



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA

“Parámetros hematológicos de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) alimentadas con dietas con alto contenido de proteína de origen vegetal”.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIOLOGA

PRESENTA:

ADRIANA ARACELI TRUJANO RODRÍGUEZ

ASESOR:

Dr. Luis Héctor Hernández Hernández



Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Este proyecto fue realizado con fondos del Programa de Apoyo a
Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT)
IN213115 de la Dirección General de Asuntos del Personal
Académico, de la Universidad Nacional Autónoma de México

Agradecimientos

A la UNAM por que si tuviera que volver a elegir, sin dudarlo seria mi primera opción. “Por mi raza hablara el espíritu”

A la Facultad de Estudios Superiores Iztacala mi segunda casa, los mejores momentos los pase en este lugar y fue un privilegio pertenecer a esta comunidad universitaria

Al Dr. Luis Héctor Hernández Hernández, por su paciencia, consejos, apoyo, enseñanzas y confianza en mi para la realización de este proyecto.

Al Mtro. Mario Fernández Araiza por sus consejos en clase para tener un pensamiento más critico y profesional.

Al Mtro. Omar Ángeles López por su dedicación, confianza, y sus ánimos para aprender cada día más, por sus enseñanzas, platicas y consejos.

Al Dr. Jorge Jiménez Contreras por ser una de las primeras personas que confió en mí, por las pláticas por compartir su conocimiento y ser un gran apoyo desde 4to semestre.

A la Mtra. Gloria Garduño Solórzano los conocimientos compartidos desde 4to semestre, por los cursos que organizaba y me permitía participar.

A todos y cada uno de mis profesores durante la carrera por hacer una de las mejores etapas de mi vida, por todo lo que compartieron conmigo y por enseñarme el valor de la ciencia, y el amor hacia la biología, sin ustedes este camino no hubiera sido igual. Gracias

Agradecimientos y dedicatorias.

A mis abuelos por que de ellos aprendí los valores y lo importante de la vida: Rosita, Fernando, Mamá Fina y Papá Toño. Especialmente a Papa Toño que estuvo conmigo la mayor parte de mi niñez y me enseñó el valor del trabajo, la perseverancia, que cada error se convierte en aprendizaje y que nunca es tarde para seguir aprendiendo para conseguir lo que uno desea y que siempre los sueños se pueden volver realidad. Gracias por ser los pilares de mi vida y en donde quiera que estén los recuerdo con mucho amor. Mi vida no hubiera sido la misma sin ustedes.

A mi madre Martha por que eres parte de este logro, gracias por apoyarme, por tus enseñanzas, por no dejar que me diera por vencida nunca, por tus consejos, por compartir tus experiencias, por siempre esperar lo mejor de mi, por nunca juzgarme y sobre todo por tu amor.

A mi padre Ángel gracias por las noches de desvelo, por siempre tener un consejo en los peores momentos, por enseñarme el gusto por la cocina, por siempre estar conmigo cuando te necesito, por tu apoyo. Gracias por tu amor y por siempre darme ánimos y confiar en mi.

A mi hermano Ángel por que a pesar de las diferencias siempre tienes un abrazo cuando más se necesita, gracias por escucharme, por las risas, por apoyarme en algunas decisiones.

A mi hermana Natalia por ser tan divertida, graciosa y un poco enojona eres increíble y gracias por que a pesar de ser la más pequeña tu forma de ver la vida es diferente y eso me llena de orgullo.

A mi familia cada uno de mis tíos, primos y sobrinos. Gracias por que a pesar de que no nos vemos muy seguido siempre tienen un consejo, una palabra de aliento y por estar ahí, cuando mas los necesito.

A mi gran amiga Caro, gracias por tantos años de amistad, por siempre estar ahí conmigo, creciendo y apoyándonos en las buenas y en las malas. Por las juntas vecinales, por ser como una hermana mayor. Por cada platica, consejo y palabra de aliento, por regañarme cuando hago algo mal, gracias a tu familia, por recibirme siempre con una sonrisa y tratarme como si fuera parte de la familia. También quiero agradecer a las rojas por acordarse de mi, por sacarme una sonrisa con sus ocurrencias, y por que cada día que convivo con ellas aprendo algo nuevo.

A Fernando H.T. por que el camino que recorrimos juntos fue largo, y siempre estuviste presente en los desvelos, ayudándome con mis presentaciones, aconsejándome y enseñándome muchas cosas que jamás olvidare, siempre estarás en mis pensamientos y tal vez no lograste llegar hasta este punto pero la mayor parte de la carrera estuviste a mi lado, gracias por cada uno de los momentos. Gracias a tu familia por apoyarme siempre.

A todos mis compañeros y amigos que conocí a lo largo de la carrera Ana, Erika, Ivan, Ismael, Magalli, Ik, Mariana, Ulises, Christian, Aldo, David, Adolfo, Jair, Alicia, cada uno de ustedes tiene un lugar en mi corazón, hicieron este camino lleno de risas, consejos y aprendimos muchas cosas juntos. Les deseo mucho éxito. A mis compañeros y amigos del acuario por compartir tantos momentos juntos, Valeria, Juan, Rodrigo, Susana, Canul, Alonso y Rene.

A Dan gracias por los mejores consejos, por jalarme las orejas cuando lo necesito, por compartir tus conocimientos, risas por siempre ser tan transparente, un gran apoyo y un gran amigo. No tengo palabras para agradecerte cada momento compartido y todo lo que has hecho por mi.

A Alejandro gracias por las risas, por tu amistad, las fiestas, las platicas, por tantos momentos que recordare siempre y por dejarme robarte un poco de la comida que te mandaba tu mamá.

A Jaciel y Lupe por compartir conmigo varios momentos, por su amistad, consejos, por las convivencias y por enseñarme que cuando te propones algo lo puedes lograr.

A Brenda que, aunque tengo poco tiempo de conocerte, hiciste los últimos días de tesis más divertidos.

A Aldair por que aunque también tengo poco tiempo de conocerte hiciste las horas de comida muy divertidas

"La vida no es fácil, para ninguno de nosotros. Pero... ¡qué importa! Hay que perseverar y, sobre todo, tener confianza en uno mismo. Hay que sentirse dotado para realizar alguna cosa y esa cosa hay que alcanzarla, cueste lo que cueste".

Marie Curie.

RESÚMEN	9
INTRODUCCIÓN.....	10
ANTECEDENTES.....	14
JUSTIFICACIÓN	15
OBJETIVO GENERAL.....	16
OBJETIVOS PARTICULARES.....	16
MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
OBTENCIÓN DE ORGANISMOS	17
DIETAS EXPERIMENTALES.....	17
PRUEBA DE ALIMENTACIÓN.....	18
PARÁMETROS DE CRECIMIENTO.....	19
ANÁLISIS QUÍMICO-PROXIMALES	20
OBTENCIÓN DE MUESTRAS.....	20
PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS Y QUÍMICA SANGUÍNEA	21
HEMATOCRITO	22
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	22
RESULTADOS.....	23
DISCUSIÓN	29
CONCLUSIONES	33
LITERATURA CITADA	34
ANEXOS	38
ANEXO 1	38
ANEXO 2	40
ANEXO 3.....	42
ANEXO 4.....	43
ANEXO 5.....	44
ANEXO 6.....	45
ANEXO 7	46
ANEXO 8.....	47

RESÚMEN

La acuicultura es el cultivo de organismos acuáticos en condiciones controladas en al menos una etapa de su desarrollo, se utilizan alimentos comerciales elaborados con harinas y aceites que contribuyen a la proteína animal obtenidos de productos pesqueros., La alta demanda de estos, se considera un riesgo ambiental, por la sobrepesca de productos acuáticos. Por esta razón se han propuesto ingredientes vegetales, como una opción para usarse como fuentes de proteína y lípidos en las dietas para la trucha arcoíris. En este trabajo se determino el efecto de una dieta con concentrado de proteína vegetal (soya, arroz y gluten de maíz) en el crecimiento, parámetros hematológicos y química sanguínea de crías de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), para lo cuál, Se formularon 2 dietas: vegetal (100% de proteína vegetal) y Veg+Pesc (90% p. vegetal + 10% p. animal). Como control se utilizo una dieta comercial (Bio-fingerling 1.5mm). La prueba se llevó a cabo durante 60 días, utilizando 270 organismos con peso promedio inicial de 0.60 g, divididos homogéneamente en tres tratamientos, cada uno de ellos por triplicado., y mantenidos en un sistema de recirculación de agua con tanques de polipropileno de 100 L. Los organismos alimentados con la dieta control tuvieron una ganancia en peso GP% mayor a los alimentados con las dietas experimentales. Estos tratamientos se comportaron de manera similar. La respuesta de los organismos con respecto a la deposición de lípidos en músculo e hígado no se observaron diferencias significativas a diferencia de la proteína en hígado en la cual hay una concentración significativamente menor en la dieta Veg+Pesc. Con respecto a la bioquímica sanguínea y parámetros hematológicos las crías alimentadas con la dieta Veg+Pesc tienen una concentración significativamente mayor de glucosa y triglicéridos, el volumen de hematocrito tuvo valores cercanos, pero en el conteo se observó un menor número de eritrocitos y leucocitos a diferencia de los otros tratamientos. Es por esta razón que el tratamiento control fue el más adecuado para el crecimiento y el estado de salud de las crías de trucha arcoíris.

