



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

“Evaluación del crecimiento y respuestas inmunes en juveniles de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss Walbaum, 1792*) alimentadas con dietas con alto contenido de proteína proveniente de gluten de maíz”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LIC. EN BIOLOGÍA

P R E S E N T A:

JAVIER ALONSO CARRILLO LONGORIA

ASESOR: DR. LUIS HECTOR HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ

Los Reyes Iztacala, Estado de México

2017





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 estudio fue realizado gracias al apoyo del programa PAPIIT IN213115 de la Universidad Nacional Autónoma de México

А Оахаса.

“¿Pero quién era yo realmente? Me veo obligado a repetirlo: era aquel que tiene varias caras. Era serio, entusiasta y convencido en las reuniones; provocativo y crítico con los amigos más cercanos; era cínico y artificialmente ingenioso con M, y cuando estaba solo (y pensaba en M) era indeciso y tebloroso. ¿Era quizás ésta última cara la verdadera? No. Todas aquellas caras eran verdaderas. No tenía, como los hipócritas, una cara verdadera y otras caras falsas. Tenía varias caras porque era joven y yo mismo no sabía quién era ni quién quería ser.”

Milán Kundera.

Tabla de contenido

Resumen	6
Introducción	7
Antecedentes	9
Justificación	11
Objetivos	12
Objetivo general.....	12
Objetivos particulares	12
Materiales y métodos	13
Obtención de organismos	13
Dietas experimentales	13
Prueba de alimentación	14
Parámetros de crecimiento	14
Análisis proximales	15
Consumo de Oxígeno (O ₂), nitrógeno amoniacal (NH ₃ -N) y fósforo (PO ₄) ³⁻ ...	15
Determinación de respuesta inmune no específica	15
Estallido respiratorio de macrófagos	15
Aislamiento de linfocitos	16
Análisis estadísticos.....	16
Resultados	17
Discusión	24
Conclusiones	29
Referencias	30
Anexos	35
Anexo 1. Descripción de la especie.....	35
Anexo 2. Ficha técnica gluten de maíz (Ingredion).....	36
Anexo 3. Determinación de fósforo y nitrógeno excretados al medio.....	37
Anexo 4. Análisis Químicos proximales.....	39
Anexo 4. Estallido respiratorio de macrófagos	43
Anexo 5. Aislamiento de linfocitos	44

Resumen

El desarrollo de la acuicultura a nivel mundial ha tenido un efecto de una demanda mayor de harina y aceite de pescado, principales ingredientes en la formulación de dietas comerciales, es por esto que se han buscado alternativas que ayuden a suplir esta demanda sin sacrificar el crecimiento, ni el bienestar de los organismos. Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue evaluar respuestas inmunes en juveniles de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) alimentadas con dietas con diferentes niveles de gluten de maíz como fuente de proteína. Se formularon 3 dietas experimentales isoenergéticas e isoproteicas con un aporte del 50, 75 y 100% de gluten de maíz, cubriendo el resto con harina de pescado. Como grupo control se utilizó dieta comercial (API-trucha 3). Existieron diferencias significativas en los parámetros de crecimiento, mostrando que la dieta con 50% de inclusión de gluten de maíz, obtuvo el mejor desempeño, observando valores significativamente más bajos de peso final, ganancia en peso y tasa de crecimiento específico en los organismos alimentados con concentraciones más altas de gluten en la dieta. Respecto a la composición corporal, la dieta con 100% de inclusión de gluten, mostró una mayor acumulación de lípidos en músculo e hígado, así como un menor porcentaje de proteína en músculo. Respecto a la respuesta inmune, el estallido respiratorio de macrófagos no mostró diferencias significativas entre los tratamientos, así mismo, en el conteo de linfocitos, sólo mostró diferencias significativas en el tratamiento con 50% de aporte de gluten.

Introducción

La acuicultura es el sector de producción de alimentos con el crecimiento más acelerado de las últimas cinco décadas, alcanzando una producción en 2014 de 73.8 millones de toneladas (160 mil millones de dólares). La producción acuícola mundial ha crecido a una tasa media anual de 6.2% en el periodo de 2000-2012, en este mismo periodo el ritmo de crecimiento en América latina fue del 10%. En términos de volumen de producción global, en 2013, la acuicultura junto con la producción de plantas acuáticas sobrepasó a la pesca por captura y por primera vez en 2014, la acuicultura proveyó de más peces que la pesca por captura (FAO, 2016).

La acuicultura en México se ha desarrollado de manera constante en las últimas décadas. El gobierno federal ha promovido la formación de distintos centros acuícolas a lo largo del país, que en 2013 se encontraban 16 activos, con el objetivo de producir crías de peces y postlarvas de crustáceos para satisfacer la demanda de organismos acuáticos para su cultivo, desarrollo tecnológico. Una de las principales especies que se producen en el país es la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), la cual se cultiva en 6 estados de la república, siendo el Estado de México uno de los principales productores de trucha arcoíris en el país con 3,786 toneladas en 2011, representando el 44.64% de la producción a nivel nacional (SAGARPA, 2011).

Sin embargo, el crecimiento de la acuicultura ha provocado una serie de problemáticas ambientales; las zonas que se encuentran cercanas a granjas acuícolas reciben grandes descargas de productos orgánicos, provenientes de los desechos producidos por los organismos cultivados, provocando la eutrofización de aguas, propiciando la producción de fitoplancton que entre sus consecuencias provoca la desoxigenación del agua (Aguillón, 2012), a su vez, la demanda de insumos necesarios para la formulación de dietas comerciales, ha provocado la disminución progresiva de las poblaciones de especies empleadas para la elaboración de las dietas, ocasionando una escasez en el suministro, mismo que conlleva al incremento en los precios de venta (Ding, 2015), esto es, porque la

harina y el aceite de pescado siguen siendo los principales ingredientes empleados en la formulación de dietas comerciales (Sánchez, 2015). Si esta tendencia continúa, la acuicultura se vería limitada por la disponibilidad de estos insumos, ocasionando que esta práctica no sea rentable a largo plazo en muchos lugares del mundo (FAO, 2010).

Como una alternativa al impacto negativo que tiene el uso de alimentos elaborados con harina de pescado, se ha buscado otras fuentes proteicas; que reduzcan las descargas de P y N en el ambiente, que tengan una alta digestibilidad, así como su precio. Entre estas alternativas las harinas provenientes de productos de origen vegetal han sido una de las principales opciones (Burrels, 1999). Ciertos productos de origen vegetal contienen una alta cantidad de proteína y un perfil adecuado de aminoácidos, haciéndolos ideales para la formulación de dietas. No obstante, el uso de harinas de origen vegetal tiene sus limitantes; debido al alto contenido de fibra, almidón y carbohidratos no solubles, mismos que afectan el crecimiento de los peces (Hernández, 2002). Por esta razón se ha buscado utilizar productos vegetales refinados, que ayuden a la digestión (Cruz, 2011) o que complementen los requerimientos nutrimentales (Deng, 2013).

Así mismo, se ha reportado que los productos de origen vegetal pueden contener ciertas sustancias que afectan el desarrollo de los peces, éstas se han denominado factores antinutricionales, mismos que afectan directa o indirectamente sobre la salud de los organismos, así como modificar su respuesta inmune (Francis, 2001) además, se ha encontrado que la adición de productos de origen vegetal en las dietas de salmónidos provoca una inflamación intestinal, aparentemente provocados por la presencia de saponinas, y glucósidos anfipáticos, (Ingerslev, 2014).

Antecedentes

Regost *et al.* (1999) formularon 5 dietas experimentales para lenguado (*Psetta máxima*) conteniendo un gradiente de gluten de maíz sustituyendo harina de pescado (0%, 20%, 40%, 75% suplementada con L-arginina y 75% suplementada con L-lisina) encontrando que el crecimiento se vio afectado en inclusiones mayores al 20% de gluten de maíz, además, la disponibilidad aparente de amino ácidos se vio afectada negativamente conforme incrementaba la incorporación de gluten de maíz, por otra parte, encontraron que el contenido proteico y lipídico en músculo dorsal disminuyeron con el incremento de gluten de maíz en las dietas.

