



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA  
SALUD ANIMAL

NUTRICIÓN Y ALIMENTACIÓN ANIMAL

**ADICIÓN DE CONCENTRADO PROTEICO DE PAPA EN UNA DIETA INICIADORA PARA  
LECHONES DESTETADOS: EFECTOS SOBRE ALGUNAS CARACTERÍSTICAS  
MORFOFISIOLÓGICAS Y MICROBIOLÓGICAS DEL APARATO DIGESTIVO**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL**

PRESENTA:

**ERICK ALEJANDRO PARRA ALARCÓN**

TÉRCIA CESÁRIA REIS DE SOUSA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

ELBA RODRÍGUEZ HERNÁNDEZ

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

GERARDO MARISCAL LANDÍN

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

Ciudad Universitaria, CD. MX. MAYO del 2023



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.

## DEDICATORIAS

- ❖ Quiero dedicar esta tesis a mis padres, Martha Alarcón Rosales y Fabián Parra Pérez, ya que siempre he contado con su apoyo y su amor incondicional, motivándome cada día a ser una mejor persona. LOS AMO.
- ❖ A mi hermano, César Parra, gracias por toda tu paciencia y el apoyo que siempre me brindas. Eres un orgullo y un ejemplo para mí y toda la familia, de que si te propones algo lo puedes lograr.
- ❖ A mi tío Luis Gerardo Parra, quien apoyó fuertemente mi educación en inglés desde pequeño y gracias a eso hoy he tenido algunas oportunidades.

## AGRADECIMIENTOS

- ❖ Doctora Tércia, gracias por aceptarme como su estudiante y tenerme la confianza para realizar este estudio, el cual fue muy retador en distintos aspectos más allá de lo académico, pero el cual me deja muchas enseñanzas.
- ❖ Doctor Gerardo Mariscal, usted fue una pieza clave para poder realizar todos los ensayos y el análisis de estos, así como un pilar en mis estudios ya que distintas materias las curse con usted.
- ❖ Doctora Elba, gracias por abrirme las puertas de su laboratorio y con ello a un área en la cual nunca imagine que exploraría y la cual ahora admiro bastante.
- ❖ Al Doctor Arturo Germán Borbolla Sosa (QPD), mi gran profesor, por confiar en mí y motivarme a tomar este camino en mi vida, siempre estaré agradecido por el acompañamiento y todos los consejos compartidos.
- ❖ Teresita, la compañera que nunca imaginé encontrarme en este camino y quien se convirtió en una gran amiga, con la cual sé que siempre contaré.
- ❖ A la Universidad Nacional Autónoma de México por todas las oportunidades durante la licenciatura y la Maestría.
- ❖ Al Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Fisiología y Mejoramiento Animal del INIFAP por permitir el uso de las instalaciones y equipo.
- ❖ A la Universidad Autónoma de Querétaro por permitir el uso del Laboratorio de Nutrición Animal para algunos análisis y al Módulo Cunicola para producir los anticuerpos.
- ❖ Al CONACYT por el apoyo económico durante los estudios de maestría.
- ❖ A la Red de Apoyo a la Investigación (RAI).

## RESUMEN

Como una alternativa a los antibióticos promotores de crecimiento el interés de este estudio fue identificar los péptidos antimicrobianos (PAMs) Potamina-1 (PT-1), Snakina-1 (SN-1) y 2 (SN-2) en un concentrado proteico de papa (CPP) y en la digesta de animales tras consumirlo, así como el balance de nitrógeno y energía (BNyE) y algunos parámetros de integridad intestinal. Se utilizaron 12 cerdos machos castrados,  $8.5 \pm 0.06$  kg y 26 días en un modelo de bloques completamente al azar con dos dietas; 1) tipo caseína (Control); 2) dieta caseína + 6% de CPP (CPP6%) (seis repeticiones/tratamiento). Por cinco días se determinó el BNyE. No se encontraron diferencias ( $P > 0.05$ ) para la digestibilidad aparente de la materia seca (93.19% y 93.12%) ni del N retenido como porcentaje del consumido (96.4 y 95.8%) para animales con dietas Control y CPP6% respectivamente. Del día 1 a 17 el consumo de alimento, y eficiencia alimenticia fueron similares ( $P > 0.05$ ) entre tratamientos, aunque la ganancia diaria de peso para el tratamiento CPP6% (0.115 kg) fue mayor ( $P < 0.05$ ) respecto al Control (0.095 kg). Mediante electroforesis se determinaron bandas en geles SDS con masas moleculares relativas de 2.67, 3.57, 4.79 y 10.87 kDa en el CPP. Mediante espectrometría de masas acoplada a cromatografía líquida se encontró que en estas bandas el 45.5% de los péptidos son inhibidoras de proteasas, 15.6% patatinas y 2.6% defensinas. El día 17 se sacrificaron a los animales para realizar ensayos de inmunodetección con los contenidos intestinales. Los péptidos objetivos no se detectaron, aunque se determinó una identidad superior al 70% para el PT-1 con los péptidos IP25; IP2X; IP2K; IP21 del CPP. Los ensayos de inmunodetección en los contenidos intestinales y el análisis bioinformático mostraron péptidos con un alto porcentaje de identidad entre los PAM y péptidos bacterianos. En conclusión, el CPP mostró ser una adecuada fuente de proteína para estos animales, y es posible que el PT-1 sea una fracción de un péptido de mayor masa molecular.

Palabras clave: Potamina-1, Snakina-1, Snakina-2, lechones.

## ABSTRACT

In search of an alternative to growth-promoting antibiotics, the purpose of this study was to identify the antimicrobial peptides (AMPs) Potamina-1 (PT-1), Snakin-1 (SN-1), and 2 (SN-2) in a potato protein concentrate (CPP), in the intestinal content of animals after consuming it, as well as the nitrogen and energy balance (BNyE) and some parameters of the gut structure. Twelve castrated pigs male,  $8.5 \pm 0.06$  kg and 26 days old were used in a completely randomized block model with two diets; 1) casein diet (Control); 2) casein diet + 6% CPP (CPP6%) (six repetitions/treatment). The BNyE was measured in five days. No differences ( $P > 0.05$ ) were found for the apparent digestibility of the dry matter (93.19% and 93.12%), or the N retained as a percentage of the consumed (96.4 and 95.8%) in the animals with the Control and CPP6% diets, respectively. From day 1 to 17, feed intake and feed efficiency were similar ( $P > 0.05$ ) between treatments, although the daily weight gain for the CPP6% treatment (0.115 kg) was higher ( $P < 0.05$ ) compared to the Control (0.095kg). On day 17, the animals were sacrificed to carry out immunodetection tests with the intestinal contents. By electrophoresis, bands with relative molecular masses of 2.67, 3.57, 4.79, and 10.87 kDa were determined in the CPP, which by liquid chromatography coupled to mass spectrometry reported 45.5% as protease inhibitors, 15.6% patatins, 2.6% defensins. Peptides PT-1, SN-1, and SN-2 were not reported, however, an identity greater than 70% was reported for PT-1 with peptides IP25 was limited; IP2X; IP2K; IP21 of the CPP. Immunodetection assays on intestinal contents and bioinformatic analysis show peptides with a high percentage of identity between PAMs and bacterial peptides. In conclusion, CPP proved to be a suitable source of protein for these animals, and PT-1 may be a fraction of a peptide with a higher molecular mass.

Keywords: Potamin-1, Snakin-1, Snakin-2, piglets.

# CONTENIDO

DEDICATORIAS .....	i
AGRADECIMIENTOS .....	ii
RESUMEN .....	iii
ABSTRACT .....	iv
CONTENIDO.....	v
ÍNDICE DE FIGURAS.....	viii
ÍNDICE DE CUADROS.....	x
Introducción .....	1
Revisión de literatura y planteamiento del problema .....	4
Destete del cerdo y complicaciones gastrointestinales .....	4
Antibióticos en la promoción de crecimiento y el control de diarreas en cerdos de destete .....	6
Resistencia bacteriana a los antibióticos .....	7
Péptidos antimicrobianos de origen vegetal.....	8
Mecanismo de acción de los péptidos antimicrobianos vegetales .....	9
Péptidos antimicrobianos descritos en el concentrado de proteína de papa .....	10
Inhibidores de proteasa de papa.....	12
Patatinas y otras proteínas de papa .....	14
Concentrado de proteína de papa en alimentación de cerdos de destete sobre el comportamiento productivo y el ambiente intestinal .....	15
Justificación.....	18
Objetivo General .....	18
Objetivos específicos .....	18

<b>Hipótesis .....</b>	<b>19</b>
<b>Materiales y métodos .....</b>	<b>19</b>
<b>Animales y Alojamiento.....</b>	<b>19</b>
<b>Tratamientos: Dietas experimentales.....</b>	<b>19</b>
<b>Comportamiento zootécnico .....</b>	<b>21</b>
<b>Prueba de digestibilidad y balance de nitrógeno y energía .....</b>	<b>21</b>
<b>Prueba de digestibilidad .....</b>	<b>22</b>
<b>Balance de nitrógeno y energía.....</b>	<b>22</b>
<b>Análisis de laboratorio.....</b>	<b>23</b>
<b>Cuantificación de coliformes y <i>lactobacillus</i> en heces.....</b>	<b>23</b>
<b>Morfología de vellosidades y criptas intestinales .....</b>	<b>24</b>
<b>Verificación de PAM en el CPP mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC/MS) .....</b>	<b>24</b>
Patrón electroforético de proteínas de bajo peso molecular del CPP.....	25
Identificación de péptidos por (LC/MS).....	25
Análisis bioinformático de secuencias obtenidas por LC/MS para determinar el grado de conservación con los PAM .....	26
<b>Identificación de PAM en el CPP y en la digesta de cerdos recién destetados mediante western blot.....</b>	<b>26</b>
Síntesis de péptidos antigénicos múltiples (MAPs) .....	26
Producción de anticuerpos anti-PT-1, anti-SN-1 y anti-SN-2.....	26
Inmunodetección de antígenos nativos en el CPP y de la digesta de cerdos de destete alimentados con las dietas experimentales .....	27
Análisis de identidad de los péptidos reconocibles por los anticuerpos anti-PT-1, anti-SN-1 y anti-SN-2 en el ambiente intestinal de los animales experimentales .....	28
<b>Análisis estadístico:.....</b>	<b>28</b>
<b>Resultados.....</b>	<b>30</b>

<b>Comportamiento zootécnico .....</b>	<b>30</b>
<b>Prueba de digestibilidad .....</b>	<b>32</b>
<b>Balance de nitrógeno y energía.....</b>	<b>33</b>
<b>Actividad del concentrado de proteína de papa sobre coliformes y <i>lactobacillus</i> en heces .....</b>	<b>35</b>
<b>Peso y pH de órganos de tracto gastrointestinal .....</b>	<b>36</b>
<b>Morfología intestinal.....</b>	<b>38</b>
<b>Verificación de PAM en el CPP mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC/MS) .....</b>	<b>39</b>
Patrón electroforético de proteínas de bajo peso molecular del CPP.....	39
Péptidos identificados por LC/MS .....	40
Síntesis de péptidos antigénicos múltiples (MAPs): .....	45
Análisis bioinformático de secuencias obtenidas por LC/MC para determinar el grado de conservación con los PAM: .....	46
<b>Inmunodetección de PAM en el CPP y en la digesta de cerdos recién destetados mediante western blot .....</b>	<b>51</b>
Producción de anticuerpos anti-SPT-1, anti-SN-1 y anti-SN2 en conejos .....	51
Inmunodetección del antígeno nativo en el CPP mediante Western blot: .....	52
Inmunodetección de péptidos del CPP en la digesta de cerdos de destete alimentados con las dietas experimentales: .....	53
Análisis de identidad de los péptidos reconocibles por los anticuerpos anti-PT-1, anti-SN-1 y anti-SN-2 en el ambiente intestinal de los animales experimentales: .....	56
<b>Discusión .....</b>	<b>59</b>
<b>BNyE y comportamiento zootécnico .....</b>	<b>59</b>
<b>Actividad del concentrado de proteína de papa sobre coliformes y <i>lactobacillus</i> en heces.....</b>	<b>63</b>
<b>Peso y pH de órganos .....</b>	<b>64</b>
<b>Morfología de vellosidades y criptas intestinales .....</b>	<b>65</b>
<b>Verificación de PAM en el CPP mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC/MS) .....</b>	<b>66</b>

Patrón electroforético de proteínas de bajo peso molecular del CPP.....	66
Péptidos identificados por LC/MS .....	67
Análisis bioinformático de secuencias obtenidas por LC/MC para determinar el grado de conservación con los PAM:.....	68
<b>Identificación de PAM en el CPP y en la digesta de cerdos recién destetados mediante western blot.....</b>	<b>69</b>
Síntesis de péptidos antigénicos múltiples (MAPs): .....	69
Producción de anticuerpos anti-PT-1, anti-SN-1 y anti-SN2 en conejos:.....	70
Inmunodetección del antígeno nativo en el CPP mediante Western blot: .....	71
Inmunodetección de péptidos del CPP en la digesta de cerdos de destete alimentados con las dietas experimentales:.....	72
Análisis de identidad de los péptidos reconocibles por los anticuerpos anti-PT-1, anti-SN-1 y anti-SN-2 en el ambiente intestinal de los animales experimentales: .....	73
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>76</b>
<b>Referencias.....</b>	<b>77</b>
<b>Anexos .....</b>	<b>89</b>
<b>Anexo 1: Protocolo de extracción de proteínas con TCA .....</b>	<b>89</b>
<b>Anexo 2: Péptidos identificados en bandas 1, 2, 3 y 4 de gel electroforesis Tris-Tricina a partir de la muestra de CPP mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas. ....</b>	<b>90</b>
<b>Anexo 3: Predicción de epítomos antigénicos para la selección de péptidos a sintetizar para la producción de anticuerpos. ....</b>	<b>98</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1. Línea de tiempo de los APC.....</b>	<b>7</b>
<b>Figura 2. Mecanismo de acción de algunos péptidos antimicrobianos (PAM). ....</b>	<b>10</b>
<b>Figura 3 Péptidos de CPP aislados a distintas temperaturas (40, 60 80 y 100°C) .....</b>	<b>12</b>