INTRODUCCIÓN

La acuicultura es la producción de organismos acuáticos en condiciones controladas en al menos una de sus etapas de desarrollo. El 80% de la producción actual deriva de animales que se encuentran en la parte inferior de la cadena alimenticia, peces omnívoros, herbívoros y moluscos. En los últimos 30 años ha disminuido la pesca de captura, por esta razón es probable que el crecimiento futuro derive de la acuicultura, posiblemente el sector de producción de alimentos de crecimiento más acelerado hoy representa casi el 50% de los productos pesqueros mundiales destinados a la alimentación y ayudando así a la recuperación de las poblaciones salvajes (FAO, 2018).

La producción mundial de la pesca de captura fue de 90.9 millones de toneladas en 2016, tuvo un ligero descenso en comparación con los dos años anteriores. (FAO, 2018) En 2017, se produjeron en México 2 millones 70 mil toneladas de productos pesqueros y acuícolas (CONAPESCA, 2018).

Dentro del sector de la acuicultura la demanda de trucha está creciendo de forma sostenida gracias al sector acuícola (FAO, 2016). Su producción es altamente eficiente debido a que los sistemas y operaciones están bien establecidos. En los últimos años se han abierto nuevas líneas de investigación para mejorar la eficacia de producción, comercialización y calidad del producto (MAPAMA, 2010).

La trucha arcoíris *Oncorhynchus mykiss* se distribuye normalmente en la vertiente Pacífica de América desde Alaska hasta California. En México se distribuye naturalmente en Chihuahua, Baja California, Sinaloa y Sonora (CARTA NACIONAL PESQUERA, 2004); en corrientes de aguas frías y cristalinas con una altitud mayor a los 1500 msnm. Debido a su importancia económica ha sido introducida en la mayoría de los continentes.

Es un salmónido de agua dulce, posee un cuerpo alargado con forma fusiforme y presenta una aleta adiposa, tiene escamas pequeñas tornasoles, debajo es plateada, posee una coloración azul verdosa, con una banda rosada sobre la línea

lateral. La coloración varía en función de su hábitat, alimentación, tamaño y estadio sexual (APROMAR, 2017).

La naturaleza anádroma de la trucha arco iris le permite ocupar diferentes hábitats, vive en mar abierto y para el desove se traslada a zonas de flujo rápido del agua y muy oxigenadas de los ríos, aunque también puede habitar permanentemente en lagos. La trucha arco iris tiene un crecimiento rápido, en 3 años consigue entre 7 y 10 kg en el mar, y los 4.5 kg en agua dulce, puede vivir en un amplio rango de temperatura (0-27 °C), pero el desove y desarrollo de los huevos se da entre los 9-14 °C. La temperatura óptima para el crecimiento de la trucha arco iris está por debajo de los 21 °C. La temperatura y disponibilidad del alimento influyen sobre el crecimiento y la maduración sexual de los individuos, siendo usualmente entre el tercer y cuarto año (Cowx, 2005).

Es cultivada en diversas partes del territorio nacional especialmente en el Estado de México, la reproducción se realiza entre los meses de noviembre y febrero, produce 1000 huevos por kilogramo de peso, alcanza la talla comercial entre los 300 y 350 g en un lapso de 8 a 9 meses, se puede cultivar en sistemas rústicos e intensivos. Su crecimiento depende de la temperatura, el manejo, la oxigenación, la alimentación, las condiciones ambientales y las buenas prácticas de producción trutícola.

Uno de los principales retos que enfrenta la acuicultura es que conforme crece la producción también aumenta la demanda hacia los principales ingredientes como es la harina y el aceite de pescado y los costos van aumentando.

Una de las principales soluciones para disminuir los costos que representan entre el 40-60% del costo total de la producción, es buscar alternativas en la alimentación, es por esto que es de gran importancia mejorar la eficiencia en los alimentos para reducir los gastos (García *et al.* 2010) como la utilización de nuevas fuentes de proteína y lípidos, en lugar de la harina y aceites de pescado en las dietas balanceadas para peces carnívoros (Ding, 2015).

La harina de pescado es el ingrediente base de los alimentos para peces, constituye la fuente principal de proteínas gracias a su óptimo perfil de

aminoácidos esenciales, a su vez aporta ácidos grasos esenciales, vitaminas y minerales presenta alta digestibilidad y palatabilidad por esta razón este ingrediente es tradicionalmente la fuente proteica en los alimentos para peces carnívoros (García *et al.* 2010).

Es importante que los nuevos alimentos formulados se basen en ingredientes de bajo costo pero que aporten los ingredientes necesarios que permitan a los peces crecer y mantenerse sanos, para atender estas necesidades, en los últimos años se han aumentado las investigaciones enfocadas en la búsqueda de nuevas materias primas que aporten los requerimientos nutricionales necesarios y suficientes para el óptimo desarrollo de los peces (Fabián *et al.* 2015).

Actualmente las materias primas más empleadas para este uso son las vegetales, provenientes principalmente de semillas oleaginosas, presentan una amplia disponibilidad durante todo el año, tienen bajos costos, principalmente se ocupa la harina de soya (Fabián *et al.* 2015).

Los ingredientes de origen vegetal se han propuesto como una opción para usarse como fuentes de proteína y lípidos (Hardy 2010). La utilización de ingredientes de origen vegetal puede tener efectos negativos en los organismos carnívoros, como la trucha arco iris, pues las harinas de origen vegetal contienen moléculas de reserva (por ejemplo ácido fitico), estructurales (fibra no soluble) o de defensa (saponinas), que pueden afectar la digestibilidad y por ende, el crecimiento y el bienestar. La utilización de productos refinados, como los concentrados de proteína, pueden disminuir el contenido de estas moléculas, permitiendo una mejor utilización de la porción de la proteína.

En algunos casos los peces alimentados con dietas sin harina de pescado comen activamente, pero después presentan una alta mortalidad, infecciones bacterianas e hipercolesterolemia, junto con anomalías hepáticas y anemia (Maita *et al.* 1998).

Para evitar los problemas antes mencionados debe de existir un equilibrio entre los aminoácidos esenciales y los no esenciales (Marcouli *et al.* 2004).

Los peces requieren de un equilibrio de aminoácidos esenciales y no esenciales. Las proteínas son la mayor fuente del material orgánico en el tejido de los peces, representa entre un 65-75% del total corporal en peso seco (Wilson et al, 2002).

Por esta razón en los últimos años se han tomado en cuenta algunos parámetros para conocer la causa de enfermedades, o si las dietas que se les han administrado son adecuadas, principalmente se mide el perfil bioquímico de los peces, analizando las proteínas totales, albuminas, lípidos (colesterol y triglicéridos).

Las proteínas son esenciales para el mantenimiento, crecimiento, renovación y reemplazo de los tejidos, además de servir como fuente de energía en el metabolismo. La concentración de proteína plasmática es un indicador importante del estado fisiológico del animal (Landolt, 1989).

Los triglicéridos son los lípidos más abundantes del organismo y su almacenamiento en el tejido adiposo supone una reserva especial de energía química para las necesidades de los tejidos. Proceden de la dieta y de la síntesis en el hígado (Davidson et al, 2000). Cumplen con el transporte de los ácidos grasos y proporcionan aislamiento para las bajas temperaturas (Nelson y Cox, 2005)

Las alteraciones en los parámetros hematológicos sirven como indicativo del estado de salud (Bueñaño, 2010). El grado y tipo de alteración varía según la especie y agente causal. En la trucha arcoíris, se ha observado que la proporción de leucocitos, linfocitos, monocitos, trombocitos y/o neutrófilos aumenta o disminuye según se trate de un proceso infeccioso o una exposición a productos químicos contaminantes (Zorriehzahra, 2011).

ANTECEDENTES

Cruz *et al.* (2011) en dietas con sustituciones del 50, 75 y 100% de harina de pescado por concentrado de soya adicionado con fitasa para trucha arcoíris, obtuvieron un resultado similar en crecimiento al de las dietas comerciales empleando el 75% de sustitución además de la reducción en el aporte de nutrientes de desecho.

Tusche *et al.* (2012) realizaron sustituciones 56% de harina de pescado (56%) por gluten de trigo y concentrado de proteína de papa a distintas concentraciones en trucha arcoíris, encontrando que no existían diferencias respecto al control en el crecimiento, bienestar y estatus nutricional, así como en la composición de la sangre (glucosa, triglicéridos y proteína en suero).