En el 2012, Burr y colaboradores evaluaron la mezcla de proteínas alternativas (concentrado de proteína de soya, gluten de maíz y concentrado de proteína de cebada) en la sustitución de harina de pescado en dietas para trucha arcoíris y en el usar dichos resultados para desarrollar y probar mezclas de proteínas alternativas en dietas para juveniles de salmón del atlántico. Encontrando que las truchas alimentadas con gluten de maíz tuvieron una ganancia en peso menor en comparación con el grupo control (15% menos), mostrando una tasa de conversión alimenticia menor, sin embargo, no hubo diferencias en la composición corporal. En ese mismo año Tusche y colaboradores formularon dietas experimentales para trucha arcoíris con sustituciones 56% de harina de pescado por gluten de trigo y concentrado de proteína de papa en distintas concentraciones, encontrando que no existían diferencias en el crecimiento, así como en la composición corporal ni la composición sanguínea (glucosa, triglicéridos y proteína en suero).

Deng *et al.* (2013) realizaron un estudio donde evaluaron las respuestas inmunes en trucha arcoíris, alimentadas con una dieta a base de proteína proveniente de soya adicionada con colesterol, encontrando que una adición de 0.9 al 12% de colesterol, mejoraba la respuesta inmune, incrementando la actividad de la lisozima, así como la actividad fagocítica.

Jalili *et al.* (2013) Evaluaron el efecto de la sustitución de harina de pescado por harinas vegetales (gluten de trigo, gluten de maíz y harina de soya) en los parámetros de crecimiento, respuestas inmunes (actividad lisozima y anticuerpos totales, parámetros hematológicos (conteo de hematocritos, hemoglobina, leucocitos y linfocitos) así como en la resistencia a las enfermedades en trucha arcoíris, encontrando que inclusiones mayores a 70% afectan negativamente el crecimiento, índices nutricionales, inmunoglobulina total en suero y actividad del complemento.

Saez *et al.* (2016) Evaluaron el efecto de la inclusión de gluten de maíz en la formulación de dietas para trucha arcoíris sobre el crecimiento y la pigmentación del músculo, se formularon 3 dietas conteniendo 0% 9% y 18% de gluten de maíz y se realizó una prueba de alimentación de 24 semanas al término de la cual evaluaron el crecimiento y pigmentación en músculo, encontrando que la inclusión de gluten de maíz hasta el 18% no afecta el peso final, la eficiencia de crecimiento termal o la eficiencia alimenticia. Por otra parte, la expresión de atributos en el color del músculo se vio negativamente afectada en inclusiones de gluten de maíz superiores al 9%.

Justificación

Debido a la problemática actual en el uso de harina de pescado y aceite de pescado como ingredientes principales en la formulación de dietas comerciales, se plantea la inclusión de gluten de maíz como principal fuente de proteína. Ya que en el cultivo de trucha arcoíris se busca reducir costos de producción, reducir las descargas de N y P, así como el bienestar animal, sin sacrificar el crecimiento de los mismos.

Objetivos

Objetivo general

- Evaluar respuestas inmunes en juveniles de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) alimentadas con dietas con diferentes niveles de gluten de maíz como fuente de proteína.

Objetivos particulares

- Determinar parámetros de crecimiento en juveniles de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) alimentadas con dietas con diferentes niveles de gluten de maíz como fuente de proteína.
- Determinar la composición proximal del cuerpo de juveniles de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) alimentadas con dietas con diferentes niveles de gluten de maíz como fuente de proteína.
- Determinar la excreción de N amoniacal de juveniles de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) alimentadas con dietas con diferentes niveles de gluten de maíz como fuente de proteína.
- Determinar la excreción de fósforo de juveniles de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) alimentadas con dietas con diferentes niveles de gluten de maíz como fuente de proteína.

Materiales y métodos

Obtención de organismos

Se obtuvieron juveniles de trucha arcoíris con un peso promedio de 15 ± 3 g, del Centro de Producción Acuícola El Zarco, localizado en el Estado de México, México. Los organismos fueron trasladados al Laboratorio de Producción Acuícola de la FES Iztacala y se aclimataron durante 15 días, alimentados con una dieta comercial (Malta-Cleyton, Api-trucha 3).

Dietas experimentales

Se formularon 3 dietas con un porcentaje mínimo de proteína del 40%, con el aporte del 50, 75 y 100% provenientes de gluten de maíz (Ingredion México, proteína cruda 61%) y el resto fue cubierto con harina de pescado. Las formulaciones completas se muestran en la Tabla 1. Las dietas fueron preparadas de acuerdo a Cruz *et al.* (2011). Como grupo control se utilizó una dieta comercial (Malta-Cleyton, Api-trucha 3).

Tabla 1: formulación basal de dietas usadas en prueba de alimentación para juveniles de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*).

Ingredientes (g/kg)	G50	G75	G100
Gluten de maíz	333.5	500.25	667
Harina de pescado	307.7	153.85	0
Aceite de pescado	40	40	40
Aceites vegetales	30	30	30
Lecitina de soya	50	50	50
Dextrina	100	100	100
Mezcla vit. y minerales	40	40	40
Aglutinante	50	50	50
Celulosa	48.8	35.9	23
Composición aproximada en peso seco (%)			
Proteína	40.58 ± 0.03	40.94 ± 0.2	37.46 ± 0.4
Lípidos	15.03 ± 0.01	16.4 ± 0.02	15.98 ± 0.2
Cenizas	8.13 ± 0.14	7.97 ± 1.4	6.24 ± 0.05

Prueba de alimentación

Las dietas se ofrecieron a grupos por duplicado de 45 juveniles, considerando una relación de 7% de la biomasa total por tanque, misma que fue distribuida en 2 porciones al día. Se realizaron biometrías de los organismos cada 10 días y la ración fue ajustada de acuerdo a la nueva biomasa. La prueba de alimentación se realizó por un periodo de 90 días, al término del cual se realizó una biometría, posteriormente los organismos fueron sacrificados y se obtuvieron muestras de sangre, riñones, músculo e hígado para la determinación de las respuestas inmunológicas y los análisis químicos proximales. Se midieron parámetros ambientales temperatura, oxígeno disuelto todos los días a las 9:00 horas y cada tercer día se midió la excreción de nitrógeno amoniacal.

Parámetros de crecimiento

Se evaluaron los parámetros de crecimiento en juveniles de trucha arcoíris, empleando las siguientes fórmulas:

Ganancia en peso (GP) (g)

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

Donde PF=peso final, PI=peso inicial

Tasa de crecimiento específico (TCE) (%)

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

Donde PF = peso final, PI = peso inicial, t = tiempo alimentación

Tasa de conversión alimenticia (TCA)

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

Donde GP = Ganancia en peso (g) a = total alimento consumido (g)

Análisis proximales

Se determinó el contenido de proteína en músculo, suero sanguíneo y dietas de acuerdo a la técnica de la AOAC (1990). 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).

Consumo de Oxígeno (O_2), nitrógeno amoniacal (NH_3-N) y fósforo (PO_4^{3-})
Para obtener el consumo de O_2 , así como la excreción de NH_3-N y $(PO_4)^{3-}$. Se utilizaron frascos herméticos de 2 L de capacidad, en los cuales se hizo recircular agua proveniente de los tanques, previa medición de la concentración de O_2 , NH_3-N y $(PO_4)^{3-}$, una vez llenos los tanques se introdujeron los organismos y se dejaron dentro por 20 minutos, posteriormente se midió de nuevo la concentración de O_2 , NH_3-N y $(PO_4)^{3-}$.

