCGGGAGGTGATGAGGGA	175
Crocodylus porosus	TGAGGGGATAGTGGGAGTCCCTTGAAAAGATTCAAGTCCATGCGGGAGGTGATGAGGGA	180
Crocodylus rhombifer	TGAGGGGCTAGT--GAGTCCCTTGAAAAGATTCAAGTCCATGCGGGAGGTGATGAGGGA	171
Gavialis gangeticus	TGAGGGGATAGTGAGAGTCCCTTGAAAAGATTCAAGTCCATGCGGGAGGTGATGAGGGA	180
Alligator mississippiensis	CAATCAGTTCGCTGTTGTTCCGAACCCCTGGCTAACTACATAGATATGTCCTACTATGG	295
Alligator sinensis	CAATCAGTTCGCTGTTGTTCCGAACCCCTGGCTAACTACATAGATATGTCCTACTATGG	300
Caiman latirostris	CAATCAGTTCGCTGTTGTTCCGAACCCCTGGCTAACTACATAGATATGTCCTACTATGG	295
Caiman yacare	CGATCAGTTCGCTGTTGTTCCGAGCCCCCTGGCTAACTACATAGATATGTCCTACTATGG	295
Crocodylus porosus	CAATCAGTTCCTGTTGCTTCTGAACCCCTGGCTAACTACATAGATATGTCCTACTATGG	300
Crocodylus rhombifer	CAATCAGTTCCTGTTGCTTCTGAACCCCTGGCTAACTACATAGATATGTCCTACTATGG	290
Gavialis gangeticus	CAATCAGTTCCTGTTGTTTCTGAACCCCTGGCTAACTACATAGATATGTCCTACTATGG	300

Figura 33. MSA de ADN de progastricina de *Caiman latirostris* y otros cocodrilianos.

Alligator mississippiensis	CAATCTGTGGGTGCCTTCCGTGACTGCCAGAGCGAGGCCTGCACCAACCACCCACTGTT	415
Alligator sinensis	CAACTGTGGGTGCCTTCCGTGACTGCCAGAGCGAGGCCTGCACCAACCACCCACTGTT	420
Caiman latirostris	CAATCTGTGGGTGCCTTCCGTGACTGCCAGAGCGAGGCCTGCACCAACCACCCACTGTT	415
Caiman yacare	CAATCTGTGGGTGCCTTCCGTGACTGCCAGAGCGAGGCCTGCACCAACCACCCACTGTT	415
Crocodylus porosus	CAACTGGGGGTGCCTTCCAGGTACTGCCAGAGCGAGGCCTGTACCAACCCCCGCTGTT	420
Crocodylus rhombifer	CAACTGGGGGTGCCTTCCAGGTACTGCCAGAGCGAGGCCTG--CCAACCCCCGCTGTT	408
Gavialis gangeticus	CAACTGCGGGGGCCTTCCGTGACTGTAGAGCGAGGCCTGCACCAACCACCTGTGTT	420
Alligator mississippiensis	GACTGGCAGCCTCNCAGGAATCTTTGGCTATGACACCCTCACCATCCAGAACGTTGCCAT	535
Alligator sinensis	GACTGGCAGCCTCACAGGAATCTTTGGCTACGACACCCTCACCATCCAGAACGTTGCCAT	540
Caiman latirostris	GACTGGCAGCCTCACAGGAATCTTTGGCTATGACACCCTCACCATCCAGAACGTTGCCAT	535
Caiman yacare	GACTGGCAGCCTCACAGGAATCTTTGGCTATGACACCCTCACCATCCAGAACGTTGCCAT	535
Crocodylus porosus	G-----GGAACTCTTCGGCTACGACACCCTCGCTATCCAGACCATAGCCAT	525
Crocodylus rhombifer	GA-----ATCCAGACCATAGCCAT	487
Gavialis gangeticus	GACTGGCAGCCTTACAGGAATCTTCGGCTACGACACCCTCACCATCCAGACCATGCCAT	540
Alligator mississippiensis	CTCAGACCAGGAGTTTGGCCTGAGCG---AGACGGAGCCTGGCACCACCTTTGTCTATG	591
Alligator sinensis	CTCAGACCAGGAGTTTGGCCTGAGCG---AGACGGAGCCTGGCACCACCTTTGTCTATG	596
Caiman latirostris	CTCAGACCAGGAGTTTGGCCTGAGCG---AGACGGAGCCTGGCACCACCTTTGTCTATG	591
Caiman yacare	CTCAGACCAGGAGTTTGGCCTGAGCG---AGACGGAGCCTGGCACCACCTTTGTCTATG	591
Crocodylus porosus	CTCAGACCAGGAGTTTGGCCTGAGTGAG-CAGACAGAGCCTGGCACTAACTTCGTCTATG	584
Crocodylus rhombifer	CTCAGACCAGGAGTTTGGCCTGAGTGAGACAGACAGAGCCTGGCACTAACTTTGTCTATG	547
Gavialis gangeticus	CTCAGACCAGGAGTTTGGCCGAGTG---AGACGGAGCCTGGCACTAACTTCGTCTACG	596
Alligator mississippiensis	TT---GTTTCTCCATCGGTGGACAGACCACTGGCTGGTGTAGCAGTGGCTGCCAAGGCA	887
Alligator sinensis	TTGAGGGTTTCTCCATCAGTGGACAGACCACTGGCTGGTGTAGCAATGGCTGCCAAGGCA	896
Caiman latirostris	TT---GTTTCTCCATCGGTGGACAGACCACTGGCTGGTGTAGCAGTGGCTGCCAAGGCA	887
Caiman yacare	TTGA--GTTTCTCCATCGGTGGACAGACCACTGGCTGGTGTAGCAGTGGCTGCCAAGGCA	889
Crocodylus porosus	TCGAGAGTTTCTCCATTGATGGACAGACCACTGGCTGGTGTAAACAATGGCTGCCAAGGCA	884
Crocodylus rhombifer	TCGAG-GTTTCTCCATCGATGGACAGACCACTGGCTGGTGTAAACAATGGCTGCCAAGGCA	844
Gavialis gangeticus	TTGAGAGTTTCTCCATCAATGGACAGACCACTGGCTGGTGTAAACAATGGCTGCCAAGGCA	896
Alligator mississippiensis	GAGTCTATTGGAGCTGAGGAAGACAGCAACGGCCAGTACGTTGTTAGCTGTGACAGCATT	1006
Alligator sinensis	GAGTCTATTGGAGCTGAGCAAGACAGTACGAGCCAGTACGTTGTTAGCTGTGACAGCATT	1015
Caiman latirostris	GAGTCTATTGGAGCTGAGGAAGACAGCAACGGCCAGTACGTTGTTAGCTGTGACAGCATT	1006
Caiman yacare	GAGTCTATTGGAGCTGAGGAAGACAGCAACGGCCAGTACGTTGTTAGCTGTGACAGCATT	1008
Crocodylus porosus	GAGTCTATTGGAGCTGAGCAAGACAGCAACGGCCAGTACGTTGTTGGCTGTGACAGCACC	1003
Crocodylus rhombifer	GAGTCTATTGGAGCTGA-----GCCAGTACGTTGTTGGCTGTGACAGCACC	950
Gavialis gangeticus	GAGTCTATTGGAGCTGAGCAAAAGCGCAACGGCCAGTACGTTGTTGGCTGTGACAGCATT	1015
Alligator mississippiensis	GATAGCCTGCCAACCATCTCCTTTGTGATCGGTGGAACAGCCTCCCTCTGCCTCCCTCT	1066
Alligator sinensis	GATAGCCTGCCAACCATCTCCTTTGTGATCGGTGGAACAGCCTCCCTCTGCCTCCCTCT	1075
Caiman latirostris	GATAGCCTGCCAACCATCTCCTTTGTGATCGGTGGAACAGCCTCCCTCTGCCTCCCTCT	1066
Caiman yacare	GATAGCCTGCCAGCCATCTCCTTTGTGATCGGTGGAACAGCCTCCCTCTGCCTCCCTCT	1068
Crocodylus porosus	GATAGCCTGCCAACCATCTCCTTTGTGATCGGTGGAACAGCCTCCCTCTGCCTCCATCA	1063
Crocodylus rhombifer	GATAGCCTGCCAACCATCTCCTTTGTGATCGGTGGAACAGCCTCCCTCTGCCTCCCTCT	1006
Gavialis gangeticus	GATAGCCTGCCAACCATCTCCTTTGTGATCAGTGGAAACAGCCTCCCTCTGCCTACGTCA	1075
Alligator mississippiensis	GCC----TACGTCATCCA--G-AG-CACAGATGGTAGCTGCGTGGTTGGCATTGGGCC	1117
Alligator sinensis	GCC----TACGTCATCCA--G-AG-CACAGATGGTAGCTGCGTGGTTGGCATTGGGCC	1126
Caiman latirostris	GCC----TACGTCATCCA--G-AG-CACAGATGGTAGCTGCGTGGTTGGCATTGGGCC	1117
Caiman yacare	GCC----TACGTCATCCA--G-AG-CACAGATGGTAGCTGCGTGGTTGGCATTGGGCC	1119
Crocodylus porosus	TCCAGGTATGCGTTTCTCATTGCACCCACAGAGGGCAGCTGCGTTGTTGGCATTGGGCC	1123
Crocodylus rhombifer	G-----AG-CACAGAGGGCAGCTGCGTTGTTGGCATTGGGCC	1043
Gavialis gangeticus	TCCAGGTATGCGTTTCTCATT--AG-CACAGATGGCAGCTGCGTTGTTGGCATTGGGCC	1132
Alligator mississippiensis	TGAACTCTGCTGACCTTTAAAGCGT	1416
Alligator sinensis	TGAACTTTGATTGAAGCCT	1425
Caiman latirostris	TGAACTCTGCTGACCTTAAAGCGT	1416
Caiman yacare	TGAACTCTGCTGACCTTTGAAGCGT	1418
Crocodylus porosus	TGAACTCTGCC-----TTTTTTTTTTTGAAGCCT	1391
Crocodylus rhombifer	TGAACTCTGCCTTGAAGCCT	1343
Gavialis gangeticus	TGAACTCTGCC-----TTTTTTTTTTTGAAGCCT	1408
Alligator mississippiensis	CTCTCTCTGTACAATTAGTGGTATGAAATTCGGGGCTCTCTTCCAAAGGTGACTGCAAA	1476
Alligator sinensis	CTCTTTTTGTACAATTAGTGGTATGAAATTCGGGGCTCTCTTCCAAAGGGACTGCAAA	1485
Caiman latirostris	CTCTCTCTGTACAATTAGTGGTATGAAATTCGGGGCTCTCTTCCAAAGGTGACTGCAAA	1476
Caiman yacare	CTCTCTCTGTACAATTAGTGGTATGAAATTCGGGGCTCTCTTCCAAAGGTGACTGCAAA	1478
Crocodylus porosus	CTCTCTCTGTACGATTTGGTGGCATGAAATTCGGGGTTCAT-----	1451
Crocodylus rhombifer	CTCTCTCTGTACAATTAGTGGTATGAAATTCGGGGTTCATCCAAAGGTGACTGCAAA	1403
Gavialis gangeticus	CTCTCTCTGTACAATTAGTGGTATGAAATTCGGGGTTCATCCAAAGGTGACTGCAAA	1468

La **Figura 34** muestra la aproximación estructural de la progastricina de *C. latirostris*, la cual tampoco presenta una arquitectura definida. Esta posee, desde el residuo aminoacídico: 1-16 una secuencia señal, 17-393 una cadena en la que se encuentra anidado el dominio “Peptidasa A1” (residuos 72-390) y en los residuos 103-108 y 314-348 enlaces disulfuro.

Figura 34. Aproximación de la estructura tridimensional de la progastricina de *Caiman latirostris*. Visualizada en PyMol, de acuerdo con su estructura secundaria: α Hélices verdes cian, β hojas rojas, y bucles magenta.



En cuanto a los alineamientos estructurales entre la progastricina de yacaré overo y otras especies, en la **Figura 35** se puede observar el alineamiento correspondiente a la progastricina de *C. latirostris* y *C. mydas*, mientras que en la **Figura 36** se observa el alineamiento entre la progastricina de *C. latirostris* y *X. tropicalis*. Del mismo modo, debajo de cada figura se pueden observar los alineamientos secuenciales, donde se aprecia con mayor facilidad las regiones donde hubo o no correspondencia entre los aminoácidos de cada enzima. El valor RMSD obtenido para el alineamiento estructural entre las progastricinas de *C. latirostris* y *C. mydas* fue de 0,357 (275-275 átomos alineados). Por otra parte, el valor RMSD hallado para el alineamiento estructural entre las progastricinas de *C. latirostris* y *X. tropicalis* fue igual a 0,845 (298-298 átomos alineados).

Figura 35. Alineamiento estructural de las progastricinas de *Caiman latirostris* y *Chelonia mydas*. Progastricina de *C. latirostris* (verde); Progastricina *C. mydas* (verde cian)

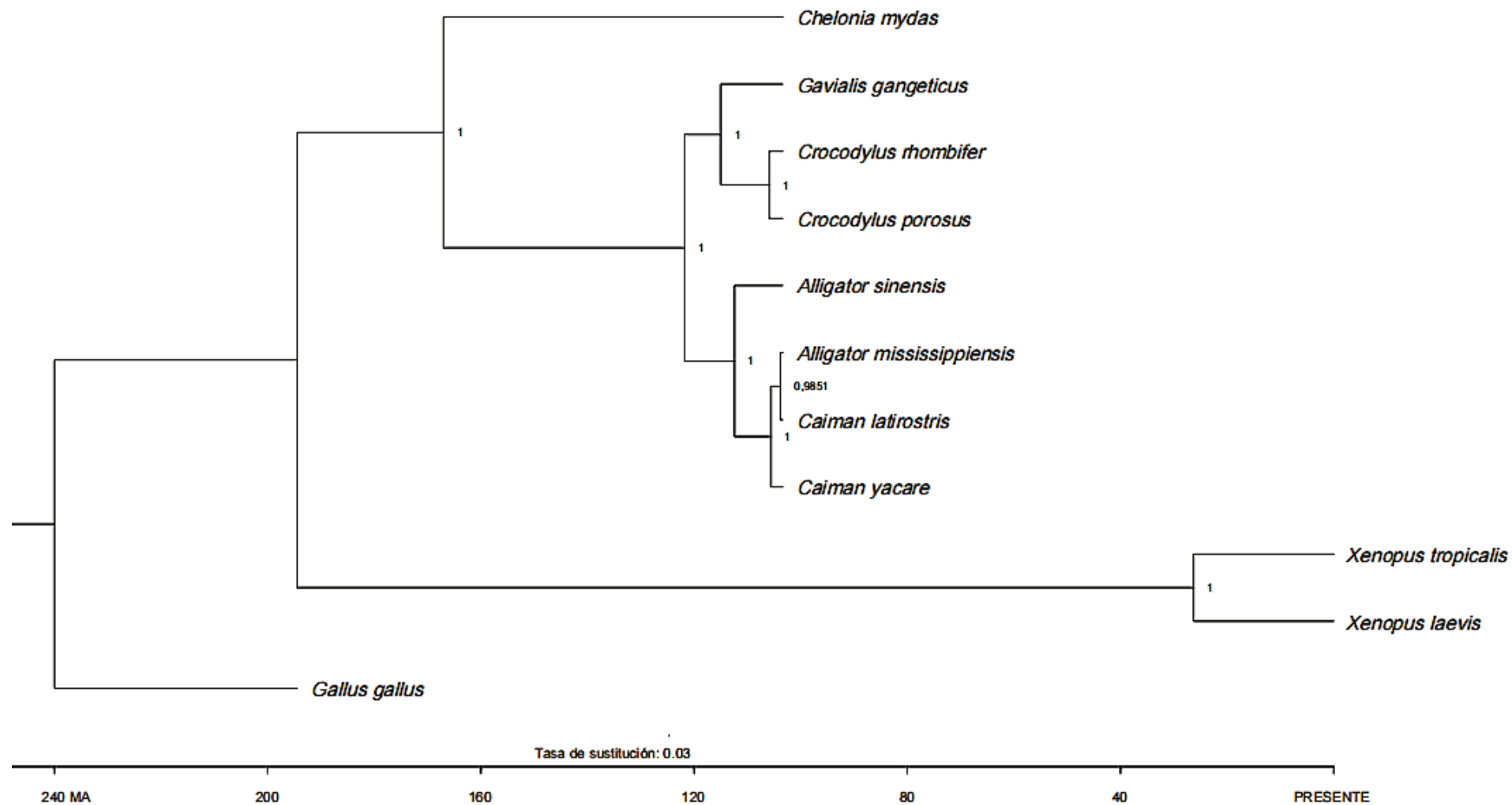


Figura 36. Alineamiento estructural de la progastricina de *Caiman latirostris* y *Xenopus tropicalis*. Progastricina de *C. latirostris* (verde), Progastricina de *X. tropicalis* (magenta).



La **Figura 37** muestra el árbol filogenético más probable, obtenido en el análisis BEAST de las secuencias de ADN de progastricina de cocodrilianos y el resto de los grupos. El árbol se separó en tres clados: el superior corresponde a las tortugas (*C. mydas*), seguido por el clado de los cocodrilianos (*G. gangeticus*, *C. rhombifer*, *C. porosus*, *A. sinensis*, *A. mississippiensis*, *C. latirostris*, y *C. yacare*) y luego el clado de las ranas (*X. tropicalis* y *X. laevis*). Cocodrilianos y tortugas difieren a las ranas respecto al ancestro común más cercano. En este árbol, el clado de los cocodrilianos también se separa en ramas correspondientes a las especies que pertenecen a la familias Alligatoridae (*A. sinensis*, *A. mississippiensis*, *C. latirostris* y *C. yacare*); Crocodylidae (*C. rhombifer* y *C. porosus*) y Gavialidae (*G. gangeticus*). Es de notar que la tasa de sustitución de nucleótidos del árbol es de 0.03. Siendo el clado de las ranas donde se acumulan mayor cantidad de cambios nucleotídicos en comparación a tortugas y cocodrilianos.