Olmeda (2014) realizo dietas a base de harina de canola encontrando que la inclusión de dietas vegetales en peces de hábitos carnívoros no afectos su supervivencia, tuvo una utilización eficiente de la proteína vegetal. Las dietas con 30% y 45% presentaron mayor concentración lipídica en hígado, se afecto la histología de la glándula tiroides y esto a largo plazo podría afectar el estado de salud

Craft *et al.* (2016) realizaron una comparación entre dietas elaboradas con harina de pescado y otras elaboradas con proteína vegetal entre las cuales se utilizaron como ingredientes principales: harina de soya, harina de soya 48%, concentrado de proteína de maíz, concentrado de proteína de soya, spirulina, harina de trigo, concentrado de proteína de cebada y pasta de soya. No encontraron diferencias significativas en una prueba de 88 días de duración.

Alcocer-Garcia (2017) Utilizo una dieta balanceada conformada por concentrado de proteína de soya, concentrado de proteína de arroz y gluten de maíz como fuentes principales de proteína en juveniles de trucha arcoíris. En sus resultados encontró que la dieta con 100% de proteína vegetal, tuvo resultados favorables en comparación con la dieta control en cuanto a GP, TCA, TCE, proteínas en suero sanguíneo, actividad de lisozima

JUSTIFICACIÓN

Se han realizado estudios probando la eficacia de las proteínas vegetales para sustituir a la proteína animal, existe información que prueba que el concentrado de proteína de soya, el concentrado de proteína de arroz y el gluten de maíz son ingredientes potenciales para sustituir a la harina de pescado. Pero existe poca información de la utilización de estos ingredientes en una misma dieta, así como pocos estudios hematológicos en trucha alimentada con proteínas vegetales, lo que dificulta avances en su estudio y la eficacia de los ingredientes.

OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de dietas con alto contenido de concentrados de proteína vegetal en el crecimiento y estado de salud de crías de trucha arco iris *Oncorhynchus mykiss*.

OBJETIVOS PARTICULARES

Determinar el efecto de dietas con alto contenido de concentrados de proteína vegetal en la ganancia en peso y tasa de crecimiento específico en crías de trucha arco iris.

Determinar la química sanguínea y parámetros hematológicos de crías de trucha arco iris.

MATERIALES Y MÉTODOS

OBTENCIÓN DE ORGANISMOS

Se obtuvieron crías de trucha arcoíris del Centro de Producción Acuícola El Zarco, localizado en el Municipio de Ocoyoacac Estado de México. Los organismos fueron trasladados al Laboratorio de Producción Acuícola de la FES Iztacala y se aclimataron durante 30 días en un tanque de 500 litros, provisto de aireación y filtración continua. Durante este periodo, se alimentaron con dieta comercial de la marca Bio-fingerling (maltaCleyton de México) de un tamaño de 1.5 mm de diámetro.

DIETAS EXPERIMENTALES

Se formularon dos dietas experimentales (Tabla 1), utilizando como fuentes de proteína, a los concentrados de proteína de soya, arroz y gluten de maíz. Una dieta se elaboró con la mezcla de proteínas vegetales exclusivamente, mientras que en la segunda, se incluyó un 10% de harina de pescado. Las dietas se prepararon de acuerdo a Cruz et al. (2011). Como grupo control se utilizó la dieta comercial Bio- fingerling de 1.5 mm.

Tabla 1. Formulación y composición proximal de las dietas experimentales para crías de trucha arcoíris.

Ingredientes (g/kg)	Vegetal	Veg + Pesc
Concentrado de proteína de arroz	200	150
Concentrado de proteína de soya	200	200
Gluten de maíz	150	100
Harina de pescado	0	100
Aceite de pescado	100	100
Lecitina de soya	50	50
Dextrina	100	100
Mezcla vitaminas y minerales	40	40

Gluten de trigo	50	50
Alfa-celulosa	110	110

Composición aproximada en peso seco (%)	Vegetal	Veg + Pesc
Lípidos	14.21%	11.03%
Proteína	44.7%	42.8%
Cenizas	4.76%	5.08%
Humedad	4.55%	4.51%

PRUEBA DE ALIMENTACIÓN

La prueba de alimentación se realizó en un sistema de recirculación, equipado con tanques de polipropileno de 100 L. Cada dieta se ofreció a grupos por triplicado de 30 crías por tanque, teniendo un total de 270 organismos con una ración diaria del 10% de la biomasa total por tanque suministrada en dos raciones (9:30 am y 16:30 pm). Una hora después de cada ración, los tanques se sifoneaban para retirar cualquier residuo de alimento y heces. Cada 15 días se realizaron biometrías ajustando la ración de acuerdo con el peso registrado. Y cada 20 días se extrajeron 10 organismos para obtener muestra de hígado y músculo. La prueba tuvo una duración de 60 días, al término del cual, los organismos se pesaron y midieron para obtener el crecimiento final, y los organismos que quedaron, fueron sacrificados para extraer las muestras de sangre, hígado y músculo.

Tabla 2. Parámetros ambientales promedio durante los 60 días de la prueba de alimentación.

Temperatura (°C)	16.25 ± 3.2
Oxígeno disuelto ((mg/l)	4.23 ± 0.2
pH	7.89 ± 0.5

PARÁMETROS DE CRECIMIENTO

Para la determinación de los parámetros de crecimiento en crías de trucha arcoíris se emplearon las siguientes fórmulas:

Ganancia en Peso (GP) %

$$\%GP = \frac{(PF - PI)}{PI} \times 100$$

Donde:

PF= Peso final

PI= Peso inicial

Tasa de crecimiento específico (TCE) (%)

$$TCE = \frac{\ln(PF) - \ln(PI)}{t} \times 100$$

Donde:

ln= logaritmo natural

PF= peso final

PI= peso inicial

t= tiempo de alimentación

Tasa de conversión alimenticia (TCA)

$$TCA = \frac{GP}{a}$$

Donde:

GP= ganancia en peso (g)

a= total de alimento consumido en base seca (g)

Tasa de eficiencia de la proteína

$$TEP = \frac{GP}{p}$$

Donde:

GP= ganancia en peso (g)

p= total de la proteína consumida (g)

ANÁLISIS QUÍMICO-PROXIMALES

Se realizó el análisis químico proximal de acuerdo con las técnicas reportadas por la AOAC (1990) para proteína, humedad y cenizas .

Se determino el contenido de proteína en músculo, hígado y dietas experimentales de acuerdo con la técnica de Kjeldahl (Foss). El contenido de lípidos en músculo, hígado y dietas experimentales fue determinado con la técnica de extracción por Metanol-Cloroformo descrita por Blight y Dyer (1959).

OBTENCIÓN DE MUESTRAS

Para la obtención de muestras los organismos fueron puestos en ayuno durante un periodo de 24 horas previo a la extracción, se realizaron en total tres sacrificios para la fase experimental.

- En los días 20 y 40, se sacrificaron 10 organismos por cada tanque para la extracción de hígado y músculo
- En el día 60 se sacrificaron las crías restantes de cada uno de los tanques.

Las crías fueron anestesiadas con aceite de clavo y diseccionadas para la toma de muestra, el musculo y el hígado fueron colocados en tubos Eppendorf, previamente etiquetados y se congelaron a -20°C.

Para el día 60 las truchas fueron anestesiadas con MS-222 (100 mg en .5 L de agua) antes el MS-222 se disolvió en 100 ml de alcohol etílico 96°, se dejaron en un lapso no mayor a 5 segundos, seguido a ello se extrajo una muestra de sangre de cada individuo, con una punción en la vena caudal, cercana a la línea media y a la columna, para el posterior análisis bioquímico. En seguida las truchas fueron sacrificadas y evisceradas para obtener el hígado y músculo, los cuales fueron colocados en tubos Eppendorf, etiquetados y congelados a (-20°C) para los análisis químico-proximales.

PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS Y QUÍMICA SANGUÍNEA

Las muestras de sangre de cada organismo fueron divididas en tres alícuotas:

- La primera alícuota fue colocada en tubos con heparina, para evitar la coagulación de la sangre y realizar el posterior análisis hematológico, fueron llevados a refrigeración a 4°C, después centrifugados a 10,000 rpm durante 10 minutos.
- La segunda alícuota fue colocada en tubos Eppendorf de 1 ml, se colocaron en el refrigerador a 4°C durante 2 horas, se centrifugaron en la micro centrifuga a 7,000 rpm por 7 minutos, al ver que no se separaba el suero de la muestra, se volvió a centrifugar a 10,000 rpm durante 10 min, se tomó el suero sanguíneo y se colocó en otros tubos Eppendorf, y se llevó al refrigerador para posteriormente realizar la química sanguínea.
- La tercer alícuota fue colectada directamente de la vena caudal con tubos capilares con EDTA para evitar la coagulación, una vez con la sangre, a los capilares se les coloco una bolita de plastilina en los extremos, a los tubos de ensaye se les colocaron un algodón hasta abajo y posteriormente se taparon, fueron centrifugados a 2500 rpm durante 5 min.