Determinación de respuesta inmune no específica

Una vez finalizada la prueba de alimentación se tomaron muestras de sangre de 5 organismos al azar de cada tratamiento, dejando coagular la muestra a $4^\circ C$. Las muestras se centrifugaron a 7,000 rpm por 10 minutos y se colectó el sobrenadante (suero sanguíneo), éste fue empleado para la determinación de la actividad de lisozima.

Estallido respiratorio de macrófagos

Se determinó el estallido respiratorio de macrófagos según Crumlish *et al.* (2000), el cual es un mecanismo microbicida del sistema inmune no específico. Para el análisis se empleó el ensayo de azul de nitrotetrazolio (NBT) para revelar la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) intracelulares, generadas por macrófagos provenientes de riñón. Se aísla la población celular de interés, tamizando los riñones usando una malla de 100μ , posteriormente se incuban durante 3 días en microplacas de 96 pocillos, una vez transcurrido el tiempo se agrega NBT, se dejó incubar durante 1 hora y después fue leído en un lector de placas de ELISA a 620 nm.

Aislamiento de linfocitos

Para el aislamiento de linfocitos, se obtuvo la sangre de la vena caudal, manteniendo las muestras en hielo. Posteriormente se trasladaron a tubos con anticoagulante y la solución balanceada de sales. Para la separación de la muestra se agregaron 3 ml de Ficoll y se realizaron 3 centrifugaciones, reemplazando el sobrenadante con solución balanceada de sales, por último se tiñeron con una solución de Wright y se contaron en una cámara de Neubauer.

Análisis estadísticos.

Se realizó un análisis de ANOVA de un factor para evaluar si existían diferencias significativas entre los tratamientos en las diferentes variables que se registraron. En caso de existir diferencias significativas, se aplicó un LSD de Fisher. El análisis estadístico se realizó mediante el programa AnalystSoft Inc., StatPlus, v5.

Resultados

Durante la prueba de alimentación el crecimiento de los organismos en el tratamiento G100 fue significativamente menor ($\alpha=0.05$) que los demás tratamientos, que tuvieron un comportamiento similar como se observa en la figura 1.

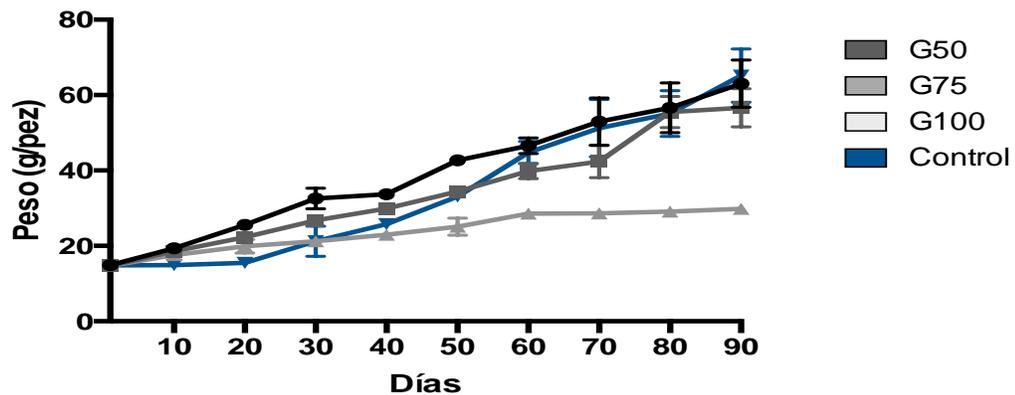


Figura 1. Peso de juveniles de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) alimentados con dietas con alto contenido de proteína proveniente de gluten de maíz, determinado cada 10 días. Los datos son la media de grupos por duplicado \pm desviación estándar.

El crecimiento obtenido, se muestran en la tabla 2. La respuesta en peso final (PF) así como ganancia en peso (GP), fue significativamente menor en grupo experimental G100. Respecto a la tasa de crecimiento específico (TCE) y conversión alimenticia (TCA) hubo diferencias significativas, entre los tratamientos experimentales respecto al grupo control como entre los tratamientos experimentales G50 y G75, respecto al grupo G100. La tasa de ingesta (TI) fue significativamente diferente entre todos los tratamientos y el grupo control.

Tabla 2. Crecimiento obtenido de juveniles de trucha arcoíris. Los datos son la media de grupos por duplicado \pm desviación estándar. Letras diferentes en la misma fila, indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

	G50	G75	G100	Control
PF (g)¹	63 \pm 6.2 b	56 \pm 5.07 b	29 \pm 0.5 a	70 \pm 7.06 b
GP (%)²	322 \pm 40.8 b	284 \pm 31.8 b	102 \pm 1.02 a	373 \pm 41.4 b
TCE (%/día)³	1.59 \pm 0.1 b	1.49 \pm 0.09 b	0.78 \pm 0.008 a	1.72 \pm 0.09 c
TCA⁴	1.32 \pm 0.1 b	1.47 \pm 0.1 b	0.69 \pm 0.09 a	5.68 \pm 2.5 c
TI (g/pez/día)⁵	4.03 \pm 0.02 c	3.14 \pm 0.1 b	1.59 \pm 0.009 a	1.48 \pm 0.3 a

¹PF: peso final

²GP: ganancia en peso = ((peso final – peso inicial) / peso inicial) x 100

³TCE: Tasa de crecimiento específico = ((ln peso final – ln peso inicial)/90) x 100

⁴TCA: Tasa de conversión alimenticia = Ganancia en peso (g) / total alimento consumido (g peso seco)

⁵TI: Tasa de ingesta

Los resultados obtenidos en la cuantificación de proteínas en músculo, mostraron diferencias significativas entre los tratamientos experimentales, G50 y G75, respecto al grupo G100, siendo éste el que menor porcentaje de proteína obtuvo. A su vez, no existieron diferencias significativas entre los tratamientos y el grupo control (Figura 2).

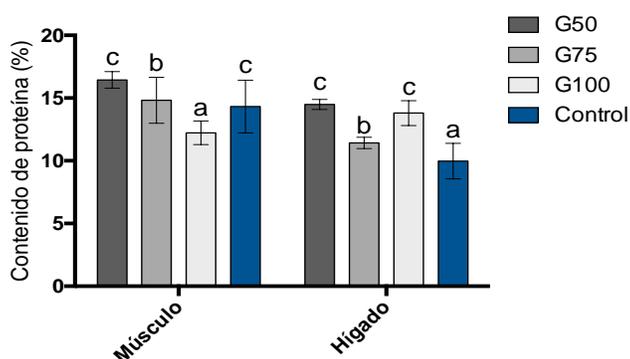


Figura 2. Contenido promedio (\pm DS) de proteína en músculo e hígado de juveniles de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) alimentados con dietas con alto contenido de proteína proveniente de gluten de maíz. (n=6) Letras diferentes, indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

Por otra parte, existieron diferencias significativas en el contenido de lípidos en músculo, siendo el tratamiento experimental G100 el que presentó una mayor proporción de los mismos. Encontrándose la misma tendencia en el contenido de lípidos en hígado (Figura 3).

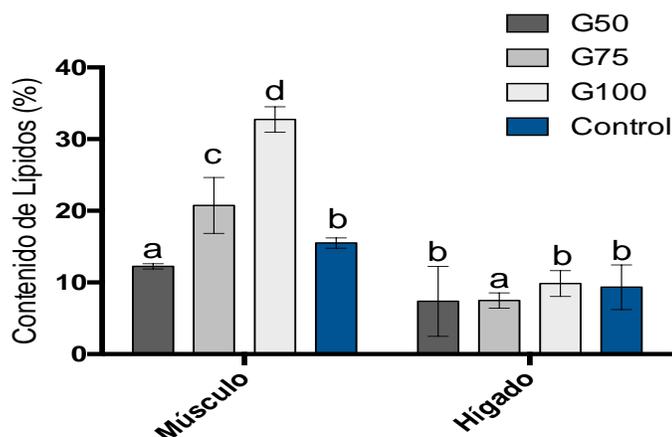


Figura 3. Contenido promedio de lípidos en músculo e hígado de juveniles de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) alimentados con dietas con alto contenido de proteína proveniente de gluten de maíz. Las barras representan la media de grupos (n=4) \pm desviación estándar. Letras diferentes, indican diferencias significativas (P <0,05).