<b>Figura 6: Patrón electroforético de proteínas del CPP.....</b>	<b>40</b>
<b>Figura 7: Péptidos identificados por LC/MS en la banda 1.....</b>	<b>41</b>
<b>Figura 8: Péptidos identificados por LC/MS en la banda 2.....</b>	<b>42</b>
<b>Figura 9: Péptidos identificados por LC/MS en la banda 3.....</b>	<b>43</b>
<b>Figura 11: Péptidos identificados por LC/MS en las bandas 1 a 4.....</b>	<b>44</b>
<b>Figura 10: Péptidos identificados por LC/MS en la banda 4.....</b>	<b>44</b>
<b>Figura 12: Patrón electroforético de los péptidos SPT-1, SSN-1 y SSN-2.....</b>	<b>45</b>
<b>Figura 13: Titulación de anticuerpos anti-SPT-1, anti-SSN-1 y anti-SSN-2 a través de Western blot.....</b>	<b>51</b>
<b>Figura 14: Identificación de antígenos nativos en CPP mediante Western blot.....</b>	<b>52</b>
<b>Figura 15: SDS/PAGE de contenidos intestinales de animales en la dieta control y CPP 6%.....</b>	<b>53</b>
<b>Figura 16. Determinación de antígenos reconocibles por los anticuerpos del péptido sintético de potamina-1 (SPT-1).....</b>	<b>54</b>
<b>Figura 18. Determinación de antígenos reconocibles por los anticuerpos del péptido sintético de Snakina-2 (SSN-2).....</b>	<b>55</b>
<b>Figura 17. Determinación de antígenos reconocibles por los anticuerpos del péptido sintético de Snakina-1 (SSN-1).....</b>	<b>55</b>
<b>Figura 19. Identidad entre SPT-1 y la proteína hipotética parcial (ID NCBI: WP_176232761) de E. coli.....</b>	<b>56</b>
<b>Figura 20. Identidad entre SSN-1 y la fosfatasa de serina/treonina (ID NCBI: MBL1008534) de E. coli.....</b>	<b>57</b>
<b>Figura 21. Identidad entre SSN-2 y la proteína hipotética (ID NCBI: WP_176232843) de E. coli.....</b>	<b>58</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Inhibidores de proteasa de papa. ....	13
Cuadro 2. Composición de las dietas experimentales.....	20
Cuadro 3. Composición del concentrado de proteína de papa (CPP).....	21
Cuadro 4: Comportamiento zootécnico del día 1 a 8. ....	30
Cuadro 5: Comportamiento zootécnico del día 8 a 13. (Durante el Balance de N y E y prueba de digestibilidad) .....	31
Cuadro 6: Comportamiento zootécnico del día 1 a 17 .....	32
Cuadro 7: Datos de inicio y fin de la prueba de digestibilidad (días posteriores al destete), para la materia seca consumida, excretada y su digestibilidad. ....	33
Cuadro 8: Datos del balance de nitrógeno. ....	34
Cuadro 9: Datos del balance de energía.....	35
Cuadro 10: Efecto del CPP 6% sobre bacterias coliformes y lácticas. Log 10 UFC/g.....	36
Cuadro 11: Efecto del CPP 6% sobre el peso los órganos del aparato gastrointestinal... ..	37
Cuadro 12: Efecto del CPP 6% sobre el pH de los órganos del aparato gastrointestinal. .	38
Cuadro 13: Efecto del concentrado de papa al 6% sobre la morfología intestinal.....	39
Cuadro 15. Alineamiento entre PT-1 y SPT-1 con el inhibidor de proteasa tipo – 2 (IP25). .....	47
Cuadro 16. Alineamiento entre PT-1 y SPT-1 con el inhibidor de proteasa tipo – 2 (IP2X) .....	48
Cuadro 17. Alineamiento entre PT-1 y SPT-1 con el Inhibidor de proteasa tipo -2 K (IP2K) .....	49
Cuadro 18. Alineamiento entre PT-1 y SPT-1 con el Inhibidor de proteasa PTI.....	50

## Introducción

El destete comercial en producción porcina se realiza entre los 21 y 28 días de edad (Insuasti y col. 2008). Este evento repentino resulta sumamente estresante para el cerdo ya que es separado de su madre, colocándolo en un nuevo ambiente y ofreciéndole una dieta sólida, a diferencia de cuando solía estar adaptado a una dieta láctea. Todo esto aunado a la presencia de nuevos patógenos propicia complicaciones neuroendocrinas, inmunológicas y digestivas (Pohl y col. 2015; Moeser y col. 2017), por lo que es común que se presente en las primeras horas un bajo consumo de alimento, atrofia de la estructura intestinal y con ello de la capacidad digestiva, así como un aumento de la incidencia de diarreas post destete (Insuasti y col. 2008; Campbell y col. 2013).

La presencia de diarreas está ampliamente relacionada con el repentino cambio de la dieta, así como a infecciones gastrointestinales. Ambos factores promueven una rápida inflamación y disbiosis (incremento de *E. coli*) que repercuten en la pérdida de la estructura intestinal, así como una reducción abrupta de *Lactobacillus spp.* (Rhouma y col. 2017). Para combatir estas complicaciones gastrointestinales en los últimos años se han empleado antibióticos como promotores de crecimiento, ya que favorecen la tasa de crecimiento y reducen la incidencia de enfermedades y la mortalidad (Pluske, 2013; Thacker, 2013). Sin embargo, la inclusión de antibióticos en las dietas animales en los últimos años se ha cuestionado e incluso prohibido en algunos países, ya que representan un serio problema por el desarrollo de resistencia bacteriana, lo cual potencialmente puede mermar el tratamiento de enfermedades en animales y posiblemente en humanos. Por lo que la búsqueda de sustitutos o alternativas a estos es de gran relevancia (Zhao y col. 2007; Levy y Marshall, 2004).

En las últimas décadas se han propuesto distintas alternativas a los antibióticos promotores de crecimiento, destacando los probióticos, prebióticos, acidificantes, extractos vegetales, minerales como el cobre y zinc, aceites esenciales, enzimas,

anticuerpos de huevo de pollo y péptidos antimicrobianos de origen vegetal, por mencionar a las opciones más estudiadas. Desafortunadamente los resultados de estos compuestos en ocasiones pueden ser inconsistentes y difícilmente capaces de igualar el efecto de los antibióticos (Vondruskova y col. 2010; Thacker, 2013; Oliveira y col. 2017; Gresse y col. 2017).

Los péptidos antimicrobianos de origen vegetal son desarrollados por distintas plantas y tubérculos como mecanismo de defensa y en respuesta a las agresiones e infecciones microbianas (Tam y col. 2015; Benko-Iseppon y col. 2010; Bártoová y col. 2018); estos son ricos en cisteína y puentes disulfuro, lo que les confiere una alta estabilidad térmica y proteolítica (Tam y col. 2015). Distintos estudios describen en la proteína del tubérculo de papa la presencia de péptidos antimicrobianos (Waglay y col. 2014), como el inhibidor de tripsina Potamina - 1 (PT - 1) de 4.8 kDa (Kim y col. 2005), así como, los péptidos Snakina - 1 (6.90 kDa) y Snakina - 2 (7.02 kDa) los cuales son péptidos ricos en el aminoácido cisteína (Bártoová y col. 2018).

Estudios recientes (Reis de Souza y col., 2019) describen que el concentrado de proteína de papa (*Solanum tuberosum*) en las dietas de cerdos recién destetados (a un 4% de inclusión) ha mostrado tener efecto sobre el crecimiento de estos animales y el control de los problemas gastrointestinales. Jin y col. (2009) observaron que el concentrado de papa (de 200 a 600 ppm) reduce la población de coliformes totales en el intestino grueso de cerdos recién destetados, aunque cabe mencionar que las inclusiones de concentrado de proteína de papa de estos estudios no mostraron los resultados alcanzados con el uso de antibióticos, sugiriendo así que una concentración mayor de la proteína de papa pudiera mejorar la respuesta del cerdo de destete.

Es importante aclarar que la inclusión de un ingrediente en una dieta puede modificar la eficiencia que el cerdo tendrá para asimilar los nutrientes de esta, como los aminoácidos y la energía (Pierce y col. 2007). Esto es en relación a que

algunos péptidos antimicrobianos de la proteína de papa son inhibidores de tripsina (como el péptido PT-1) Estas moléculas se unen específicamente a la enzima, bloqueando su sitio activo (Blow y col. 1974), por lo que este fenómeno puede reducir la asimilación de algunos nutrientes, principalmente aminoácidos que podría usar el cerdo para el crecimiento (Gumbmann y col. 1989; Grant, 1989; Woyengo y col. 2016; Jezierny y col. 2010). Sin embargo, poca información existe sobre el efecto de la proteína de papa sobre su uso del nitrógeno y energía por parte del cerdo recién destetado.

Por lo tanto, los objetivos de este estudio fueron determinar la presencia de péptidos antimicrobianos en un concentrado de proteína papa (*Solanum tuberosum*) y en el ambiente intestinal de cerdos recién destetados alimentados con esta proteína. Así como la evaluación de este ingrediente en la dieta sobre el balance de nitrógeno y energía y su acción sobre el crecimiento de coliformes y *lactobacillus* característicos del medio ambiente intestinal de estos animales.

## Revisión de literatura y planteamiento del problema

### Destete del cerdo y complicaciones gastrointestinales

El cerdo actual tiene un alto requerimiento de nutrientes (Medel y col. 1999), pues ésta especie ha sido sometida a intensos programas de selección genética (Culbertson y col. 2017) con el objetivo de alcanzar la mayor velocidad de crecimiento muscular en el menor tiempo posible; lo que requiere de importantes cantidades de aminoácidos (AA) y energía (Liu y col. 2015), para que después de los procesos de digestión y absorción, la mayor concentración de AA llegue al torrente sanguíneo, posteriormente a las fibras musculares y superen la tasa de degradación (Liu y col. 2015; Culbertson y col. 2017). Sin embargo, el cerdo después del nacimiento tiene una baja capacidad intestinal para digerir alimentos de origen vegetal, por lo que debe madurar rápidamente para asegurar su sobrevivencia y crecimiento (Buddington y col. 2012; Pohl y col. 2015). Durante los primeros días de vida del cerdo distintos géneros bacterianos colonizan el tracto gastrointestinal, algunos involucrados en el metabolismo de nutrientes (Pohl y col. 2015; McCormack, 2017), así como también con funciones de protección al intestino, mediante exclusión competitiva con microorganismos patógenos (Mach y col. 2015). En animales sanos la microbiota contempla al menos 500 especies de los géneros: *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Eubacterium*, *Fusobacterium*, *Peptostreptococcus*, *Enterobacter*, *Bacteroides*, *Porphyromona*, y en menores concentraciones bacterias como *E. coli* y *Clostridium sp.* (Vondruskova y col. 2010). Sin embargo, la composición de la microbiota no es estática, se desarrolla gradualmente y sobre todo sufre cambios durante el destete. (Vondruskova y col. 2010).

De manera comercial el destete en producción porcina se realiza entre los 21 y 28 días de edad (Insuasti y col. 2008). Este evento es sumamente abrupto y estresante para el cerdo aún inmaduro (digestiva e inmunológicamente), ya que el

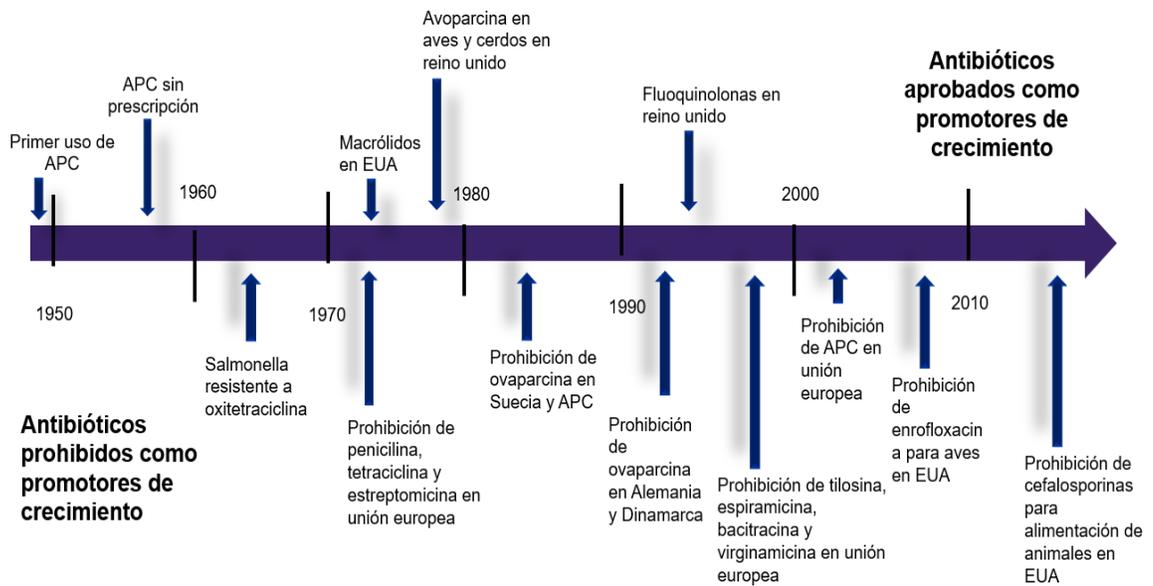
lechón es separado de su madre, colocado en un nuevo ambiente y se le ofrece una dieta sólida (con grandes cantidades de cereales), cuando antes solía estar adaptado a una dieta láctea y líquida. (Pohl y col. 2015; Moeser y col. 2017). Estas circunstancias inducen una rápida inflamación digestiva (Medel y col. 1999), por lo que es común que en las primeras 48 horas post destete se presente un bajo consumo de alimento (Insuasti y col. 2008; Campbell y col. 2013), y disbiosis de la microbiota intestinal caracterizada por el incremento de *E. coli*, y géneros como *Clostridium* y *Brachyspira*, y reducción de las poblaciones de *Lactobacillus spp* (Vondruskova y col. 2010; Rhouma y col. 2017). Estos factores conducen a la atrofia de la altura de las vellosidades intestinales e hipertrofia de las criptas, provocando con ello una reducción de la capacidad digestiva e induciendo la presencia de diarrea mecánica por mala absorción (Campbell y col. 2013; Jayaraman y Nyachoti, 2017). En casos más severos el daño en la integridad de la estructura intestinal favorece que grandes cantidades de proteína dietaria no digerida lleguen al intestino grueso, donde la microbiota puede utilizarla como sustrato fácilmente fermentable, favoreciendo la proliferación de enteropatógenos, inflamación y la desarrollo de diarreas de tipo infeccioso (Insuasti y col. 2008).

En consecuencia y ante la alta demanda de nutrientes por parte del cerdo para su crecimiento, el bajo consumo de alimento que se presenta inmediatamente después del destete y la modificación en su microbiota, se observa una pérdida de la masa muscular y de los órganos digestivos, así como un retraso en la tasa de crecimiento del animal (Moeser y col. 2017). Por lo que, para esta etapa los cerdos deben adaptarse rápidamente a la exposición de patógenos y los ingredientes presentes en el alimento, así como a su ambiente (Campbell y col. 2013; Tay, 2015). Esto se apoya mediante prácticas que incrementan el consumo de alimento, mediante el uso de ingredientes de alta digestibilidad, manejo y estado sanitario adecuados y típicamente con el uso de antibióticos como promotores de crecimiento (Insuasti y col. 2008; Jayaraman y Nyachoti, 2017; Muns y Magowan, 2018).

## **Antibióticos en la promoción de crecimiento y el control de diarreas en cerdos de destete**

Los antibióticos (ATB) son moléculas que inhiben el crecimiento de microorganismos bacterianos (Li, 2017). La administración de ATB en animales domésticos ha tenido dos motivos; el primero contempla el tratamiento de enfermedades (Cromwell, 2002). El segundo motivo, ha sido la suplementación de estas moléculas dentro de los programas de alimentación como promotores del crecimiento (Li, 2017; Marshall y Levy, 2011; Koch y *col.* 2017). Esta ha sido la estrategia más efectiva para prevenir la incidencia de diarreas, reducir la mortalidad y favorecer el crecimiento animal en los últimos años (Pluske, 2013; Thacker, 2013; Lu y *col.* 2018). Un antibiótico promotor de crecimiento (APC) puede definirse como cualquier fármaco que inhibe el crecimiento bacteriano y que es administrado en dosis sub terapéuticas (Gonzalez y Angeles, 2016).