Se determinaron los parámetros hematológicos de hematocrito, conteo de leucocitos y eritrocitos (Cid-García 2018); así como el contenido de proteínas (micro BCA protein assay kit, ThermoFisher Sci., Rockford, EU) , glucosa (glucose

detection kit, Abcam, Cambridge, EU) y triglicéridos (Enzychrom triglyceride assay kit, Bioassay System, Hayward, EU) en el suero.

HEMATOCRITO

Se sacaron los tubos de la centrifuga y posteriormente los capilares de cada uno de los tubos. El contenido de los capilares se separó en dos: paquete celular (eritrocitos y leucocitos) y plasma, se colocaron encima de una hoja blanca y se procedió a medirlos con una regla, para así sacar el porcentaje total, él del paquete celular y del plasma. Para el conteo de leucocitos y eritrocitos, muestras de 0.5 ml de la muestra y se introdujeron en un tubo de ensaye con liquido de Hayem (para eritrocitos) o de Türk (para leucocitos) y se observaron en el microscopio óptico para su conteo.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos se analizaron para normalidad y homocedasticidad con las pruebas W de Shapiro y Wilk, así como de Bartlett, respectivamente (Zar, 1999). Los datos que mostraron normalidad y homocedasticidad se trataron con un ANDEVA de una vía (Prism 6 for MAC OS X, GraphPad Software Inc., E.U.). Las diferencias significativas entre los tratamientos se evaluaron con una prueba de LSD de Fisher (Zar, 1999) y se determinaron con un error de 5% ($p < 0.05$) para cada grupo de comparaciones.

RESULTADOS

En la Figura 1 se muestran los pesos de las crías determinados cada 15 días, a lo largo de la prueba de alimentación. Se observa que los organismos alimentados con la dieta control mostraron un peso mayor a partir del día 30, pero los valores de ganancia en peso y tasa de crecimiento específico (Tabla 3) nos mostraron diferencias significativas entre los tratamientos.

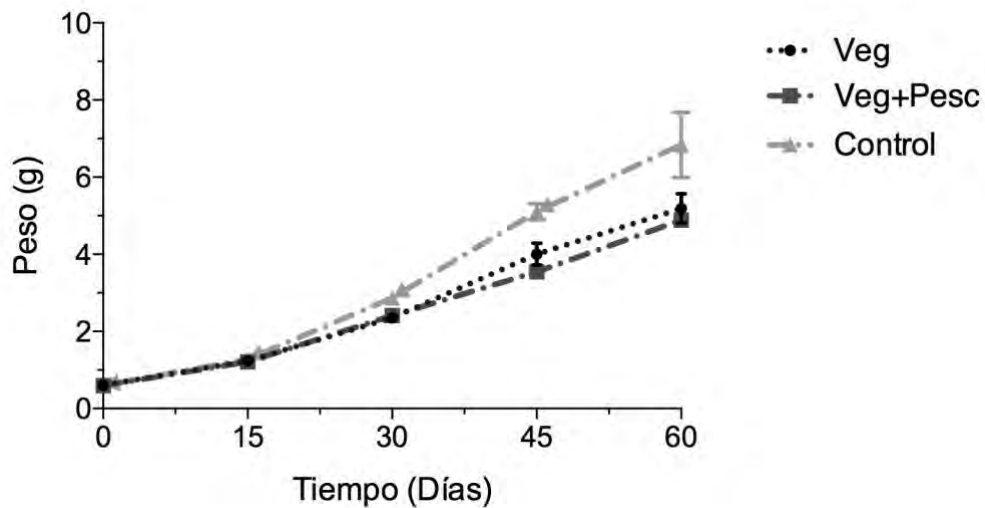


Figura 1. Peso promedio de crías de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) alimentadas con dietas elaboradas con concentrados de proteína vegetal, determinado cada 15 días. Cada punto representa la media de tres replicas \pm del error estándar.

Tabla 3. Se muestran los valores de ganancia de peso (GP), tasa de crecimiento específico (TCE), tasa de conversión alimenticia (TCA) de crías de trucha arcoíris alimentados con dietas con concentrados de proteína vegetal durante 60 días. Los datos representan la media de los tratamientos por triplicado \pm error estándar. No se observaron diferencias significativas a este nivel ($P < 0.05$).

Tratamiento	GP ¹ (%)	TCE ² (%/día)	TCA ³
Control	1047 \pm 134	4.1 \pm 0.2	0.52 \pm 0.05
Vegetal	720 \pm 63	3.5 \pm 0.1	0.48 \pm 0.04
Veg+Pesc	719 \pm 25	3.5 \pm 0.05	0.54 \pm 0.02

¹GP: ganancia en peso = $((\text{peso final} - \text{peso inicial}) / \text{peso inicial}) \times 100$

²TCE: tasa de crecimiento específico = $((\ln \text{peso final} - \ln \text{peso inicial}) / 90) \times 100$

³TCA: tasa de conversión alimenticia = ganancia en peso (g) / total alimento consumido (g)

En la figura 2 se muestra el contenido de lípidos en el músculo (A) e hígado (B). En ambos tejidos, no se observaron diferencias significativas entre las medias ($P < 0.05$).

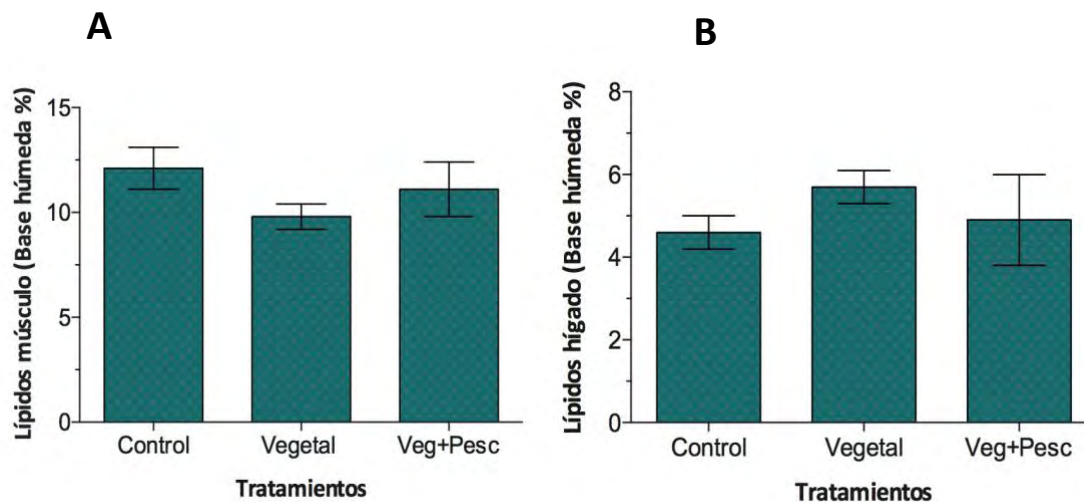


Figura 2. Contenido de lípidos en músculo (A) e hígado (B) de crías de trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) alimentadas con dietas elaboradas con concentrados vegetales, determinado cada 15 días. Cada columna representa la media de tres replicas \pm del error estándar. No se observaron diferencias significativas

Por otra parte, el contenido de proteínas en músculo (Fig. 3A) no mostró diferencias significativas entre los tratamientos. Sin embargo, el contenido de proteínas en el hígado se observó un contenido significativamente menor en el grupo alimentado con la dieta Veg+Pesc que el observado en los organismos alimentados con la dieta control (Fig 3B) .