Los porcentajes de humedad y cenizas en músculo se presentan en la tabla 3. Respecto al porcentaje de humedad, no existieron diferencias significativas entre los grupos experimentales, pero si respecto al grupo control. Por otra parte, no existieron diferencias significativas en el porcentaje de cenizas, ni entre los tratamientos experimentales, ni respecto al grupo control.

Tabla 3. Porcentaje de humedad y cenizas presentes en músculo de juveniles de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) alimentados con dietas con alto contenido de proteína proveniente de gluten de maíz. Los datos representan la media de grupos (n=6) \pm desviación estándar. Letras diferentes en la misma fila, indican diferencias significativas (P <0,05).

	G50	G75	G100	Control
Humedad (%)	33.27 \pm 10.08 a	26.05 \pm 1.20 a	26.37 \pm 1.92 a	55.10 \pm 2.14 b
Cenizas (%)	6.27 \pm 0.60	6.71 \pm 1.12	5.80 \pm 0.57	6.54 \pm 0.94

El consumo de oxígeno por los organismos (figura 4) fue significativamente menor en el grupo control y en el tratamiento G50 se observaron diferencias con los otros tratamientos experimentales (G75 y G100), en los que no se evidenciaron diferencias significativas.

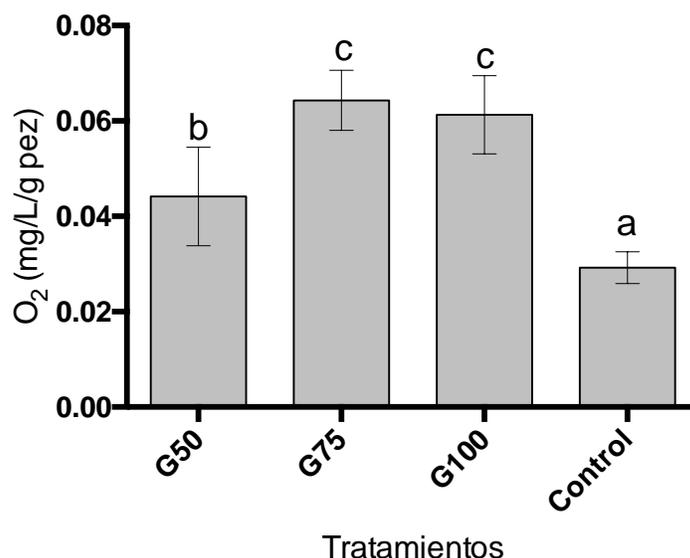


Figura 4. Consumo promedio de oxígeno de juveniles de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) alimentados con dietas con alto contenido de proteína proveniente de gluten de maíz. (n=2) ± desviación estándar. Letras diferentes, indican diferencias significativas (P <0,05).

Por otra parte, el nitrógeno amoniacal excretado por orina y branquias (Figura 5) mostró diferencias significativas entre los tratamientos experimentales, siendo el tratamiento G75 el que mostró una menor excreción, a su vez, existieron diferencias significativas entre los tratamientos experimentales y el grupo control, siendo éste el que excretó menos nitrógeno amoniacal.

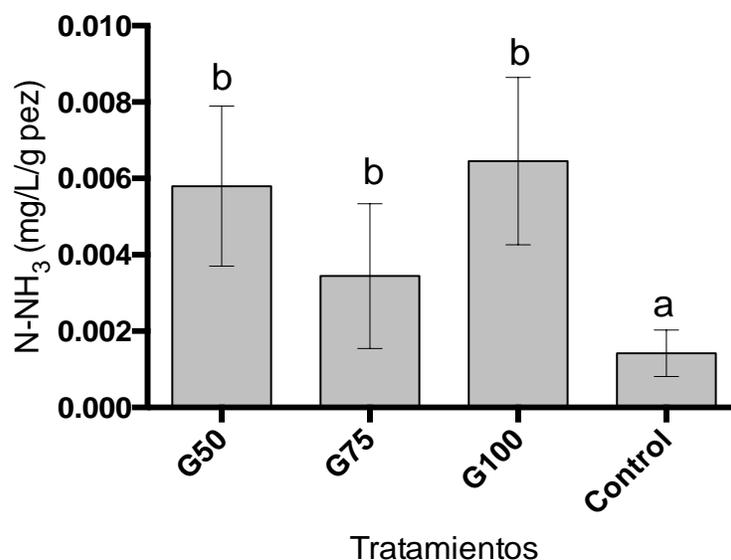


Figura 5: Excreción promedio de amoníaco de juveniles de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) alimentados con dietas con alto contenido de proteína proveniente de gluten de maíz. Letras diferentes, indican diferencias significativas ($P < 0,05$)

El fósforo excretado por orina (Figura 6) no mostró diferencias significativas entre los tratamientos experimentales y el grupo control.

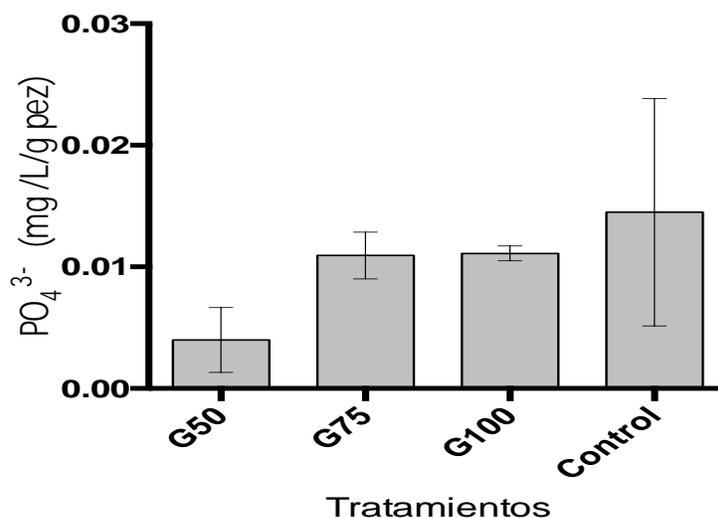


Figura 6. Excreción promedio de fosforo de juveniles de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) alimentados con dietas con alto contenido de proteína proveniente de gluten de maíz. Las barras representan la media de grupos ($n=2$) \pm desviación estándar. Letras diferentes, indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

Los resultados obtenidos en el estallido respiratorio de macrófagos se muestran en la figura 7, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos ni respecto al grupo control 10^4 cel.

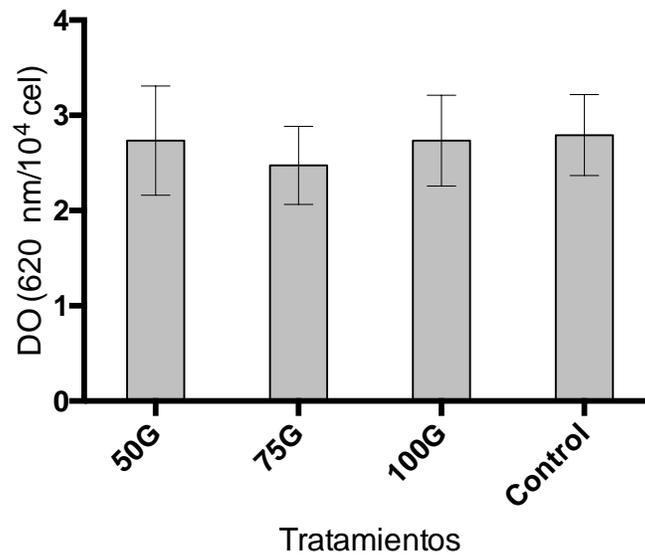


Figura 7: Estallido respiratorio de macrófagos de juveniles de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) alimentados con dietas con alto contenido de proteína proveniente de gluten de maíz. Las barras representan la media de grupos (n=18) \pm desviación estándar. Letras diferentes, indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

Los resultados obtenidos en el conteo de linfocitos presentes en sangre se muestran en la figura 8, el tratamiento G50 mostró un mayor número de la población celular encontrándose diferencias significativas respecto a los otros tratamientos experimentales y el grupo control.