El uso de APC inició en la década de 1940, cuando en dietas de aves se incluyeron subproductos de fermentación como fuente de vitamina B12, y observando una mejora en la tasa de crecimiento y menor mortalidad (Stokstad y *col.* 1949). Posteriormente se identificó que los subproductos contenían moléculas de clortetraciclina. A partir de ese momento se diversificaron estas moléculas y su uso como APC a otras especies animales (Stokstad y *col.* 1949; Gonzales y Angeles, 2016). La mejora en crecimiento, así como la reducción de diarreas y mortalidad asociada con la práctica de APC en distintas especies domesticas favoreció por muchos años el uso libre de estas moléculas (Marshall y Levy, 2011), pues para la década de 1950 (**Figura 1**) la administración de alimentos y drogas (FDA por sus siglas en ingles) de Estados Unidos de América había aprobado el empleo de APC sin prescripción (Castanon, 2007).



**Figura 1. Línea de tiempo de los APC. Gonzales y Angeles, (2016).**

En los últimos años entre el 70 y 80% de los alimentos para cerdos de destete ha contenido ATB/APC, para cerdos de crecimiento cerca del 70%, alrededor del 60% para animales en finalización y cerca del 50% para cerdas gestantes (Cromwell, 2002). Esto ha originado que fuera mayor la cantidad de antibióticos utilizados en animales sanos que en humanos con alguna enfermedad (Marshall y Levy, 2011).

### **Resistencia bacteriana a los antibióticos**

El amplio uso de los APC ha mantenido a distintos patógenos bacterianos bajo una intensa presión de selección, favoreciendo la permanencia de aquellos que, dentro de una población y en respuesta a la variación genética, desarrollan mecanismos para sobrevivir (Mateu y Martin, 2001; Koch y *col.* 2017; Li, 2017). Este fenómeno comenzó a observarse no mucho tiempo después de la aparición del primer antibiótico, reportándose resistencia para antibióticos como; betalactámicos, sulfamidas, anfenicoles, aminoglucósidos y tetraciclinas (Foster, 1983). Y para finales del siglo XX una gran proporción de microorganismos resistentes comenzó a adjudicarse al excesivo y libre empleo de los agentes

antibacterianos en la industria animal (Levin y col. 1998; Li, 2017). En cerdos lactantes y de destete, patógenos respiratorios como *Pasteurella* y *Haemophilus*, así como patógenos entéricos (*E. coli* y *Salmonella*) son los principales objetivos en las terapias antibióticas, pero también los que desarrollan las más altas tasas de resistencia (Hummel y col. 1986; Mateu y Martin 2001) en periodos tan cortos como una semana (Edwards, 1961).

El fenómeno de resistencia bacteriana demanda medidas que contemplen un nuevo enfoque y estrategias terapéuticas distintas a los antibióticos (Culp y Wright, 2016). En las últimas décadas se han estudiado distintas alternativas al uso de antibióticos en la industria animal mediante la inclusión de algunos aditivos e ingredientes, desafortunadamente los resultados de estos en ocasiones son inconsistentes y/o incapaces de igualar el efecto de los antibióticos. Entre las alternativas más estudiadas destacan los extractos vegetales, anticuerpos de huevo de pollo, ácidos orgánicos y enzimas (Thacker, 2013), además de aceites esenciales (Gresse y col. 2017), probióticos (Vondruskova y col. 2010), prebióticos (Oliveira y col. 2017), minerales como el cobre y zinc (Pluske, 2013) y proteínas y péptidos antimicrobianos de origen vegetal, como lo contenidos en la proteína de papa (Cotten y col. 2016; Casas y col. 2017).

### **Péptidos antimicrobianos de origen vegetal**

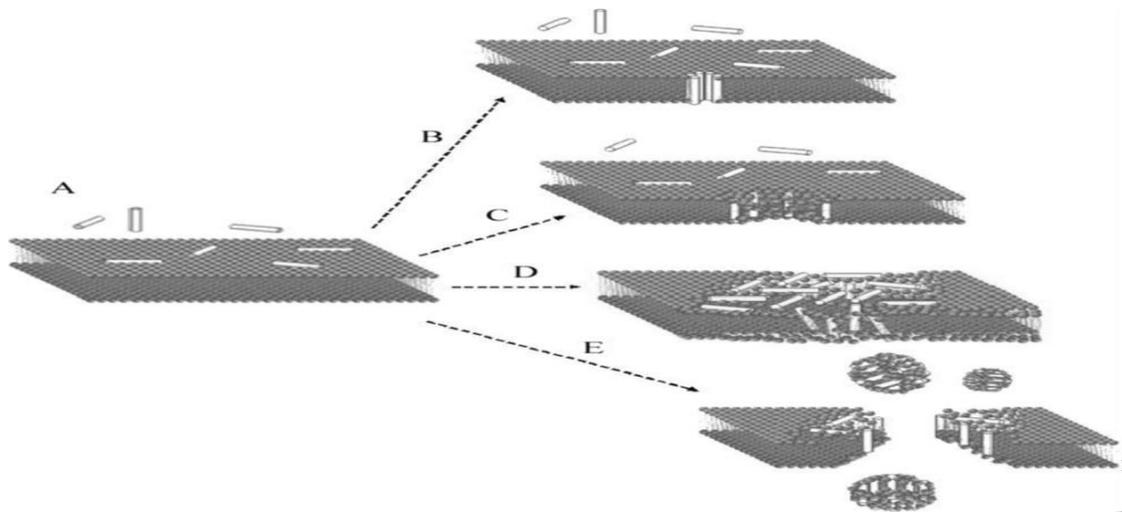
Distintos vegetales ante infecciones y agresiones por parte de microorganismos son capaces de regular genes asociados para la síntesis de fitoalexinas, taninos, compuestos polifenólicos y péptidos antimicrobianos (PAM) como mecanismos de defensa (Tam y col. 2015; Benko-Iseppon y col. 2010). Los PAM existen en distintas formas moleculares, la gran parte lineales. La mayoría cuenta con dos a seis residuos de cisteína (Tam y col. 2015), que les confieren alta estabilidad térmica y química (Contreras y col. 2015). Son polipéptidos de bajo peso molecular con menos de 200 AA (comúnmente menores a 50 AA, cercanos a los 10 kDa), son básicos en su mayoría y generalmente son cationes a pH fisiológico

por sus residuos de arginina y lisina cargados. Los PAM ricos en cistina se clasifican en familias en relación con su similitud de secuencia, motivos de cisteína y patrones de enlaces disulfuro. Las familias de PAM de plantas ricos en cistina incluyen tioninas, defensinas, péptidos de tipo heveína, péptidos de tipo knotinas (lineales y cíclicos), proteínas de transferencia de lípidos,  $\alpha$ -horquillas y snakins. (Benko-Iseppon y *col.* 2010).

### **Mecanismo de acción de los péptidos antimicrobianos vegetales**

Los PAM vegetales tienen actividad no solo contra bacterias, sino también frente a hongos, virus y parásitos. El mecanismo de acción de los PAM está relacionado con la lisis de la membrana y/o la penetración del péptido seguido del ataque a objetivos intracelulares (**Figura 2**). La naturaleza catiónica y capacidad anfipática de los PAM permite la interacción con la pared (aniónica) y la membrana fosfolipídica de microorganismos (Benko-Iseppon y *col.* 2010; Tam y *col.* 2015).

Otro mecanismo antimicrobiano se ha descrito en familias de PAM las proteínas de transferencia de lípidos que se unen a lípidos para interrumpir la penetración microbiana en las membranas celulares (Tam y *col.* 2015). También se han asociado defensinas, proteínas de transferencia de lípidos y péptidos de tipo snakina con propiedades de inhibir proteasas. Por lo que las características antes mencionadas, perfilan a estos péptidos vegetales como una importante alternativa al uso de APC para el desarrollo de estrategias antibióticas y antiinflamatorias (Benko-Iseppon y *col.* 2010; Tam y *col.* 2015).



**Figura 2. Mecanismo de acción de algunos péptidos antimicrobianos (PAM).**

Tomado y editado de Bártová y *col.* (2019). A) Adsorción de PAM en la membrana. B y C) Reorientación de PAM en la bicapa lipídica y formación de poros. B) Los PAM interactúan lateralmente entre sí cuando las regiones hidrofóbicas de los PAM se alinean con las colas de los lípidos y las regiones hidrofílicas forman la superficie interna del poro. C) No hay interacciones específicas de PAM en el poro, pero las partes hidrofílicas de los lípidos son atraídas electrostáticamente por los residuos cargados del PAM. El espesor de la membrana disminuye. D) Los PAM están unidos a la superficie de la membrana. Residuos hidrofóbicos de PAM están frente a la membrana y sus superficies hidrofílicas frente al solvente. E) Cuando una gran concentración de PAM se une a la membrana esta es fraccionada.

### **Péptidos antimicrobianos descritos en el concentrado de proteína de papa**

Distintos estudios de revisión describen una gran variedad de péptidos en los tubérculos de papa con potencial antibacteriano (Waglay, 2014; Bártová y *col.* 2019). Una gran proporción de los péptidos de los tubérculos de papa que han mostrado actividad contra ciertos patógenos pertenecen a inhibidores de proteasa predominantemente de serina, cisteína y tipo Kunitz, así como isoformas específicas de patatinas y péptidos de bajo peso molecular contemplando

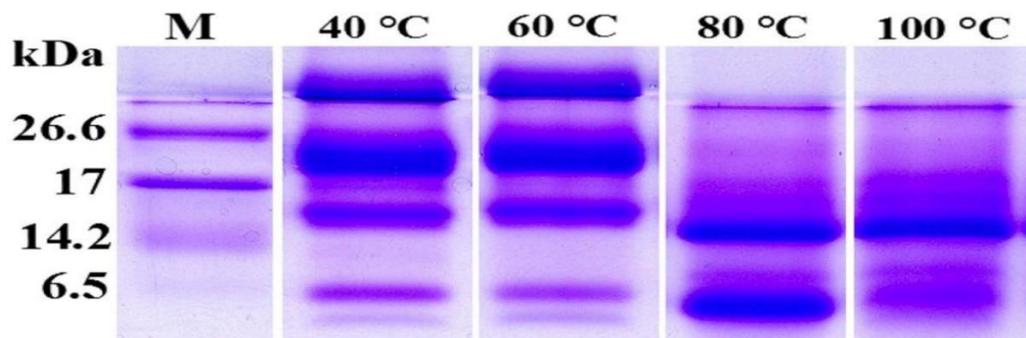
defensinas, tioninas y snakinas (Bártová y col. 2019). Donde podemos destacar en la literatura inhibidores de proteasa (tripsina) térmicamente estables como el Potamina - 1 (PT - 1) de 4.8 kDa descrito por Kim y col. (2005), y los péptidos ricos en cisteína Snakina - 1 (6.92 kDa) y Snakina - 2 (7.02 kDa) (Kovalskaya y Hammond, 2009), que han mostrado potencial antimicrobiano. Sin embargo, el estudio de los péptidos de papa es complejo, ya que existen cerca de 5000 variedades de papa (cerca de 10 variedades pertenecen a la especie *Solanum tuberosum*), originarias principalmente de los Andes, con variantes en tamaño, forma, color, textura, así como perfil nutricional, donde la composición química de la papa está sujeta a distintos factores como el área y prácticas de cultivo, conteniendo desde el 0.49 hasta el 2.7% de proteína en la papa cruda fresca.

Es importante resaltar que la disponibilidad de tubérculos de papa y de su proteína parece ir en ascenso, con China con el 80% de la producción mundial. (Wijesinha-Bettoni y Mouillé, 2019; Mu y col. 2009). La producción de tubérculos de papa está fuertemente orientada a la obtención de almidón, donde tan solo la Unión Europea anualmente procesa cerca de ocho millones de toneladas de estos tubérculos, obteniendo como subproducto un concentrado de proteína de papa (CPP) con aproximadamente 80% de proteína. El proceso para la obtención del CPP se basa en la coagulación térmica seguida de la separación de proteínas y secado (Pastuszewska y col. 2009; Bártová y col. 2018). Las proteínas de papa se clasifican típicamente de acuerdo con su masa molecular y separación electroforética en 3 grandes grupos; patatinas, inhibidores de proteasa y otras proteínas (Bártová y col. 2019).

El valor nutricional del CPP está relacionado con su concentración y disponibilidad de AA, que es comparable al perfil de AA de la soya (Froidmont y col. 2008) y al de algunas proteínas animales (Refstie y Tiekstra, 2003). Donde la concentración de ocho AA esenciales (treonina, valina, metionina, isoleucina, leucina, fenilalanina, lisina y triptófano) del CPP contempla hasta el 40.7% de su proteína de acuerdo con Mu y col. (2009). Por otra parte, es importante

mencionar la presencia de algunos factores anti-nutricionales; glicoalcaloides de solaninas (927 - 2632 mg/kg) e inhibidores de tripsina (0.97 - 3.70mg/kg), donde la concentración puede ser variable de acuerdo con las condiciones de procesamiento según Pastuszewska y *col.* (2009). Aunque el procesamiento térmico (100°/15 min) capaz de inactivar hasta el 48% de los inhibidores de proteasa y hasta el 89% de los glicoalcaloides, aunque afectando la concentración /disponibilidad de AA (Wojnowska y *col.* 1982).

El tratamiento térmico es el método industrial más utilizado para la obtención del CPP, resultando componentes termoestables de baja masa molecular que en gran parte son inhibidores de proteasa, sin embargo, la temperatura utilizada determinará las concentraciones y actividad de distintas fracciones de la proteína de papa (Bártová y *col.* 2018). De acuerdo con Bártová y *col.* (2018), la concentración de proteínas de CPP es variable tras un procesamiento de 80 °C y 100°C, en comparación con menores temperaturas (40 y 60°C) (**Figura 3**).



**Figura 3 Péptidos de CPP aislados a distintas temperaturas (40, 60 80 y 100°C).** M = marcador molecular. Tomado de Bártová y *col.* (2018).

### **Inhibidores de proteasa de papa**

Los inhibidores de proteasas (IP) de papa representan su grupo heterogéneo de proteínas/péptidos (**Cuadro 1**) clasificándose de acuerdo con la proteína que

inhiben, homología de secuencia, masa molecular, número de puentes disulfuro, punto isoeléctrico y mecanismo de acción (Bártová y col. 2019).