Figura 37. Árbol filogenético de la progastricina. Incluye secuencias de tortugas, cocodrilianos, y ranas; utilizando *Gallus gallus* como outgroup. La barra inferior muestra el tiempo de divergencia en una escala temporal (MA)



4. DISCUSIÓN

4.1. DIGESTIBILIDAD DE LA HARINA DE SOJA POR PARTE DE LOS EJEMPLARES DE *Caiman latirostris* EN CAUTIVIDAD.

La digestibilidad es la base de la evaluación de la producción de alimentos, y se define como la fracción de alimento consumido y absorbido en el tracto gastrointestinal (Stein et al., 2007). Sirve como medida para determinar la calidad de las materias primas empleadas, la disponibilidad y desempeño de los nutrientes que las constituyen (Harmon, 2007). La harina de soja es generalmente la fuente de proteína más usada y rentable para incluir en la alimentación de peces, camarones, aves, cerdos y vacas (Lin y Dominy, 1990; Peres y Lim, 2008; Dei, 2011), debido a su alto contenido proteico, el perfil aminoacídico equilibrado y su alta digestibilidad (Davis y Arnold, 2000; Amaya et al., 2007a,b).

Los resultados obtenidos en este estudio (**Tabla 9**), fueron similares a los coeficientes de digestibilidad obtenidos por Staton et al. (1990b) para *A. mississippiensis*. Ellos reportaron coeficientes de digestibilidad iguales a 96-97% para proteínas y carbohidratos provenientes de la soja. Esto permitiría suponer que existe un aprovechamiento de los nutrientes provenientes de la soja por parte de los individuos de *C. latirostris* y otras especies pertenecientes a la familia Alligatoridae.

A su vez, el aumento de hasta un 2,45% de la digestibilidad de la dieta, pone en evidencia que la adición de una fuente proteica vegetal como la harina de soja a la dieta de una supuesta especie carnívora “estricta” como *C. latirostris*, impacta positivamente (**Tabla 10**), mejorando la extracción de los macronutrientes (Zhang et al, 2013). Estos resultados concuerdan con los reportes de aumento de la digestibilidad de la dieta en presencia de proteínas de origen vegetal (entre ellas, soja) reportada por Coulson et al. (1987) para *A. mississippiensis*.

Existen registros que indican que, durante la era Mesozoica, existió una amplia diversidad de cocodriliformes, y dada la amplia disponibilidad de presas y nichos ecológicos, estos podía ser depredadores oceánicos, carnívoros terrestres, herbívoros u omnívoros (Godoy, 2020). Recientes estudios sobre la forma de los dientes (Melstrom e Irmis, 2019) y el cráneo (Stubbs et al., 2021) de fósiles de crocodiliformes mesozoicos, han ampliado la información que describe la gama de nichos y estrategias alimenticias que estos desarrollaron a través del tiempo y su evolución (Stubbs et al., 2021).

El grupo de los cocodriliformes mesozoicos se separó en dos grandes grupos: los “long-snouted” (de cráneos alargados y delgados) y los “short-snouted” (de cráneos cortos y anchos; Busbey, 1995). La morfología craneana de los cocodriliformes short-snouted es distintiva de los cocodriliformes basales (Ősi, 2014) y de aligatóridos extintos, además es semejante a la morfología craneana de especies con hábitos alimenticios generalistas (Salas-Gismondi et al., 2015). Estos también poseían dentición heterodonta, similar en forma y función, a los de herbívoros y omnívoros actuales (O’Connor, et al., 2010; Ősi, 2014; Melstrom e Irmis, 2019). Algunas de estas características aún están presentes en los cocodrilianos actuales como *A. mississippiensis* y *C. latirostris* (Ginac et al., 2016).

La aparición de hábitos herbívoros en los cocodriliformes mesozoicos también indica, que estos animales debían de poseer metabolismos y respuestas fisiológicas adaptadas para aprovechar la materia vegetal y sus nutrientes (Marinho y Carvalho, 2009; Ősi, 2014; Cubo et al., 2020). Los resultados del estudio de Stubbs et al. (2021), junto a los resultados de la digestibilidad de la harina de soja (**Tablas 9 y 10**), indican que las especies de cocodrilos actuales, en especial los aligatóridos, podrían mantener estas capacidades y explicar parcialmente los mecanismos de absorción de nutrientes vegetales.

La digestibilidad de la harina de soja fue más alta en la sección proximal del intestino delgado de *C. latirostris*. Estos valores disminuyeron ligeramente en la sección media y distal del intestino delgado, siendo la digestibilidad en el intestino grueso menor a la del resto de los segmentos (**Tablas 9 y 10**). En los reptiles, estos resultados suelen asociarse a la alta actividad metabólica que posee el sistema digestivo, en particular el intestino delgado (Holmberg et al., 2002), siendo la sección proximal del intestino delgado de los cocodrilianos donde se ha reportado una mayor función y actividad enzimática para la digestión de las proteína, glucógeno y grasas (Huchzermeyer; 2003; Tracy et al., 2015).

Se ha detectado la presencia y actividad de diferentes enzimas digestivas, capaces de degradar nutrientes de origen vegetal en el intestino delgado de diferentes especies de cocodrilianos. Martínez del Rio y Stevens (1988) detectaron en *A. mississippiensis* actividad de enzimas como la maltasa, isomaltasa y trehalasa. Mientras que Read (2000) aisló de *C. porosus* las enzimas tripsina, quimotripsina, carboxipeptidasa-A, carboxipeptidasa-B, aminopeptidasa y una enzima amilolítica (probablemente α -amilasa). Todas las enzimas antes mencionadas tienen una importancia funcional en la

capacidad de absorción del intestino delgado y para la utilización de los nutrientes vegetales de la dieta; lo cual podría explicar por qué *C. latirostris* digiere eficazmente los nutrientes provenientes de la harina de soja. Mientras que la baja digestibilidad de la harina de soja encontrada en el intestino grueso del yacaré overo se debe, a que como en otros taxones animales, esta sección de intestino cumple funciones de reabsorción de agua y excreción de productos de desecho (Richardson et al., 2002).

A pesar de que el jugo gástrico de los cocodrilianos posee un bajo pH, permitiendo a estos animales disolver incluso huesos (Coulson et al., 1989; Read, 2000), fue posible encontrar restos de dieta en el estómago de los individuos tratados con la dieta 60HS, mientras que los animales tratados con las dietas 0HS, 20HS y 40HS sólo mantenían residuos en los diferentes segmentos de intestinos (**Tabla 11**). Así como en otros animales monogástricos, esto podría estar relacionado a los altos niveles de fibra contenidos en la dieta, factor comúnmente conocido por enlentecer el tránsito gastrointestinal, reducir la digestión en el intestino y disminuir el movimiento de nutrientes hacia la superficie de la mucosa (Leeds, 1982; Coulson et al., 1987). También puede deberse a la limitada producción de enzimas del tipo amilasas en la digestión de los cocodrilianos (Shimeno et al., 1977; Spannofl y Plantikowh, 1983; Reigh y Williams, 2013).

Leary y Lovell (1975) reportan en una especie omnívora de bagre (*Ictalurus punctatus*), alimentados con altos niveles de celulosa en su dieta mostraban tasas de crecimiento reducidas. En especies carnívoras, han sido obtenidos resultados similares, en un estudio realizado con lubinas negras (*Micropterus salmoides*) alimentadas con dietas que contenían un 8,5% de fibra, tenían tasas de ganancia de peso y transformación alimenticia significativamente inferiores a las lubinas alimentadas con otras dietas con menor contenido de fibra (Zhong et al., 2020). De acuerdo con los antecedentes mencionados y a los resultados obtenidos en este estudio, se considera que el valor óptimo de inclusión de harina de soja dentro de un alimento formulado para *C. latirostris* a fin de estimular una buena absorción de los nutrientes y promover un mejor crecimiento estaría en el rango del 20 al 40% (**Tabla 10, Figuras 15 y 16**). En el caso de que se superen estos valores aparece el riesgo de ocasionar retrasos en el tiempo de pasaje de la dieta a través del tracto digestivo y disminuir el performance digestivo de la especie.

En la naturaleza, las especies de cocodrilianos, de diferentes clases de tamaño han sido observadas consumiendo distintos tipos de plantas y frutos (**Tabla 16**). Muchas veces, esta clase de información no se considera importante y se coloca en secciones comúnmente llamadas "material vegetal", que en algunos de los casos representan más del 80% de los componentes dietéticos encontrados en el estómago de los animales (Brito et al., 2002; Platt et al., 2013). Generalmente se ha asumido que el consumo de plantas por parte de los cocodrilianos puede deberse a la ingestión continua de "gastrolitos" (Diefenbach, 1979) o favoreciendo la dispersión de semillas o "saurocoria" (Traveset, 1990). De manera similar, otros autores afirman que la ingestión de material vegetal por parte de los cocodrilianos no es deliberada, sino más bien accidental tratando de capturar a sus presas, o previamente consumidas por sus presas (consumidores secundarios) (Webb y Manolis, 1989; Brito et al., 2002).

Los resultados obtenidos (**Tablas 9, 10 y 11**), indican que la ingestión de material vegetal por parte de cocodrilianos de vida libre podría ser de manera deliberada, no solo para mantener por más tiempo el alimento en el sistema digestivo, mejorando así la digestión y absorción de los nutrientes de la dieta, sino también como un ítem alimenticio más dentro de su dieta.

4.2. TASA DE CRECIMIENTO A DIFERENTES PORCENTAJES DE HARINA DE SOJA EN LA DIETA DE NEONATOS DE *Caiman latirostris* EN CAUTIVIDAD.

Una vez determinada la capacidad de absorción del sistema digestivo del yacaré overo en presencia de nutrientes provenientes de soja, se procedió a estimar la tasas de crecimiento de la especie cuando es alimentada con dietas enriquecidas con soja. Siguiendo la línea de los resultados obtenidos, fueron testeadas dietas con contenidos de soja de entre un 25 y 40% (**Tabla 5**)

En los reptiles (animales ectotermos), la temperatura ambiental desempeña un papel fundamental, fungiendo como modulador del metabolismo y regulando el consumo de alimento por parte de estos individuos (Parachú-Marco et al., 2009). En nuestro estudio la temperatura se mantuvo constante a $31 \pm 1^\circ\text{C}$. De igual forma, el consumo de las dietas fue similar entre los grupos experimentales, sin importar la cantidad de harina de soja presente en estas (**Tabla 12**).

En algunas especies de interés comercial, por ejemplo, para *Sciaenops ocellatus* y *Lutjanus campechanus*, ha sido evaluada la palatabilidad de la soja, obteniéndose una disminución del consumo de la dieta como consecuencia de una baja palatabilidad de este ingrediente (McGoogan y Gatlin, 1997; Allen et al., 2005).

A diferencia de los resultados antes citados, la presencia de harina de soja en la dieta de *C. latirostris* aumenta ligeramente la TCA en las dietas 25HS y 40HS (**Tabla 12**), lo cual es deseable para la alimentación de los cocodrilianos, dado que estos presentan una alta demanda de alimento, especialmente en cuanto a nutrientes se refiere, principalmente proteínas y grasas (Hilevski et al., 2022). Un aumento en la TCA puede llevar a un mayor suministro de energía, lo que resulta en un mayor crecimiento y desarrollo del organismo, manteniendo un estado nutricional adecuado para la salud y longevidad de estos animales (Garnett y Murray, 1986; Moleón et al., 2023).

Las tasas de conversión de alimento estimadas para juveniles cautivos de *C. porosus* bajo diversas pautas de alimentación oscilan entre el 17-37%, mientras que para *A. mississippiensis* cautivos menores de dos años son de entre 25-40% (Coulson et al., 1973; Joanen and McNease, 1987). Estos resultados son bastante similares a las TCA de *C. latirostris* alimentados con dietas con contenido de soja (**Tabla 12**), permitiendo sugerir que la harina de soja es un ingrediente que no interfiere con la palatabilidad de la dieta de estos reptiles y que incluso puede promover el consumo de dietas enriquecidas con él (McGoogan y Gatlin, 1997; Allen et al., 2005) y que nutrientes y fibras vegetales aportados por la harina de soja no afectan el metabolismo de *C. latirostris* (Staton, 1990a; Tracy et al., 2015; Reigh, 2018).

El ICA, aunque no es significativo, fue más alto en los yacarés overos alimentados con dietas que contenían 25 y 40% de harina soja (**Tabla 10**). La temperatura tiene claramente efectos importantes en la dinámica de la digestión y la asimilación de nutrientes en los cocodrilianos (Coulson y Hernández, 1983; Coulson et al., 1987; Huchzermeyer, 2003), ya que el aumento de la temperatura corporal tras la alimentación aumenta la producción de jugos gástricos y acelera la digestión, permitiendo a los animales volver a alimentarse (Lang, 1979). Esto se traduce en mayor crecimiento y cantidad de energía extraída del alimento, aumentando la ICA de los animales (Parachú-Marco et al., 2009)

Se ha estudiado cómo promover una mayor ganancia de peso y longitud de los individuos de *C. latirostris* criados en cautiverio, variando ciertas condiciones de cría, tales como, la densidad de individuos, la temperatura, origen y tiempo de exposición a radiación UV y el origen de las fuentes de proteína animal (Pinheiro y Lavorenti, 2001; Poletta et al., 2008; Parachú-Marco et al., 2009; Siroski et al., 2012). Sin embargo, la inclusión de proteína vegetal en la dieta a fin de optimizar el crecimiento de *C. latirostris*, no había sido probado hasta este estudio. La mayoría de los estudios donde se incluyen nutrientes vegetales en la dieta de cocodrilianos se han realizado con *A. mississippiensis* (Coulson y Hernández, 1964, 1974, 1983; Coulson y Coulson, 1986; Coulson et al., 1987; Staton et al., 1990a, 1990b; Reigh y Williams, 2013, 2014, 2016, 2018) y *Crocodylus porosus* (Webb et al., 2013).

Históricamente se asumía que los cocodrilos son carnívoros "estrictos", por lo tanto, incapaces de degradar y asimilar los nutrientes provenientes de las plantas (Coulson y Hernández, 1983). Sin embargo, los resultados obtenidos en este estudio indican hipótesis diferentes. Se puede observar como la ganancia de peso y longitud de *C. latirostris* tratados con dietas enriquecidas con soja tuvieron un performance igual al de la dieta sin suplemento (**Figuras 15 y 16**) que de acuerdo con Urbaityte et al. (2009), esto podría atribuirse al origen de la soja, al proceso de obtención de la harina, o la presentación de esta (grados de molienda de la harina).

Datos similares fueron obtenidos por Staton et al. (1990a), quienes afirman que la inclusión de hasta 12% de grasas y 36% de maíz en la dieta, produce ganancias de peso en *A. mississippiensis* similares a las dietas con alto porcentaje de proteína animal, libres de maíz y grasa. De manera similar Reigh y Williams (2013, 2016, 2018) han probado dietas compuestas por harina de pescado, soja y otros ingredientes vegetales en la dieta de *A. mississippiensis*, determinando que promueven un desarrollo óptimo de los animales, siendo el componente vegetal un excelente complemento para la dieta de esta especie.

Contrariamente, Sosa et al. (2011) incluyeron pellets de soja dentro de la dieta de *C. rhombifer* y obtuvieron que el crecimiento de los individuos alimentados con dietas enriquecidas con soja fue neutro. Concluyeron que, *C. rhombifer* digiere parcialmente la soja y que sus nutrientes son destinados al mantenimiento corporal, por lo que la consideran una fuente nutricional poco apropiada para complementar la dieta de esta

especie. En otra especie de la familia Crocodylidae, *C. porosus* también se evaluaron dietas enriquecidas con nutrientes vegetales. Los resultados de esta investigación ratifican que la inclusión de materia prima vegetal (gluten de trigo, soja y altramuz) dentro de la dieta cocodrilos, no favorece su crecimiento (Webb et al., 2013). En el estudio realizado por Tracy et al., (2015) se mencionan las razones de las diferencias antes mencionadas. Se detallan que especies pertenecientes a la familia Alligatoridae, como *A. mississippiensis* y *C. latirostris* poseen una excelente absorción de los nutrientes de origen vegetal, a diferencia de las especies pertenecientes a la familia Crocodylidae, como *C. porosus* y *C. rhombifer* que poseen una absorción neutra o negativa. Este fenómeno se debe a que en la superficie de la membrana intestinal de los aligatónidos existe una mayor actividad de las enzimas tipo N-aminopeptidasa, maltasa y sacarasa, lo que se traduce en una mayor eficacia en la absorción de los carbohidratos presentes en la dieta.

Es importante aclarar que pueden existir ciertas diferencias en la absorción de los nutrientes provenientes de plantas entre los yacarés overos que consumen material vegetal "entero" en la naturaleza y los yacarés de este estudio. Los últimos se encontraban bajo condiciones ambientales controladas y fueron alimentados con material vegetal "modificado", con una pared celular rota que permite el acceso a las proteínas, los carbohidratos y los lípidos.

La cantidad de harina de soja a incluir dentro del alimento de *C. latirostris* para optimizar la ganancia de peso y longitud, fue estimada entre un 20 y 30% (**Figura 17**). Este intervalo es consistente con lo reportado por Staton et al. (1990a) para *A. mississippiensis* y lo obtenido para *C. latirostris* en este estudio (**Figuras 15 y 16**). El cálculo y optimización de ingredientes a incluir dentro de una dieta, es un método que considera los requerimientos fisiológicos de la especie en cuestión y el valor nutricional de los ingredientes empleados. Su aplicación dentro de la acuicultura es un aspecto relevante para el diseño y elaboración de alimentos balanceados, permitiendo minimizar los costos de alimentación y producción (Martinez-Llorens et al., 2009).