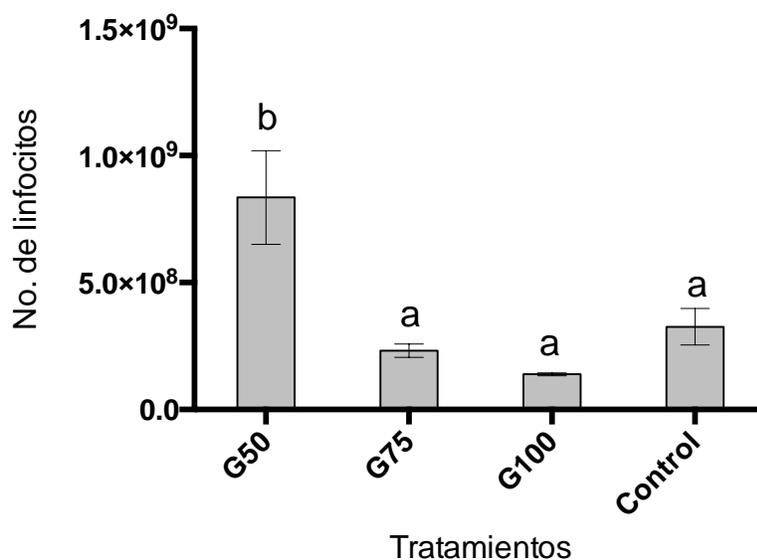


Figura 8. Número de Linfocitos presentes en sangre de juveniles de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) alimentados con dietas con alto contenido de proteína proveniente de gluten de maíz. Las barras representan la media de grupos (n=18) ± desviación estándar. Letras diferentes, indican diferencias significativas (P < 0,05).

Discusión

De acuerdo a los resultados obtenidos, se encontró que una inclusión de 50% de gluten de maíz en la dieta presenta resultados similares a los obtenidos con el grupo control en juveniles de trucha arcoíris, esto debido al alto contenido proteico del gluten, así como la alta digestibilidad que presenta (Burr, 2011). Previamente, Jalili (2013), reportó que inclusiones de hasta el 40% de gluten de trigo y de maíz en dietas no afectaban el crecimiento en juveniles de trucha arcoíris ($15 \pm 0.2g$) la ganancia en peso (GP) y la tasa de crecimiento específico (TCE).

Sin embargo, se ha reportado con anterioridad que la inclusión de proteínas de origen vegetal en dietas para peces carnívoros, puede afectar su crecimiento, ya que no utilizan las proteínas de la misma forma (Mente, 2003; Tusche, 2012; Jalili, 2013). Uno de los factores por los cuales no se emplea la proteína de la misma forma es el perfil de aminoácidos, como lo reporta Aslaken *et al.* en 2007, quienes realizaron inclusiones del 20% de gluten de maíz en dietas para salmón, reportando que no existieron diferencias significativas en la digestibilidad de proteína respecto al grupo control, pero destacan que el gluten de maíz al ser carente en lisina y triptófano, afectó significativamente la digestibilidad de estos aminoácidos sugiriendo una suplementación de los mismos en inclusiones mayores a las empleadas en el experimento.

Así mismo, la tasa de conversión alimenticia (TCA) que es la relación entre el alimento suministrado y la ganancia en peso, mostró diferencias significativas entre el grupo control y los tratamientos experimentales, siendo menor en la dieta G100, ya que eran los organismos que menor alimento consumían y con el menor crecimiento, cabe destacar que en el grupo control, existió una TCA casi 4 veces mayor que en los grupos experimentales G50 y G75, se ha reportado con anterioridad, que distintos factores modifican la TCA, tales como el tamaño de los organismos, temperatura (Sigurd, 2008).

Se ha reportado que un incremento en la inclusión de proteínas vegetales en la dieta, afecta la palatabilidad de las mismas, como lo reporta Pratoomyot *et al.* 2010 quienes encontraron que salmónes consumieron menor cantidad de alimento en dietas con alto contenido de proteínas vegetales, atribuyendo esto a la falta de palatabilidad de las dietas, afectando así su crecimiento.

Respecto a la composición corporal de los organismos, los resultados de cuantificación de proteínas en músculo, muestran una disminución progresiva en el contenido proteico conforme se incrementa la inclusión de gluten en las dietas. Siendo la dieta G50, la que presentó resultados similares al grupo control. Lo anterior puede atribuirse a distintos factores como el tamaño de los tanques, así como la densidad de organismo, misma puede modificar la disposición de proteína músculo, debido a la movilidad que presentan los organismos dentro del mismo (Craft, 2016), así mismo, se ha reportado que el perfil de aminoácidos, presentes en las dietas modifica la composición corporal de trucha arcoíris (Mente, 2003). El gluten de maíz, es deficiente el lisina, misma que es necesaria para la incorporación a las proteínas de la cadena pesada de miosina muscular (Berge, 1994) siendo ésta fundamental para un rápido crecimiento y una retención de proteína en músculo para salmónidos (Mente, 2003).

Respecto a los resultados de lípidos totales presentes en músculo, el tratamiento experimental G100 presentó una mayor proporción de los mismos. Las dietas G50 y G75 mostraron contenidos lipídicos similares al grupo control. Diversos factores modifican la deposición de lípidos en músculo en peces, tales como factores ambientales, la ingesta de comida, el tipo de lípidos suministrados en la dieta, la densidad de organismos, entre otros (Cocan, 2015). Así mismo, Pratoomyot *et al.* 2010, reporta una estrecha relación entre inclusiones elevadas de proteínas vegetales y la deposición de lípidos en tejido. En su estudio realizado con salmónes, encontró que inclusiones elevadas de proteínas vegetales, afectaban el consumo de alimento, resultado de un balance inadecuado de aminoácidos que mantuvieran el máximo crecimiento de los organismos, limitando así la deposición

de proteínas y afectando la utilización de lípidos; conllevando en una acumulación de los mismos en músculo.

Por otra parte, Azevedo *et al.* en el 2004, reporta que la excreción de N amoniacal y el consumo de oxígeno, son parámetros que pueden ser usados para estimar el uso de la proteína en la dieta (oxidación de nutrientes en la dieta), indicando que, con una menor excreción, un menor gasto de energía; un mejor uso de la dieta. El oxígeno consumido por los organismos mostró una clara tendencia en los tratamientos experimentales, siendo mayores respecto al grupo control, esto contrasta con lo obtenido por Verdín en 2016, quien reporta un decremento en el consumo de oxígeno conforme se incrementa el contenido de proteína vegetal en la dieta, atribuido a un menor gasto energético para la metabolización de nutrientes, respecto a la harina de pescado. Esto puede deberse a que factores externos modifican el consumo de oxígeno en peces, tales como la temperatura ambiental (Handeland, 2008), el trabajo físico, así como la manipulación de los organismos, previa al estudio (Aguillón, 2015). Así mismo, el consumo de oxígeno, se encuentra estrechamente relacionado con el metabolismo de nutrientes, reportándose que la ingesta de alimentos modifica el consumo de oxígeno, siendo significativamente diferente el consumo de oxígeno entre organismos en inanición, que en organismos recién alimentados (Aslop, 1997).