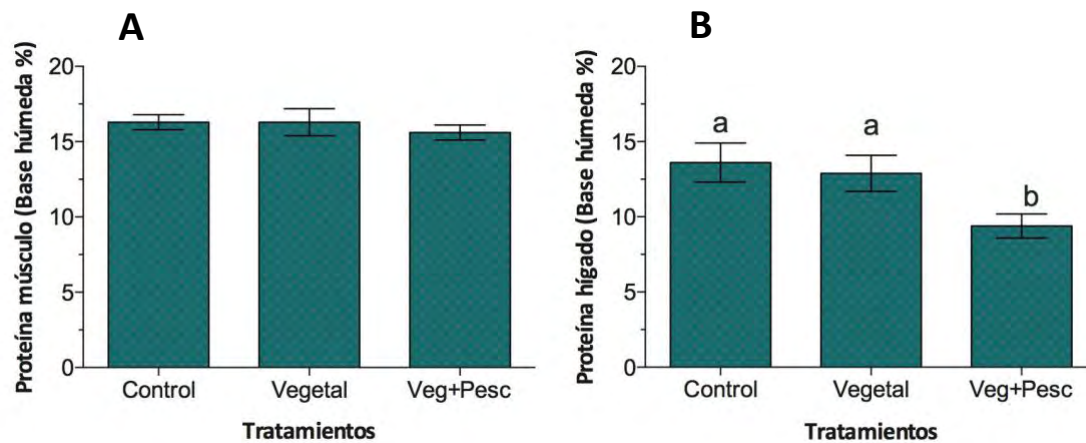


Figura 3. Contenido de proteína en músculo (A) e hígado (B) de crías de trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) alimentadas con dietas elaboradas con concentrados vegetales. Cada columna representa la media de tres replicas \pm error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

Los resultados de la química sanguínea se muestran en la Figura 4. Los contenidos de proteína (A) no mostraron diferencias significativas entre las medias. Respecto al contenido de glucosa (B) y triglicéridos (C), el grupo alimentado con la dieta Veg+Pesc mostro valores significativamente más altos que los observados en los otros 2 grupos.

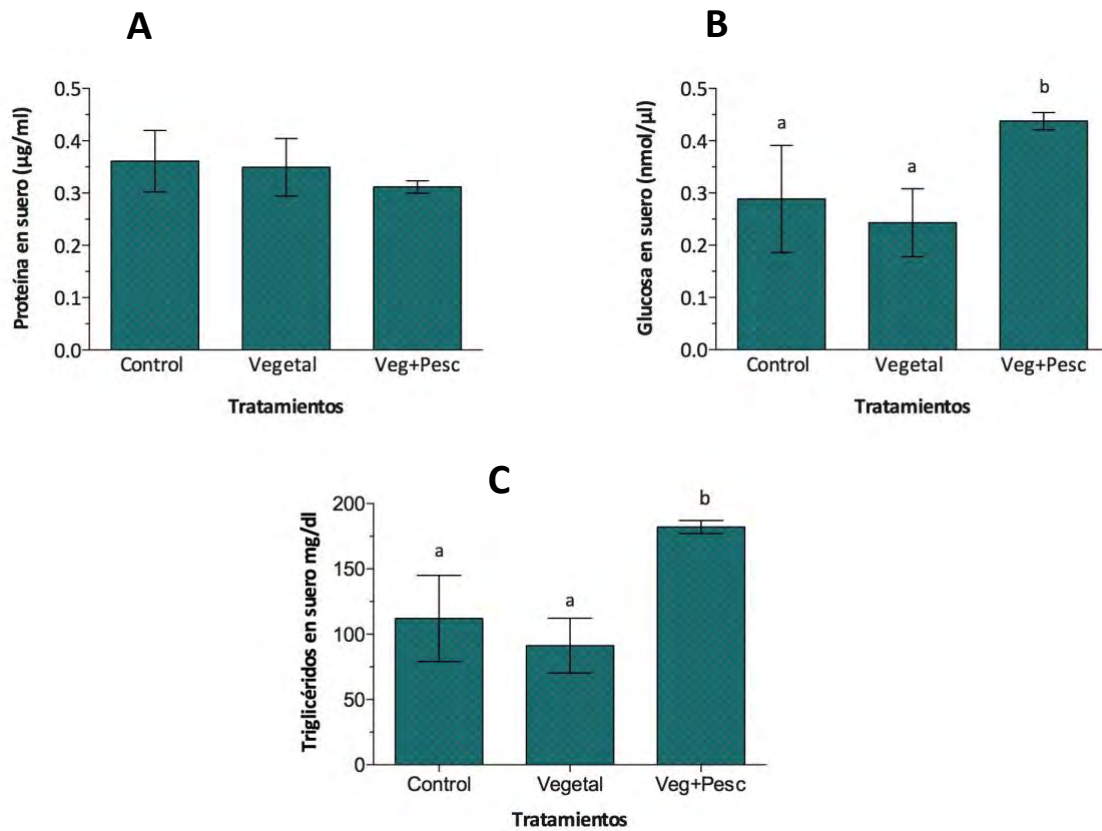


Figura 4. Química sanguínea de crías de trucha arcoíris alimentadas con dietas elaboradas con concentrados vegetales. Las columnas representan la media de tres replicas \pm del error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

En la Figura 5, se muestra el conteo de eritrocitos (A) y leucocitos (B), así como el hematocrito (C). Los organismos alimentados con la dieta Veg+Pesc mostraron valores significativamente bajos que los otros tratamientos. Respecto al hematocrito, no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos.

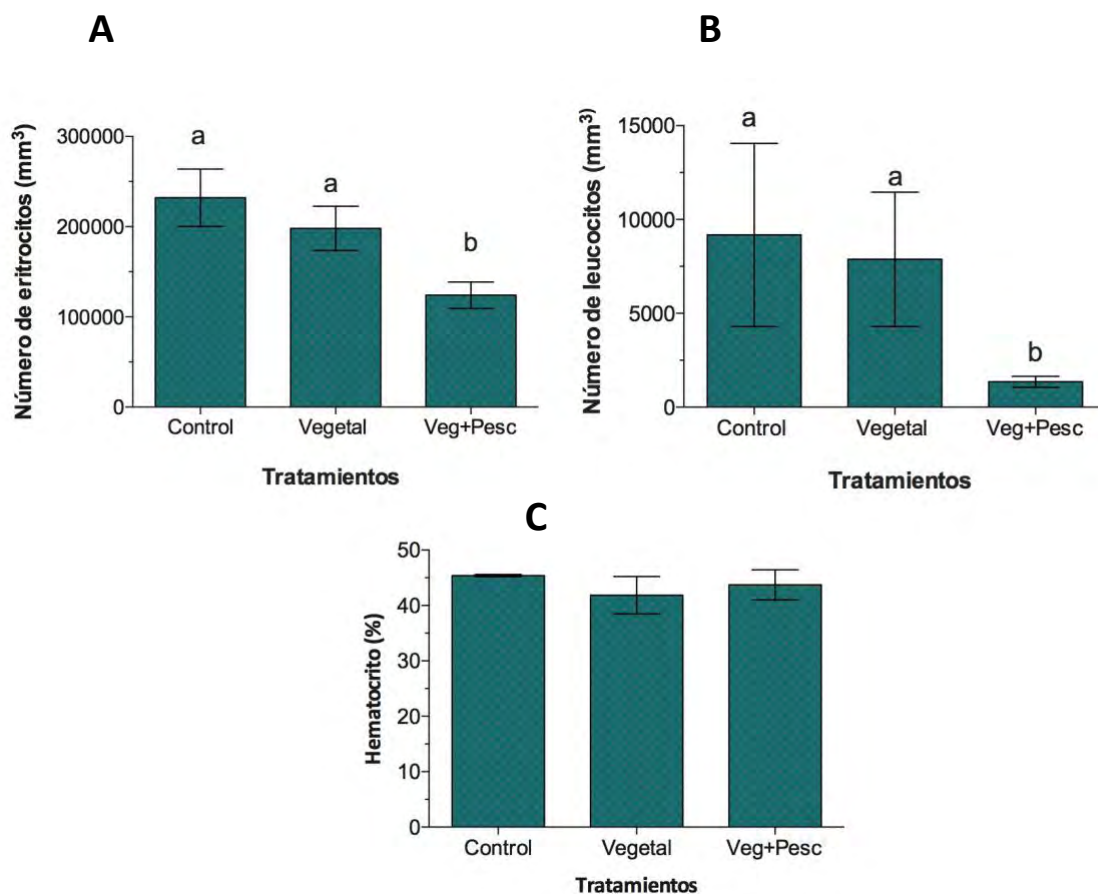


Figura 5. Número de eritrocitos y leucocitos presentes en la sangre de crías de trucha arcoíris alimentadas con dietas elaboradas con concentrados de proteínas vegetales. Los datos representan la media de tres replicas \pm del error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos muestran que la incorporación de los concentrados de proteína vegetal en las dietas experimentales afecta el crecimiento de las crías de trucha durante 60 días, ya que este fue menor que en los organismos alimentados con la dieta control. Considerando lo reportado por Alcocer-García (2017) en juveniles de trucha arcoíris, ya que, con la misma formulación de la dieta vegetal, presentaron mayor crecimiento que un grupo control alimentado con una dieta comercial. Lo que indica que organismos en el estadio de crías podrían tener problemas al utilizar adecuadamente las proteínas vegetales en combinación (soya, arroz y gluten de maíz). Por lo tanto, esta mezcla no cumple con los requerimientos nutricionales de crías de trucha arcoíris, por lo que se tendría que buscar la formulación adecuada que permita un aprovechamiento adecuado de la dieta.