En la actualidad, la formulación de los piensos para cocodrilos está cambiando y la disponibilidad y diversidad de los ingredientes utilizados influyen de forma importante en el costo de los alimentos fabricados, aunado a ello está el costo de su transporte, el almacenaje y refrigeración, además de la mezcla y preparación (Peucker y Jack, 2006).

El costo de las dietas sin soja es de 1,13 dólares por kg, frente a los 0,86 dólares por kg de la dieta 25HS. Más allá de que las dietas con soja sean más económicas que las compuestas solamente de carcasas de pollo, la rentabilidad de las primeras radica en su mayor rendimiento respecto a la ganancia de longitud, peso, TCA y ICA (**Figuras 15, 16 y Tabla 12**). Para producir un yacaré overo de talla comercial (al menos 3 kg de peso), si es alimentado con la dieta 25HS es necesario que consuma cerca de 5,17 kg de esta, mientras que si es alimentado con la dieta 0HS debe consumir 8,76 kg (**Tabla 12**). Esto se traduce en que para llevar a término un animal alimentado con la dieta 25HS se necesitan 4,45 US\$ frente a 8,90 US\$ necesarios con la dieta 0HS.

Otro elemento importante para destacar es la aceptación total del pienso, lo que puede verse en su TCA (**Tabla 12**). La dieta 25HS al ser más compacta (la mezcla de sus ingredientes forman una masa), reduce la pérdida de alimento y puede ser garantía de la reducción del trabajo requerido para la limpieza de los corrales y la generación de residuos contaminantes, permitiendo una mejor gestión del agua y disminuyendo su contaminación y la del ambiente.

Debido al rendimiento de la dieta 25HS (**Figuras 15, 16 y Tabla 12**), su implementación además de reducir directamente los costos de alimentación también influirá indirectamente disminuyendo los costos de mantenimiento y producción al reducir el tiempo para que los animales alcancen el peso y la longitud requerida comercialmente. Todo para disminuir los costos de producción de pieles de yacaré overo, poder competir en el mercado internacional y mantener el financiamiento del programa de conservación de la especie y las investigaciones asociadas a esta.

4.3. EFECTO DE LA HARINA DE SOJA SOBRE PARÁMETROS BIOQUÍMICOS Y MORFOMETRÍA INTESTINAL Y HEPÁTICA DE *Caiman latirostris*.

El perfil bioquímico de la sangre es un método mínimamente invasivo que puede acceder al estado de salud y fisiológico de los animales, tanto silvestres, como cautivos (Diethelm y Stein, 2006; Wu et al., 2014; Arguedas et al., 2018; Moleon et al., 2023). Algunos autores mencionan que variaciones en los valores de la bioquímica sanguínea de especies de cocodrilianos no necesariamente significan una diferencia real entre estos, debido a la falta de valores estándares y de referencia necesarios para la profilaxis de enfermedades

y monitoreo nutricional en las granjas de cocodrilianos (Millan et al., 1997). Asimismo, la evaluación histológica de órganos como los intestinos o el hígado es importante, debido a su participación en el metabolismo, homeostasis, desintoxicación y la excreción de compuestos endógenos. Ejemplos de la función intestinal y hepática son la absorción de nutrientes, defensa del organismo, síntesis de albúmina, factores de coagulación, el almacenamiento de glucosa o el metabolismo de hormonas (Aulbach y Amuzie, 2017).

Las alteraciones en los valores de la bioquímica sanguínea pueden indicar la existencia de problemas hepáticos, renales, intestinales, hemorragias o inflamaciones (Quiroz-Rocha y Bouda, 2007). Por todo lo anterior, la evaluación histológica y de los parámetros bioquímicos sanguíneos establecen herramientas importantes para la interpretación de la capacidad nutricional de las dietas y su efecto sobre el estado fisiológico de los animales (Hidalgo-Vila et al., 2007; Thrall et al., 2012).

Para lograr un manejo adecuado de las dietas, es necesario conocer los valores referenciales de la bioquímica sanguínea para poder detectar y evitar posibles efectos adversos de las dietas sobre la salud de los animales (Campbell, 1996, 2004). Aunque se han reportado los valores de referencia para muchas especies de reptiles (Alleman et al., 1999; Dickinson et al., 2002; Casal y Oros, 2007), incluyendo varias especies de cocodrilianos (**Tabla 16**), estos valores reportados están relacionados a comparaciones entre individuos silvestres y de cautiverio (Peng et al., 2018). Asimismo, los reportes para *C. latirostris* son escasos o relacionados con su respuesta a factores ambientales (Zayas et al., 2011; Moleón et al., 2023).

Nuestra investigación se centra en tomar los valores de ciertos parámetros bioquímicos en sangre (**Tabla 14**) como indicadores del estado de salud y la respuesta fisiológica de *C. latirostris* frente a nutrientes provenientes de la soja.

La concentración de lípidos en sangre suele ser uno de los parámetros a monitorear atentamente cuando se trata del estado de nutrición y salud de cualquier especie animal. Respecto a la concentración de colesterol de los individuos de *C. latirostris* tratados con las diferentes dietas, se puede apreciar que este parámetro es similar a lo reportado para esta y otras especies de cocodrilianos (**Tabla 16**). Asimismo, la concentración de triglicéridos en sangre de los individuos tratados con las dietas 0HS y 25HS fueron semejantes a las reportados para *C. latirostris*, *C. niloticus* y *G. gangeticus*; pero menores

a los reportes para *A. sinensis*, *A. mississippiensis*, *C. palustris*, y *C. mindorensis* (Sigler, 1990; Stacy y Whitaker, 2000; Lance et al., 2001; Mora-Rivera, 2003; Lovely et al., 2007; Zayas et al., 2011; Amin y Shrivastav, 2014; Peng et al., 2018; Regaza et al., 2021). Mientras que los valores de triglicéridos de los individuos tratados con la dieta 40HS fueron menores respecto a los reportados para las especies de la **Tabla 16**.

Tabla 16. Valores reportados de la bioquímica sanguínea de diferentes cocodrilianos. Datos extraídos de: Sigler (1990); Stacy y Whitaker (2000); Lance et al. (2001); Mora-Rivera (2003); Lovely et al. (2007); Padilla et al. (2011); Zayas et al. (2011); Amin y Shrivastav (2014); Peng et al. (2018); Regaza et al. (2021).

Especie de Cocodriliano	Parámetros bioquímicos del Suero sanguíneo				
	Glucosa (g/L)	Proteínas Totales (g/dL)	Albúmina (g/dL)	Colesterol (g/L)	Triglicéridos (g/L)
<i>C. latirostris</i>	1,24	4,76	2,38	1,594	0,152
<i>A. sinensis</i>	1,24	7,38	2,648	2,401	1,515
<i>C. palustris</i>	0,68	3,15	1,11	2,959	3,238
<i>C. moreletti</i>	0,696	-	-	2,501	-
<i>A. mississippiensis</i>	0,98	5,45	-	0,144	0,753
<i>C. niloticus</i>	0,684	4,12	1,47	2,123	0,376
<i>C. mindorensis</i>	0,657	9,55	1,99	1,59	1,021
<i>G. gangeticus</i>	-	4,33	1,17	1,983	0,536

Las concentraciones de lípidos en sangre de los cocodrilianos pueden variar entre individuos de diferentes sexos o clases de tamaño (Padilla et al., 2011; Peng et al., 2018). Estas concentraciones están directamente relacionadas con la dieta que consumen (Girling et al., 2015), que en cautividad suele ser rica en grasas saturadas. Por lo tanto, no es sorprendente encontrar valores elevados de lípidos en sangre, lo cual puede ser el resultado de una baja actividad física general en los cocodrilianos y un consumo adicional de alimento para reservas nutricionales (Lance et al., 2001; Padilla et al., 2011). Los triglicéridos son una fuente importante de energía para los cocodrilianos, y aunque no suelen experimentar problemas con el catabolismo de estos lípidos, concentraciones elevadas en sangre pueden causar obesidad, pancreatitis y enfermedades cardiovasculares (Coulson y Herbert, 1981).

En nuestra investigación, las concentraciones de triglicéridos en sangre de los animales alimentados con las dietas 0HS y 25HS no difirieron significativamente entre sí (**Tabla 14**). Esto sugiere que las dietas con al menos un 25% de soja en su contenido proporcionan la cantidad de triglicéridos que aportan las dietas con 100% proteína animal. Por otro lado, la ligeramente baja concentración de triglicéridos encontrada en los individuos alimentados con la dieta 40HS (**Tabla 14**) podría ser un indicador de malnutrición o alguna otra patología en otros reptiles (Campbell, 2006; Thrall et al., 2004). Sin embargo, es importante tener en cuenta que niveles bajos de triglicéridos no siempre están asociados a la presencia de una enfermedad, en este caso, ya que los valores de triglicéridos reportados son similares a los reportados para la especie (Zayas et al., 2011) y cercanos a los valores reportados para otras especies de cocodrilianos en cautiverio (**Tabla 16**).

La concentración de proteínas totales y albúmina en sangre de *C. latirostris* durante la alimentación con dietas enriquecidas con harina de soja no mostró diferencias entre los diferentes tratamientos (**Tabla 14**). Por lo que se puede asumir que el catabolismo proteico no fue afectado por la cantidad de soja presente en el alimento y que la cantidad de proteína (animal + vegetal) presente en el alimento suministrado es suficiente para satisfacer la demanda nutricional de los yacarés. Algunos de los valores obtenidos en este estudio (**Tabla 14**) no difieren en gran magnitud a los reportados para otras especies de cocodrilianos (**Tabla 16**).

Las variaciones en los valores del proteinograma se pueden asociar a problemas nutricionales y patológicos (Campbell, 1996). Por ejemplo, altas concentraciones de proteínas totales pueden indicar procesos inflamatorios, inmunes e incluso parasitismo en los individuos, mientras que bajas concentraciones de albúmina se relacionan más estrechamente con el estado nutricional (Adelakun et al., 2019), sugiriendo hipoproteinemias como consecuencia de una desnutrición crónica, o una mala absorción y digestión (Moleón et al., 2023). Sin embargo, ya que los niveles de albúmina en sangre reportados en este estudio para *C. latirostris* son iguales o mayores a los que se han reportado esta y otras especies de cocodrilianos (**Tabla 16**), es posible descartar la posibilidad de que los yacarés alimentados con dietas enriquecidas con harina de soja padecieran de hipoproteinemia o estuvieran mal absorbiendo la dieta.

Las concentraciones típicas de glucosa en sangre en la mayoría de los reptiles van de 0,6 g/L a 1 g/L (Campbell, 1996), aunque los niveles “normales” para cocodrilianos se ubican entre 1 y 2 g/L. La concentración de glucosa en sangre en los reptiles suele estar relacionada con la edad del individuo, su nivel de actividad, la presencia de afecciones metabólicas, patologías y estrés (Thrall et al., 2004; Campbell, 2006; Moleón et al., 2023), aunque en cocodrilianos este parámetro en la mayoría de los casos suele ser influenciado por la dieta y el periodo de ingesta de alimento (Botha, 2011).

El metabolismo único de los cocodrilianos mantiene estables las concentraciones de glucosa en sangre, incluso tras periodos prolongados de ayuno. La dieta también afecta los niveles de glucosa: después de la ingestión de alimento, aumentan debido a la digestión y absorción de nutrientes. Con el tiempo, los valores disminuyen para conservar la energía. Estudios en *C. latirostris* reportaron valores más altos 24 h después de la ingesta (Zayas et al., 2011), en comparación con análisis realizados en *C. palustris* por Stacy y Whitaker (2000) 48 h después.

Los valores de glucosa en sangre obtenidos en los animales alimentados con las dietas 0HS y 25HS fueron similares a los previamente reportados para *C. latirostris* (Zayas et al., 2011). Por otro lado, los animales alimentados con la dieta 40HS presentaron concentraciones ligeramente inferiores, aunque similares a las registradas en *C. palustris* y otras especies relacionadas (ver Tabla 16). Estos resultados sugieren una adaptación del metabolismo de *C. latirostris* en respuesta a los nutrientes derivados de la soja, y al mismo tiempo descartan efectos negativos en la salud de la especie debido a las dietas con harina de soja (Botha, 2011).

La interacción "intestino-nutriente" es una relación compleja, donde la presencia o ausencia de nutrientes en la luz intestinal puede inducir atrofia o hipertrofia de la mucosa (Caruso y Demonte, 2005). Esto ha llevado a establecer que el estado de las vellosidades intestinales como un indicador de la absorción de nutrientes de la dieta (Yamauchi et al., 2006). De este modo es posible modular la absorción de nutrientes mediante la composición de la dieta, por ejemplo, variando las materias primas o las cantidades de macronutrientes presentes (Tamura y Suzuki, 1998), sin embargo, los resultados pueden diferir entre especies y estadio etario de las mismas (Lee et al., 2003).

Se ha establecido que los animales con hábitos alimenticios omnívoros o carnívoros típicamente presentan vellosidades intestinales altas y delgadas, esto para permitir un transporte rápido del quimo adecuadamente preparado (a partir de la digestión gástrica y enzimática) para la absorción intestinal, manteniendo al mismo tiempo una mayor superficie de la mucosa. Por su parte, animales con hábitos alimenticios herbívoros presentan vellosidades cortas y anchas, capaces de disminuir la velocidad de pasaje del alimento y, por ende, favorecer la acción digestiva sobre el quimo altamente celulósico (Barry, 1976).

Al evaluar la morfometría de las vellosidades intestinales de *C. latirostris* en función de la cantidad de soja presente en las dietas, la longitud de las vellosidades de los animales alimentados con la dieta 25HS fueron más largas que las del resto, mientras que los animales alimentados con la dieta 40HS presentaron vellosidades menos anchas que el resto de los animales (**Tabla 15**). Estos datos permiten aseverar que la dieta 25HS es el tratamiento que más estimuló una respuesta morfofisiológica, promoviendo mayor crecimiento de las vellosidades, y por lo tanto una mayor superficie de absorción. Resultados similares han sido encontrados en otras especies monogástricas alimentadas con dietas enriquecidas con materias primas vegetales (Tapia et al., 2000; Rodríguez et al., 2006; González et al., 2007; Teng et al., 2017). Los estudios de Macari (1998) y Teng et al. (2017) sugieren que los nutrientes de la soja no interfieren o limitan la proliferación celular de la mucosa intestinal, por lo que el crecimiento de las vellosidades no se ve afectado. Además, las investigaciones de Velásquez et al. (2003) y Bakare y Chimonyo (2017) han propuesto que el crecimiento de las vellosidades intestinales podría ser el resultado de una mayor producción de enzimas digestivas, promovida por el alto contenido de fibra en los alimentos.

Del mismo modo, el largo y ancho de las vellosidades de los yacarés overos alimentados con las diferentes dietas tratamientos, disminuyó progresivamente desde el segmento proximal del intestino delgado hasta el intestino grueso (**Tabla 15**), siendo un comportamiento fisiológico frecuente en la mayoría de las especies (Bakare y Chimonyo, 2017). Mayhew y Middleton (1985) explican que los factores que aumentan el tamaño de las vellosidades, como la cantidad y el tipo de nutrientes, así como ciertas hormonas, tienen mayor concentración al principio del intestino delgado, y se reduce en la porción final de este órgano.

Es posible observar cómo la presencia de harina de soja en el alimento suscitó cambios en la morfoanatomía de las vellosidades intestinales del yacaré overo (**Tabla 15**), reflejándose características intermedias a ambos fenotipos antes descritos, es decir, vellosidades largas y anchas. La expresión de estos cambios pueden ser producto de una lenta tasa evolutiva de *C. latirostris* (Green et al., 2014), entendiéndose que las transiciones en los hábitos alimenticios en los cocodrilianos han sido recientes (Barry, 1976; Melstrom y Irmis, 2019).

Por su parte, el hígado es un órgano importante y a considerar dentro del monitoreo del efecto de las dietas sobre la salud de los animales, ya que participa activamente, tanto en la digestión y absorción de los lípidos, como en la síntesis de los ácidos grasos (Leveille et al., 1968; Malheiros et al., 2003). Aunque en algunas especies de reptiles se almacenan la mayoría de los lípidos en un órgano especializado, denominado cuerpo graso (Huchzermeyer; 2003), también se acumulan en el hígado (Price, 2017). En *Caiman latirostris* este último normalmente presenta grandes cantidad de lípidos dentro de los hepatocitos (**Figura 19 y 21**; Stark et al., 2007). Sin embargo, una acumulación excesiva de lípidos puede afectar la absorción de otros nutrientes, causar inflamación e infecciones del tejido adiposo de los animales, conduciendo a enfermedades cardiovasculares y elevando su mortalidad (Wang et al., 2017).

Por ende, se puede considerar positivo el hecho de que la cantidad de lípidos presentes en el hígado de *C. latirostris* en relación con la cantidad de soja presente en las dietas, fuesen iguales o menores en los individuos alimentados con la dietas 25HS y 40HS que en los individuos alimentados con la dieta 0HS (**Figura 20**). Esto permite concluir que la inclusión de harina de soja dentro de la dieta del yacaré overo impacta efectivamente en el almacenaje, digestión y absorción, tanto de carbohidratos y proteínas (**Tabla 14**), como de los lípidos (**Tabla 14; Figura 20**), ya que las concentraciones de todos los macronutrientes se mantuvieron dentro de los rangos reportados (**Tabla 14; Tabla 16**).