La excreción de N amoniacal, tiene una relación estrecha con el metabolismo, siendo ésta resultado de la desaminación de aminoácidos para que puedan ser empleados como fuente de energía para el organismo, por lo tanto, la cantidad, así como la calidad de proteína suministradas en la dieta, influirán directamente sobre la excreción (Romarheim, 2006). En el presente estudio, el nitrógeno amoniacal excretado por orina y branquias fue significativamente mayor en los tratamientos experimentales respecto al grupo control. Un incremento en la excreción de N amoniacal, indica que los peces están catabolizando una mayor cantidad de proteína digerida, canalizándolo hacia crecimiento, un desbalance en el perfil de aminoácidos contenidos en la dieta, puede conducir a una mayor excreción de N amoniacal, como lo reporta Lund *et al.* en 2011, donde

desarrollaron dietas para trucha arcoíris con alto contenido de proteína vegetal, resultando en una excreción mayor de N amoniacal, atribuyendo esto a la carencia de metionina y treonina, en las dietas experimentales.

El P es un elemento fundamental en los componentes estructurales de los organismos, constituyente de ácidos nucleicos y membranas celulares, así como en el desarrollo de esqueleto y tejidos, estando directamente implicado en la producción de energía (Sánchez, 2012). El P ingerido, es repartido en tres rutas: P retenido en crecimiento, P sólido excretado en heces y P excretado en orina. Los factores que afectan la distribución de P ingerido son: su disponibilidad, el nivel de P en la dieta, así como la regulación fisiológica de la absorción intestinal y la excreción urinaria de P (Green, 2002). En el presente estudio el P excretado por orina no mostró diferencias significativas entre los tratamientos experimentales y el grupo control, indicando que la disponibilidad de P en dietas con altas inclusiones de gluten de maíz, son similares a la dieta comercial. Cabe que la dieta G50 mostró una tendencia similar, respecto al grupo control en la excreción de P.

La evaluación de la respuesta inmune dentro de la acuicultura, se ha convertido en un requisito al momento de formular dietas experimentales, ya que la adición de ciertos compuestos puede comprometer el bienestar de los organismos haciéndolos más propensos a enfermedades, poniendo en riesgo la producción (Demers, 1997; Caruso, 2002; Deng, 2013; Jalili, 2013).

Burrels et al. (1999) reportaron que la inclusión progresiva de proteínas de origen vegetal, afectaba la actividad respiratoria de macrófagos en truchas arcoíris (inclusiones de hasta 70%), sin embargo, apuntan que inclusiones superiores al 70% de proteínas vegetales en la dieta, tienden a reactivar la actividad de macrófagos, en el presente estudio no existieron diferencias significativas en el estallido respiratorio de macrófagos entre los tratamientos experimentales ni respecto al grupo control, sugiriendo que la inclusión de gluten de maíz, no afectó la respuesta inmune en truchas arcoíris.

Sin embargo, cabe destacar que los resultados obtenidos en el estallido respiratorio de macrófagos, no entraron dentro de los parámetros reportados en una actividad normal en truchas arcoíris (Solem, 1995), sugiriendo que los organismos usados como muestra podrían estar enfrentando alguna enfermedad al momento de la prueba.

Los resultados obtenidos en el conteo de linfocitos, mostraron diferencias significativas entre el tratamiento G50 y los otros tratamientos experimentales y respecto al grupo control, es necesario apuntar que los linfocitos, pertenecen a la respuesta inmune específica o de memoria, misma que se intensifica con la exposición repetida a patógenos, esto nos indica que el encontrar una respuesta exacerbada en la población celular, revela una exposición previa a un patógeno (Ye, 2013).

Jalili *et al.* no encontró diferencias significativas en el conteo de linfocitos en truchas arcoíris alimentadas con altos contenidos de gluten de maíz, sugiriendo que su inclusión no modifica dicha población celular. Esto contrasta con lo encontrado en esta investigación, donde la inclusión del 50% de gluten mostró un aumento en dicha población celular, siendo esto atribuido a que los organismos empleados en la muestra, se encontraban haciendo frente a algún patógeno, como se ha anotado anteriormente. Sin embargo, no existieron diferencias significativas en el conteo de linfocitos en las dietas G75 y G100, respecto al grupo control.

Conclusiones

Los grupos experimentales G50 y G75 mostraron un crecimiento similar al grupo control. Siendo la dieta G50 la que mostró los mejores resultados, sugiriendo que es posible una inclusión del 50% de gluten sin afectar el crecimiento de trucha arcoíris.

La inclusión progresiva de gluten de maíz afectó la composición corporal de los organismos, disminuyendo el contenido proteico en músculo y aumentando el contenido lipídico. Respecto al contenido proteico en músculo e hígado, no se encontraron diferencias significativas.

La excreción de N amoniacal y el consumo de oxígeno fueron mayores en los grupos experimentales, respecto al grupo control.

No se encontraron diferencias significativas en la excreción de P entre los grupos experimentales ni respecto al grupo control.

La dieta que mostró un mejor aprovechamiento en juveniles de trucha arcoíris fue la G50, misma que sería una opción viable en la producción de trucha arcoíris, se recomienda además una suplementación de aminoácidos.

La inclusión de gluten de maíz en la dieta, aparentemente no modificó la respuesta inmune de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) por lo que se puede considerar su inclusión en la formulación de dietas en el futuro.

Referencias

Aguillón, O. 2012. Efecto del aislado de proteína de soya y polvo de *Spirulina* como Fuentes de proteína en el crecimiento, excreción de fósforo (P) y nitrógeno en la tilapia híbrida (*Oreochromis sp.*). Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México, México.

Aguillón, O. 2015. Suplementación de metionina y taurina en dietas para trucha arcoíris *Oncorhynchus mykiss* formuladas con proteína vegetal y su efecto sobre el crecimiento y otras respuestas metabólicas. Tesis de maestría. Universidad Nacional Autónoma de México, México.

Askalen, M., Kraugerud, O., Penn, M., Svihus, B., Denstadli, V., Jorgensen, H., Hillestad, M., Krogdahl, A. and Storebakken, T. 2007. Screening of nutrient digestibilities and intestinal pathologies in Atlantic salmon, *Salmo salar*, fed diets with legumes, oilseeds, or cereals. *Aquaculture*, 272: 541-555

Aslop, D. and Wood, C. 1997. The interactive effects of feeding and exercise on oxygen consumption, swimming performance and protein usage in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *The Journal of Experimental Biology*, 200: 2337–2346

AOAC (Association of Official Analytical Chemist). 1990. Official Methods of Analysis Vol 2. Association of Official Analytical Chemist Inc. Arlington, Virginia, USA

Azevedo, P., Leeson, S., Cho, C. and Bureau, D. 2004. Growth, nitrogen and energy utilization of juveniles from four salmonid species: diet, species and size effects. *Aquaculture*, 234: 393-414

Berge, G., Hauler, R., Buchannan and B., Mitchell, A. 1994. Absorption and incorporation of dietary free and protein bound ($U^{14}C$)-lysine in Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 681–688.

Bligh, E. & Dyer, W. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37(8): 911-917

Burr, G., Wolters, W., Barrows, F. and Hardy, R. 2012. Replacing fishmeal with blends of alternative proteins on the growth performance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), and early or late stage juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 334-337

Burrels, C., Williams, P.D., Southgate, P.J. & Crampton, V.O. 1999. Immunological, physiological and pathological responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to increasing dietary concentrations of soybean proteins. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 72: 277-288

Caruso, D., Schlumberger, O., Dahm, C. & Proteau, J.P. 2002. Plasma lysozyme levels in sheatfish *Silurus glanis* (L.) Subjected to stress and experimental infection with *Edwardsiella tarda*. *Aquaculture Research*, 33: 999-1008.