**Cuadro 1. Inhibidores de proteasa de papa.**

Enzima	kDa	Punto isoeléctrico	Enzima que inhibe
Inhibidor de proteasa I	7.68 - 7.87	5.1–6.3–7.2–7.8	T, Ch.
Inhibidores de proteasa II	20.02 - 20.68	5.5–5.8–5.9–6.0– 6.1– 6.5–6.9	T, Ch.
Inhibidor de proteasa aspartato de papa	19.87 - 22.03	6.2–7.5–8.2–8.4– 8.6– 8.7	T, Ch, CDA.
Inhibidor de proteasa cisteína de papa	20.1 - 22.7	5.8–6.6–6.7–7.1– 8.0– 8.3–>9	T, Ch, Pap.
Inhibidor de proteasa tipo Kunitz	20.19 - 20.24	8.0–9.0	T, Ch.
Otros inhibidores de serina proteasas	21..03 - 21.80	7.5-8.8	T, Ch.
Inhibidor de carboxipolipeptidasa	4.20	no determinado	CpA.

T = tripsina; Ch = quimotripsina; CdA = catepsina D; Pap = papaína; CpA = carboxipolipeptidasa A  
Tomado y editado de (Bártová y col. 2019).

En el pasado los inhibidores de proteasa (IP) eran considerados solo como factores antinutricionales, sin embargo, los IP recientemente han despertado interés por estar involucrados en múltiples actividades biológicas. Los IP de papa

se han estudiado por su efecto antimicrobiano, actividad anticancerígena y regulación del consumo de alimento relacionada a la modulación de colecistocinina (Bártová y col. 2019).

Dentro de los péptidos de papa con función antimicrobiana reportados se encuentran; Inhibidores de tripsina como el inhibidor de serina proteasa de papa de 21 kDa (PSPI-21), inhibidor de proteasa tipo Kunitz (PKPI) Grupo A y B, inhibidor de la proteasa subtilisina de papa de la familia tipo Kunitz (PKSI) (Grupo C del inhibidor de proteasa tipo Kunitz). Inhibidores de serina como el inhibidor de proteasa tipo Kunitz (PKPI), inhibidor de serina proteasa específico para proteasa K (PLPKI), inhibidor de proteasa térmicamente estable II de papa (PPI-II): Inhibidores de carboxipolipeptidasa como el Inhibidor de carboxipolipeptidasa de papa (PCI). Inhibidores de proteasa tipo Kunitz como el inhibidor de serina proteasa de papa de 22 kDa (PSPI-22 potide-G, potamina-1 (PT-1), potide-G 2 (PG-2) (Bártová y col. 2019).

Interesantemente un péptido ampliamente mencionado en la literatura sobre el mecanismo de acción del CPP es el péptido Potamina - 1 (4.8 kDa) de 47 AA con siete residuos de cisteína; NH<sub>2</sub>-Asp-Ile-Cys-Thr-Asn- Cys-Cys-Ala-Gly-Thr-Lys-Gly-Cys-Asn-Thr-Thr-Ser-Ala-Asn-Gly-Ala-Phe-Ile-Cys-Glu-Gly-Gln-Ser-Asp-Pro-Lys-Lys-Pro-Lys-Ala-Cys-Pro-Leu-Asn-Cys-Asp-Pro-His- Ile-Ala-Tyr-Ala-, en un estudio in vitro inhibió el crecimiento de distintos patógenos vegetales incluyendo *C. albicans*, *R. solani* y *C. michiganensis subsp. Michiganense*, además de actividad inhibitoria contra las enzimas tripsina, quimiotripsina y papaína. Este péptido pertenece a la familia tipo Kunitz, con 62% de homología con un inhibidor de serina proteasa (Kim y col. 2005).

### **Patatinas y otras proteínas de papa**

Las proteínas dentro del grupo de las patatinas representan cerca de la mitad de la proteína de papa. Son glicoproteínas con pesos moleculares de 39 a 43 kDa

con actividades enzimáticas (hidrolasas, fosfolipasas, glucanasas) (Bártová y col. 2019).

Dentro del grupo denominado otras proteínas de papa se incluyen péptidos ricos en cisteína como tioninas, defensinas, lectinas y snakinas. Las tioninas basan su actividad antimicrobiana en la interacción con la membrana fosfolipídica de los patógenos. Las defensinas parecen actuar sobre receptores específicos de la membrana y no sobre la permeabilidad de la membrana como las tioninas, sin embargo, la información sobre estos péptidos es limitada (Bártová y col. 2019).

Los péptidos Snakina son parte de un grupo independiente. Se encuentran dentro de la clasificación de otras proteínas de papa debido a su prácticamente nula similitud a cualquier otro tipo de péptido de papa (Bártová y col. 2019). Las proteínas Snakinas se describen en procesos biológicos como división celular, elongación y crecimiento y señalización en la defensa de la papa. Se encuentran dos tipos de péptidos snakins; snakina -1 (SN1) y snakina- 2 (SN-2) y aunque solo comparten 38% de homología, ambos son péptidos ricos en residuos de cisteína con actividad reportada contra bacterias Gram -, Gram + (*C. michiganensis*, *R. solanacearum*, *R. solanacearum*, *E. chrysanthemi*, *R. melliloti*) así como contra algunos hongos (Berrocal-Lobo y col. 2002).

### **Concentrado de proteína de papa en alimentación de cerdos de destete sobre el comportamiento productivo y el ambiente intestinal**

La inclusión de proteína de papa en cerdos de destete ha mostrado resultados interesantes sobre distintos parámetros productivos y de salud. Jin y col. (2008) con cerdos de destete donde se incluyó en la dieta proteína de papa por 28 días concluyen en un efecto lineal sobre la digestibilidad de la materia seca, la GDP y el CDA en respuesta a dietas con 0.25, 0.50 y 0.75% de proteína de papa, donde un ensayo in vitro mostró el efecto antibacteriano de la proteína de papa con una concentración mínima inhibitoria de 500 µg/mL para distintos géneros bacterianos

como *Staphylococcus aureus*, *Salmonella Choleraesuis*, *Salmonella Gallinarum* y *Escherichia coli*. En el mismo estudio Jin y col. (2008) muestran el efecto lineal antibacteriano de la proteína de papa sobre las bacterias totales en heces desde el día 7 y hasta el día 28 del estudio, destacando la reducción de coliformes y *Staphylococcus* spp y un efecto similar para el contenido de ciego, colon.

Estudios más recientes concuerdan que la inclusión de CPP en dietas de cerdos destetados favorece un comportamiento productivo comparable al observado en animales con dietas con APC y plasma animal, con una similar digestibilidad ileal de la PC, evidenciando el potencial del CPP como alternativa a los APC (Reis de Souza y col. 2019). Por otra parte, años atrás Kerr y col. (1998) con dietas con CPP para cerdos recién destetados (4.4 kg) no observaron este efecto positivo en el comportamiento productivo respecto a dietas con plasma animal. Sin embargo, al someter al CPP a un tratamiento para obtener un CPP bajo en glicoalcaloides, se presentó una respuesta cuadrática al aumento de esta proteína al reemplazar el 25, 50, 75 y 100% de plasma animal de la dieta, sobre la ganancia de peso y consumo de alimento.

Respecto al efecto del CPP sobre algunos parámetros de la morfología intestinal, Jin y col. (2008) no encontraron efecto positivo ante el incremento de la inclusión de CPP en la dieta de cerdos de destete. sobre la altura de vellosidades y profundidad de las criptas en duodeno, yeyuno e íleon. En cuanto a la digestibilidad Jin y col. (2008, 2009) observaron que inclusiones crecientes del CPP en las dietas de animales de destete y en comparación a una dieta con APC. no se modificó la digestibilidad ileal aparente de AA respecto a una dieta con APC. En animales de talla mayor la proteína de papa es capaz de mostrar ciertos efectos ya que en cerdos de crecimiento de acuerdo con Cotten y col. (2016) esta proteína obtuvo similar digestibilidad ileal estandarizada y aparente del nitrógeno al de proteínas más comunes como la del concentrado y aislado de soya, así como de la mayoría de los AA, destacando incluso valores mayores en el CPP para leucina y treonina. De manera similar Tuśnio y col. (2011) reportaron que la proteína de

papa en dietas de cerdos de crecimiento no influyó en el peso relativo del estómago y yeyuno, así como de algunos aspectos morfológicos intestinales, pero si en menor digestibilidad ileal aparente de los AA respecto a una dieta con caseína como fuente de proteína, aunque sin reflejarse reducción sobre el comportamiento productivo, nitrógeno absorbido, así como de la energía digestible y metabolizable. Por lo tanto, los datos de los estudios antes mencionados dejan muy claro que el mecanismo de acción de la proteína de papa sobre el comportamiento productivo del cerdo de destete parece estar relacionado no solo con el alto valor nutricional de sus AA, sino que también y posiblemente tiene una fuerte relación la acción de ciertos péptidos que puedan estar actuando con un efecto antimicrobiano similar al ejercido por distintos APC (Waglay y col. 2014; Bártová y col. 2019).

## Justificación

La incidencia de desórdenes digestivos y el bajo crecimiento que se propicia en el cerdo recién destetado ocasiona pérdidas económicas en la producción porcina. Sin embargo, esto puede ser controlado con la adición en la alimentación de un concentrado de proteína de papa que contenga los péptidos Potamina-1, Snakina-1 y 2, resultaría en una propuesta para prevenir o atenuar los problemas gastrointestinales a los que son susceptibles los lechones de destete.

## Objetivo General

Evaluar el efecto de la adición de 6% de CPP en una dieta iniciadora sobre algunas características morfofisiológicas y microbiológicas del aparato digestivo de lechones destetados.

## Objetivos específicos

En cerdos recién destetados alimentados con una dieta adicionada con 6% de CPP determinar:

- El comportamiento zootécnico, la presencia y severidad de diarreas durante el periodo experimental.
- El balance de nitrógeno y energía de los lechones, así como la digestibilidad de algunos nutrientes.
- El efecto antibacteriano del concentrado de proteína de papa sobre la relación de coliformes y *Lactobacillus* presentes en heces.
- La integridad intestinal: Altura de vellosidades y profundidad de criptas intestinales de duodeno, yeyuno e íleon.
- El peso y pH de los órganos digestivos de los lechones.
- La presencia de péptidos antimicrobianos (SN-1, SN-2 y PT-1) en

el concentrado de papa, y en la digesta de cerdos de destete.

## **Hipótesis**

El concentrado de papa contiene péptidos antimicrobianos, los cuales tienen efectos benéficos sobre algunas características morfofisiológicas y microbiológicas del cerdo recién destetado.

## **Materiales y métodos**

El estudio se llevó a cabo en la Unidad Metabólica y en el Laboratorio de Biología Molecular del Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Fisiología y Mejoramiento Animal del INIFAP, Colón, Querétaro, México. Los análisis de histología se realizaron en el Laboratorio de Nutrición Animal de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro y la producción de anticuerpos en el área canícula del Campus Amazcala de la Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma de Querétaro.

## **Animales y Alojamiento**

Se utilizaron un total de 12 cerdos macho castrados, con peso un promedio de 8.5 kg y 26 días de edad. Los lechones se alojaron individualmente en jaulas metabólicas provistas con un comedero y bebedero en un cuarto con temperatura controlada fluctuando entre los 26 y 29°C durante la recepción de los animales y disminuyendo 1°C la semana posterior. Cada jaula contó con una malla que permitió la separación y colecta de heces y un embudo para la colecta de orina.

## **Tratamientos: Dietas experimentales**

Los tratamientos fueron 2 dietas experimentales (**Cuadro 2**) en presentación de harina con alto nivel de proteína cruda (> 20%): Una dieta control (C) y una dieta con la inclusión del 6% de concentrado de proteína de papa (CPP 6%) Ambas

dietas se ajustaron para cubrir los requerimientos del NRC (2012). Cada cerdo se consideró la unidad experimental (6 réplicas/tratamiento).

**Cuadro 2. Composición de las dietas experimentales**

Ingrediente, %	Tratamientos	
	Control (C)	CPP 6%
Almidón de Maíz	43.622	42.140
CPP	-	6.000
Lactosa	20.619	20.619
Caseína	25.356	21.033
Maíz, Aceite	3.000	3.000
Sal Común	0.600	0.600
Carbonato de calcio	0.195	0.173
Fosfato Bicálcico	2.660	2.754
Oxido de titanio	0.300	0.300
Colina	0.145	0.145
CFC <sup>1</sup>	3.333	3.067
Vitaminas <sup>2</sup>	0.070	0.070
Minerales <sup>3</sup>	0.100	0.100
<b>Análisis químico, %</b>		
Materia seca	90.77	93.63
Energía bruta, Kcal/kg	4100.43	4176.37
FDN	2.82	2.28
Proteína cruda	22.71	22.96

<sup>1</sup>Concentrado de fibra cruda: Arbocel®. <sup>2</sup>Premezcla de vitaminas que aporta por kg de dieta: vit. A 10,200 UI, vit. D 1980 UI, vit. E 60 UI, vit. K 1.2 mg, riboflavina 7.2 mg, cianocobalamina 0.04 mg, niacina 36 mg, ácido pantoténico 16.55 mg, tiamina 0.30 mg, piridoxina 0.31 mg, biotina 0.08 mg, ácido fólico 0.75 mg. <sup>3</sup>Premezcla de minerales que aporta por kg de dieta: cobalto 0.72 mg, cobre 14.4 mg, hierro 120 mg, manganeso 36 mg, selenio 0.30 mg, iodo 0.96 mg, zinc 144 mg.

El **Cuadro 3** describe la composición del concentrado de proteína de papa (CPP)-

**Cuadro 3. Composición del concentrado de proteína de papa (CPP)**

<b>CPP</b>	<b>Porcentaje</b>
Materia seca	92.28
Proteína cruda	78.92
Energía bruta, kcal	5290.00
FDN	0.74
Cenizas	0.57

### **Comportamiento zootécnico**

Los lechones se pesaron los días 1, 8, 13 y 17 del experimento con la finalidad de determinar la ganancia diaria de peso (GDP). Diariamente se registró el alimento ofrecido y rechazado para calcular el consumo diario de alimento (CDA) y la eficiencia alimenticia (EA) por cerdo.

### **Prueba de digestibilidad y balance de nitrógeno y energía**

El estudio de digestibilidad de nutrientes y el balance de nitrógeno se realizó después de 8 días de adaptación a las dietas, y durante 5 días. En esta etapa se proporcionó en la dieta óxido férrico (3 g/kg) como marcador para determinar el inicio de colecta de muestras de heces y orina correspondientes al periodo experimental. El sexto día (un día después del fin del periodo experimental) se administró el marcador en el alimento para determinar mediante las heces marcadas el fin del periodo experimental. Las muestras de orina se colectaron diariamente durante el periodo experimental con un contenedor con lana de vidrio

como filtro del recipiente receptor de la orina y se le adicionaron 40 ml de HCl 6M con la finalidad de acidificar y evitar la volatilización del N en forma de amoníaco. Cada día se conservó una alícuota del 20% de la orina producida. Ambas muestras (heces y orina) se conservaron a – 20 °C hasta su procesamiento.

### **Prueba de digestibilidad**

El coeficiente de digestibilidad aparente de las dietas experimentales se calculó utilizando la ecuación propuesta por Mariscal y *col.* (2009):

$$CDDA = 1 - [(InD \times AF) / (AD \times InF)] \times 100$$

Donde, CDDA es la digestibilidad aparente de MS, Energía y PC en las dietas (%); InD es la concentración del marcador en las dietas experimentales (mg/kg MS); AF es la concentración de MS, Energía y PC en las heces (mg/kg MS); AD es la concentración de MS, Energía y PC en las dietas experimentales (mg/kg MS); e InF es la concentración del marcador en las heces (mg/kg MS).