Los organismos alimentados con la dieta de Veg+Pesc tuvieron un crecimiento bajo en comparación a los otros tratamientos. Respuesta que ha sido reportada previamente por Bureau (2006) y Jerusalén (2017) y aunque no existe una explicación definitiva, puede deberse a un desequilibrio en el patrón de aminoácidos, particularmente un exceso de alguno de ellos (Robaina, 1998) debido a la inclusión de la harina de pescado.

En cuanto a la tasa de conversión alimenticia (TCA) los valores fueron mayores en el tratamiento control.

La deposición de proteína y lípidos en hígado y músculo de las crías siguieron una tendencia similar a lo reportado con anterioridad en relación con el crecimiento. Los lípidos en el hígado se encontraron en mayor cantidad en la dieta vegetal, esto podría deberse a un reservorio de energía en donde los lípidos todavía no estaban listos para ser sintetizados y tuvieron mayor concentración de estos, diversos estudios concuerdan con que altos niveles de sustitución provocan un aumento de la grasa en el hígado, y por ende aumentan el índice hepatosomático y el contenido de vesículas lipídicas en peces carnívoros (Sus, 2014). Las

proteínas depositadas en el músculo mostraron niveles similares en los tratamientos, de acuerdo con lo reportado por Bullerwell et al (2015) que determino que la deposición proteica en el músculo no se ve afectada utilizando camelina en diferentes presentaciones. Por otra parte, en los resultados de proteínas depositadas en el hígado se obtuvo un valor significativamente menor en el tratamiento Veg+Pesc. Craft et al. (2016) compararon diferentes dietas a base de proteínas vegetales, y otras de harina de pescado, pero no encontraron diferencias significativas en la deposición de lípidos y proteínas en músculo e hígado.

En la búsqueda de conocer más acerca de los beneficios de las dietas con concentrados de proteínas de origen vegetal se llevan a cabo evaluaciones de las diferentes variables hematológicas junto con variables bioquímicas, éstas son usadas como una herramienta para determinar el estado de salud (Abdel *et al.*, 2006) Existen muy pocos trabajos relacionados a estas variables, ya que la mayoría son en estadios juveniles o en reproductores. Por esta razón este trabajo se realizó con crías para conocer el rango óptimo y los efectos de estas dietas en el estado de salud. Una desventaja de utilizar crías, es su tamaño, debido a esto la muestra de sangre y las cantidades extraídas de sangre fueron menores en comparación de los otros estadios, esto no afecto los resultados ya que cada una de las pruebas pudo realizarse de manera adecuada y sin ninguna complicación.

La calidad y cantidad del alimento unido a factores ambientales tienen un efecto en la fisiología de los organismos especialmente en los que son mantenidos en cautiverio, y esto interfiere en las variables hematológicas (Tavares-Dias y Ruas de Moraes, 2004).

En cuanto a la bioquímica sanguínea, los valores de proteínas en suero muestran que la concentración se comporto de manera similar en los tratamientos, y al igual que en los resultados de crecimiento la dieta Veg+Pesc muestra una tendencia inferior a las otras dietas.

Es necesario conocer los niveles normales de glucosa en los peces, existen diversos trabajos con los valores de juveniles y adultos, sin embargo, en crías

todavía falta información. Bermejo et al. (2015) mencionan que los niveles de glucosa en trucha arcoíris sin ser sometidos a estrés están entre 71.89 a 78.79 mg/dl. Mientras que Trenzado (2004) reporta que los valores de la glucosa plasmática en la trucha arcoíris son de 77.8 mg/dl y Fazio et al (2016) encontraron resultados diferentes 77.93 mg/dl para truchas en Italia y 58.99 mg/dl para truchas en Turquía. Los resultados de glucosa muestran valores bajos en la dieta vegetal y en la dieta Veg+Pesc los valores son altos. De acuerdo con Pottinger *et al.* (2003) un descenso en los niveles de glucosa plasmática se presenta en periodos de restricción alimenticia y es una respuesta característica observada en la trucha arcoíris. Una de las consecuencias de la variación de resultados es la influencia de diferencia de hábitats, el manejo de los organismos, las condiciones ambientales y las dietas que se les suministran.

En relación con los triglicéridos la dieta vegetal presenta el mismo comportamiento que con la glucosa, relacionado a esto Pérez-Jimenez *et al* (2007) menciona que la inhibición en la síntesis de ácidos grasos podría ser la responsable de una reducción en los niveles. Pero en el caso de la dieta Veg+Pesc los resultados fueron elevados de acuerdo con lo reportado por Fazio *et al.* (2016) ya que el obtuvo valores de 331.70 mg/dl para truchas en Italia y 133.40 mg/dl en Turquía. Una causa de la diferencia de estos datos es que podrían ser causados por estrés (Aguirre-Gúzman, 2016), la influencia del medio ambiente, las condiciones de cultivo y el alimento suministrado ya que este es de gran importancia en la diferencia de resultados. En el presente trabajo las truchas estuvieron en las condiciones óptimas ambientales y de calidad del agua, fueron tratadas bajo el menor estrés, pero adjudicamos estos valores a una deficiencia en la dieta al mezclar las proteínas vegetales con harina de pescado.

En cuanto a los parámetros hematológicos el porcentaje de hematocrito tuvo valores normales (Fazio *et al*, 2016) y no presento diferencia significativa alguna, mientras que ya en los conteos de eritrocitos y leucocitos observamos que la dieta Veg+Pesc presento valores totalmente diferentes a las otras dietas y muy por debajo de la media lo que nos muestra que esta dieta no favoreció en nada a los

organismos alimentados. De acuerdo a lo reportado por Aguirre-Guzmán (2016) el volumen de hematocrito, así como de los eritrocitos y los leucocitos pueden verse afectados y con valores mayores a la media después de ser sometidos a estrés, y conforme pasan las horas el volumen podría aumentar un poco mas, nuestros organismos fueron anestesiados y al momento de la extracción de sangre, no fueron puestos en condiciones estresantes para que los valores se vieran afectados, es por esto que podemos decir que estos valores están mas relacionados con la ineficiencia de la dieta Veg+Pesc.

Se han probado altas inclusiones de harinas vegetales para peces carnívoros con buenos resultados en crecimiento y supervivencia (Monge et al. 2016). Aunque se ha demostrado que cuando los peces son sometidos a algún tipo de estrés, los resultados pueden no ser satisfactorios (Barandica, 2010; Monge et al. 2017). Un claro ejemplo, es una sustitución de 75% de harina de pescado con harina de soya, y obteniendo resultados similares al grupo control en cuanto a crecimiento en juveniles de trucha (peso final, TCE, TEP) como lo menciona Cruz *et al.* (2011).

Se han encontrado mejores resultados en relación con el crecimiento mezclando diferentes proporciones de gluten de maíz con otras fuentes de proteína vegetal. Los resultados más favorables se obtuvieron sustituyendo 50% la harina de pescado por harina de soya y gluten de maíz en trucha arcoíris dando siendo similares al control según lo reportado por Gomes *et al.* (1994)

CONCLUSIONES

- Los organismos alimentados con la dieta Vegetal tuvieron un crecimiento menor a la dieta control, mostrando una relación negativa al suministrarla en crías de trucha arcoíris. Sin embargo, los concentrados de proteína vegetal utilizados no afectaron el bienestar de las crías de trucha arcoíris por un periodo de 60 días
- La inclusión de harina de pescado en una dieta de concentrados vegetales (Veg+Pesc), presentó resultados desfavorables afectando el crecimiento de las crías, así como también el número de eritrocitos y leucocitos, debemos destacar que el uso de esta dieta también tuvo un efecto negativo en el contenido de glucosa y triglicéridos en el suero sanguíneo