Craft, C., Ross, C., Wendy, M., Gibson, T., Barrows, F., Fornshell, G. and Myrick, C. 2016. Growth proximate composition, and sensory characteristics of Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss* consuming alternative proteins. *Aquaculture*, 459: 223-231

Cocan, D., Miresan, V., Cosier, V., Ruxanda, F., Rus, V. and Miclaus V. 2015. Lipid accumulation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) muscle cells, reared in superintensive system. *Annals of the Romanian Society for Cell Biology* 19(2):55-59

Cruz, C., Hernández, L., Fernández, M. and Ángeles, 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

Demers, N. and Bayne, C. 1997. The immediate effects of stress on hormones and plasma lysozyme in rainbow trout. *Developmental & Comparative Immunology*, 21 (4) 363-373

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

FAO. 2016. The State of World Fisheries and Aquaculture 2016. Rome, FAO, 200 pp.

Francis, G., Makkar, H and Becker, K. 2001. Antinutritional factors present in plant-derived alternative fish feed ingredients and their effects in fish. Aquaculture, 1999: 197-227

Green, J., Hardy, R. and Brannon, E. 2002. Effects of dietary phosphorus and lipid levels on utilization and excretion of phosphorus and nitrogen by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). 1. Laboratory-scale study. Aquaculture Nutrition, 8: 279-290

Handeland, S., Imsland, A. and Stefansson, S. 2008. The effect of temperature and fish size on growth, feed intake, food conversion efficiency and stomach evacuation rate of Atlantic salmon post-molts. Aquaculture, 283: 36-42

Hernández, G., Hernandez, L., Fernández, M. and Ángeles, 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

Ingerslev, H., Strube M., Gersdorff, L., Dalsgaard, I., Boye, M. and Madsen, L. 2014. Diet type dictates the gut microbiota and the immune response against *Yersenia ruckeri* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Fish & shellfish immunology, 40: 624-633

Jalili, R., Tukmechi, A., Aghn N., Noori, F. and Ghamesi, A. 2013. Replacement of dietary fish meal with plant sources in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*); effect

on growth performance, immune responses, blood indices and disease resistance. Iranian Journal of Fisheries Sciences, 12(3) 577-591

Lund, I., Dalsgaard, J., Rasmussen, H., Holm, J. and Jokumsen, A. 2011. Replacement of fish meal with a matrix of organic plant proteins in organic trout (*Oncorhynchus mykiss*) feed, and the effects on nutrient utilization and fish performance. Aquaculture 321: 259-266

Mente, E., Deguara, S., Begoña, M. and Houlihan. 2003. White muscle free amino acid concentrations following feeding a maize gluten dietary protein in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Aquaculture, 225: 133-147

Pratoomyot, j., Bendiksen, E., Bell, J. and Tocher D. 2010. Effects of increasing replacement of dietary fishmeal with plant protein sources on growth performance and body lipid composition of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Aquaculture, 305: 124-132

Regost, C., Arzel, J. and Kaushik S. 1999. Partial or total replacement of fish meal by corn gluten meal in diet for turbot (*Psetta maxima*). Aquaculture, 188: 99-117

SAGARPA. 2011. Anuario estadístico de Acuicultura y Pesca 2011. CONAPESCA México, 311 pp.

Saez, P., Abdel-Aal, E. and Bureau, D. 2016. Feeding increasing levels of corn gluten meal induces suboptimal muscle pigmentation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture Research, 47: 1972-1983

Sánchez, D. 2012. Acción de probióticos en la digestibilidad de dietas con altos contenidos de harina de soya en trucha arcoíris. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México, México.

Sánchez, D., Arvizu, E., Hernandez, L., Fernández, M. and Ángeles, O. 2015. Addition of Yeast and/or Phytase to diets with soybean Meal as main protein source: effects on Growth, P excretion and Lysozyme activity in juvenile Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 15: 213-220

Solem, S., Jorgensen, J. and Robertsen, B. 1995. Stimulation of respiratory burst and phagocytic activity in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) macrophages by lipopolysaccharide. *Fish & Shellfish Immunology* 5: 475-491

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

Verdín, J. 2016. Efecto de dietas con contenido de proteína y lípidos de origen vegetal en respuestas fisiológicas de crías de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) obtenidas de una granja comercial. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México, México.

Anexos

Anexo 1. Descripción de la especie

Reino: Animalia

Filo: Chordata

Clase: Actinopterygii

Orden: Salmoniformes

Familia: Salmonidae

Subfamilia: Salmoninae

Género: *Oncorhynchus*

Especie: *Oncorhynchus Mykiss*

Cuerpo alargado, de alguna forma comprimido, sin espinas dorsales, 12 radios dorsales, 10-12 radios anales, 19 radios caudales con 60-66 vertebras. La coloración varía de acuerdo al hábitat, tamaño y condición sexual. Presentan una banda rosada a lo largo de la línea lateral cuando alcanzan la madurez sexual, exhiben una serie de puntos negros por encima de la línea media.

Anexo 2. Ficha técnica gluten de maíz (Ingredion)

El gluten (proteína) de maíz, obtenida durante el fraccionamiento de maíz por vía húmeda. En este proceso se separa en primer lugar la parte soluble (corn steep) y posteriormente por centrifugación en almidón y gluten. Este último contiene la mayor parte de la proteína del endospermo del grano, junto con pequeñas cantidades de fibra y almidón, no purificadas en el proceso. La proteína de gluten tiene una concentración aceptable de metionina y treonina, pero es deficiente en lisina y triptófano.

AAs	Composición	
	(%PB)	(%)
Lys	1.70	1.02
Met	2.50	1.50
Met + Cys	4.30	2.58
Tre	3.50	2.10
Trp	0.56	0.34
Ile	4.05	2.43
Val	4.60	2.76
Arg	3.15	1.89

Anexo 3. Determinación de fósforo y nitrógeno excretados al medio

Método de Nessler

1. Se emplea un espectrofotómetro (HACH) con el programa “380 N Amonia de Ness”
2. Preparar un blanco con: 10 ml de agua destilada, 3 gotas de estabilizador de minerales, 3 gotas de alcohol polivinílico y 1 ml de reactivo de Nessler.
3. Preparar muestras de agua con: 10 ml de agua, 3 gotas de estabilizador de minerales, 3 gotas de alcohol polivinílico y 1ml de reactivo de Nessler.
4. Dejar reposar 1 minuto.
5. Calibrar a cero con el blanco, presionando la opción “Zero”.
6. Introducir muestras y presionar la opción “Read” los resultados se expresan en mg/l de $\text{NH}_3\text{-N}$

Método de reactivo de molibdovanadato

1. Se emplea un espectrofotómetro (HACH) con el programa “480 P React. Mo.”
2. Usar recipientes libres de fosfatos.
3. Preparar un blanco con: 10 ml de agua destilada y 0.5 ml de reagente de molibdovanadato.
4. Preparar muestras de agua con: 10 ml de agua y 0.5 ml de reagente de molibdovanadato.
5. Dejar reposar 7 minutos.
6. Calibrar a cero con el blanco, presionando la opción “Zero”.
7. Introducir muestras y presionar la opción “Read” los resultados se expresan en mg/l de $(\text{PO}_4)^{3-}$

Consumo de O₂ excreción de N y excreción de P

Se emplean frascos herméticos de 2 L conectados en serie mediante mangueras de 0.5 cm de diámetro, por los cuales se hace recircular agua de una pecera con agua proveniente de los tanques.

1. Una vez llenos los frascos, dejar circular agua por 20 minutos y se cierra la entrada y salida de agua.
2. Medir la concentración de oxígeno, P y N.
3. Pesar a los organismos que serán introducidos.
4. Introducir un organismo en cada frasco, evitando la pérdida de líquido.
5. Cerrar los frascos, dejar a los organismos dentro durante 20 minutos.
6. Medir de nuevo la concentración de O₂, N y P

Anexo 4. Análisis Químicos proximales

Cuantificación de proteína por la técnica de Kjeldahl

Esta técnica consta de tres pasos: digestión, destilación y titulación para conocer el estimado de nitrógeno dentro de una muestra. El procesamiento de la muestra toma alrededor de 5 horas para 8 muestras.