La harina de soja es uno de los componentes más usados y preponderantes dentro de la formulación de las dietas de animales monogástricos (Sookying et al., 2013) y debido al alto contenido de lípidos de la soja, su ingesta suele relacionarse con una excesiva acumulación de grasa, disminuyendo el consumo del alimento (Wang et al., 2017; Chuang et al., 2019; Geary, 2020). Sin embargo, la cantidad de grasas de la soja son

suficiente para satisfacer los requerimientos nutricionales de *C. latirostris*, mantener la TCA (**Tabla 12**) y la concentración de lípidos en sangre e hígado dentro los rangos reportados (**Tablas 16**). No obstante, se observó una ligera disminución en los niveles de triglicéridos de los yacarés alimentados con la dieta 40HS, lo cual podría indicar una mayor eficiencia en el metabolismo y un mejor equilibrio nutricional en las dietas con contenidos de soja.

4.4. EFECTO DE LA INCLUSIÓN DE ENZIMAS DIGESTIVAS EXÓGENAS, SOBRE LA DIGESTIBILIDAD DE LA DIETA Y LA TASA DE CRECIMIENTO EN NEONATOS Y JUVENILES DE *Caiman latirostris*.

El uso de enzimas digestivas para degradar las dietas y optimizar su absorción, en cocodrilianos ha sido poco estudiado (Hilevski et al., 2022), centrándose en la inclusión de otros elementos complementarios como aminoácidos (Reigh y Williams, 2022), mientras que en la nutrición aviar este tópico está bien establecido y desarrollado (Selle y Ravindran, 2007). La combinación de diferentes tipos de enzimas son un medio para facilitar la digestión de nutrientes, mejorar el valor alimenticio de las dietas a base de soja y neutralizar los efectos antinutritivos de algunos de sus componentes (Józefiak et al., 2010), además de maximizar la formulación dietaria, promoviendo un óptimo crecimiento manteniendo bajos los costos (Cowieson et al., 2006; Francesch y Geraert, 2009; Amer et al., 2021).

4.4.1. EFECTO DE LA INCLUSIÓN DE ENZIMAS DIGESTIVAS EXÓGENAS, SOBRE LA TASA DE CRECIMIENTO EN NEONATOS DE *Caiman latirostris*.

El fitato es capaz de unirse a iones minerales esenciales como hierro, calcio, zinc, fósforo, e incluso a las vitaminas D y B12, lo que reduce su absorción y pudiendo comprometer la densidad ósea de los huesos o causar anemias (Jiang et al. 2013; Mangels, 2014). También, puede unirse directa o indirectamente a proteínas e hidratos de carbono formando complejos, inhibiendo su actividad o disminuyendo su absorción (Oatway et al., 2001; Selle y Ravindran, 2007, 2008; Jiang et al. 2013). Además, contiene otros factores antinutricionales como inhibidores de tripsina que pueden reducir la digestibilidad proteica (Cheng y Hardy, 2003; Selle y Ravindran, 2007, 2008).

En consecuencia, la inclusión de enzimas del tipo fitasas, proteasas y carbohidrasas en las dietas de engorde de distintos animales monogástricos es una práctica cada vez más habitual para facilitar la producción sostenible.

En la actualidad, las fitasas exógenas se incluyen de forma rutinaria en las dietas para aves, debido a que representan una fuente económica para aumentar la digestibilidad de estas (Liua et al., 2014). En el presente estudio, tanto el peso, como la longitud de los yacaré alimentados con la dieta suplementada con AXTRA® PHY no difirió del resto de animales alimentados con las otras dietas (**Tabla 8**). Sin embargo, el crecimiento de este grupo fue mayor (Figuras 22 y 23), en línea con los hallazgos de Ravindran et al. (1999), sugiriendo que la adición de fitasas en dietas con harina de soja no afectó el crecimiento del yacaré overo, resultados similares a lo de Ayhan et al. (2008) en trucha dorada (*Oncorhynchus aguabonita*) y Józefiak et al. (2010) en *G. gallus*.

Los efectos reportados en esta investigación pueden relacionarse a factores como el origen de las enzimas usadas, su concentración o la del fitato presente en la dieta. También pueden influir la concentración y origen de las proteínas, la temperatura y el pH estomacal para generar una actividad enzimática máxima. Asimismo, cabe la posibilidad de que la naturaleza fibrosa de la soja limitara el acceso de la fitasa a su sustrato, impidiendo así la correcta degradación del fitato (Selle et al., 2010).

Las dietas suplementadas con AXTRA® XAP o AXTRA® XAP + AXTRA® PHY, tampoco generaron diferencias significativas en el crecimiento de los animales alimentados con estas (**Figura 22 y 23**). Otros estudios han abordado el efecto contiguo de diferentes enzimas sobre el crecimiento de pollos y peces alimentados con dietas formuladas a base de soja, trigo, sorgo o maíz (Yildirim, 2008; Korkut et al., 2016; Amer et al., 2021). Los resultados reportados son contradictorios, pero de igual manera sugieren un efecto aditivo entre estas enzimas (Choct, 2006; Francesch y Geraert, 2009).

En la práctica, la xilanasas, amilasas y proteasas se incluyen rutinariamente en las dietas de pollos de engorde a base de ingredientes vegetales para amortiguar el impacto negativo de los polisacáridos solubles no amiláceos e inhibidores de tripsina (Caine et al., 1998; Choct, 2006) y mejorar la digestibilidad de las proteínas (Drew et al., 2005; Dalsgaard et al., 2012).

Ayhan et al. (2008) y Dalsgaard et al. (2012) evaluaron el efecto de proteasas y carbohidrasas exógenas sobre la digestibilidad de dietas con altas cantidades de nutrientes vegetales, sin encontrar efectos significativos sobre los parámetros de crecimiento al agregar estas enzimas a dietas con harina de soja, lo cual es similar a los resultados encontrados en este estudio.

La pobre respuesta generada por la adición de proteasas y carbohidrasas a la dieta sobre el crecimiento de los yacarés puede atribuirse a que la especie presenta altas concentraciones de enzimas digestivas en luz de intestinal para una digestión ideal de proteínas y carbohidratos. También podría deberse a un efecto adverso sobre la secreción de enzimas endógenas, o a una respuesta adaptativa de la especie (Cardinal et al., 2019; Shima et al., 2021).

A pesar de los datos poco concluyentes con relación a los efectos de los cócteles de enzimas, las mezclas se han generalizado en la producción animal, principalmente en pollos y cerdos, ya que el uso de combinaciones de enzimas puede constituir un medio para facilitar la disponibilidad de nutrientes para la digestión y mejorar así el valor alimenticio de las dietas a base de ingredientes vegetales (Juanpere et al., 2005; Francesch y Geraert, 2009).

4.4.2. EFECTO DE LA INCLUSIÓN DE FITASAS SOBRE LA TASA DE CRECIMIENTO EN JUVENILES DE *Caiman latirostris*.

La adición de fitasas a la dieta con 25% de harina de soja, no generó un aumento significativo del peso o la longitud en los juveniles de yacaré overo (**Figuras 24 y 25**). Al igual que en los individuos neonatos, estos resultados están relacionados con las características y factores inherentes a las fitasas ya antes mencionados en el **Punto 4.4.1**. No obstante, al comparar la ganancia de peso y longitud entre individuos neonatos y juveniles de *C. latirostris* alimentados con dietas con 25HS + AXTRA® PHY generó ligeras respuestas en la ganancia de peso y longitud de los juveniles, pero más acentuadas en los neonatos de la especie (**Figuras 26 y 27**). La tasa de crecimiento de los cocodrilianos esta influenciada por variables como la densidad de animales, fotoperiodo, temperatura ambiental (Poletta et al., 2008; Parachú-Marco et al., 2009; Ciocan et al., 2018), o como en el caso de esta investigación, a la alimentación y composición nutricional de las dietas.

También es un parámetro que depende del sexo del individuo y su madurez sexual, pero principalmente depende de la edad del individuo (Chabreck y Joanen, 1979; Joanen y McNease, 1987), donde los animales de mayor edad muestran tasas de crecimiento inferiores a las mostradas por los individuos neonatos o más jóvenes (Joanen et al., 2021).

4.5. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO Y FILOGENÉTICO DE ENZIMAS DIGESTIVAS DE *Caiman latirostris*.

Las enzimas digestivas son uno de los factores más importantes que influyen en la conversión alimenticia y el crecimiento de los animales (Kuz'mina y Garina, 2001). La caracterización de las enzimas digestivas puede proporcionar información valiosa sobre la capacidad de los cocodrilianos para hidrolizar carbohidratos, lípidos y proteínas, siendo esto esencial para comprender su adaptación a ciertas dietas.

La pepsina y progastricina son de las principales proteasas que catalizan la hidrólisis de las proteínas en péptidos más pequeños, estando asociadas naturalmente al tracto gastrointestinal de los cocodrilianos y desempeñando un papel fundamental en los procesos digestivos, ya que los péptidos que generan entran en el tracto intestinal, donde las proteasas pancreáticas e intestinales degradan los péptidos a aminoácidos (Siar et al., 2018).

Estudios han indicado la existencia de una correlación entre las enzimas digestivas y los hábitos alimenticios de peces y aves, comprobándose que la actividad y cantidad de ciertas enzimas puede variar si los animales son herbívoros, omnívoros o carnívoros (Ray et al., 2012). Bajo esta premisa se llevaron a cabo los análisis correspondientes.

4.5.1. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO Y FILOGENÉTICO DE LA PEPSINA Y PROGASTRICINA DE *Caiman latirostris*.

Las diferencias halladas en los MSA y alineamientos estructurales de aminoácidos de la pepsina y progastricina entre *C. latirostris* y especies relacionadas (**Figuras 28, 30, 31, 33, 35 y 36**) señalan un patrón de conservación entre enzimas indispensables para la nutrición y digestión de la dieta de vertebrados. Son cambios discretos que no necesariamente influyen en una actividad diferenciada de las enzimas (en el caso de proteínas aspárticas sólo una fracción de sus residuos contribuyen a la divergencia funcional) ya que la mayoría de los sitios están altamente conservados. Algunos de estos residuos son sitios de interacción enzima-sustrato (Carginale et al., 2004).

La diversificación funcional entre los distintos tipos de proteasas aspárticas está respaldada por pruebas experimentales (Carginale et al., 2004). Sin embargo, estas enzimas muestran un nivel bastante alto de conservación, si se consideran sus propiedades catalíticas generales (Carginale et al., 2004). Es así como, en la pepsina y progastricina de *C. latirostris* se observó la conservación de los residuos catalíticos: Asp32, Asp210 (pepsina) y Asp30, Asp201 (progastricina); reportados anteriormente por Kageyama, (2002) en la pepsina A porcina como Asp32 y Asp215; y Castro et al., (2012) en los residuos Asp32 y Asp217 de una extensa filogenia realizada en mamíferos, anfibios y peces. Estos residuos se encuentran situados en las hendiduras de unión al sustrato de la mayoría de las proteínas aspárticas.

Igualmente, en *C. latirostris* se conservaron las regiones de las secuencias aminoacídicas de las proteínas en cuestión. Kageyama, (2002) identificó en la pepsina porcina las regiones: secuencia señal (pre péptido) y secuencia de cadena (que incluye segmento de activación y fracción activa de la enzima), en ese orden. El número de aminoácidos que constituyeron cada región fue de 1-15, 44 -326. También, Castro et al. (2012) halló puentes disulfuros que intervienen en el plegamiento de las proteínas. Estos resultados coinciden con las regiones y tipos de enlaces identificados en *C. latirostris*.

Se habla de diversificación y divergencia funcional, debido a que todos los grupos de pepsinas evolucionaron a partir de una proteinasa ancestral común, y luego ocurrieron varias duplicaciones génicas, que generaron una variedad de especies de pepsinas con propiedades catalíticas variables (Kageyama et al., 1990; Kageyama, 2000; Kageyama, 2002). De este hecho también se puede inferir que a partir de la aparición del dominio “Peptidasa A1” en las proteínas pepsina y progastricina de *C. latirostris*, probablemente dicho dominio divergió de un dominio ancestral y en la actualidad se encuentra en la mayoría de los organismos eucariotas (Tang et al., 1978).

De acuerdo con análisis filogenéticos recientes al menos ocho eventos de duplicación ocurrieron a lo largo de diferentes linajes, y fue en la primera duplicación (la cual podría haberse producido en la primera etapa de la evolución de los vertebrados) en la cual ocurrió la divergencia entre el grupo de las progastricinas (pepsinógeno C/pepsina C) y las pepsinas A (Kageyama, 2002; Carginale et al., 2004).

Las enzimas digestivas de vertebrados no mamíferos, como los de los peces, aparecieron mucho antes en la evolución, dando lugar a una diversidad significativa en sus estructuras y propiedades enzimáticas (Gildberg, 1988). Sin embargo, antes de la divergencia de los tetrápodos, un único gen de progastricina se expandió en tándem para producir dos linajes génicos de progastricina: pgbC y pgC2. Así, pgC2 se encuentra en saurópsidos, anfibios y marsupiales. Por su parte, pgbC se retuvo en los anfibios, pero se duplicó en el ancestro de los amniotas dando lugar a otras progastricinas entre las que se encuentra la progastricina pgC1, la cual se mantiene en mamíferos, reptiles y marsupiales, pero no en aves (Castro et al., 2012).

La reconstrucción filogenética aquí presentada (**Figuras 32 y 37**) incluye un único tipo de pepsina y progastricina para todas las especies animales que conforman el análisis, ya que el estudio de divergencia de variedades de estas proteínas no compete al presente trabajo. Al igual que en los árboles filogenéticos reportados por Carginale et al. (2004), los obtenidos en esta investigación coinciden en que los peces son el grupo más ancestral que diverge primero, seguidos de los anfibios. Es importante señalar, que la acumulación de cambios genéticos en las ranas fue mucho mayor que la del resto de los grupos, ya que poseen sub-genomas que pueden ejercer control sobre parámetros como la expresión o silenciamiento génico, el splicing alternativo, tasas de recombinación y de evolución de proteínas entre otros (Premachandra et al., 2022). Caso contrario a los cocodrilianos y serpientes que ostentan bajas tasas de acumulación de cambios en el genoma permitiendo inferir que los pocos cambios que ocurren en la pepsina y progastricina son significativos (Green et al., 2014). Esta reconstrucción, a pesar de ser limitada a unas pocas especies, concuerda con la filogenia de los vertebrados actualmente aceptada.

La heterogeneidad y expresión de las proteínas aspárticas podría ser ventajosa para la digestión eficaz de diversas proteínas en el estómago. De tal manera que la presencia de diferentes formas de pepsina en ciertas especies puede ser indicador del nicho alimenticio y correlacionarse con adaptaciones a diferentes tipo de alimento, dietas, hábitos alimentarios, o a una estrategia para aumentar la producción de enzimas con el fin de facilitar la digestión a bajo diferentes variables ambientales. En otros casos, se ha sugerido que en animales herbívoros se requiere más enzima para lograr una degradación efectiva de bajas concentraciones de proteínas en la dieta (Kapoor et al., 1975; Fernández et al., 2001; Kageyama, 2002; Carginale et al., 2004).

Con relación a la progastricina, los niveles totales de la proteína en la mucosa gástrica varían en los mamíferos en correlación con los hábitos alimentarios. Los valores parecen ser más altos en mamíferos herbívoros (Kageyama et al., 1984; Kageyama et al., 1991), que en omnívoros y carnívoros (Furihata et al., 1980; Kageyama et al., 1992; Suzuki et al., 1999). Esto puede significar que los animales que ingieren alimentos poco proteícos o herbáceos necesitan mayores concentraciones de progastricina, para digerir de forma eficiente las proteínas de los alimentos (Suzuki et al., 1999).

Otra variable que también puede tener influencia sobre la presencia y actividad de este tipo de enzimas es el estadio etario. El efecto puede apreciarse con mayor facilidad en especies que experimentan cambios ontogenéticos en la dieta (Kuz'mina, 1996; Peres et al., 1998). En el caso de la rana toro (*Lithobates catesbeianus*) la actividad de las enzimas digestivas aumenta desde el inicio de la fase de alimentación hasta la premetamorfosis, lo que está relacionado con la maduración del aparato digestivo. Luego, durante el clímax de la metamorfosis, las actividades de las enzimas digestivas disminuyen, porque el animal no come durante este periodo. Finalmente, al terminar la metamorfosis, la actividad de las enzimas proteolíticas, las proteasas ácidas y la tripsina, aumenta entre 35% y 400%. Estos resultados indican que las enzimas digestivas específicas de cada estadio tienen presumiblemente un significado fisiológico y además mejoran la comprensión de la dinámica de desarrollo de las enzimas digestivas en el cambio de hábitos alimentarios omnívoros/herbívoros a carnívoros (Santos et al., 2016).

Debido a la elevada conservación de secuencias y estructuras de la pepsina y la progastricina entre cocodrilianos y otras especies relacionadas, puede parecer que la actividad y producción de estas enzimas en yacaré overo podrían estar correlacionadas con su dieta y ontogenia. No obstante, poco se sabe acerca de este tópico.

Si especulamos que los cocodrilianos pudieron haber explotado un nicho dietético omnívoro desde finales del Cretácico como sugieren Melstron e Irmis (2019), y que los recursos estables y altamente predecibles del Cenozoico actuaron como la principal fuerza evolutiva que impulsó su especialización en una dieta carnívora (Kissling et al., 2012; Burin et al., 2016), quedaría aún por esclarecer cómo es que aligatóridos pueden aprovechar mejor los nutrientes de origen vegetal en comparación a las otras familias de cocodrilianos. En la topología de los árboles filogenéticos (**Figura 30 y 33**) puede hallarse la respuesta. Se puede apreciar como para ambas enzimas, el clado de los cocodrilianos

se divide y agrupa a las especies evaluadas en las ramas correspondiente a sus familias, indicando que los cambios en la dieta (paso de omnivoría a carnivoría) fueron más pronunciados en la familia Crocodylidae que en la Alligatoridae, lo cual es sustentando por lo expuesto por Tracy et al. (2015) y los resultados de esta investigación.