La digestibilidad aparente del CPP se calculó de acuerdo con la metodología de Fan y Sauer (1995).

$$DA = (DD - (DB \times SB)) / AS$$

Donde DA es digestibilidad aparente del CPP, DD es la digestibilidad aparente de la dieta, BD es el coeficiente de digestibilidad de la dieta basal, SB es la contribución de la caseína a la dieta ensayo y SA es el porcentaje de PC del CPP en la dieta ensayo.

### **Balance de nitrógeno y energía**

Para el estudio de balance de nitrógeno y energía se colectaron muestras de orina diariamente con un contenedor con lana de vidrio como filtro del recipiente receptor de la orina y se le adicionaron 40 ml de HCl 6M con la finalidad de

acidificar y evitar la volatilización del N en forma de amoníaco. Cada día se conservó una alícuota del 20% de la orina producida. Ambas muestras (heces y orina) se conservaron a – 20 °C hasta su procesamiento.

El consumo de alimento se utilizó para obtener el consumo de materia seca (g/día), nitrógeno (g/día) y energía (Kcal/día), multiplicando el consumo de alimento por la concentración del nutriente en la dieta. La estimación de la excreción de materia seca (g/día), nitrógeno (g/día) y energía (Kcal/día) en heces se realizó al multiplicar la cantidad de heces producidas en base seca por la concentración de nutrimentos en las heces. La estimación de la excreción de nitrógeno (g/día) y energía (Kcal/día) en orina se estimó multiplicando el total de orina producida por la concentración de nutrimentos en la orina.

### **Análisis de laboratorio**

Las heces se descongelaron, y secaron en una estufa de aire forzado a 60°C. Las muestras cada alimento y heces fueron homogeneizadas respectivamente, y se molieron en un molino a través de una criba de 1 mm, para posteriormente analizar su contenido de proteína cruda (AOAC, 2002), energía bruta (Bateman, 1970) y titanio como marcador de digestibilidad (Myers y col. 2004), y calcular los coeficientes de digestibilidad total aparente.

### **Cuantificación de coliformes y *Lactobacillus* en heces**

Al finalizar la colecta de heces perteneciente al balance de nitrógeno y energía se colectó una muestra de heces de dos a tres gramos por animal de cada tratamiento para realizar el conteo de coliformes y *Lactobacillus* para determinar el efecto sobre estos microorganismos que tuvo el CPP al ser administrado mediante la dieta. Los medios de cultivo fueron agar de bilis y rojo violeta (Bioxon) para coliformes y para bacterias lácticas agar MRS Lactobacilos (Difco). La técnica fue con diluciones seriadas y siembra en superficie de 100 microlitros. Placas incubadas a 37 °C. Condiciones aerobias (coliformes) y anaerobias

(lácticas) (NOM-113-SSA1-1994).

### **Colecta de muestras del aparato gastrointestinal**

El día 17 del experimento se procedió al sacrificio a los cerdos de cada tratamiento. Los cerdos se tranquilizaron y desensibilizaron farmacológicamente (Azaperona: 20 mg/kg de peso; Sural®) para posteriormente sacrificarse por sobre dosis de anestesia (Pentobarbital sódico: 630 mg; Pisabental, PISA®). Se procedió con la apertura de la cavidad abdominal para extraer los órganos digestivos. De los contenidos de estómago, yeyuno, íleon, ciego y colon se midió el pH con un potenciómetro, y posteriormente se recolectaron las digestas de estómago, yeyuno, íleon y colon conservándose en congelación a -80°C para su posterior liofilización. Los estómagos, intestinos delgados, intestinos gruesos, hígados y páncreas se lavaron y pesaron para calcular su peso relativo.

### **Morfología de vellosidades y criptas intestinales**

Para evaluar morfológicamente la mucosa intestinal, se colectaron y cortaron longitudinalmente en la inserción anti mesentérica muestras de duodeno, yeyuno e íleon, así como de colon. Cada muestra de tejido se fijó en formalina en una relación 1:10. Una zona de 2 cm de ancho de la mucosa se fijó en parafina, para cortar secciones (de 5 µm) y teñir con el procedimiento H y E, para determinar la profundidad de la cripta (µm) y longitud de las vellosidades (µm). Se utilizó un portaobjetos por muestra de tejido y se tomaron los valores medios para un mínimo de 10 vellosidades y criptas utilizando un microscopio óptico con el objetivo 10x (primo Star, Carl Zeiss, Alemania) y el software ZEN (Carl Zeiss, Alemania) (Vente-Spreewenbergh y *col.* 2003; Reis de Sousa y *col.* 2007).

### **Verificación de PAM en el CPP mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC/MS)**

La estrategia experimental utilizada en este trabajo para la verificación de PT-1 y

SN- 1 y SN-2 en el CPP, constó de dos ensayos. En el primero se identificaron los péptidos del CPP por LC/MS para evidenciar la presencia de Potamina – 1 y Snakina - 1 y 2.

#### *Patrón electroforético de proteínas de bajo peso molecular del CPP*

Mediante una electroforesis en gel de poliacrilamida en una dimensión se evidenció el patrón electroforético de las proteínas de CPP, a partir de la cual se cortaron las bandas de bajo peso molecular y se enviaron a identificar. Para iniciar con el ensayo el CPP se sometió a una extracción de proteínas con ácido tricloroacético (TCA) a partir de dos gramos de CPP (Protamyl® PF, Avebe) y 20 ml de PBS 1 X con inhibidor de proteasa cOmplete, EDTA-free (Roche, Cat. 11873580001, EE. UU.) posteriormente se homogenizó la solución por 30 minutos (Anexo 1). A la muestra de proteína se le añadieron 100 µl de buffer muestra tricina (Bio-Rad, Cat: 161-0739, EE. UU.). La muestra se llevó a ebullición (95°C por 5 min), posteriormente se colocaron tres mg de proteína de papa por pozo. La electroforesis se realizó en geles SDS (Dodesil sulfonato de sodio) de Tris-Tricina 16.5% de 10 pozos (Bio Rad Mini-PROTEAN®, EE. UU). El buffer de corrida utilizado fue Tris/Tricina/SDS 1x (Bio Rad, Cat: 1610744, EE. UU). Las condiciones de corrida fueron 100 V por 100 min y se utilizó un marcador de masa molecular de 2 a 250 kDa (Bio Rad Precision Plus Protein™ Dual Xtra Standars, Cat: 161-0397, EE. UU). Posteriormente se realizó un lavado del gel con agua destilada filtrada. El gel se fijó en una solución con 10% de ácido acético glacial y 50% de etanol desnaturalizado por 1 hora. Se realizó un lavado con agua destilada filtrada para teñir con 50 ml de Coomassie G - 250 (Bio-Rad, Cat: 1610786, EE. UU.) por 1 hora. Se destiñó el gel en agua destilada filtrada por 10 horas.

*Identificación de péptidos por (LC/MS):* Se utilizaron cuatro bandas (por duplicado) del gel de electroforesis cercanas a los pesos moleculares de los péptidos objetivo para identificar las proteínas presentes en el CPP mediante LC/MS. El análisis se

llevó a cabo con un cromatógrafo de líquidos Eksigent nanoLC 425 acoplado al espectrómetro de masas AB Sciex TripleTOF 5600+ en las instalaciones de la Red de Apoyo a la Investigación de la UNAM.

Análisis bioinformático de secuencias obtenidas por LC/MS para determinar el grado de conservación con los PAM: A través un análisis bioinformático de los péptidos reportados mediante la herramienta BLAST (por sus siglas en inglés) del Centro Nacional de Información Biotecnológica NCBI, Biblioteca Nacional de Medicina de EE. UU NLH, (Stephen y col 1997) así como con alineamiento de secuencias utilizando la base de datos GenomeNet del Centro de bioinformática de Kyoto mediante la herramienta bioinformática ClustalW (Thompson y col, 1994) se analizó la identidad de los péptidos en el CPP con los péptidos PT-1, SN-1 y SN-2.

### **Identificación de PAM en el CPP y en la digesta de cerdos recién destetados mediante western blot**

El segundo ensayo para evidenciar la presencia de los PAM PT-1 y SN- 1 y SN-2 contempló la búsqueda de péptidos en el CPP mediante western blot. Este ensayo implicó la utilización de anticuerpos específicos para los péptidos PT-1 y SN- 1 y SN-2, para ello se realizó la síntesis de una fracción inmunogénica de cada péptido.

Síntesis de péptidos antigénicos múltiples (MAPs): De acuerdo con la secuencia de cada péptido antimicrobiano objetivo (PT-1 y SN- 1 y SN-2) se realizó un análisis de predicción de epítomos inmunogénicos utilizando el software ABCpred (Saha y Raghava, 2006). A partir de la fracción antigénica seleccionada (**Anexo 2**) se sintetizó cada péptido (Peptide 2.0 inc), formando una cadena de 8 péptidos multi antigénicos (MAP por sus siglas en inglés).

Producción de anticuerpos anti-PT-1, anti-SN-1 y anti-SN-2: Los péptidos sintetizados (MAP) de PT-1, SN1 y SN2 denominados SPT-1, SSN1 y SSN-2

respectivamente, se utilizaron para la producción de anticuerpos en conejos macho raza Nueva Zelanda (3 para cada péptido) de 63 días de edad alojados en jaulas individuales. Previo a la primera inmunización (3 días) se realizó un sangrado de la vena marginal de cada conejo para obtener suero preinmune el cual se utilizó como control. La inmunización se realizó a intervalos de 15 días (3 veces) (Díaz y col. 2014; Gómez Soto y col. 2017). La dosis correspondiente de cada péptido en el día cero fue 0.5 mg de péptido diluido en 500 µl de PBS1 X y emulsificado con 500 µl de adyuvante de Freud completo (cada ml contiene 1 mg de *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra, ATCC 25177, destruido por calor y secado, 0,85 ml de aceite de parafina y 0,15 ml de monooleato de manida que dispersa el aceite en gotas pequeñas que rodean al antígeno y este último se libera con lentitud del sitio de inoculación) (Sigma Cat. F5881, EE. UU) e inyectado por vía subcutánea. Se realizaron dos refuerzos (día 14 y 28) con 0.25 mg (de cada péptido) en 500 ml de PBS1x y con 500 µl de adyuvante de Freud incompleto (cada ml contiene 0,85 ml de aceite de parafina y 0,15 ml de monooleato de manida; Cat. F5506 Sigma) vía subcutánea (Díaz y col. 2014; García – Casanova y col. 2008; Gómez Soto y col. 2017). Finalizado el periodo de inmunización los conejos fueron sacrificados el día 35 según la NOM 033 (se utilizó electricidad para insensibilizar y luego se efectuó el corte de la yugular), para mediante la exanguinación obtener la mayor cantidad de muestra de sangre (Díaz y col. 2014; Gómez Soto y col. 2017).

*Inmunodetección de antígenos nativos en el CPP y de la digesta de cerdos de destete alimentados con las dietas experimentales:* La producción de anticuerpos para cada suero inmune fue analizada mediante la técnica de Western blot determinando una relación 1:25 del anticuerpo primario y utilizado como control el suero preinmune y los péptidos sintéticos como antígeno (1µg/pozo). Posteriormente los anticuerpos específicos anti-potamina-1, anti-snakina-1 y anti-snakina-2 se utilizaron para identificar los péptidos antimicrobianos en el CPP y en la digesta de cerdos recién destetados y alimentados con una dieta conteniendo

CPP al 6% y la dieta control mediante la técnica de Western blot. Las muestras de contenido intestinal de estómago, yeyuno, íleon y colón de cada animal (a partir de 5 mg de contenido intestinal liofilizado) fueron rehidratadas en 500 microlitros de PBS para formar una mezcla por cada compartimento digestivo para cada tratamiento (resultando en 3 réplicas). El procedimiento comenzó con una electroforesis para el CPP y cada muestra de contenido intestinal de acuerdo con la metodología antes descrita de electroforesis. Las proteínas fueron electrotransferidas a una membrana de nitrocelulosa de 0.45 µm por 25 min a 20 V. Posteriormente se bloqueó la membrana con una solución de leche al 5% por 10 horas a 4°C. Se continuó con tres lavados con TBS tween 20 al 1% por 15 minutos para incubar con el anticuerpo anti-potamina-1 anti-snakina-1 y anti-snakina-2 (anticuerpo primario 1:100 por 10 hora). Se realizaron tres lavados con TBS tween 1% por 15 minutos y se incubó con un anticuerpo secundario (anti-conejo AT2) 1:5000 con TBS tween-leche 1% (dos horas). Se lavó tres veces con TBS tween 1% por 15 minutos para permitir una reacción de quimioluminiscencia enzimática (Bio-Rad, Clarity Western ECL substrate, Cat1705061, EE. UU) en relación 1:1, 5 minutos.

*Análisis de identidad de los péptidos reconocibles por los anticuerpos anti-PT-1, anti-SN-1 y anti-SN-2 en el ambiente intestinal de los animales experimentales:* Se realizó un análisis bioinformático de proteínas con la herramienta básica de búsqueda de alineación local BLAST (por sus siglas en inglés) del Centro Nacional de Información Biotecnológica NCBI, Biblioteca Nacional de Medicina de EE. UU NLH, (Stephen y col 1997) para determinar la identidad de proteínas de cerdo y/o de microorganismos típicos en el ambiente intestinal de cerdos de destete, con proteínas reconocibles por los anticuerpos primarios diseñados y usados con la técnica de western blot.

#### **Análisis estadístico:**

El análisis estadístico se realizó según un modelo de bloques completamente al

azar, considerando como bloque las salas de experimentación, en el cual se tuvieron dos tratamientos (Control y 6% de CPP) y seis repeticiones por tratamiento, donde el cerdo destetado se consideró como la unidad experimental para las pruebas de comportamiento productivo y balance de nitrógeno. Para los estudios de biología molecular, estructura intestinal (histología, bacteriología se consideró como la unidad experimental cada muestra respectiva de cada cerdo en cada tratamiento. El análisis estadístico se realizó empleando el procedimiento GLM del paquete estadístico SAS 9.1, 2003 (SAS Inst. Inc., Cary, NC). Los resultados se presentan como las medias de mínimos cuadrados, el error estándar (EE) y la probabilidad del modelo para cada una de las variables. Las diferencias se consideraron significativas cuando ( $P < 0.05$ ), y una tendencia cuando ( $0.05 < P < 0.10$ ).

## Resultados

### Comportamiento zootécnico

En el **Cuadro 4** se presentan los resultados del comportamiento zootécnico del día 1 al 8 posdestete. El peso al final de este periodo fue similar ( $P > 0.05$ ) en los animales de ambas dietas con una diferencia del 1.3% (peso al día 8 posdestete; 8.636 y 8.746 kg para los tratamientos control y CPP 6% respectivamente). En cuanto al CDA (0.128 vs 0.133 kg para los tratamientos control y CPP 6% respectivamente), la GDP (0.074 vs 0.097 kg para los tratamientos control y CPP 6% respectivamente) y la EA (0.613 vs 0.722 para los tratamientos control y CPP 6% respectivamente) no se observaron diferencias estadísticas ( $P > 0.05$ ) entre tratamientos.