LITERATURA CITADA

- Abdel, M.; Khattab, Y.; Ahmad, M. y Shalaby, A 2006. Compensatory Growth, Feed Utilization, Whole-Body Composition, and Hematological Changes in Starved Juvenile Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). *Journal of applied aquaculture*. 18(3):17-36.
- Alcocer-García J. R., 2017 Proteínas de origen vegetal en la dieta de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) obtenidas de una granja comercial. Facultad de Estudios Superiores UNAM, Cuautitlan, Estado de México.
- Almeida, A. J., Yuji, R. Y Possebon, J.E. 2009. Growth and hematology of pacu, *Plaractus mesopotamicus*, fed diets with varying protein to energy ratio. *Aquaculture research*. 40: 486-495.
- Association of Official Analytical Chemist, 1990. *Official Methods of Analysis Vol 2*. Association of Official Analytical Chemist Inc. Arlington, Virginia, USA.
- APROMAR, 2017. *La acuicultura en España*. Asociación Empresarial de Acuicultura de España. España 93 pp.
- Barandica C. L., 2010. Efectos de las dietas experimentales en la respuesta inmune de los peces. Universidad Autonomy de Barcelona.
- Bligh, E. & Dyer, W. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37(8): 911-917
- Bureau D. P. 2006 Utilización de harinas de origen animal en la nutrición de peces. Revisado el 25 de agosto de 2018.
https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKEwjcgdiM07DdAhXCqIMKHbRACsQQFjAAegQICRAC&url=https%3A%2F%2Fcalifornia.arizona.edu%2Ffazagua%2Fista%2Fista7%2FMemorias%2Falbert_tacon.doc&usq=AOvVaw18LleJvI56xCaaiLZ_Tz_ZC
- Bueñaño, M.V. 2010. Hemograma de trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) en tres etapas de producción en la cuenca alta de la provincia del Napo, Ecuador. *Bol. Téc. 9, Ser. Zool.*, 6: 1-14.
- Carta Nacional Pesquera, 2004, INAPESCA, México.
- Cid-Garcia R. 2018 Inclusión de fructooligosacáridos y levadura en dietas con proteína vegetal para crías de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) y su efecto en el crecimiento y respuesta inmune. *Ciencias del Mar y Limnología*, UNAM. CDMX.
- Comision Nacional de Pesca y Acuicultura, 2018 CONAPESCA, México
- Cowx, I. 2005. Review of the exploitation pressures on the fisheries resources of Lake Victoria. LVEMP National Secretariat, Entebbe, Uganda. 125 pp.

- Craft C. D., Ross C., Sealey W., Gaylord G., Barrows F., Formshell G., Myrick C., 2016, Growth, proximate composition, and sensory characteristics of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*)
- Cruz, C., Hernandez, L., Fernandez, M. and Angeles, O. 2011. Effects of diets with soybean meal on the growth, digestibility, phosphorus and Nitrogen excretion of juvenile rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Hidrobiológica* 21 (2): 118-125
- Davidson M. Roderich E., y Lumsden J., 2000 Patología clínica en pequeños animales. Madrid, España.
- Deng, J., Kang, B., Tao, L., Rong, H. & Zhang, X. 2013 Effects of dietary cholesterol on antioxidant capacity, non-specific immune response, and resistance to *Aeromonas hydrophila* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed soybean meal-based diets. *Fish & Shellfish immunology*. 34: 324-331
- Ding, Z., Zhang. Y., Ye, J., Du, Z. & Kong, Y. 2015. An evaluation of replacing fish meal with fermented soybean meal in the diet of *Macrobrachium nipponense*: Growth, nonspecific immunity, and resistance to *Aeromonas hydrophila*. *Fish & Shellfish Immunology*, 44: 295-301
- Fabian C. L. Casas L. J. Fernández S. A. D. Rodríguez F. R. Ramirez L. H. Chavez G. A. Vázquez L. O. Duran A. S. 2015 Desarrollo de alimentos formulados para especies acuícolas. *Rev. Mex. De Agro*. 2(1): 40-48.
- Fazio F., Saoca C., Piccione G., Kesbic S. O., Acar Ü. 2016 Comparative Study of Some Hematological and Biochemical Parameters of Italian and Turkish Farmed Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792). *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 16:715-721.
- FAO, 2016. El estado mundial de la pesca y la acuicultura “Contribución a la seguridad alimentaria y la nutrición para todos”. Organización de las naciones unidas para la alimentación y la agricultura. Roma 224 pp.
- FAO, 2018 El estado mundial de la pesca y acuicultura “cumplir los objetivos de desarrollo sostenible” Organización de las naciones unidas para la alimentación y la agricultura. Roma 250pp.
- García, A. Muy- Rangel, D. Puello-Cruz, A. Villa-López y Escalane-Rojas, M. Preciado-Iñiguez K. 2010. Uso de los ingredientes de origen vegetal como fuentes de proteína y lípidos en alimentos balanceados para peces marinos carnívoros.
- Gomes E. F., Rema P., Gouveia, A. y Oliva-Teles A., 1994. Replacement of fishmeal by plant proteins in diets for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): effect of the quality of the fishmeal based control diets on digestibility and nitrogen balance. II intern symp. On nutritional strategies and management of aquaculture waste. Aalborg, Holanda.

- Hardy W. R. 2010 Utilization of plant proteins in fish diets: effects of global demand and supplies of fishmeal. University of Idaho, Aquaculture Research 41, 770-776.
- Hernández, G., Hernandez, L., Fernandez, M. and Angeles, O. 2012. Effects of Total Replacement of Fishmeal with Spirulina Powder and Soybean Meal on Juvenile Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss Walbaum*). The Israeli Journal of Aquaculture, 64: 1-8
- Jerusalén LL. E. 2017 Efecto de la sustitución de harina de pescado por una mezcla de turtó de soja y gluten de trigo en piensos para trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*. Universidad Politécnica de Valencia, España
- Landolt M. 1989 The relationship between diet and the immune response of fish. Aquaculture 79: 193-206
- Maita, M. Aoki, H. Satoh, S. Okamoto N. 1998. Watanabe plasma biochemistry and disease resistance in yellowtail fed a non-fish meal diet. *Fish Pathol* 33(2): 59-63 pp
- MAPAMA 2010. Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y medio ambiente. Trucha arcoíris. España.
- Marcouli P. A., Alexis M. N., Andriopoulou A., Iliopoulou-Georgudaki J., 2004 Development of a reference diet for use in indispensable amino acid requirement studies of gilthead seabream (*sparus aurata L.*) Aquaculture Nutrition. DOI: 10.1111/j.1365-2095.2004.00308.x. 10: 335-343 pp.
- Nelson D. y Cox M. 2005 Lehninger principles of biochemistry. Fourth edition.
- Olmeda G. P., 2014 Diseño y evaluación de dietas a base de harina de canola para la alimentación del pargo flamenco *Lutjanus guttatus* (Steindachner, 1869): efecto en crecimiento digestibilidad y estado de salud. UNAM, México, Ciudad de México
- Pottinger T. Rand M. Y Sumpter J. 2003 Overwinter fasting and re-feeding in rainbow trout: plasma growth hormone and cortisol levels in relation to energy mobilization. Comparative Biochemistry and Physiology, Parte B. 136: 403–417
- Robaina-Robaina. L. E. 1998 Utilización nutritiva de fuentes de proteína alternativas a la harina de pescado en dietas de engorde para dorada (*Sparus aurata*) Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, España. 195 pp.
- Sus, C, S. (2014). *Formulación de piensos sostenibles para la producción de Seriola dumerili*. Grado. Universitat Politècnica de València.
- Tavares-Dias, M. Y Ruas de Moraes, F. 2004. Hematología de peixes teleósteos. 144p.

- Tusche, K., Arning, S., Wuertz, S., Susenbeth, A. & Schulz, C. 2012. Wheat gluten and potato protein concentrate - Promising protein sources for organic farming of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 344-349: 120-15
- Wilson R.P. Amino acids and proteins. In: HALVER, J.E.; HARDY, R.W. (Eds.) *Fish nutrition*. New York: Academic Press, 2002. p.143-179
- Zar, J.H. 1999 *Biostatistical Analysis*. 4th Edition, Prentice Hall, Upper Saddle River.
- Zorriehzahra, M.J., M.D. Hassan, M. Gholizadeh & A.A. Saidi. 2010. Study of some hematological and biochemical parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry in western part of Mazandaran province, Iran. *J. Fish. Sci.*, 9(1) 185-198.

ANEXOS

ANEXO 1

Determinación del porcentaje de proteína (Método de Kjendhal)

1. Revisar que las dos jarras del scrubber estén llenas de lo contrario llenarlas con 1,700 ml de agua destilada
2. La que esta marcada con NaOH agregarle 255 g de hojuelas de NaOH y 4 gotas de BBT (indicador de pH)
3. Pesar un gramo de muestra seca correspondiente en cada uno de los tubos de digestión
4. Agregar 2 kjeltabs a cada uno de los tubos
5. Con precaución y utilizando guantes de nitrilo/látex/vinil agregar 15 ml de ácido sulfúrico a cada uno de los tubos
6. Encender el digestor (Tecator digestor) 420°C
7. Colocar el rack con los tubos hasta que la temperatura indique 150°C y taparlos
8. Al alcanzar los 420°C se dejarán durante una hora
9. Una vez terminado el ciclo se dejarán enfriar los tubos durante 30 min después sacar el rack y colocarlo encima de una franela durante 15 min más
10. Agregar 70 ml de agua destilada a cada uno de los tubos
11. Preparar los matraces con la solución de ácido bórico
12. Iniciar una purga con 150 ml de agua destilada en el tubo y un matraz vacío
13. Colocar cada uno de los tubos y cada uno de los matraces con solución de ácido bórico hasta que la coloración sea verde
14. Titular el contenido de los matraces con la solución de H_2SO_4 0.1 N hasta virar