Entre los homopolisacáridos más abundantes de la naturaleza se encuentran la celulosa, componente estructural de la pared celular de las plantas, y la quitina, componente principal del exoesqueleto de los invertebrados (Rodríguez-Pedroso et al., 2009; Slavin y Carlson, 2014). Como se mencionó previamente, el yacaré overo experimenta cambios ontogénicos en su dieta; sin embargo, los insectos y otros invertebrados son un recurso constante en su alimentación a lo largo de toda su vida (Brochu, 2003; Seijas, 2011; van Hoek, 2014).

La constante presencia de quitina en la dieta de *C. latirostris*, junto a la similitud con la celulosa y una respuesta a dietas ricas en proteínas, sugiere que pepsina y progastricina están programadas genéticamente para cambios ontogenéticos en el yacaré overo (producción y actividad), cierta indicando plasticidad fenotípica frente a ciertos nutrientes (Horn et al., 1986; Karasov, 1992; Hidalgo et al., 1999; Caviedes-Vidal et al., 2000).

CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos en este estudio es posible concluir que existen evidencias que respaldan la capacidad de los cocodrilianos, en particular los aligatóridos como *C. latirostris*, para aprovechar eficientemente nutrientes provenientes de fuentes vegetales, como la harina de soja. Se observa como aumenta la digestibilidad de la dieta con la adición de harina de soja, indicando que la inclusión de este ingrediente en una dieta formulada para *C. latirostris* en un rango del 20 al 40% podría estimular una buena absorción de nutrientes y promover un mejor crecimiento. Estos hallazgos sugieren que los cocodrilianos de vida libre podrían ingerir material vegetal de manera deliberada, no solo para prolongar el tiempo de residencia del alimento en el sistema digestivo y mejorar la digestión y absorción de nutrientes, sino también como parte de su dieta habitual.

Los resultados indicaron que la harina de soja es un ingrediente altamente palatable para el yacaré overo, e incluso puede fomentar la aceptación de dietas enriquecidas con este componente. Además, se observó que los nutrientes y fibras vegetales proporcionados por la harina de soja no afectan negativamente el metabolismo de *C. latirostris*. Por el contrario, se ha constatado que el Índice de Conversión de Alimento y crecimiento de los animales mejora, lo cual refleja una buena eficiencia en la digestión y asimilación de nutrientes. Estos resultados concuerdan con estudios previos realizados en otras especies de aligatóridos.

A partir de esta investigación también es posible concluir que la inclusión de harina de soja en la dieta de *C. latirostris* no tiene un impacto negativo sobre los niveles de lípidos, proteínas y glucosa en sangre. Aunque las dietas para cocodrilianos criados en cautiverio pueden ser ricas en grasas saturadas y contribuir a niveles altos de lípidos en sangre, los valores obtenidos en este estudio se consideran normales y similares a los reportados para esta y otras especies de cocodrilianos. Asimismo, las concentraciones de proteínas totales y albúmina en la sangre de los yacarés overos tampoco se vieron afectados. En cuanto a los niveles de glucosa en sangre, los yacarés overos no mostraron cambios significativos en comparación con los valores previamente reportados para *C. latirostris*. En conjunto, estos hallazgos respaldan la viabilidad de utilizar la harina de soja como un componente en la alimentación de los yacarés overos sin afectar negativamente su estado de salud metabólica.

La inclusión de harina de soja en la dieta del yacaré overo tiene efectos beneficiosos en el crecimiento de las vellosidades intestinales y en el metabolismo de los lípidos en el hígado. La adición de harina de soja a la dieta de *C. latirostris* afecta positivamente la morfometría de las vellosidades intestinales. Específicamente, se observó que la dieta con un 25% de soja estimula una respuesta morfofisiológica más pronunciada, promoviendo un mayor crecimiento de las vellosidades y, por ende, una mayor superficie de absorción. Además, aunque el yacaré overo tiende a acumular grandes cantidades de lípidos en el hígado, se encontró que la concentración de lípidos presentes en el hígado de los individuos alimentados con dietas que contenían soja era igual o menor en comparación con aquellos alimentados sin soja.

La adición de fitasas exógenas en las dietas de animales como *C. latirostris* ha demostrado ser una fuente económica para aumentar la digestibilidad de las dietas y el crecimiento de los individuos. Sin embargo, sus efectos pueden variar según el origen de la enzima, su concentración y la del fitato presente en el alimento, así como la naturaleza fibrosa de los ingredientes. Aunque se ha demostrado que la inclusión de otras enzimas como xilanasas, amilasas y proteasas en las dietas de aves mejora la digestibilidad de las proteínas y amortigua el impacto negativo de algunos ingredientes vegetales, no se ha encontrado efectos significativos en los parámetros de crecimiento del yacaré overo. El aumento de peso y longitud está influenciado por diversos factores, además de la alimentación y la composición nutricional de su dieta, la edad del individuo, entre otros. En general, se sugiere que la inclusión de enzimas exógenas puede ser beneficiosa para mejorar la digestibilidad de *C. latirostris* frente a dietas enriquecidas con soja, pero se deben considerar varios factores más, como la inmovilización de la enzima en una matriz de polisacáridos para lograr un efecto óptimo.

Los análisis bioinformáticos de las enzimas pepsina y progastricina en *C. latirostris* revelaron un patrón conservado en sus alineamientos secuenciales y estructurales en comparación con especies relacionadas. Aunque se observaron cambios discretos en estas enzimas, no parecen tener un impacto significativo en su actividad diferenciada en los cocodrilianos. Si bien existe cierta diversificación funcional en estas proteasas, aún se conservan en alto grado sus propiedades catalíticas generales. La presencia de regiones conservadas en las secuencias aminoacídicas de estas enzimas digestivas de *C. latirostris* refuerzan su importancia en la nutrición y asimilación de la dieta. Los análisis

filogenéticos sugieren que la pepsina y progastricina de peces y anfibios surgieron primero, mientras que los cocodrilianos poseen secuencias y estructuras más conservadas. La presencia de múltiples formas de pepsina y progastricina en diversas especies se correlaciona con el tipo de alimento, el hábito alimentario, la adaptación a diferentes dietas y la ontogenia, lo cual influye en su presencia y actividad, con cambios significativos en distintas etapas del desarrollo. En conclusión, los resultados indican que las enzimas digestivas en *C. latirostris* están estrechamente relacionadas con su dieta, ontogenia y adaptación a diferentes recursos alimentarios.

Para finalizar, los resultados de este estudio indican que la dieta con un 25% de harina de soja es más rentable que las dietas sin soja para obtener en el menor tiempo posible ejemplares del tamaño apropiado para los programas que contemplan reintroducciones y comercio. Las dietas con soja tienen un costo por kg más bajo, asimismo su rentabilidad también se debe a un buen rendimiento en términos de ganancia de longitud, peso, TCA e ICA. Además, las dietas con soja tienen excelente aceptación, lo que reduce las pérdidas de alimento y los costos indirectos de mantenimiento y producción. En conclusión, la implementación de las dietas con 25% de soja podrían ayudar a disminuir los costos de producción de pieles de yacaré overo y mantener el financiamiento del programa de conservación de la especie y las investigaciones asociadas a esta.

REFERENCIAS

Adelakun KM, Kehinde AS, Olaoye O, Ihidero AA, Dalha A. 2017. Blood biochemical of Nile crocodile (*Crocodylus niloticus*) in kano zoological garden, Nigeria. Journal of Zoo Biology. Bulletin of Animal Health and Production in Africa. 65(1): 95-102.

Amin S, Shrivastav AB. 2014. Hematology and serum biochemistry of captive gharial (*Gavialis gangeticus*) in India. Veterinary World. 7(10).

Akaike H. 1974. A new look at the statistical model identification. IEEE Transactions on Automatic Control. 19(6):716-723.

Aleixo V, Cotta T, Logato P, Gomes A, Fialho E. 2002. Efeitos da adição de diferentes teores de farelo de soja na dieta sobre o desenvolvimento de filhotes de jacaré do pantanal (*Caiman yacare*). CiencAgrotéc. 26: 411-417.

Alleman AR, Jacobson ER, Raskin RE. 1999. Morphologic and cytochemical characteristics, and ultrastructural characteristics of blood cells from eastern diamondback rattlesnakes (*Crotalus adamanteus*). American Journal of Veterinary Research. 60:507–513.

Allen D, Miller C, Phelps R. 2005. Replacement of fish meal with soybean meal in the production diets of juvenile red snapper, *Lutjanus campechanus*. Journal of World Aquaculture Society. 36(1): 114-119.

Amaya EA, Davis DA, Rouse DB. 2007a. Replacement of fish meal in practical diets for the Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) reared under pond conditions. Aquaculture. 262: 393–401.

Amaya E, Davis DA, Rouse DB. 2007b. Alternative diets for the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture. 262: 419–425.

Amer SA, Beheiry RR, Abdel Fattah DM, Roushdy EM, Hassan FA, Ismail TA, Zaitoun NA, Abo-Elmaaty AM, Metwally AE. 2021. Effects of different feeding regimens with protease supplementation on growth, amino acid digestibility, economic efficiency, blood biochemical parameters, and intestinal histology in broiler chickens. *BMC Veterinary Research*. 17(1): 1-16.

Angilleta, MJ Jr. 2001. Thermal and physiological constraints on energy assimilation in a widespread lizard (*Sceloporus undulatus*). *Ecology*. 82: 3044-3056.

Arguedas R, Steinberg D, Lewbart GA, Deresienski D, Lohmann KJ., Muñoz- Pérez, JP, Valle CA. 2018. Hematology and biochemistry of the San Cristóbal lava lizard (*Microlophus bivittatus*). *Conservation Physiology*. 6(1): coy046.

Aulbach AD, Amuzie CJ. 2017. Biomarkers in nonclinical drug development. En: Faqi A.S, *A Comprehensive guide to toxicology in nonclinical drug development*. p 447-471. Ed. Elsevier Inc. London.

Avendaño G, López A, Palou E. 2013. Propiedades del alginato y aplicaciones en alimentos. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*. 7: 87-96.

Ayarzaguena J. 1983. Ecología del caimán de anteojos (*Caiman crocodilus*) en los llanos de Apure Venezuela. *Doña Ana Acta Vertebrata*. 10: 1-136.

Ayhan V, Diler I, Arabacı M, Sevgili H. 2008. Enzyme supplementation to soybean-based diet in gilthead sea bream (*Sparus aurata*): effects on growth parameters and nitrogen and phosphorus excretion. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*. 14:161-168.

Bagatto B, Crossley II DA, Altimiras J, Elsey RM, Hicks JW. 2012. Physiological variability in yearling alligators: Clutch differences at rest and during activity. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology*. 162(1): 44-50.

Bakare AG, Chimonyo M. 2017. Relationship between feed characteristics and histomorphometry of small intestines of growing pigs. *South African Journal of Animal Science*. 47(1): 7-15.

Barry RE. 1976. Mucosal surface areas and villous morphology of the small intestine of small mammals: Functional interpretations. *Journal of Mammalogy*. 57(2): 273-290.

Bassetti L, Hilevski S, Siroski P. 2021. Crocodilianos: o uso sustentável no Brasil. En: Barreto-Lima F, Deus Santos MR, Nóbrega Y, Tratado de crocodilianos do Brasil. p. 190-210. Ed. Instituto Marcos Daniel. Vitória.

Bassetti L, Marques TS, Malvásio A; Piña CI, Verdade LM. 2014. Thermoregulation in captive Broad-snouted caiman (*Caiman latirostris*). *Zoological Studies*. 53: 1-10.

Blackman S, Obendorf R, Leopold A. 1992. Maturation proteins and sugars in desiccation tolerance of developing soybean seeds. *Plant Physiology*. 100(1): 225-230.

Bolin DW, King RP, Klosterman EW. 1952. A simplified method for the determination of chromic oxide (Cr₂O₃) when used as an index substance. *Science*. 116(3023): 634-635.

Bonessi M. 2012. Instalación de una planta elaboradora de alimentos balanceados en la provincia de La Pampa: estudio de factibilidad. Tesis de ingeniería industrial. Instituto Tecnológico de Buenos Aires. Buenos Aires.

Borteiro C, Gutiérrez F, Tedros M, Kolenc F. 2009. Food habits of the broad-snouted caiman (*Caiman latirostris*: Crocodylia, Alligatoridae) in northwestern Uruguay. *Studies on Neotropical Fauna and Environment*. 44(1): 31–36.

Botha H, Van Hoven W, Guillette LJ. 2011. The decline of the Nile crocodile population in Loskop Dam, Olifants River, South Africa. *Water SA*. 37(1).

Boursier J, Ledinghen V, Sturm N, Amrani L, Bacq Y, Sandrini J, Le Bail B, Chaigneau J, Zarski J, Gallois Y, Leroy V, Al Hamany Z, Oberti F, Fouchard-Hubert I, Dib N,

Bertrais S, Rousselet M, Calès P, Multicentre group ANRS HC EP23 FIBROSTAR. 2014. Precise evaluation of liver histology by computerized morphometry shows that steatosis influences liver stiffness measured by transient elastography in chronic hepatitis C. *Journal of Gastroenterology*. 49: 527–537

Brandley M, Wang Y, Guo X, Nieto-Montes de Oca A, Feria-Ortiz M, Hikida T, Ota, H. 2010. Bermuda as an evolutionary life raft for an ancient lineage of endangered lizards. *PLoS One*. 5(6): e11375.

Brisson GJ. 1956. On the routine determination of chromic oxide in feces. *Canadian Journal of Agricultural Science*. 36(3): 210-212.

Brito S, Andrade D, Abe A. 2002. Do caimans eat fruit? *Herpetological Natural History*. 9: 95–96.

Brochu CA. 2003. Phylogenetic approaches toward crocodylian history. *Annual Review of Earth and Planetary Sciences*. 31: 357-397.

Burin G, Kissling WD, Guimarães PR, Şekercioğlu ÇH, Quental TB. 2016. Omnivory in birds is a macroevolutionary sink. *Nature Communications*. 7(1): 1-10.

Busbey AB. 1995. The structural consequences of skull flattening in crocodylians. En: Thomason JJ, *Functional morphology in vertebrate paleontology*. p 173–192. Ed Cambridge University Press. Cambridge.

Caine WR, Verstegen MW, Sauer WC, Tamminga S, Schulze H. 1998. Effect of protease treatment of soybean meal on content of total soluble matter and crude protein and level of soybean trypsin inhibitors. *Animal feed science and technology*. 71: 177–183.

Caldwell J. 2012. *World Trade in Crocodylian Skin 2008–2010*. UNEP-World Conservation Monitoring Center. Cambridge.

Campbell TW. 1996. *Clinical Pathology*. En: Mader DS, *Reptile medicine and surgery*. p. 248-257. Saunders. Philadelphia.

Campbell TW. 2004. Hematology of reptiles. En: Thrall MA, Veterinary Hematology and clinical chemistry. p. 259–276. Ed. Lippincott Williams and Wilkins. Philadelphia.

Cardinal KM, Moraes ML, Andretta I, Schirmann GD, Belote BL, Barrios MA, Santin E, Ribeiro AM. 2019. Growth performance and intestinal health of broilers fed a standard or low-protein diet with the addition of a protease. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 48.

Carginale V, Trinchella F, Capasso C, Scudiero R, Riggio M, Parisi E. 2004. Adaptive evolution and functional divergence of pepsin gene family. *Gene*. 333: 81-90.

Carusso M, Demonte A. 2005. Histomorfometria do intestino delgado de ratos submetidos a diferentes fontes proteicas. *Alimentos e Nutrição*. 16(2): 131-133.

Casal AB, Orós J. 2007. Morphologic and cytochemical characteristics of blood cells of juvenile loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*). *Research in Veterinary Science*. 82(2): 158-165.

Castro L, Lopes-Marques M, Gonçalves O, Wilson J. 2012. The evolution of pepsinogen C genes in vertebrates: duplication, loss and functional diversification. *PloS one*. 7(3): e32852.

Caviedes-Vidal E, Afik D, Martínez del Rio C, Karasov WH. 2000. Dietary modulation of intestinal enzymes of the house sparrow (*Passer domesticus*): testing an adaptive hypothesis. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology*. 125: 11–24.

Chabreck R, Joanen T. 1979. Growth rates of alligators in Louisiana. *Herpetologica*. 35: 51–57.

Cheng ZJ, Hardy RW. 2003. Effects of extrusion and expelling processing, and microbial phytase supplementation on apparent digestibility coefficients of nutrients in full-fat soybeans for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*. 218: 501–514.

Choct M. 2006. Enzymes for the feed industry: past, present and future. *World's Poultry Science Journal*. 62: 5–15.

Chuang WY, Lin WC, Hsieh YC, Huang CM, Chang SC, Lee TT. 2019. Evaluation of the combined use of *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus oryzae* with phytase fermentation products on growth, inflammatory, and intestinal morphology in broilers. *Animals*. 9: E1051.

Ciocan H, Imhof A, Parachú-Marcó MV, Isberg SR, Siroski PA, Larriera A. 2018. Increasing photoperiod enhances growth in captive hatchling *Caiman latirostris*. *Aquaculture*. 482: 193-196

Colletti A, Attrovio A, Boffa L, Mantegna S, Cravotto G. 2020. Valorisation of by-products from soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) processing. *Molecules*. 25(9): 2129.

Coulson R, Coulson T, Herbert J, Staton M. 1987. Protein nutrition in the alligator. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A: Molecular and Integrative Physiology*. 87: 449–459.

Coulson R, Coulson T. 1986. Effect of temperature on the rates of digestion, amino acid absorption and assimilation in the Alligator. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A: Molecular and Integrative Physiology*. 83: 585–588.