**Cuadro 4: Comportamiento zootécnico del día 1 a 8.**

Parámetro	Tratamientos		EEM	P valor
	Control	CPP 6%		
Peso d 1, kg	8.042	7.966	0.061	0.539
Peso d 8, kg	8.636	8.746	0.083	0.627
Consumo de alimento, kg	1.022	1.058	0.046	0.741
Ganancia de peso, kg	0.594	0.780	0.110	0.481
CDA, kg	0.128	0.133	0.006	0.720
GDP, kg	0.074	0.097	0.014	0.482
EA	0.613	0.722	0.111	0.687

El **Cuadro 5** muestra el comportamiento productivo de los animales durante el periodo destinado a la colecta de muestras para la prueba de digestibilidad el BNyE. El peso inicial y final no mostró diferencia estadística ( $P > 0.05$ ). El parámetro del CDA entretratamientos resultó similar ( $P > 0.05$ ) 0.282 vs 0.287 kg para los tratamientos control y CPP 6% respectivamente, existiendo solo una diferencia de 1.5%. La GDP (0.181 vs 0.163 kg para los tratamientos control y CPP 6% respectivamente) entre dietas no fue diferente ( $P > 0.05$ ), con una EA similar ( $P > 0.05$ ) para los animales de ambas dietas (0.634 vs 0.722 para los tratamientos control y CPP 6% respectivamente).

**Cuadro 5: Comportamiento zootécnico del día 8 a 13. (Durante el Balance de N y E y prueba de digestibilidad)**

Parámetro	Tratamientos		EEM	P valor
	Control	CPP 6%		
peso d 8, kg	8.636	8.746	0.106	0.539
Peso d 13, kg	9.343	9.560	0.107	0.627
Consumo de alimento, kg	1.412	1.432	0.061	0.741
Ganancia de peso, kg	0.907	0.814	0.085	0.481
CDA, kg	0.282	0.287	0.012	0.720
GDP, kg	0.181	0.163	0.017	0.482
EA	0.643	0.550	0.050	0.687

Al observar el comportamiento zootécnico del día 1 al 17 (**Cuadro 6**), ambas dietas fueron similares ( $P > 0.05$ ) sobre el CDA y EA. Sin embargo, numéricamente la dieta con CPP 6% mostró un mayor peso final (9.658 vs 9.920 kg para los tratamientos control y CPP 6% respectivamente) y un mayor CDA al de la dieta control (0.198 vs 0.208 kg para los tratamientos control y CPP 6%

respectivamente). La GDP mostró una diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) del 17% a favor de la dieta con CPP respecto a la dieta control (0.095 vs 0.115 kg para los tratamientos control y CPP 6% respectivamente); aunque la eficiencia de igual manera fue numéricamente mayor no fue significativamente diferente ( $P > 0.05$ ) entre las dietas (0.481 vs 0.567 kg para los tratamientos control y CPP 6% respectivamente).

**Cuadro 6: Comportamiento zootécnico del día 1 a 17**

Parámetro	Tratamientos		EEM	P valor
	Control	CPP 6%		
Peso d 1, kg	8.042	7.966	0.061	0.539
Peso d 17, kg	9.658	9.920	0.090	0.222
Consumo de alimento, kg	3.364	3.572	0.115	0.542
Ganancia de peso, kg	1.616	1.954	0.082	0.047
CDA, kg	0.198	0.208	0.007	0.533
GDP, kg	0.095	0.115	0.005	0.045
EA	0.481	0.567	0.033	0.285

### Prueba de digestibilidad

Los animales en ambas dietas tuvieron un consumo de materia seca similar ( $P > 0.05$ ) de 257.43 g/d para el tratamiento control y 267.00 g/d para el tratamiento CPP 6%. En cuanto a la materia seca excretada el tratamiento control excretó 16.76 g/d y el tratamiento CPP 6% 13.84g/d con una digestibilidad de 93.19% y 93.12% para los tratamientos control y CPP 6% siendo estadísticamente similares ( $P > 0.05$ ). (**Cuadro 7**). De acuerdo con la metodología de Fan y Sauer (1995) se

determinó que digestibilidad aparente de la proteína del CPP en la dieta CPP6% fue de 90.37%.

**Cuadro 7: Datos de inicio y fin de la prueba de digestibilidad (días posteriores al destete), para la materia seca consumida, excretada y su digestibilidad.**

Parámetro	Tratamientos			P valor
	Control	CPP 6%	EEM	
Observaciones	5	5		
peso d 8, kg	8.636	8.746	0.106	0.539
Peso d 13, kg	9.343	9.560	0.107	0.627
Materia seca consumida, g/d	257.43	267.00	11.425	0.720
Matéria seca excretada, g/d	16.760	13.840	0.720	0.527
Digestibilidad de la materia seca, %	93.190	93.120	0.139	0.827

### Balance de nitrógeno y energía

El **Cuadro 8** muestra que el N consumido para los animales de la dieta control fue de 10.31 g/d el cual fue muy similar ( $P > 0.05$ ) al consumido por los animales en la dieta CPP 6% con 10.47 g/d. Asimismo, el N en heces fue de 0.34 y 0.39 g/d ( $P > 0.05$ ) para los animales en las dietas control y CPP 6%. Interesantemente existe una mayor ( $P > 0.075$ ) digestibilidad del N (96.23%) en la dieta control respecto al N de la dieta CPP 6% (95.08%). Sin embargo, esta diferencia ( $P > 0.05$ ) no se observó para el N absorbido donde los animales de la dieta control tuvieron 9.92 g/d y los de la dieta CPP 6% 10.08 g/d. Al mismo tiempo el N en orina para ambos tratamientos fue de 0.02 g /d ( $P > 0.05$ ), de forma que el N excretado ( $P > 0.05$ ) fue de 0.36 g/d para el tratamiento control y 0.42 g/d para el tratamiento CPP 6%. Por consiguiente, el N retenido fue de 9.91 g/d para el tratamiento control y de 10.06 g/d para el tratamiento CPP 6% ( $P > 0.05$ ), donde el

N retenido como porcentaje del consumido fue del 96.41 % y del 95.88 % para los tratamientos control y CPP 6% respectivamente ( $P > 0.05$ ), y el N retenido como porcentaje del absorbido fue 99.75 % para ambos tratamientos ( $P > 0.05$ ).

**Cuadro 8: Datos del balance de nitrógeno.**

Balance de nitrógeno	Tratamientos			P valor
	Control	CPP 6%	EEM	
Nitrógeno consumido, g/d	10.306	10.474	0.445	0.872
Nitrógeno en heces, g/d	0.339	0.393	0.028	0.351
Nitrógeno digestible, %	96.227	95.079	0.310	0.075
Nitrógeno absorbido, g/d	9.922	10.076	0.448	0.884
Nitrógeno en orina, g/d	0.023	0.024	0.003	0.876
Nitrógeno excretado, g/d	0.363	0.418	0.029	0.371
Nitrógeno retenido, g/d	9.912	10.055	0.450	0.915
Nitrógeno retenido, % del consumo	96.406	95.880	0.381	0.550
Nitrógeno retenido, % del absorbido	99.746	99.749	0.038	0.980

En lo que concierne a la energía consumida no se observó diferencia significativa ( $P > 0.05$ ) entre ambos tratamientos donde los animales con la dieta control tuvieron un consumo de 1055.56 kcal/d y los animales de la dieta CPP 6% de 1115.19 kcal/d, (**Cuadro 9**). La energía en heces fue de 69.44 kcal/d y 59.67 kcal/d para los tratamientos control y CPP 6% respectivamente ( $P > 0.05$ ). En consecuencia, la energía digestible representó el 93.75% (989.34 kcal/d) para los animales con la dieta control y del 93.34% (1040.65 kcal/d) en los animales dentro de la dieta CPP 6% ( $P > 0.05$ ). Acerca de la energía en orina, los animales en el

tratamiento control tuvieron 44.26 kcal/d y 57.61 kcal/d los animales en la dieta CPP 6% ( $P > 0.05$ ). La energía excretada fue 113.70 kcal/d y 117.28 kcal/d para los tratamientos control y CPP 6% ( $P > 0.05$ ). De modo que la energía metabolizable para los animales en la dieta control fue de 945.08 kcal/d (89.62%) y para la dieta con CPP 6% de 983.04 (88.18%) ( $P > 0.05$ ).

**Cuadro 9: Datos del balance de energía.**

Balance de energía	tratamientos			P valor
	Control	CPP 6%	EEM	
Energía consumida, kcal/d	1055.558	1115.185	48.231	0.594
Energía en heces, kcal/d	69.444	59.667	2.940	0.122
Energía digestible, %	93.754	93.338	0.217	0.369
Energía digestible, kcal/d	989.342	1040.652	44.256	0.619
Energía en orina, kcal/d	44.259	57.611	4.603	0.175
Energía excretada, kcal/d	113.704	117.278	5.120	0.753
Energía metabolizable, %	89.617	88.175	0.487	0.151
Energía metabolizable, kcal/d	945.082	983.041	40.954	0.693

### **Actividad del concentrado de proteína de papa sobre coliformes y *lactobacillus* en heces**

El efecto de los tratamientos sobre algunos géneros bacterias en heces se observa en el **Cuadro 10**, donde los coliformes para los tratamientos control y

CPP 6% tuvieron 5.65 UFC y 5.80 UFC ( $P > 0.05$ ), donde tampoco se observó una diferencia estadística ( $P > 0.05$ ) en cuanto a bacterias lácticas, con 5.45 UFC/g y 5.16 UFC/g para los tratamientos control y CPP6% respectivamente

**Cuadro 10: Efecto del CPP 6% sobre bacterias coliformes y lácticas. Log 10 UFC/g.**

	Tratamiento		EEM	P valor
	Control	CPP 6%		
Coliformes	5.65	5.80	0.08	0.314
Lácticas	5.45	5.16	0.22	0.531

### Peso y pH de órganos de tracto gastrointestinal

Desde la perspectiva del efecto de los tratamientos sobre el peso de los órganos del aparato gastrointestinal al día 17 después del destete (**Cuadro 11**), los animales de la dieta control tuvieron pesos de 71.29 g, 203.31 g, 14.20 g, 330.57 g y 120.97 g, para el estómago, hígado, páncreas, intestino delgado e intestino grueso respectivamente, y para los animales en la dieta CPP 6% de 70.75 g, 210.13g, 14.56 g, 357.15 g y 125.23 g, en cuanto al estómago, hígado, páncreas, intestino delgado e intestino grueso ( $P > 0.05$ ).

Al realizar el análisis en cuanto al peso relativo de los órganos antes mencionados el tratamiento control tuvo pesos para el estómago, hígado, páncreas, intestino delgado e intestino grueso de 7.34 g, 20.97 g, 1.32 g, 34.05 g, y 12.46 g respectivamente sin mostrar diferencia ( $P > 0.05$ ) con el peso relativo de los órganos de los animales del tratamiento CPP 6% con 7.36 g, 21.70 g, 1.60 g, 36.85 g y 12.90 g para el estómago, hígado, páncreas, intestino delgado e intestino grueso, respectivamente.

**Cuadro 11: Efecto del CPP 6% sobre el peso los órganos del aparato gastrointestinal.**

	Tratamientos		EEM	P valor
	Control	CPP 6%		
<i>Peso</i>				
Peso d 17, kg	9.701	9.668	0.149	0.914
Estómago, g	71.298	70.750	2.476	0.924
Hígado, g	203.311	210.133	5.854	0.612
Páncreas, g	14.200	14.566	0.296	0.730
Intestino delgado, g	330.570	357.150	12.238	0.316
Intestino grueso, g	120.977	125.233	5.613	0.710
<i>Peso relativo</i>				
Estómago, g	7.340	7.368	0.310	0.958
Hígado, g	20.970	21.700	0.482	0.470
Páncreas, g	1.328	1.605	0.230	0.061
Intestino delgado, g	34.050	36.858	0.953	0.176
Intestino grueso, g	12.466	12.902	0.478	0.666

En términos del efecto de las dietas sobre el pH de los órganos del aparato gastrointestinal (**Cuadro 12**), no se encontraron diferencias ( $P > 0.05$ ) para los valores de 4.34, 5.59, 6.10, 7.04, 6.12, y 6.08 respectivamente para el estómago, duodeno, yeyuno, íleon ciego y colon de los animales en la dieta control en comparación con los valores de 4.55, 5.50, 5.87, 6.64, 6.02 y 6.09 del estómago, duodeno, yeyuno, íleon ciego y colon respectivamente para los animales en el tratamiento CPP 6%.

**Cuadro 12: Efecto del CPP 6% sobre el pH de los órganos del aparato gastrointestinal.**

	Tratamientos		EEM	P valor
	Control	CPP 6%		
<b>Estómago</b>	4.342	4.550	0.132	0.478
<b>Duodeno</b>	5.598	5.501	0.132	0.747
<b>Yeyuno</b>	6.102	5.871	0.123	0.390
<b>íleon</b>	7.040	6.640	0.169	0.426
<b>Ciego</b>	6.127	6.028	0.051	0.372
<b>Colon</b>	6.080	6.090	0.063	0.948

### Morfología intestinal

En el aspecto de la morfología intestinal (**Cuadro13**) el tratamiento control mostró en duodeno una altura de vellosidades de 425.04  $\mu\text{m}$ , ancho de 148.71  $\mu\text{m}$  y profundidad de la cripta de 255.00  $\mu\text{m}$ , datos similares ( $P > 0.05$ ) a los del tratamiento CPP 6% con 412.57  $\mu\text{m}$  en la altura de la vellosidad, 145.19  $\mu\text{m}$  de anchura, y profundidad de la cripta de 246.39  $\mu\text{m}$ . Para el yeyuno animales en la dieta control, la altura de vellosidad fue de 274.26  $\mu\text{m}$  con una anchura de 129  $\mu\text{m}$  y profundidad de cripta de 184.26  $\mu\text{m}$ , sin diferencia ( $P > 0.05$ ) respecto a los datos de los animales en la dieta CPP 6% con una altura de vellosidad de 339.41  $\mu\text{m}$ , una anchura de 106.56  $\mu\text{m}$  y profundidad de cripta de 192.42  $\mu\text{m}$ . Respecto al íleon la altura de la vellosidad, así como la profundidad de la cripta de los animales en el tratamiento control fue de 340.95  $\mu\text{m}$  y 243.47  $\mu\text{m}$  respectivamente, y para los animales del tratamiento CPP 6% ( $P > 0.05$ ) de 309.06  $\mu\text{m}$  y 238.83  $\mu\text{m}$  para la altura de la vellosidad así como la profundidad de la cripta respectivamente. Donde la anchura entre ambos tratamientos fue mayor ( $P < 0.05$ ) para el tratamiento CPP 6%; 128.09  $\mu\text{m}$  para el tratamiento control y 148.40  $\mu\text{m}$  para el tratamiento CPP 6%. La profundidad de la cripta en colon no fue diferente ( $P > 0.05$ ) entre tratamientos, con 382.81  $\mu\text{m}$  para el tratamiento control y 408.44 en el tratamiento CPP 6%.