Preparar:

- A. Solución neutralizadora de ácidos (scrubber): 2 L NaOH 15%.
 - B. Solución álcali: 5 L NaOH 40% que va en el bidón conectado al destilador.
 - C. Solución indicadora:
 - I. Solución A: (0.22 g rojo de metilo/100 ml de etanol) + (0.11 g verde de bromocresol/50 ml etanol)
 - II. Solución B: (40 g H₃BO₃/700 ml H₂O) + 200ml etanol
- En un matraz aforado agregar 17 ml de la solución A y agregar la solución B. Aforar a 1 L.
- D. Solución para titulación: H₂SO₄ 0.1 N.
 - E. H₂SO₄ concentrado (96%) 15 ml/muestra.
 - F. Verificar que existan suficientes Kjeltabs (2 por muestra).
 - G. Configurar destilador: 50 ml NaOH y 5 minutos en el temporizador.

Digestión

1. Agregar la solución neutralizadora de ácidos y agua destilada a los depósitos del Scrubber hasta el nivel indicado.
2. Colocar 1 g de muestra homogenizada en cada tubo, dejando un tubo sin muestra (blanco).
3. Añadir 2 Kjeltabs a cada tubo.
4. Agregar 15 ml de H₂SO₄ concentrado a cada tubo.
5. Encender el digestor a 420°C.
6. Colocar los tubos cuando la temperatura alcance los 200°C, colocar extractor de gases e iniciar el programa (digerir por 1 hora).
7. Encender Scrubber cuando el H₂SO₄ comience a evaporarse.

8. Una vez finalizada la digestión esperar a que los tubos se enfríen.
9. Agregar 70 ml de agua destilada a cada tubo.

Destilación

1. Colocar un tubo limpio con agua destilada a la mitad. En el otro soporte colocar un matraz limpio de 250 ml.
2. Encender el destilador e iniciar purga presionando el botón de en medio. La purga debe realizarse entre cada corrida.
3. Colocar 25 ml de solución indicadora en 8 matraces de 250 ml.
4. Colocar tubo con muestra y en el otro soporte un matraz con solución indicadora, presionar el botón de arranque.
5. Una vez terminada la destilación, desechar el contenido del tubo y reservar el matraz para titular.

Titulación

1. En constante agitación, titular con H_2SO_4 0.1 N. hasta virar.

Cálculos

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

Dónde: V_m = ml usados para titular muestra V_b = ml usados para titular blanco

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

Lípidos totales por la técnica de Bligh and Dyer, 1959.

Procedimiento:

Usar guantes para evitar alterar mediciones

1. Lavar viales y tubos de ensayo con jabón libre de fosfatos, posteriormente introducir al sonificador durante 5 minutos.
2. Enjuagar los viales con agua corriente, después con agua destilada y para finalizar con alcohol.
3. Pesar en una balanza analítica los viales.
4. Preparar un vaso de precipitado con cubos de hielo.
5. Colocar en un tubo de ensayo 200 de muestra.
6. Agregar al tubo 1.5ml de cloroformo y 3 ml de metanol, homogenizar por dos minutos.
7. Agregar 1.5 ml de cloroformo y homogenizar por dos minutos.
8. Armar y conectar bomba de vacío.
9. Colocar filtro Fluoropore Membrane Filters (25mm) entre un matraz Kitasato y una probeta graduada con fondo esmerilado.
10. Verter el contenido de los tubos de ensayo, en la probeta y esperar a que se filtre la muestra hacia el matraz Kitasato.
11. Verter el contenido de cada muestra en un embudo de separación.
12. Agregar 0.8ml de agua destilada manteniendo una proporción de 0.8:1:1 de agua-cloroformo-metanol.
13. Agitar vigorosamente y dejar reposar unos segundos para que se formen dos fases; sino se formaran las dos fases, agua destilada gota por gota hasta que se formen.
14. Verter la fase más densa en un vial y pesar.
15. Poner a secar los viales bajo una corriente de aire constante hasta que se evapore la parte líquida.
16. Pesar viales.

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

Contenido de humedad

Usar guantes para evitar alterar las mediciones

1. Eliminar la humedad de los crisoles de aluminio en el horno de convección por 2 horas aproximadamente para evitar variaciones en la medición.
2. Obtener el peso inicial de la muestra
3. Poner a secar la muestra en un horno de convección a $90 \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 4 horas
4. Sacar la muestra del horno y pesar
5. introducir la muestra nuevamente en el horno por una hora
6. sacar la muestra del horno y pesar.
7. Si el peso de la muestra en el paso 6 es diferente del peso de la muestra en el paso 4 continuar secando a intervalos de una hora hasta que el peso sea constante y este valor será peso final. Obtener el porcentaje de humedad total.

Cálculos:

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

Dónde: PI=Peso inicial PF=peso final

Contenido de cenizas

1. Pesar muestra seca
2. Colocar la muestra en un crisol de porcelana dejándolo ligeramente abierto.
3. Introducir el crisol en la mufla y encenderla, programar a 550°C por 6-8 horas.
4. Colocar la muestra en un desecador para que se termine de enfriar.

Cálculos:

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

Dónde: Donde: PI=Peso inicial PF=peso final

Anexo 4. Estallido respiratorio de macrófagos

1. Realizar todo el procedimiento en un campo estéril.
2. Aislamiento de células fagocíticas
 - A. Extraer riñones y colocar en 5 ml de medio Leibovitz 14 g/l con 0.1% de suero fetal bovino (medio L-15 L4386 Sigma-Aldrich).
 - B. Macerar, filtrando el contenido a través de una malla de 100 μ .
 - C. Extraer sobrenadante por pipeteo (200 μ l) y colocar en pocillos de microplacas (microplacas de 96 pocillos) ocupando 5 pocillos por muestra.
 - D. Realizar recambios totales de medio cada 24 horas. Mantener el cultivo por 3 días.
3. Ensayo
 - A. Agregar 50 μ l de una solución de nitrotetrazolio (NBT) 2 mg/l a cada pocillo.
 - B. emplear un blanco con 150 μ l de medio Leibovitz y 50 μ l de NBT
 - C. Dejar incubar durante 1 hora.
 - D. Medir en lector de placas de ELISA PR 3100 TSC a 620 nm.
 - E. Restar a las muestras la absorbancia obtenida por el blanco para obtener el aumento real de unidades de densidad óptica (DO).
 - F. Las unidades de DO fueron reportadas por cada 10,000 células (10^4)

Anexo 5. Aislamiento de linfocitos

Preparar solución balanceada de sales 20 ml para cada muestra.

Solución A	g/l
Glucosa D-anhidra	1
CaCl₂ H₂O	0.0074
MgCl₂ 6H₂O	0.1992
Kcl	0.4026
TRIS	17.565

Disolver en 950 ml y ajustar a pH 7 con HCl 10N antes de aforar a 1 l.

Solución B	g/l
NaCl	8.19

Preparación final 1:9 volúmenes.

Obtención y preparación de la muestra

1. Obtener sangre de la vena caudal, recolectándola en tubos Eppendorf, manteniéndolos en hielo.
2. En tubos de ensayo colocar 2 ml de muestra (con anticoagulante) y 2 ml de solución balanceada de sales.
3. Mezclar con una pipeta Pasteur

Tratamiento y separación

1. En tubos de centrifuga añadir 3 ml de Ficoll.
2. Añadir muestra, procurando no mezclar.
3. Centrifugar a 2260 rpm por 40 minutos.
4. Retirar sobrenadante.
5. Agregar 6 ml de solución balanceada de sales y homogenizar.
6. Centrifugar a 1130 rpm por 10 minutos.
7. Remover sobrenadante y adicionar 6 ml de solución balanceada de sales y homogenizar.

8. Centrifugar a 1130 rpm por 10 minutos.
9. Remover sobrenadante.
10. Los linfocitos deberán estar suspendidos en el medio.
11. Teñir con solución de Wright.
12. Contar en cámara de Neubauer.

“Il me semble que je serais toujours bien là où je ne suis pas.”

Charles Baudelaire