Coulson R, Herbert J. 1981. Relationship between metabolic rate and various physiological and biochemical parameters. A comparison of alligator, man and shrew. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology*. 69(1): 1-13.

Coulson R, Hernandez T. 1964. *Biochemistry of the Alligator. A Study of metabolism in slow motion*. Louisiana State University Press, Baton Rouge.

Coulson R, Hernandez T. 1974. Intermediary metabolism of reptiles. En: Florkin M, Scheer B, *Chemical Zoology*. p 217–247. Ed. Academic Press New York, New York.

Coulson T, Coulson R, Hernandez T. 1973. Some observations on the growth of captive alligators. *Zoologica*, N.Y. 58:47–52.

Coulson T, Hernandez T. 1983. Alligator metabolism: studies on chemical reactions in vivo. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*. 74: 1–175.

Cowieson AJ, Acamovic T, Bedford MR. 2006. Phytic acid and phytase: Implications for protein utilization by poultry. *Poultry Science*. 85: 878-885.

Cubo J, Sena MV, Aubier P, Houee G, Claisse P, Faure-Brac MG, Ronan A, Andrade R, Sayão JM, Oliveira G. 2020. Were *Notosuchia* (*Pseudosuchia: Crocodylomorpha*) warm-blooded? A palaeohistological analysis suggests ectothermy. *Biological Journal of the Linnean Society*. 131(1): 154-162.

Cuniberti M, Herrero R, Masiero B. 2011. Evolución del contenido de proteína y de aceite en la región sojera Argentina. 5° Congreso de la soja del MERCOSUR, I foro de la soja Asia-MERCOSUR. Rosario, Argentina. 14-16 de septiembre 2011.

Dalsgaard J, Verlhac V, Hjermitsev NH, Ekmann K.S, Fischer M, Klausen M, Pedersen PB. 2012. Effects of exogenous enzymes on apparent nutrient digestibility in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed diets with high inclusion of plant-based protein. *Animal Feed Science Technology*. 171: 181–191.

Darriba D, Taboada G, Doallo R, Posada D. 2012. JModelTest 2: More models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*. 9(8): 772.

Davis DA, Arnold CR. 2000. Replacement of fish meal in practical diets for the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*. 185: 291–298.

Dei HK. 2011. Soybean as a feed ingredient for livestock and poultry. En: Krezhova D, Recent trends for enhancing the diversity and quality of soybean products. p 215-226. Ed. InTech. Rijeka.

Dickinson VM, Jarchow JL, Trueblood MH. 2002. Hematology and plasma biochemistry reference range values for free-ranging desert tortoises in Arizona. *Journal of Wildlife Diseases*. 38(1): 143-153.

Diefenbach C. 1975. Gastric function in *Caiman crocodilus* (Crocodylia: Reptilia)–II. Effects of temperature on pH and proteolysis. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology*. 51(2): 267–274.

Diefenbach C. 1979. Ampullarid gastropod – staple food of *Caiman latirostris*? *Copeia*. 1: 162–163.

Diethelm G, Stein G. 2006. Hematologic and blood chemistry values in reptiles. En: Mader DR, *Reptile medicine and surgery*. p. 1103-1118. Ed. Saunders Elsevier, St. Louis.

Digeronimo P, Digirolamo N, Crossland N, del Piero F, Reigh R, Nevarez J. 2017. Effects of plant protein diets on the health of farmed American Alligators (*Alligator mississippiensis*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 48: 131–135.

Drew MD, Racz VJ, Gauthier R, Thiessen DL. 2005. Effect of adding protease to coextruded flax pea or canola pea products on nutrient digestibility and growth performance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Animal Feed Science Technology*. 119: 117–128.

Drummond A, Ho S, Phillips M, Rambaut A. 2006. Relaxed phylogenetics and dating with confidence. *PLoS biology*. 4(5): e88.

Drummond AJ, Suchard MA, Xie D, Rambaut A. 2012. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Molecular biology and evolution*. 29(8): 1969-1973.

Eaton M. 2010. Dwarf Crocodile *Osteolaemus tetraspis*. En: *Crocodyles. Status survey and conservation action plan*. p. 127-132 Ed. Crocodile Specialist Group. Darwin.

Elf PK. 2003. Yolk steroid hormones and sex determination in reptiles with TSD. *General and Comparative Endocrinology*. 132: 349-355.

Fernández I, Moyano FJ, Díaz M, Martínez T. 2001. Characterization of α -amylase activity in five species of Mediterranean sparid fishes (Sparidae, Teleostei). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 262: 1–12.

Fernández L, Poletta G, Imhof A, Siroski P. 2013. Efectos de la radiación ultravioleta natural y artificial (UVA/ UVB) sobre la concentración plasmática de calcio y fósforo y el crecimiento en crías de *Caiman latirostris*. *InVet*. 15: 75–82.

Francesch M, Geraert PA. 2009. Enzyme complex containing carbohydrases and phytase improves growth performance and bone mineralization of broilers fed reduced nutrient corn-soybean-based diets. *Poultry Science*. 88: 1915-1924.

Francis M, Morel P., Wilkinson B., Wester T. 2017. Alginate increases water stability whilst maintaining diet digestibility in farmed saltwater crocodiles (*Crocodylus porosus*). *Journal of Animal Science*. 95: 820–826.

Francis M. 2014. Improving water stability of extrudate feed for *Crocodylus porosus* using sodium alginate. Tesis de maestría. Massey University. New Zealand.

Furihata C, Saito D, Fujiki H, Kanai Y, Matsushima T, Sugimura T. 1980. Purification and characterization of pepsinogens and a unique pepsin from rat stomach. *European Journal of Biochemistry*. 105(1): 43-50.

Furukawa A, Tsukahara H. 1966. On the acid digestion method for the determination of chromic oxide as an index substance in the study of digestibility of fish feed. *Bulletin of the Japanese society of scientific fisheries*. 32(6): 502-508.

Garnett ST, Murray RM. 1986. Parameters affecting the growth of the estuarine crocodile, *Crocodylus porosus*, in Captivity. *Australian Journal of Zoology*. 34(2): 211–223.

Geary N. 2020. Control-theory models of body-weight regulation and body-weight regulatory appetite. *Appetite*. 144: 104440.

Gignac P, O'Brien H. 2016 Suchian feeding success at the interface of ontogeny and macroevolution. *Integrative and Comparative Biology*. 56(3): 449-458.

Gildberg, A. 1988. Aspartic proteinases in fishes and aquatic invertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*. 91(3): 425-435.

Girling SJ, Campbell-Palmer R, Pizzi R, Fraser MA, Cracknell J, Arnemo J, Rosell F. 2015. Hematology and serum biochemistry parameters and variations in the Eurasian Beaver (*Castor fiber*). *PLoS One*. 10(6): e128775.

Godoy PL. 2020. Crocodylomorph cranial shape evolution and its relationship with body size and ecology. *Journal of Evolution Biology*. 33; 4–21.

González JM, Jiménez E, Lázaro R, Mateos G.G. 2007. Effect of type of cereal, heat processing of the cereal, and inclusion of fiber in the diet on productive performance and digestive traits of broilers. *Poultry Science*. 86: 705.

Green R, Braun E, Armstrong J, Earl D, Nguyen N, Hickey G, ... , Ray, D. 2014. Three crocodylian genomes reveal ancestral patterns of evolution among archosaurs. *Science*. 346(6215): 1254449.

Gruss, J, Waller T. 1998. Diagnóstico y recomendaciones sobre la administración de recursos silvestres en Argentina. Ed. WWF. Buenos Aires. pp 113.

Harmon D. 2007. Experimental approaches to study the nutritional value of foods ingredients for dogs and cats. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 36: 251-262.

Hekkala E, Shirley M, Amato G, Austin J, Charter S, Thorbjarnarson J, Vliet K, Houck M, Desalle R, Blum J. 2011. An ancient icon reveals new mysteries: mummy DNA resurrects a cryptic species within the Nile crocodile. *Molecular Ecology*. 20: 4195-4215.

Hernández P, Nolasco H, Carrillo O, Hernández H, García R, Casas G, Montoya C, Vega F. 2018. Contributions to the nutrition of the American Crocodile *Crocodylus acutus* (Cuvier, 1807) in captivity. *Latin American Journal of Aquatic Research*. 46: 15-19.

Hidalgo MC, Urea E, Sanz A. 1999. Comparative study of digestive enzymes in fish with different nutritional habits: proteolytic and amylase activities. *Aquaculture*. 170: 267–283.

Hidalgo-Vila J, Díaz-Paniagua C, Pérez-Santigosa N, Laza A, Camacho I, Recio F. 2007. Hematologic and biochemical reference intervals of free-living Mediterranean pond turtles (*Mauremys leprosa*). *Journal of Wildlife Diseases*. 43(4): 798–801.

Hilevski S, Siroski P. 2021. A novel laxative method for crocodilians and digestibility of soybean (*Glicine max*) in broad-snouted caiman (*Caiman latirostris*). *Aquaculture*. 533: 736137.

Hilevski, S, Cordero, T, Siroski, P. 2022. Do crocodilians eat plant material? A review of plant nutrients consumed by captive crocodilians. *South American Journal of Herpetology*. 24(1): 19-25.

Holmberg A, Kaim J, Persson A, Jensen J, Wang T, Holmgren S. 2002. Effects of digestive status on the reptilian gut. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A: Molecular and Integrative Physiology*. 133(3): 499-518.

Horn MH, Neighbors MA, Murray SN. 1986. Herbivore responses to a seasonally fluctuating food supply: growth potential of two temperate intertidal fishes based on the protein and energy assimilated from their macroalgal diets. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 103: 217–234.

Huchzermeyer F. 2002. Diseases of farmed crocodiles and ostriches. *Revue Scientifique et Technique-Office International Des Épizooties*. 21(1): 265-276.

Huchzermeyer F. 2003. *Crocodiles: Biology, Husbandry and Diseases*. Ed. CABI Publishing. Cambridge.

Hutton J, Webb G. 2002. Legal trade snaps back: using the experience of crocodylians to draw lessons on regulation of the wildlife trade. Crocodiles. Proceedings of the 16th working meeting of the IUCN-SSC Crocodile Specialist Group. Gainesville, USA. IUCN Publications. Gland.

Ibáñez MA, de Blas C, Cámara L, Mateos GG. 2020. Chemical composition, protein quality and nutritive value of commercial soybean meals produced from beans from different countries: A meta-analytical study. Animal Feed Science and Technology. 267: 114531.

Isberg S. 2007. Nutrition of juvenile saltwater crocodiles (*Crocodylus porosus*) in commercial production systems. CABI Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources. 2: 1–11.

Jenkins RW. 1987. The world conservation strategy and CITES: principles for the management of crocodylians. En: Webb G, Manolis SC, Whitehead P, Wildlife Management: Crocodiles and Alligators. p. 27–31. Ed. Surrey Beatty and Sons. Chipping Norton.

Jiang S, Cai W, Xu B. 2013. Food quality improvement of soy milk made from short-time germinated soybeans. Foods. 2: 198-212.

Joanen T, McNease L. 1987. Alligator farming research in Louisiana. En. Webb G, Manolis SC, Whitehead P, Wildlife Management: Crocodiles and Alligators. p. 329–340. Ed. Surrey Beatty and Sons. Chipping Norton.

Joanen T, Merchant M, Griffith R, Linscombe J, Guidry A. 2021. Evaluation of effects of harvest on alligator populations in Louisiana. The Journal of Wildlife Management. 85(4): 696-705.

Józefiak D, Ptak A, Kaczmarek S, Maćkowiak P, Sassek M, Słominski B.A. 2010. Multi-carbohydrase and phytase supplementation improve growth performance and liver insulin receptor sensitivity in broiler chickens fed diets containing full-fat rapeseed. Poultry Science. 89(9): 1939-1946.

Juanpere J, Pérez-Vendrell A, Angulo E, Brufau J. 2005. Assessment of potential interactions between phytase and glycosidase enzyme supplementation on nutrient digestibility in broilers. *Poultry Science*. 84: 571-580.

Kageyama T, Ichinose M, Tsukada S, Miki K, Kurokawa K, Koiwai O, ... Takahashi K. 1992. Gastric procathepsin E and progastricsin from guinea pig. Purification, molecular cloning of cDNAs, and characterization of enzymatic properties, with special reference to procathepsin E. *Journal of Biological Chemistry*. 267(23): 16450-16459.

Kageyama T, Takahashi K. 1984. Rabbit pepsinogens: Purification, characterization, analysis of the conversion process to pepsin and determination of the NH₂-terminal amino-acid sequences. *European Journal of Biochemistry*. 141(2): 261-269.

Kageyama T, Tanabe K, Koiwai O. 1990. Structure and development of rabbit pepsinogens. Stage-specific zymogens, nucleotide sequences of cDNAs, molecular evolution, and gene expression during development. *Journal of Biological Chemistry*. 265(28): 17031-17038.

Kageyama T, Tanabe K, Koiwai, O. 1991. Development-dependent expression of isozymogens of monkey pepsinogens and structural differences between them. *European Journal of Biochemistry*. 202(1): 205-215.

Kageyama T. 2000. New world monkey pepsinogens A and C, and prochymosins. Purification, characterization of enzymatic properties, cDNA cloning, and molecular evolution. *The Journal of Biochemistry*. 127(5): 761-770.

Kageyama T. 2002. Pepsinogens, progastricsins, and prochymosins: structure, function, evolution, and development. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 59: 288-306.

Kapoor BG, Smit H, Verighina IA. 1975. The alimentary canal and digestion in teleosts. *Advances in marine biology*. 13:109-239.

Karasov WH. 1992. Test of the adaptive modulation hypothesis for dietary control of intestinal transport. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 267: R496–R502.

Katoh K, Rozewicki J, Yamada K. 2019. MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Briefings in Bioinformatics*. 20(4): 1160–1166.

King F. 1999. ¿Es posible el uso sustentable de la fauna silvestre si este depende de un mercado externo? En: Fang T, Montenegro O, Bodmer R, Manejo y conservación de fauna silvestre en América latina. p 37-40. Ed. Instituto de Ecología. La Paz.

Kissling WD, Eiserhardt WL, Baker WJ, Borchsenius F, Couvreur TLP, Balslev H, Svenning J. 2012. Cenozoic imprints on the phylogenetic structure of palm species assemblages worldwide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 109(19): 7379-7384.

Korkut AY, Kop A, Saygi H, Göktepe C, Yedek Y, Kalkan T. 2016. General evaluation of fish feed production in Turkey. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 17(1): 223-229.

Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. 2018. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular biology and evolution*. 35(6): 1547.

Kuz'mina VV. 1996. Influence of age on digestive enzyme activity in some freshwater teleosts. *Aquaculture*. 148: 25–37.

Kuz'mina VV, Garina DV. 2001. Effects of glucose, insulin, and adrenaline on feeding behavior in fishes. *Zhurnal Evoliutsionnoi Biokhimii i Fiziologii*. 37(2):116-120.

Lance VA, Morici LA, Elsey RM, Land ED, Place AR. 2001. Hyperlipidemia and reproductive failure in captive-reared alligators: vitamin E vitamin A, plasma lipids, fatty acids, and steroid hormones. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*.128: 285–294.

Lance VA. 2003. Alligator physiology and life history: the importance of temperature. *Experimental gerontology*. 38: 801-805.

Lang JW, Andrews HV. 1994. Temperature-dependent sex determination in crocodylians. *Journal of Experimental Zoology*. 270(1): 28-44.

Lang JW. 1979. Thermophilic response of the American Alligator and the American Crocodile to feeding. *Copeia*. 1979: 48-59.

Larriera A, Imhof A. 2006. Proyecto yacaré: cosecha de huevos para cría en granjas del género *Caiman* en Argentina. En: Bolkovic M, Ramadori D, Manejo de fauna silvestre en Argentina. p. 51–64. Ed. Secretaría de Ambiente y Desarrollo Sustentable, Buenos Aires.

Larriera A. 1990. A program of monitoring and recovering of caiman populations in Argentina with the aim of management. *Crocodyles*. Proceedings of the 10th Working Meeting of the IUCN-SSC Crocodile Specialist Group. Gainesville, USA. IUCN Publications. Gland.

Larriera A. 1993. La conservación y el manejo de *Caiman latirostris* en Santa Fe, Argentina. En: Verdade LM, Packer IU, Rocha MB, Molina FB , Duarte PG y L. A. B. M. Lula. Ed. Anais do 30 Workshop sobre Conservação e Manejo do Jacaré-de-papoamarelo. p 61-69. CIZBAS / ESALQ. Universidade de São Paulo, Piracicaba SP, Brasil.

Larriera A, 1998. The *Caiman latirostris* ranching program in Santa Fe, Argentina. The first commercial rearing. En: *Crocodyles*. Proceedings of the 14th Working Meeting of the IUCN-SSC. Crocodyles Specialist Group. Singapore. IUCN Publications. Gland.

Larriera A. 2022. Deontology or consequentialism? Ethical approach on the use and management of wildlife, illustrated by the use of caimans in Latin America. *Ethnobiology and Conservation*. 11: 1-5.

Larriera A, Imhof A, Siroski P. 2008. Estado actual de los programas de conservación y manejo de género Caiman en Argentina. En: Castroviejo J, Ayarzagüena J, Velasco A, Contribución al conocimiento del Género Caiman de Suramérica. p 139-179. Ed.Public. Asoc. Amigos de Doña Ana 18. Sevilla, España.

Larriera, A, Piña CI, Dacey T. 2008. Conservación, manejo y uso sustentable de los cocodrilos en Cuba. Anales II Taller Nacional “Situación actual del cocodrilo cubano “*Crocodylus rhombifer*”. Zapata. Cuba.