**Cuadro 13: Efecto del concentrado de papa al 6% sobre la morfología intestinal**

	Tratamiento		EEM	P valor
	Control	CPP 6%		
<b>Duodeno</b>				
Altura vellosidad, $\mu\text{m}$	425.04	412.57	17.93	0.931
Anchura vellosidad, $\mu\text{m}$	148.71	145.19	5.829	0.796
Profundidad cripta, $\mu\text{m}$	255.00	246.39	7.87	0.594
<b>Yeyuno</b>				
Altura vellosidad, $\mu\text{m}$	274.26	339.41	27.26	0.215
Anchura vellosidad, $\mu\text{m}$	129.259	106.56	8.66	0.217
Profundidad cripta, $\mu\text{m}$	184.26	192.42	12.33	0.770
<b>Íleon</b>				
Altura vellosidad, $\mu\text{m}$	340.95	309.06	22.09	0.516
Anchura vellosidad, $\mu\text{m}$	128.09	148.40	4.55	0.019
Profundidad cripta, $\mu\text{m}$	243.47	238.83	7.91	0.799
<b>Colon</b>				
Profundidad cripta, $\mu\text{m}$	382.81	408.44	18.69	0.540

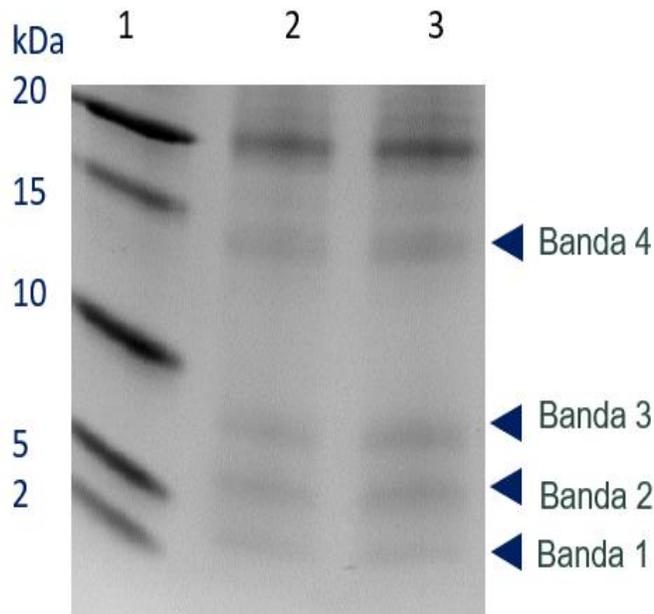
### **Verificación de PAM en el CPP mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC/MS)**

En este ensayo se identificaron los péptidos del CPP a través de LC/MS con la finalidad de evidenciar la presencia de PT-1 y SN- 1 y SN-2.

#### *Patrón electroforético de proteínas de bajo peso molecular del CPP:*

Las proteínas del CPP fueron separadas mediante electroforesis para evidenciar péptidos de bajo peso molecular, que de acuerdo con la literatura los PAM son de bajo peso molecular, cercano a los 10 kDa. La **Figura 6** muestra el patrón electroforético de proteínas del CPP con el protocolo con ácido tricloroacético (TCA) (3mg/pozo), y una muestra de CPP suspendida en PBS1x (3mg/pozo),

donde se observa una adecuada concentración de proteína en ambos protocolos que permiten visualizar el patrón electroforético y migración relativa de bandas menores a 15 kDa sugerentes de los PAM objetivo de este estudio. La banda 1 tiene una masa molecular relativa de 2.67 kDa; la banda 2 de 3.57 kDa; la banda 3 de 4.79 kDa y la banda 4 de 10.87 kDa.



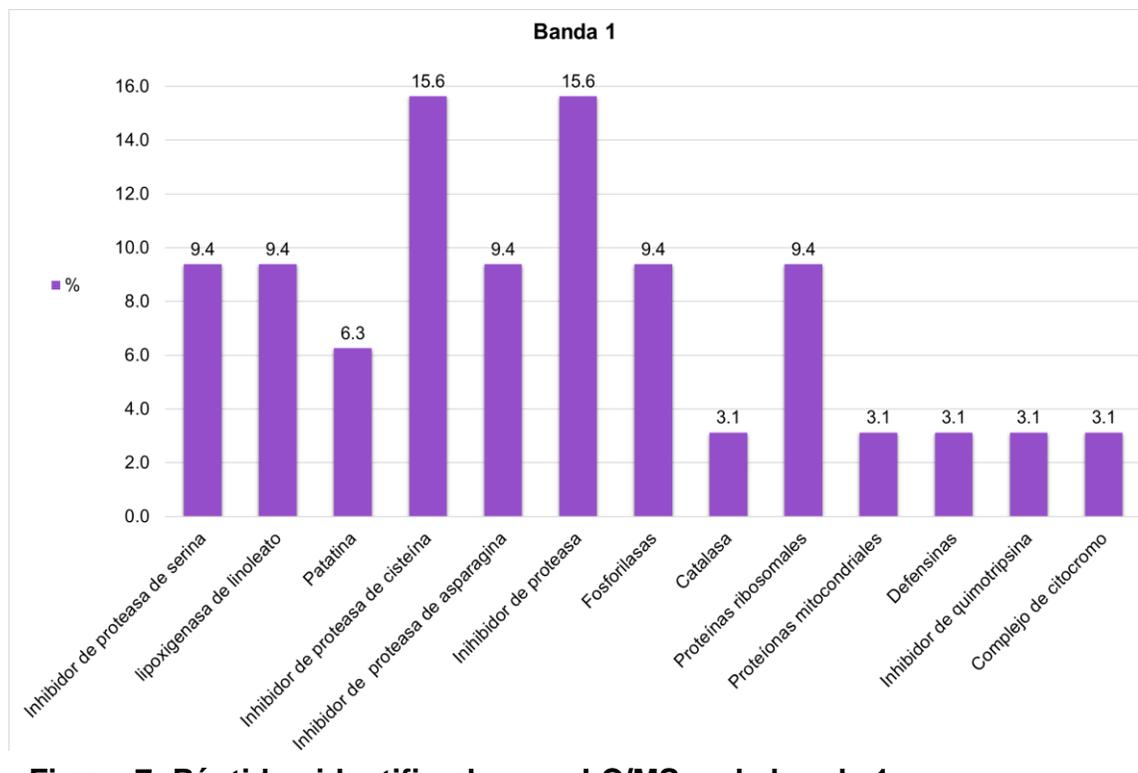
**Figura 6: Patrón electroforético de proteínas del CPP.** Carril 1: Marcador de masa molecular (kDa). Carril 2: Muestra de CPP suspendida en PBS1x. (3 mg de proteína de papa). Carriles 3: Muestra del protocolo de extracción de proteínas con TCA. (3 mg de proteína de papa). Banda1: 2.67 kDa; Banda 2: 3.57 kDa; Banda 3: 4.79 kDa; Banda 4: 10.87 kDa de acuerdo con la estimación por migración relativa.

#### Péptidos identificados por LC/MS:

Los péptidos de las bandas 1, 2, 3 y 4 fueron identificados mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC/MS) y se utilizó la base de datos Uniprot con el software ProteinPilot 5.0.1 de AB Sciex, **Anexo 1**. Se identificaron 154 péptidos en total; 32 para la banda 1, 41 para la banda 2, 37 péptidos en la

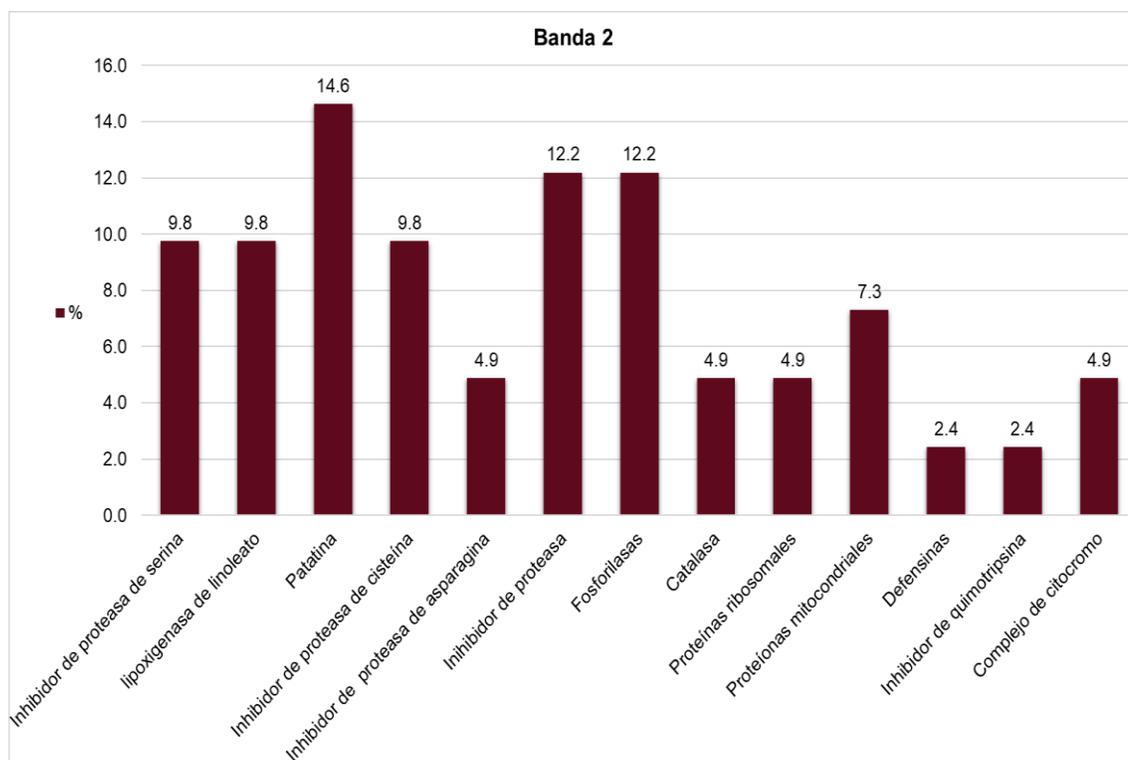
banda 3 y 44 en la banda 4. El análisis bioinformático se filtró utilizando la base de datos para proteínas *Solanum tuberosum*. Las proteínas tienen una confiabilidad de identificación mayor al 95%.

Los péptidos antimicrobianos PT-1, SN-1 y SN-2 no fueron identificados en el análisis por LC/MC. Sin embargo, interesantemente al analizar las secuencias de manera puntual; dentro de las proteínas identificadas, encontramos una gran variedad de inhibidores de distintas proteasas. Para la banda de 2.67 kDa el 9.4% de los péptidos identificados corresponden a inhibidores de proteasas de serina, un 15.6% de inhibidores proteasas de cisteína, 9.4% son inhibidores de proteasas de asparagina, e 3.1% inhibidores de quimiotripsina y el 15.6% son otros inhibidores de proteasa. El 46.9% restante corresponde a otras proteínas como lipoxigenasas, patatinas, fosforilasas, catalasas, proteínas ribosomales y mitocondriales, así como defensinas (**Figura 7**).



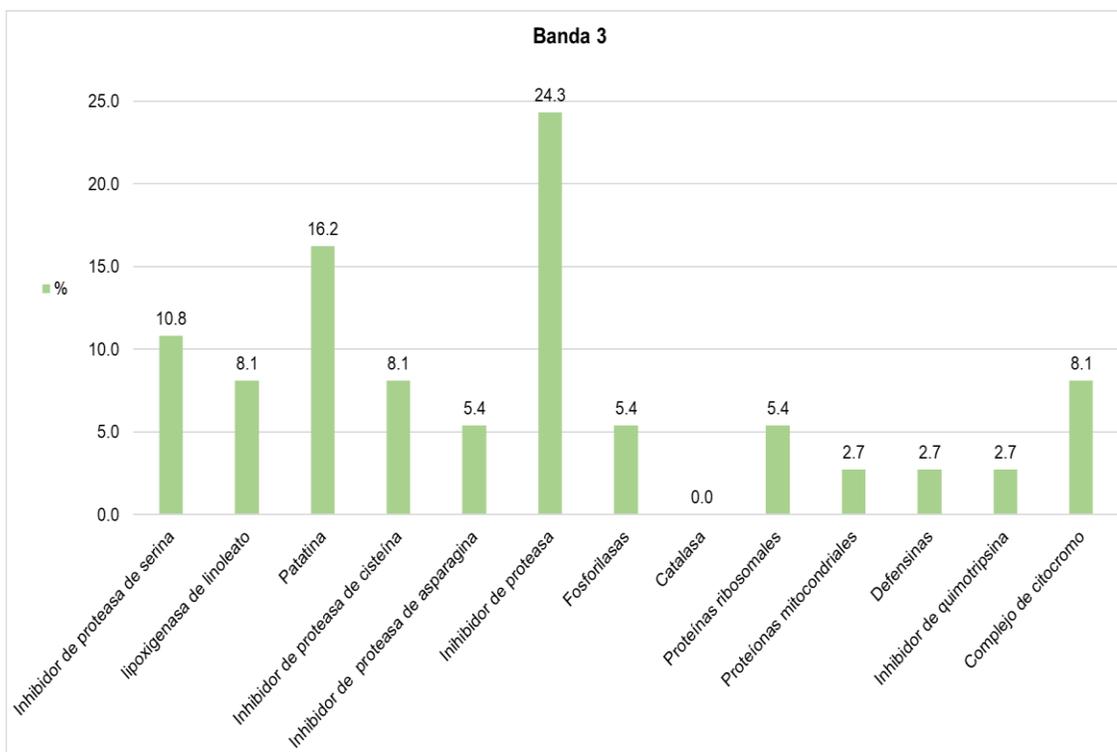
**Figura 7: Péptidos identificados por LC/MS en la banda 1.**

De los péptidos identificados en la banda 2 (**Figura 8**), el 9.8% son inhibidores de proteasa de serina y también este mismo porcentaje de inhibidores de proteasas de cisteína. El 4.9% son inhibidores de proteasa de asparagina, un 2.4% de inhibidores de quimotripsina y el 12.2% son otros inhibidores de proteasas.