Cálculos

$$\%N = \frac{(Vm - Vb) \times 140.07}{mg \text{ muestra}}$$

Donde

Vm= ml usados para titular

Vb= ml usados para titular blanco

$$\% \text{ proteína cruda} = \%N * 6.25$$

ANEXO 2

Determinación del porcentaje de lípidos (Bligh y Dryer, 1959)

1. Se pesan 200 mg de muestra en la balanza analítica para posteriormente colocarla en un tubo de ensaye de vidrio y con tapa
2. Se agregan 3 ml de metanol y 1.5 ml de cloroformo se tapan los tubos para evitar la evaporación de los gases
3. Posteriormente se destaparán los tubos y se colocarán en un recipiente con hielo y se homogenizara la muestra durante 2 minutos (el hielo evitara la oxidación de los lípidos)
4. Agregar 1.5 ml de cloroformo para obtener una proporción metanol-cloroformo 1:1, homogenizar por 2 minutos más
5. Tapar los tubos y colocarlos en el refrigerador para evitar evaporación
6. Conectar la bomba de vacío, y la manguera al matraz Kitasato, colocar el filtro de membrana entre el matraz y la probeta graduada con fondo esmerilado, checar que embone bien y colocar la pinza.
7. Pasar el contenido líquido de los tubos de ensaye hacia la probeta cuidando que no pasen partículas de muestra, se puede utilizar una pipeta Pasteur para tener mayor control.
8. Esperar a que la bomba de vacío haga el proceso de filtrado, quitar la manguera, la pinza y la probeta y verter el contenido del matraz Kitasato en el embudo de separación.
9. Agregar 0.8 ml de agua destilada para mantener una proporción 0.8:1:1 con la mezcla cloroformo-metanol
10. Tapar el embudo y agitar vigorosamente, dejar reposar unos segundos hasta que se formen dos fases
11. La fase superior debe de quedar casi transparente y la inferior densa y de un color amarillo (en caso de que no queden así se deberán agregar gotas de agua destilada una por una y agitar hasta obtener la coloración esperada) (si se forman tres fases hacer una solución cloroformo-metanol

- 1:1 y agregar gotas una por una y agitar hasta que se formen dos fases y tornen del color esperado.
12. Pesar previamente los viales ámbar (utilizando guantes para no agregar peso)
 13. Una vez que se obtengan las dos fases, colocar el vial ámbar debajo del embudo de separación y verter la fase mas densa, poner a secar los viales bajo una corriente de aire constante hasta que se observe una capa amarilla en el fondo
 14. Posteriormente pesar los viales
 15. Hacer los cálculos correspondientes

Peso total de lípidos= (Peso inicial del frasco – Peso final del frasco)

$$\% \text{ Total de lípidos} = \left(\frac{\text{peso total de los lípidos}}{\text{peso de la muestra seca}} \right) \times 100$$

ANEXO 3

Contenido de humedad

Utilizar guantes de látex/ nitrilo/ vinil durante todo el proceso para evitar alterar las mediciones.

1. Utilizar los crisoles de aluminio,
2. Lavarlos con agua destilada y jabón libre de fosfatos, dejarlos secar, después mojar un paño limpio con alcohol y limpiar cada uno de los crisoles, una vez secos
3. Pesarlos en la balanza analítica.
4. Ponerlos en la caja antihumedad y llevarlos al horno de convección a 30°C por 24 horas para quitar la humedad.
5. Sacarlos del horno, colocarlos nuevamente en el desecador, pesarlos uno por uno para ver si perdieron humedad.
6. Obtener el peso inicial de la muestra
7. Poner a secar la muestra en el horno de convección a 90°C durante 6 horas
8. Sacar la muestra del horno y pesarla
9. Introducirla nuevamente en el horno por dos horas, sacar la muestra del horno y volverla a pesar.
10. Si el peso de la muestra es diferente, continuar secando en intervalos de una hora, hasta que el peso sea constante y así ocupar ese valor como el peso final.

$$\text{Humedad total (\%)} = \frac{(PI-PF)}{PF} \times 100$$

Donde: PI= Peso inicial

PF: Peso final

ANEXO 4

Contenido de cenizas

Utilizar guantes látex/ vinilo/ nitrilo para evitar alterar las mediciones

1. Utilizar los crisoles de porcelana
2. Lavarlos con agua destilada y jabón sin fosfatos, dejarlos secar, mojar un paño limpio con alcohol, limpiar cada uno de los crisoles, dejarlos secar nuevamente
3. Pesarlos en la balanza analítica
4. Colocarlos en el desecador y llevarlos al horno de convección a 50°C durante 1 hora para quitar la humedad
5. Volver a pesarlos si existe diferencia, meterlos nuevamente al horno durante una hora, hasta que el peso sea constante.
6. Pesar la muestra seca
7. Colocar la muestra en un crisol, poner los crisoles en el desecador, colocarles la tapa dejándolos ligeramente abiertos.
8. Introducir los crisoles en la mufla y encenderla, programar a 550°C por 6 horas
9. Una vez transcurrido el tiempo bajar la temperatura a 80° C y con mucho cuidado y ayuda de unas pinzas y guantes de carnaza, sacar uno por uno los crisoles y colocarlos en el desecador.
10. Dejar que se enfríen un poco y pesarlos.
11. Realizar los siguientes cálculos:

$$\text{Cenizas \%} = \frac{(\text{PF} \times 100)}{\text{PI}}$$

Dónde: PI= Peso inicial

PF= Peso final

ANEXO 5

Determinación de proteínas en suero sanguíneo

- Se utilizaron 20 μ l de suero para cada pozo
- Se preparo la curva patrón de diluciones con lo reactivos dentro del kit
- El procedimiento se realizó en una microplaca
- Se pipetearon 150 μ l de cada muestra y se colocaron en cada uno de los pozos a utilizar
- Se le agrego 150 μ l del reactivo de trabajo WR a cada uno de los pozos
- Se agitó la microplaca durante 30 segundos para que los reactivos y la muestra se mezclaran perfectamente
- Se tapo la placa con papel periódico para evitar la entrada de luz ya que podría afectar los resultados
- Posteriormente se incubo a 37°C durante 2 horas

NOTA: Limitar las incubaciones a menos o igual de 37°C de lo contrario podría notarse un color aberrante. Tener cuidado ya que la mayoría de las placas se deforman a 60°C.

- Pasadas las 2 horas se enfrió la placa a temperatura ambiente
- Se midió la ABS a 562 nm en un lector de microplacas

ANEXO 6

Determinación de glucosa en suero sanguíneo

- Se realizó la mezcla para la curva patrón disolviendo 10 μ l de Glucose Standard + 990 μ l de Glucose Assay Buffer, se mezcló perfectamente.
- Se agregaron en serie a cada pozo 0,2,4,6,8 y 10 μ l ajustar a un total de 50 μ l con el Glucose Assay Buffer
- Para la preparación de las muestras cada pozo tendrá un volumen total de 100 μ l este se realizara en dos partes.
- Para la primera se utilizaron 2 μ l de suero sanguíneo y para ajustar el volumen se agregaron 48 μ l de buffer.
- Los otros 50 μ l se prepararon con 46 μ l de buffer, 2 μ l mezcla de enzimas y 2 μ l de mezcla de sustrato para cada uno de los pozos
- La placa se cubrió con papel aluminio para protegerla de la luz ya que podría afectar los resultados, se incubo la muestra durante 30 minutos
- Posteriormente se leyó a 450 nm en un lector de microplacas

ANEXO 7

Determinación de triglicéridos en suero sanguíneo

- Equilibrar todos los componentes a temperatura ambiente
- Mantener la lipasa y la mezcla de enzimas en el refrigerador o en hielo
- Diluir el standard en agua destilada

STD+H ₂ O	Volumen total	Concentración de Triglicéridos (nmol/l)
10 μ l + 990 μ l	1000	1
6 μ l + 994 μ l	1000	0.6
3 μ l + 997 μ l	1000	0.3
0 μ l + 1000 μ l	1000	0

- Transferir 10 μ l de las diluciones standard en los pozos
- Diluir el suero 5 veces (10 μ l de la muestra+40 μ l de dH₂O)
- Preparar el reactivo de trabajo para cada pozo, transferir 100 μ l en cada uno de los pozos con muestra
- Tapar la microplaca
- Agitar un poco e incubar 30 minutos a temperatura ambiente
- Leer a una densidad de 570 nm.

ANEXO 8

Líquido de Hayem para conteo de eritrocitos

- 0.5 g NaCl
- 0.25 g Na₂SO₄
- 0.25 g MgCl₂
- 100 ml de H₂O destilada

Líquido de Türk para conteo de leucocitos

- 3 ml de CH₃COOH
- 97 ml de H₂O destilada
- 4 gotas de azul de metileno

Filtrarlo antes de cada uso y antes de enfrascarlo