Larriera, A, Simoncini MS, Cruz FB, Piña CI. 2011. Climatic effects on the reproductive biology of *Caiman latirostris* (Crocodylia: Alligatoridae). *Amphibia-Reptilia*. 32(3): 305-314.

Lawrence P, Loveridge JP. 1988. Carbon, nitrogen, and energy balances of young crocodiles (*Crocodylus niloticus*) fed meat. *Physiological zoology*. 61(4): 351-363.

Lee KW; Everts H, Kappert HJ, Yeom KH, Beynen AC. 2003. Dietary carvacrol lowers body weight gain but improves feed conversion in female broiler chickens. *Journal of Applied Poultry Research*. 12: 394–399.

Leeds A. 1982. Modification of intestinal absorption by dietary fiber and fiber components. En: Vahouny GV, Rritchevsky D, Dietary fiber in health and disease. p. 53–71. Ed. Springer. Boston.

Leary D, Lovell R, 1975. Value of fiber in production type diet for channel catfish. *Transactions of the American Fisheries Society*. 104(2): 328–332.

Leighton M, Leighton D. 1983. Vertebrate response to fruiting seasonality within a Bornean rain forest. En: Sutton S, Whitmore T, Chadwick A, Tropical rain forest ecology and management. p. 181–191. Ed. Blackwell Scientific Publications. London.

Leveille GA, O’Hea EK, Chakrabarty K. 1968. In vivo lipogenesis in the domestic chicken. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 128(2): 398-401.

Lim C, Dominy W. 1990. Evaluation of soybean meal as a replacement for marine animal protein in diets for shrimp (*Penaeus vannamei*). *Aquaculture*. 87: 53–63.

Liua SY, Cadoganb DJ, Péronc A, Truonga HH, Sellea PH. 2014. Effects of phytase supplementation on growth performance, nutrient utilization and digestive dynamics of starch and protein in broiler chickens offered maize, sorghum and wheat-based diets. *Animal Feed Science and Technology*. 197: 164-175.

Lovely CJ, Pittman JM, Leslie AJ. 2007. Normal hematology and blood biochemistry of wild Nile crocodiles (*Crocodylus niloticus*) in the Okavango Delta, Botswana. *Journal of the South African Veterinary Association*. 78(3): 137–144.

Luchini L, Wicki G. 2007. Consideraciones sobre insumos utilizados en los alimentos para organismos acuáticos bajo cultivo. *Información básica*, Ministerio de agricultura, Ganadería y Pesca, Buenos Aires.

Macari M. 1998. Aspectos fisiológicos do sistema digestivo das aves. *Veterinária, Sacavet-Semana Acadêmica*. 8: 4-18.

Malagie M, Jensen G, Graham J, Smith D. 1998. Procesos de la industria alimentaria. En: Berkowitz D, *Enciclopedia de salud y seguridad en el trabajo*. p. 67.1–67.35. Ed. Ministerio de Trabajo y Asuntos Sociales, Subdirección General de Publicaciones. Madrid.

Malheiros RD, Moraes VM, Collin A, Decuypere E, Buyse J. 2003. Free diet selection by broilers as influenced by dietary macronutrient ratio and corticosterone supplementation. 1. Diet selection, organ weights, and plasma metabolites. *Poultry Science*. 82: 123–131.

Mangels AR. 2014. Bone nutrients for vegetarians. *The American journal of clinical nutrition*. 100: 469S–475S.

Marinho T, Carvalho I. 2009. An armadillo-like sphagesaurid crocodyliform from the late cretaceous of Brazil. *Journal of South American Earth Sciences*. 27: 36–41.

Martelli P, Shilton C, Manolis C. 2020. Humane euthanasia/killing methods for crocodylians - An update. *Crocodile Specialist Group Newsletter*. 39(1): 6-8.

Martellotto E, Salas P, Lovera E. 2001. Impacto del monocultivo de soja. INTA Manfredi. <http://www.inta.gov.ar/manfredi/documentos/docsuelos/impamonosoja.htm>.

Martínez del Río C, Stevens B. 1988. Intestinal brush border membrane-bound disaccharidases of the American alligator, *Alligator mississippiensis*. *Comparative Biochemistry and physiology. B, Comparative Biochemistry*. 91(4): 751–754.

Martínez JL, Neira AA, Nava E, Iliná A, Michelena G, Gaona J. 2013. Aspectos fundamentales de las fitasas. *Investigación y Ciencia de la Universidad Autónoma de Aguascalientes*. 57: 58-63.

Martínez-Llorens S, Vidal AT, Garcia IJ, Torres MP, Cerdá MJ. 2009. Optimum dietary soybean meal level for maximizing growth and nutrient utilization of on-growing gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture Nutrition*. 15(3): 320-328.

Mayhew TM, Middleton C. 1985. Crypts, villi and microvilli in the small intestine of the rat. A stereological study of their variability within and between animals. *Journal of Anatomy*. 141: 1-17.

McGoogan B, Gatlin D. Effects of replacing fish meal with soybean meal in diets for red drum *Sciuenops ocellatus* and potential for palatability enhancement. *Journal of World Aquaculture Society*. 28(4): 374-385.

McNease L, Joanen T. 1977. Alligator diets in relation to marsh salinity. *Annual Meeting of the Southeastern Association of Game and Fish Commissioners*. 31: 36–40.

Medem F. 1983. Los Crocodylia de Sur América. Vol. II. Ed. Colciencias, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá.

Melo MTQ. 2002. Dieta do *Caiman latirostris* no sul do Brasil. En: Verdade LM, Larriera A Conservação e manejo de jacarés e crocodilos da América Latina. p. 116–125. Ed. C.N. Editoria. Piracicaba.

Melstrom K, Irmis R. 2019. Repeated evolution of herbivorous crocodyliforms during the age of dinosaurs. *Current Biology*. 29: 2389–2395.

Millan JM, Janmaat A, Richardson KC, Chambers LK, Formiatti KR. 1997. Reference ranges for biochemical and hematological values in farmed saltwater crocodile (*Crocodylus porosus*) yearlings. *Australian Veterinary Journal*. 75:814–817.

Minucci P, Waller T. 1995. Los yacarés en Argentina: Hacia un aprovechamiento sustentable. la conservación y el manejo de caimanes y cocodrilos de América latina. Ed. fundación banco bica. Santa Fe. p 81-112.

Moleón SM, Santiago G, Hilevski S, Siroski PA. 2023. Blood biochemistry parameters of broad-snouted caiman, *Caiman latirostris* subjected to stress conditions, applying Micro-volume techniques. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological and Integrative Physiology*. 2023: 1-6.

Montini JP, Piña CI, Larriera A, Siroski P, Verdade LM. 2006. The relationship between nesting habitat and hatching success in *Caiman latirostris* (Crocodylia, Alligatoridae). *Phyllomedusa: Journal of Herpetology*. 5: 91-96.

Mora-Rivera, C. 2003. Perfil hematológico del cocodrilo de pantano (*Crocodylus moreletii*) en cautiverio en Veracruz, México. Tesis de licenciatura. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Autónoma de Veracruz. Veracruz.

Mussart NB, Barboza NN, Fioranelli SA, Koza GA, Prado WS, Coppo JA. 2006. Age, sex, year season, and handling system modify the leukocytal parameters from captive *Caiman latirostris* and *Caiman yacare* (Crocodylia: Alligatoridae). *Revista Veterinaria*. 17: 3-10.

Myburgh JG, Kirberger RM, Steyl JC, Soley JT, Booyse DG, Huchzermeyer FW, Guillette LJ, Lowers RH. 2014. The post-occipital spinal venous sinus of the Nile crocodile (*Crocodylus niloticus*): Its anatomy and use for blood sample collection and intravenous infusions. *Journal of the South African Veterinary Association*. 85(1): 1-10.

Neill W. 1971. *The last of the ruling reptiles: alligators, crocodiles, and their kin*. Ed. Columbia University Press. New York.

Norell MA. 1989. The higher-level relationship of the extant Crocodylia. *Journal of Herpetology*. 23(4): 325-335.

NRC (National Research Council). 1983. *Crocodiles as a resource for the tropics*. Ed. National Academy Press. Washington.

NRC (National Research Council). 2011. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals: Eighth Edition*. Ed. National Academies Press. Washington.

O'Connor PM, Sertich JJ, Stevens NJ, Roberts EM, Gottfried MD, Hieronymus TL, Jinnah ZA, Ridgely R, Ngasala SE, Temba J. 2010. The evolution of mammal-like crocodyliforms in the Cretaceous Period of Gondwana. *Nature*. 466: 748–775.

Oatway L, Vasanthan T, Helm JH, 2001. Phytic acid. *Food Review International*. 17: 419–431.

Ortiz A. Implicaciones de la utilización de altos niveles de soja em avicultura. *Anais do 46 Symposium científico de avicultura*. Zaragoza. España, 30 de septiembre- 2 de octubre del 2009. p.81-94.

Ósi A. 2014 The evolution of jaw mechanism and dental function in heterodont crocodyliforms. *Historical Biology*. 26: 279–414.

Padilla, S.E., Weber, M., Jacobson, E.R., 2011. Hematologic and plasma biochemical reference intervals for morelet's crocodiles (*Crocodylus Moreletii*) in the northern wetlands of Campeche, Mexico. *Journal of Wildlife Disease*. 47(3): 511–522.

Pantoja-Zamora R. 2017. UMA Reptilario Cipactli. Tesis de Licenciatura en Biología. Universidad de Guadalajara. Guadalajara.

Parachú-Marco M, Piña C, Larriera A. 2009. Food conversion rate (FCR) in *Caiman latirostris* resulted more efficient at higher temperatures. *Interciencia*. 34(6): 428-431.

Peng F, Chen X, Meng T, Li E, Zhou Y, Zhang S. 2018. Hematology and serum biochemistry parameters of captive Chinese alligators (*Alligator sinensis*) during the active and hibernating periods. *Tissue and Cell*. 51: 8–13.

Peña-Buñuelos M. 2014. Manejo biológico de crías de *Crocodylus acutus* durante el primer año de vida en la UMA Reptilario Cipactli. Tesis de Licenciatura en Biología. Universidad de Guadalajara. Guadalajara.

Peres A, Zambonino-Infante JL, Cahu C. 1998. Dietary regulation of activities and mRNA levels of trypsin and amylase in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Fish Physiology and Biochemistry*, 19:145–152.

Peres H, Lim C. 2008. Utilization of soybean products in diets of non-salmonid marine finfish. En: Lim C, Webster CD, Lee CS, Alternative protein sources in aquaculture diets. p. 281–312. Ed. The Haworth press, Taylor and Francis group. New York.

Pérez A. 2000. Crecimiento del *Caiman crocodilus crocodilus* en cautiverio. *Interciencia*. 29: 442–446.

Pérez M, Naranjo C, Reyes B, Vega I. 2009. Influencia de dos tipos de dietas sobre la talla y el peso corporal en neonatos de *Crocodylus acutus* Cuvier, 1807 (Crocodylidae: Crocodylia) del zoológico de Manzanillo, Cuba. *Acta Zoológica Mexicana*. 25: 151–160.

Pérez O, Escobedo A. 2007. Crecimiento en cautiverio de *Crocodylus acutus* (Cuvier, 1807) en Tumbes, Perú. *Revista Peruana de Biología*. 14: 221–223.

Peucker SK, Davis BM, Van Barneveld RJ. 2005. Crocodile farming research: hatching to harvest. A report for the rural industries research and development corporation. Rural Industries Research and Development Corporation. Publication No. 05/152. Canberra.

Peucker SK, Jack RH. 2006. Crocodile farming research: On-farm research of pelleted feed for crocodiles. A report for the rural industries research and development corporation. Rural Industries Research and Development Corporation. Publication No. 06/016. Canberra.

Piña CI, Larriera A, Siroski P. 2004. Cocodrilos en la región litoral: especies, distribución geográfica, modo de vida. *Miscelánea*.12: 318.

Piña CI, Lucero L, Simoncini M, Peterson G, Tavella M. 2016. Lipid profile of yacare overo meat fed with diets enriched with flaxseeds. *Zootecnia Tropical*. 34: 25–33.

Pinheiro M, Lavorenti A. 2001. Growth of broad-nosed caiman, *Caiman latirostris* (Daudin, 1802) hatchlings, fed with diets of animal origin. *Brazilian Journal of Biology*. 61: 421–429.

Platt S, Elsey R, Liu H, Rainwater T, Nifong J, Roseblatt A, Heithaus M, Mazzotti F. 2013. Frugivory and seed dispersal by crocodylians: an overlooked form of saurochory? *Journal of Zoology*. 281: 87–99.

Platt S, Rainwater T, Finger A, Thorbjarnarson J, Anderson T, McMurry S. 2006 Food habits, ontogenetic dietary partitioning and observations of foraging behavior of Morelet's crocodile (*Crocodylus moreletii*) in northern Belize. *The Herpetological Journal*. 16: 281–290.

- Plumb D. 2010. Manual de farmacología veterinaria. Ed. Intermedica. Buenos Aires.
- Poletta G, Larriera A, Siroski P. 2008. Broad snouted caiman (*Caiman latirostris*) growth under different rearing densities. *Aquaculture*. 280(1–4): 264-266.
- Pough F., Andrews R, Cadle J, Crump M, Savitzky A, Wells K. 2004. *Herpetology*. Ed. Pearson Prentice Hall. New Jersey.
- Prado WS, Piña CI, Waller T. 2012. Categorización del estado de conservación de los caimanes (yacaré) de la República Argentina. *Cuadernos de Herpetología*. 26: 403-410.
- Premachandra T, Cauret CMS, Conradie W, Measey J, Evans BJ. 2022. Population genomics and subgenome evolution of the allotetraploid frog *Xenopus laevis* in southern Africa. *G3 Genes|Genomes|Genetics*. jkac325
- Price E. 2017. The physiology of lipids storage and use in reptiles. *Biological reviews*. Cambridge Philosophical Society. 9(3): 1406-1426.
- Quiroz-Rocha GF, Bouda J 2007. Patología Clínica de Hígado. En: Núñez L, Bouda J, Patología clínica veterinaria. p. 122-137. Ed. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia-UNAM. Mexico DF.
- Rambaut A, Drummond A, Xie D, Baele G, Suchard M. 2018. Posterior summarization in Bayesian phylogenetics using Tracer 1.7. *Systematic Biology*. 67(5): 901.
- Rambaut A. 2009. FigTree, ver. 1.3. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>.
- Rana KJ, Siriwardena S, Hasan MR. 2009. Impact of rising feed ingredient prices on aquafeeds and aquaculture production. En: Rana KJ, Hasan MR, FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper No. 541. p. 63. Ed Food and Agriculture Organisation Rome.
- Ravidran V. 2010. Aditivos en la alimentación animal: presente y futuro. En: Rebollar P.G, de Blas C, Mateos G.G, XXVI Curso de Especialización FEDNA: Avances en Nutrición y Alimentación Animal. p 3-26. Ed. Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal. Madrid.

Ravindran V, Cabahug S, Ravindran G, Bryden W.L. 1999. Influence of microbial phytase on apparent ileal amino acid digestibility of feedstuffs for broilers. *Poultry Science*. 78: 699–706.

Ray AK, Ghosh K, Ringø E. 2012. Enzyme producing bacteria isolated from fish gut: A review. *Aquaculture Nutrition*. 18(5): 465-92.

Read MA. 2000. Aspects of protein utilisation and metabolism by post-hatchling estuarine crocodiles (*Crocodylus porosus* Schneider). Tesis de doctorado. University of Queensland. Brisbane.

Ragaza JA, Velasquez SF, Asuncion MSM., Torres EMF, Freitag H. 2021. Serum biochemical profile of captive-bred Philippine crocodiles (*Crocodylus mindorensis* Schmidt, 1935) sub-adults. *Philippine Journal of Science*. 150(3): 939-944.

Reigh R, Williams M. 2013. Amino acid availability of selected plant products and fish meal for American alligator (*Alligator mississippiensis*). *Aquaculture*. 412: 81–87.

Reigh R, Williams M. 2014. Improvement of diets for alligator aquaculture. *Journal of World Aquaculture Society*. 45(3): 64–65.

Reigh R, Williams M. 2016. Feed intake and length-weight relationship of captive American alligator fed a compounded diet. *Journal of World Aquaculture Society*. 47(1): 63–65.

Reigh R, Williams M. 2018. Plant products in compounded diets are effectively utilized by American alligator, *Alligator mississippiensis*. *Journal of World Aquaculture Society*. 49(6): 1014–1018.

Reigh R, Williams M. 2022. Growth effects of lysine in compounded diets for American alligator, *Alligator mississippiensis*. *Journal of the World Aquaculture Society*. 53(5): 995-1005.

Richardson K, Webb G, Manolis SC. 2002. Crocodiles: Inside Out: a guide to the crocodylians and their functional morphology. Ed. Surrey Beatty and Sons, Chipping Norton.

Rodríguez M, Clavijo L, López F, Gerardino A, Ceballos F, Arboleda J, Silva A, Guerrero P. 1996. Avances en la nutrición de *Caiman crocodilus*. Crocodiles: Proceedings of the 16th working meeting of the IUCN-SSC Crocodile Specialist Group. Santa Fe, Argentina. IUCN Publications. Gland.

Rodríguez-Pedroso AT, Ramírez-Arrebato MA, Rivero-González D, Bosquez-Molina E, Barrera-Necha LL, Bautista-Baños S. 2009. Propiedades químico-estructurales y actividad biológica de la quitosana en microorganismos fitopatógenos Revista Chapingo Serie Horticultura. 15(3): 307-317.

Rodríguez R, Martínez M, Valdivié M, Cisneros M, Cárdenas M, Sarduy L. 2006. Morfometría del tracto gastrointestinal y sus órganos accesorios en gallinas ponedoras alimentadas con piensos que contienen harina de caña proteica. Revista Cubana de Ciencia Agrícola. 40(3): 361-365.

Ross JP. 1998. Crocodiles. Status Survey and Conservation Action Plan. IUCN/SSC Crocodile Specialist Group. Gland.

Salas-Gismondi R, Flynn JJ, Baby P, Tejada-Lara JV, Wesselingh FP, Antoine PO. 2015. A Miocene hyperdiverse crocodylian community reveals peculiar trophic dynamics in proto-Amazonian mega-wetlands. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences. 282(1804): 20142490.

Santiago G, Salinas FJ, Cabaña E, Stassi A, Ortega HH, Hein GJ. 2021. Desarrollo y validación de técnicas analíticas para la determinación de biomarcadores sanguíneos en ensayos preclínicos. ¿Por qué y para qué? MEDICINA (Buenos Aires). 81(1): 76–90.

Santos SA, Stoll M, Silva M, Campos Z, Magnusson WE, Mourao G. 1996. Diets of *Caiman crocodilus yacare* from different habitats in the Brazilian Pantanal. Herpetological Journal. 6:111–117.

- Santos L, de Oliveira-Bahia V, Nakaghi L, De Stefani M, Gonçalves A, Junior, J. 2016. Ontogeny of the Digestive Enzymes of Tadpoles of *Lithobates catesbeianus*. *Copeia*. 104(4): 838-842.
- Scott TA, Boldaji F. 1997. Comparison of inert markers [chromic oxide or insoluble ash (Celite)] for determining apparent metabolizable energy of wheat-or barley-based broiler diets with or without enzymes. *Poultry Science*. 76(4): 594-598.
- Seah L, Saudi Z, Wee B. 2017. Survival of prey DNA inside a crocodile gut: a review of crocodilian gastric function and accompanying gastric assault. *Journal of Forensic Science and Criminal Investigation*. 4(3): 1–2.
- Seijas A. 2011. Los crocodylia de Venezuela: Ecología y conservación. Ed. Academia de Ciencias Físicas, Matemáticas y Naturales. Caracas.
- Selle PH, Cadogan DJ, Li X, Bryden WL. 2010. Implications of sorghum in broiler chicken nutrition. *Animal Feed Science and Technology*. 156(3-4): 57–74.
- Selle PH, Ravindran V. 2007. Microbial phytase in poultry nutrition. *Animal Feed Science and Technology*. 135: 1–41.
- Selle PH, Ravindran V. 2008. Phytate-degrading enzymes in pig nutrition. *Livestock Science*. 113: 99–122.
- Shimeno S, Hosokawa H, Hirata H, Takeda M. 1977. Comparative studies on carbohydrate metabolism of yellowtail and carp. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*. 43: 213–217.
- Shirley M, Carr A, Nestler J, Vliet K, Brochu C. 2018. Systemic revision of the living African Slender-snouted crocodiles (*Mecistops* Gray, 1844). *Zootaxa*. 4504(2): 151-193.
- Shirley M, Vliet K, Carr A, Austin J. 2014. Rigorous approaches to species delimitation have significant implications for African crocodile systematics and conservation. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 281(1776): 2013-2483.

Siar EH, Arana-Peña S, Barbosa O, Zidoune MN, Fernandez-Lafuente R. 2018. Immobilization/stabilization of ficin extract on glutaraldehyde-activated agarose beads. Variables that control the final stability and activity in protein hydrolyses. *Catalysts*. 8(4):149.

Sigler L. 1990. Constantes fisiológicas y valores hemáticos de cocodrilianos mexicanos en cautiverio en los estados de Chiapas, Quintana Roo y Yucatán. Tesis de licenciatura. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México.

Siroski P, Bassetti L, Piña C, Larriera A. 2020. *Caiman latirostris*. The IUCN Red List of Threatened Species 2020: e.T46585A3009813. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2020-3.RLTS.T46585A3009813.en>.

Siroski P, Poletta G, Fernandez L, Ortega H, Merchant M. 2012. Ultraviolet radiation on innate immunity and growth of broad-snouted caiman (*Caiman latirostris*): Implications for facilities design. *Zoo Biology*. 31: 523–533.

Siroski P, Bassetti L, Braga P, Nóbrega Y, Bauer F, Motte M, Martínez N, Llobet A, Morales J, Borteiro C, Gutiérrez F, Gutiérrez F, Larriera A. 2022. Broad-Snouted Caiman (*Caiman latirostris*) geographic distribution and population update. Crocodiles. Proceedings of the 26th working meeting of the IUCN-SSC Crocodile Specialist Group. Chetumal, Mexico. IUCN Publications. Gland.

Sookying D, Davis DA, Soller-Dias da Silva F. 2013. A review of the development and application of soybean-based diets for Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Nutrition*. 19(4): 441-448.

Sosa G, Pérez E, Guerra L. 2011. Resultados de crecimiento de cocodrilo cubano (*Crocodylus rhombifer*) bajo condiciones de alimentación diferentes en el criadero de ciénaga de Zapata. *Cubazoo* 24: 11–14.

Spannhof, L., Plantikow, H., 1983. Studies on carbohydrate digestion in rainbow trout. *Aquaculture*. 30(1–4): 95–108.

Stacy BA, Whitaker N. 2000. Hematology and biochemistry of captive mugger crocodiles (*Crocodylus palustris*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*. 31: 339–347.

Staniewicz A, Behler N, Dharmasyah S, Jones G. 2018. Niche partitioning between juvenile sympatric crocodylians in Mesangat Lake, East Kalimantan, Indonesia. *Raffles Bulletin of Zoology*. 66: 528-537.

Starck JM, Cruz-Neto AP, Abe AS. 2007. Physiological and morphological responses to feeding in broad-nosed caiman (*Caiman latirostris*). *Journal of Experimental Biology*. 210(12): 2033-2045.

Staton M, Edwards H, Brisbin L, McNease L, Joanen T. 1990a. Dietary energy sources for the American Alligator, *Alligator mississippiensis* (Daudin). *Aquaculture*. 89: 245–261.

Staton M, Edwards H, Brisbin L, McNease L, Joanen T. 1990b. Protein and energy relationships in the diet of the American Alligator (*Alligator mississippiensis*). *The Journal of Nutrition*. 120: 775–785.

Stein HH, Fuller MF, Moughan PJ, Sève B, Mosenthine R, Jansman AJ, Fernández JA, de Langeh CF. 2007. Definition of apparent, true, and standardized ileal digestibility of amino acids in pigs. *Livestock Science*. 109: 282-285.

Stubbs TL, Pierce SE, Elsler A, Anderson PS, Rayfield EJ, Benton MJ. 2021. Ecological opportunity and the rise and fall of crocodylomorph evolutionary innovation. *Proceedings of the Royal Society B*. 288(1947): 20210069.

Suzuki M, Narita Y, Oda S, Moriyama A, Takenaka O, Kageyama T. 1999. Purification and characterization of goat pepsinogens and pepsins. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. 122(4): 453-460.

Sweeting A. 2012. Integrating business skills into ecotourism operations. IUCN and Kuoni, Gland.

- Tamura M, Suzuki H. 1998. Effects of soy protein on the morphology of ileum and the ultrastructure of liver cells in adult mice. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*. 68(1): 73-76.
- Tang J, James M, Hsu I, Jenkins J, Blundell T. 1978. Structural evidence for gene duplication in the evolution of the acid proteases. *Nature*. 271(5646): 618-621.
- Tapia L, López JL, Bueno JR, Riva R. 2000. Hojas de *Leucaena leucocephala* en la alimentación de patos. *Revista de Producción Animal*. 12: 41.
- Teng PY, Chang CL, Huang CM, Chang SC, Lee TT. 2017, Effects of solid-state fermented wheat bran by *Bacillus amyloliquefaciens* and *Saccharomyces cerevisiae* on growth performance and intestinal microbiota in broiler chickens. *Italian Journal of Animal Science*. 16(4): 552-562.
- Thorbjarnarson J. 1993. Fishing behavior of the spectacled caiman in the Venezuelan llanos. *Copeia*. 1166–1171.
- Thrall MA, Weiser G, Allison RW, Campbell TW. 2012. *Veterinary hematology and clinical chemistry*. Ed. Wiley-Blackwell. Ames. p. 776.
- Toledo P. 2012. El desafío de la proteína para la acuicultura. *Infopesca Internacional*. 49.
- Tracy C, McWhorter T, Gienger C, Starck M, Medley P, Manolis SC, Webb G, Christian K. 2015. Alligators and crocodiles have high paracellular absorption of nutrients but differ in digestive morphology and physiology. *Integrative and Comparative Biology*. 55: 986–1004.
- Traveset A. 1990. *Ctenosaura similis* Gray (Iguanidae) as a seed disperser in a Central American deciduous forest. *American Midland Naturalist*. 123(2): 402–404.
- Urbaityte R, Mosenthin R, Eklund M, Piepho HP, Sauer N, Rademacher M. 2009. Determination of standardized ileal crude protein and amino acid digestibilities in protein supplements for piglets. *Animal*. 3: 1696-1705.

- van Hoek ML. 2014. Antimicrobial peptides in reptiles. *Pharmaceuticals*. 7: 723-753.
- Velasco A. 2017. La conservación y el uso sustentable de los cocodrilos en Latino América y el Caribe. *Quehacer Científico en Chiapas*. 12: 72–79.
- Velasco A., De Sola R. 1999. Programa de manejo de la baba (*Caiman crocodilus*) de Venezuela. *Vida Silvestre Neotropical*. 8: 10–17.
- Velásquez JCC, Fonseca CC, Menin E, Paula TAR. 2003. Estudio histológico do intestino delgado de capivaras adultas (*Hydrochoerus hydrochaeris*). *Arquivo de Ciencia Veterinária e Zoologia*. 6: 21-25.
- Verdade LM, Larriera A, Piña CI. 2010. Broad-snouted Caiman *Caiman latirostris*. En: Manolis SC, Stevenson C, Crocodiles. Status survey and conservation action plan. p. 18-22 Ed. Crocodile Specialist Group, Darwin.
- Waller T, Minucci P. 1993. Relevamiento de la distribución, hábitat y abundancia de los cocodrilos de la provincia de Corrientes, Argentina. *Anales I Reunión regional del grupo de especialistas en cocodrilos*. Santa Marta. Colombia.
- Wang G, Kim WK, Cline MA, Gilbert ER. 2017. Factors acting adipose tissue development in chickens, a review. *Poultry Science*. 96: 3687–3699.
- Webb G, Manolis SC. 1989. *Crocodiles of Australia*. Ed. Reed Books, Frenchs Forest. New South Wales.
- Webb G, Reynolds S, Brien M, Manolis SC, Brien J. 2013. Improving Australia's crocodile industry productivity: Nutritional requirements, feed ingredients and feeding systems for farmed crocodile production. Rural Industries Research and Development Corporation. Publication No. 12/139. Canberra.

Wicki G, Wiltchiensky E, Luchini L. 2003. Ensilados de vísceras de pescado de río como fuente de proteína y formulas alimentarias a base de harina de soja, o de algodón, o de pluma; como sustituto total o parcial de la harina de pescado en el engorde final de pacu, en el noreste Argentino. Ed. Secretaria de agricultura, ganaderia y pesca. Buenos Aires.

Wu H, Gao C, Guo Y, Zhang Y, Zhang J, Ma E . 2014. Acute toxicity and sublethal effects of fipronil on detoxification enzymes in juvenile zebrafish (*Danio rerio*). Pesticide Biochemistry and Physiology. 115: 9–14.

Yamauchi K, Buwjoom T, Koge K, Ebashi T. 2006. Histological intestinal recovery in chickens refed dietary sugar cane extract. Poultry Science. 85(4): 645-651.

Yanosky A. 1990. Histoire naturelle du Caiman à museau large (*Caiman latirostris*), un alligatoriné mal connu. Revue française d'aquariologie (Nancy). 17:19-31.

Yıldırım O. 2008. Aquafeed industry in Turkey: its aquafeed projections towards the year 2015. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. 8: 93–98.

Zayas MA, Rodríguez HA, Galoppo GH, Stoker C, Durando M, Luque EH, Muñoz de Toro M. 2011. Hematology and blood biochemistry of young healthy broad-snouted caimans (*Caiman latirostris*). Journal of Herpetology. 45(4): 516–524.

Zhang HY, Yi JQ, Piao XS, Li PF, Zeng ZK, Wang D, Liu L, Wang GQ, Han X. 2013. The metabolizable energy value, standardized ileal digestibility of amino acids in soybean meal, soy protein concentrate and fermented soybean meal, and the application of these products in early-weaned piglets. Australasian Journal of Animal Science. 26: 691-699.

Zhong YF, Shi CM, Zhou YL, Chen YJ, Lin SM, Tang RJ. 2020. Optimum dietary fiber level could improve growth, plasma biochemical indexes and liver function of largemouth bass, *Micropterus salmoides*. Aquaculture. 518: 734661.

APÉNDICE I

Determinación de óxido de cromo y curva calibración

Para determinar el contenido de óxido de cromo (Cr_2O_3) presente en las muestras de heces primero se preparó una solución madre de dicromato de potasio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$), a fin de diseñar una curva de calibración, la cual sirvió para establecer los niveles de Cr_2O_3 en las muestras. La solución de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ se preparó de la siguiente forma:

1. Se determinó el peso molecular (PM) del $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$:

$$\text{PM de } \text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7 = (\text{K: } 39.1 \text{ g} \times 2) + (\text{Cr: } 52 \text{ g} \times 2) + (\text{O: } 16 \text{ g} \times 7)$$

$$\text{PM de } \text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7 = 294.1818 \text{ g}$$

2. Se estableció el contenido de cromo (Cr) en $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$:

$$\% \text{ de Cr en } \text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7 = \frac{(\text{PM de Cr: } 104)}{(\text{PM de } \text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7: 294,2)} \times 100 = 35,35\%$$

3. Se calculó la cantidad de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ a emplear para obtener una solución madre con una concentración de 2 g/L de Cr:

$$100\% \times \left(\frac{2 \text{ g}}{35,35\%} \right) = 5,657708628 \text{ g}$$

$$5,657708628 \text{ g} \times \left(\frac{1 \text{ L}}{1000 \text{ ml}} \right) = 0,0056577086 \text{ g/ml}$$

$$0,0056577086 \text{ g} \times 100 \text{ ml} = 0,5658 \text{ g/ml}$$

Por lo tanto, para preparar 100 ml de solución madre se agregaron 0,5658 g de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$

4. Se estableció la cantidad de ácido nítrico (HNO₃) a agregar a la solución madre partir de los siguientes datos y ecuación:

- PM de HNO₃ = (H: 1 g) + (N: 14 g) + (O: 16 g x 3) = 63 g/mol
- Concentración del HNO₃ = 0,4N.
- Pureza = 65%
- Densidad = 1,68 g/ml

$$0,1 \text{ L solución } 0,4 \text{ N} \times \left(\frac{0,4 \text{ EQ/g}}{1 \text{ L solución } 0,4 \text{ N}} \times \left(\frac{63 \text{ g}}{1 \text{ EQ/g}} \times \left(\frac{1 \text{ mL}}{1,68 \text{ g}} \times \left(\frac{1}{0,65} \right) \right) \right) \right)$$

$$\text{HNO}_3 = 2,3 \text{ ml}$$

Por lo tanto, para preparar 100 ml de solución madre se agregó 2,3 ml de HNO₃.

5. Entonces, en un vaso de precipitado de 50 ml se pesaron 0,05658 g de K₂Cr₂O₇ y se añadieron 2,3 ml de HNO₃ y 10 ml de agua destilada.
6. Esta solución fue transferida a un balón aforado de 100 ml y se agitó en un vórtex.
7. Se completaron los 100 ml de volumen final con agua destilada.
8. Esta solución fue cubierta con papel de aluminio a fin de protegerla de la luz (ya que ésta la degrada), y se almacenó en la heladera hasta su uso.
9. Para construir la curva de calibración se realizaron diluciones de la solución madre, empleándose la siguiente fórmula:

$$C_1 V_1 = C_2 V_2$$

Donde:

C₁ = Concentración de la solución madre (μg Cr/ml).

V₁ = Volumen a tomar de la solución madre (ml).

C₂ = Concentración a la cual queremos llevar la nueva solución (20; 2; 0,2; 0,002; 0,0002 μg Cr/ml).

V₂ = Volumen final de la nueva solución (10 ml).

Se despejo el volumen inicial a tomar de la solución madre:

$$V_1 = \frac{C_2 V_2}{C_1}$$

Habiéndose despejado el volumen inicial de la ecuación, se calcularon los puntos de la curva de calibración para esta investigación de la siguientes manera.

$$V_1 = \frac{(20\mu\text{g Cr/ml}) (10 \text{ ml})}{(200 \mu\text{g Cr/ml})} = 1 \text{ mL}$$

$$V_1 = \frac{(2\mu\text{g Cr/ml}) (10 \text{ ml})}{(200 \mu\text{g Cr/ml})} = 0,1 \text{ mL}$$

$$V_1 = \frac{(0,2\mu\text{g Cr/ml}) (10 \text{ ml})}{(200 \mu\text{g Cr/ml})} = 0,01 \text{ mL}$$

$$V_1 = \frac{(0,002\mu\text{g Cr/ml}) (10 \text{ ml})}{(200 \mu\text{g Cr/ml})} = 0,0001 \text{ mL}$$

$$V_1 = \frac{(0,0002\mu\text{g Cr/ml}) (10 \text{ ml})}{(200 \mu\text{g Cr/ml})} = 0,00001 \text{ mL}$$

10. Se calibró el espectrofotómetro a 350 nm, para leer la absorbancia (ABS) del Cr_2O_3 contenido en la solución madre a diferentes concentraciones.

11. Una vez obtenidas las diferentes lecturas, se construyó la curva de calibración.

Curva de calibración para determinar concentraciones de Cr₂O₃ en las muestras.