**Figura 8: Péptidos identificados por LC/MS en la banda 2.**

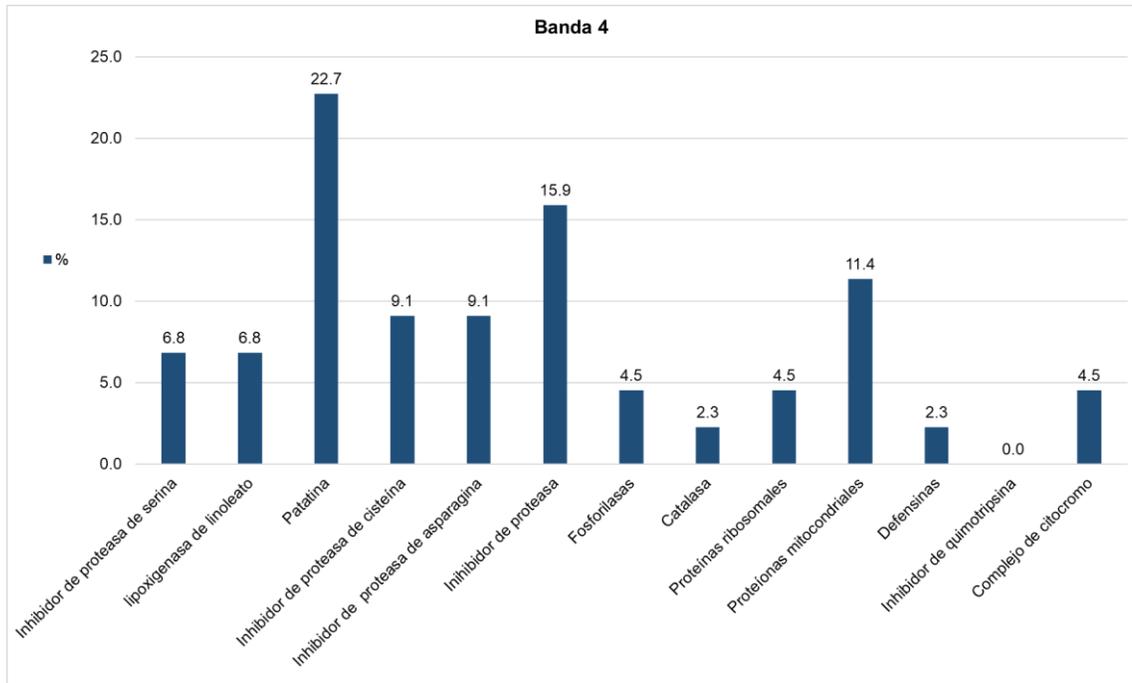
Respecto a los péptidos reportados en la banda 3 (**Figura 9**) el 10.8% son inhibidores de proteasas de serina, los inhibidores de proteasas de cisteína contemplan el 8.1%, los inhibidores de proteasa de asparagina el 5.4%, los inhibidores de quimotripsina en 2.7% y otros inhibidores de proteasa el 24.3%.



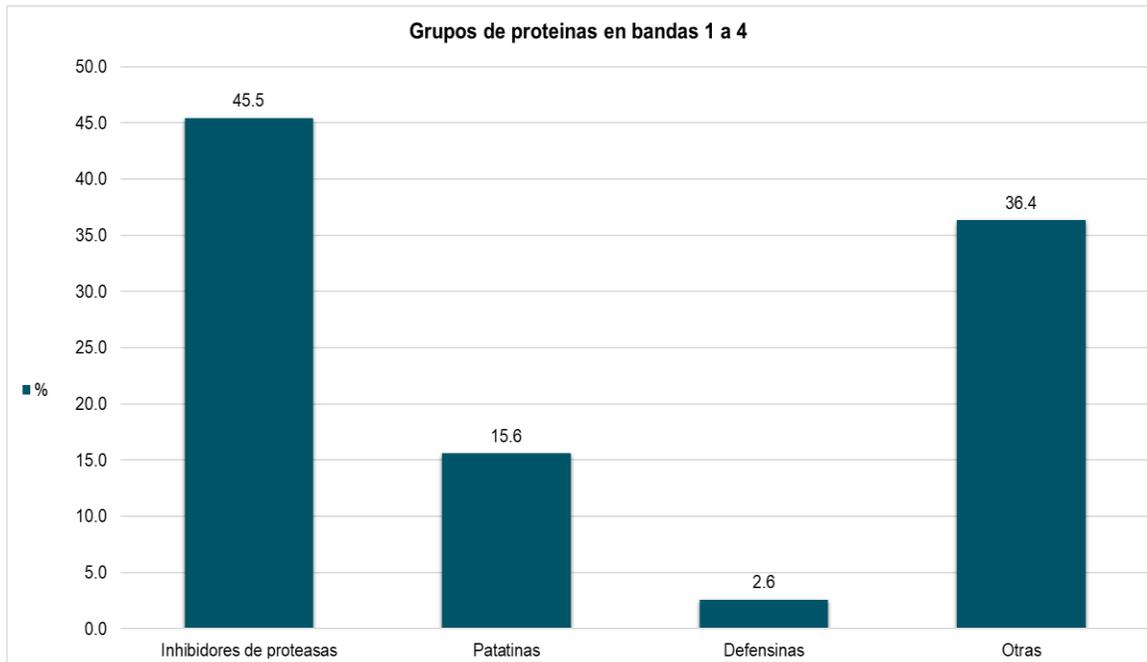
**Figura 9: Péptidos identificados por LC/MS en la banda 3.**

En cuanto a la banda 4 (**Figura 10**), los péptidos reportados por LC/MS corresponden en un 6.8% a inhibidores de proteasa de serina, un 9.1% para los inhibidores de proteasas de cisteína, 9.1% para los inhibidores de proteasas de asparagina y el 15.9% para otros inhibidores de proteasas.

Al observar el total de péptidos en las cuatro bandas la **Figura 11** muestra que la mayor parte (45.5%), son inhibidores de proteasas de serina, inhibidores de proteasas de cisteína, inhibidores de proteasas de asparagina, inhibidores de quimiotripsina y otros inhibidores de proteasa, el 15.6% son péptidos del grupo patatinas, solo el 2.6% son defensinas y 36.4% corresponde a otros péptidos.



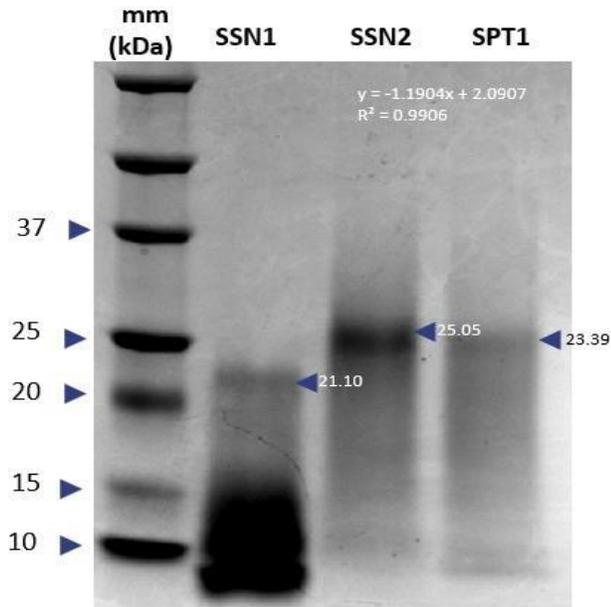
**Figura 10: Péptidos identificados por LC/MS en la banda 4.**



**Figura 11: Péptidos identificados por LC/MS en las bandas 1 a 4.**

Síntesis de péptidos antigénicos múltiples (MAPs):

Las secuencias de los péptidos PT-1, SN1 y SN-2 fueron analizadas para determinar epítomos inmunogénicos con el software ABCpred. Los resultados del análisis demuestran distintos epítomos (**Anexo 3**) en cada péptido. Posteriormente se sintetizaron péptidos con 30 residuos de aminoácidos para cada los péptidos PT-1 y SN- 1 y SN-2 con 8 ramificaciones cada uno. Se realizó una electroforesis (**Figura 12**) para evidenciar la integridad y masa molecular de los péptidos sintetizados. La cadena para el péptido sintético de PT-1 (SPT-1) en la electroforesis de acuerdo con su migración relativa mostró una masa molecular de 23.39 kDa, la cadena para el péptido sintético de SN-1 (SSN-1) una masa molecular de 21.10 kDa y el péptido sintético de SN-2 (SSN-2) una masa molecular de 25.05 kDa de acuerdo con su migración relativa.



**Figura 12: Patrón electroforético de los péptidos SPT-1, SSN-1 y SSN-2.**

Análisis bioinformático de secuencias obtenidas por LC/MC para determinar el grado de conservación con los PAM: Las secuencias de los péptidos que se obtuvieron de la LC/MC se utilizaron para realizar un alineamiento con las secuencias de los péptidos PT-1, SN-1 y SN-2 y sus fracciones sintetizadas utilizando la base de datos GenomeNet del Centro de bioinformática de Kyoto mediante la herramienta bioinformática ClustalW (Thompson y col. 1994). El análisis de las secuencias mostró un alto grado de identidad de cuatro péptidos con las secuencias de los péptidos PT-1 y el péptido sintético de este (SPT1 los cuales, por lo tanto, fueron objetivo entonces de búsqueda en los contenidos intestinales de los animales que consumieron la dieta CPP 6%). No se encontraron secuencias conservadas para los péptidos Snakina -1 y 2 en los péptidos reportados por LC/MS.

El **Cuadro 15** muestra el grado de conservación e identidad entre las secuencias del Inhibidor de proteasa tipo - 2 P303.51 (IP25) (ID UniProt: Q41488) de 154 aminoácidos (16.6 kDa) con el péptido PT-1 (ID UniProt: P84813) y la fracción que se sintetizó de PT-1 (SPT-1) mostrando una identidad del 86.9 y del 86.7% respectivamente. Este cuadro muestra también una identidad del 86.9% entre el IP25 y el PT-1 que contempla 40 AA completamente conservados y dos similarmente conservados. En cuanto a la identidad entre el IP25 y el SPT-1 del 86.67% esta se compone por 26 AA conservados y uno de menor grado de conservación.

**Cuadro 15. Alineamiento entre PT-1 y SPT-1 con el inhibidor de proteasa tipo – 2 (IP25).**

Péptido	Potamina – 1 (PT-1)	Sintético Potamina -1 (SPT-1)	Inhibidor de proteasa tipo- 2 P303.51 (IP25)
Masa (Da)	4,833		16,660
Longitud	47	30	154
<b>Alineamiento de IP25 y PT-1:</b> Identidad (%): 86.96; AA conservados (*): 40; AA con conservación similar (:): 2; AA conservados débilmente (.): 0			
PT-1	-----		-----DICTN
IP25		MAVHKEVNFVAYLLIVLGLLVLSAMEHVDAKACTLECGNLGFGICPRSEGSPENR	ICTN ****
PT-1		CCAGTKGCNTTSANGAFICEGQSDPKKPKACFLNCDPHIAYA-----	
IP25		CCAGYKGCNYYSANGAFICEGESDPKKPKACPRNCDPHIAYSKCPRSEGKSLIYPTGCTT	
		**** * : ***** : ***** :	
PT-1	-----		-----
IP25		CCTGYKGCYYFGKNGKFVCEGESDEPKANMYPAM	
<b>Alineamiento de IP25 y SPT-1:</b> Identidad (%): 86.67; AA conservados (*): 26; AA con conservación similar (:): 1; AA conservados débilmente (.): 0			
SPT-1	-----		-----
IP25		MAVHKEVNFVAYLLIVLGLLVLSAMEHVDAKACTLECGNLGFGICPRSEGSPENRICTN	
SPT-1		--AGTKGCNTTSANGAFICEGQSDPKKPKACP-----	
IP25		CCAGYKGCNYYSANGAFICEGESDPKKPKACPRNCDPHIAYSKCPRSEGKSLIYPTGCTT	
		** **** : ***** :	
SPT-1	-----		-----
IP25		CCTGYKGCYYFGKNGKFVCEGESDEPKANMYPAM	
(*): Indica AA con residuos completamente conservados, (:): Indica AA con conservación similar; (.): Indica AA conservación debil.			

El **Cuadro 16** muestra que el Inhibidor de proteasa tipo – 2 (IP2X) reportado en el CPP mediante cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas se compone de 158 aminoácidos en total (ID UniProt: Q00782) y una masa de 17.1 kDa. Este péptido tiene una identidad del 82.6% con el péptido PT-1 de 47 aminoácidos en total, siendo entonces 38 de sus AA conservados, tres AA

similares en conservación y solo uno menos conservado. Entre los péptidos IP2X y el SPT-1 existe una identidad del 80.0% que se compone de 24 AA conservados, dos de conservación similar y uno conservados débilmente.

**Cuadro 16. Alineamiento entre PT-1 y SPT-1 con el inhibidor de proteasa tipo – 2 (IP2X)**

Péptido	Potamina – 1 (PT-1)	Sintético Potamina -1 (SPT-1)	Inhibidor de proteasa tipo – 2(IP2X)
<b>Masa (Da)</b>	4,833		17,132
<b>Longitud</b>	47	30	158
<b>Alineamiento de IP2X y PT-1:</b> Identidad (%): 82.61; AA conservados (*): 38; AA con conservación similar (:): 3; AA conservados débilmente (.): 1			
PT-1	-----		-----DICTNC
IP2X		MAIHKEVSFLAYLLVLGMLLFVSAMEHVDAKACTLECGNLGYGICPRSEGSPENP	ICTNC *****
PT-1	CAGTKGCNITTSANGAFICEGQSDPKKPKACP	LNCDPHIAYA	-----
IP2X	CAGYKGCNYY	SANGTFICEGQSHPKNPKACPRNCDPHIAYS	KCPRSGGKTLIYPTGCTTC
	*** ****	****:*****.:**:*	*****:
PT-1	-----		
IP2X		CTGYTDCYYFGKDGKFCVCEGESIEPKACTLECDLHT	
<b>Alineamiento de IP2X y SPT-1:</b> Identidad (%): 80.0; AA conservados (*): 24; AA con conservación similar (:): 2; AA conservados débilmente (.): 1			
SPT-1	-----		
IP2X		MAIHKEVSFLAYLLVLGMLLFVSAMEHVDAKACTLECGNLGYGICPRSEGSPENP	ICTNC
SPT-1	AGTKGCNITTSANGAFICEGQSDPKKPKACP	-----	
IP2X	CAGYKGCNYY	SANGTFICEGQSHPKNPKACPRNCDPHIAYS	KCPRSGGKTLIYPTGCTTC
	** ****	****:*****.:**:*	
SPT-1	-----		
IP2X		CTGYTDCYYFGKDGKFCVCEGESIEPKACTLECDLHT	
(*) Indica AA con residuos completamente conservados, (:) Indica AA con conservación similar, (.) Indica AA conservación debil.			

En el **Cuadro 17** se observa que el Inhibidor de proteasa tipo -2 K (IP2K) (ID UniProt: P01080) con 153 aminoácidos en total identificados por cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas en el CPP tiene una masa de 16.5 kDa compartiendo una identidad del 91.3% con el péptido PT-1, está contemplando 42 AA idénticos y uno de conservación similar. La identidad entre los péptidos P2K y el SPT-1 es del 90% que se compone de 27 AA conservados.

**Cuadro 17. Alineamiento entre PT-1 y SPT-1 con el Inhibidor de proteasa tipo -2 K (IP2K)**

Péptido	Potamina – 1 (PT-1)	Sintético Potamina -1 (SPT-1)	Inhibidor de proteasa tipo -2 K (IP2K)
Masa (Da)	4,8 33		16,505
Longitud	47	30	153
<b>Alineamiento de IP2K y PT-1:</b> Identidad (%): 91.30; AA conservados (*): 42; AA con conservación similar (:): 1; AA conservados débilmente (.): 0			
PT-1	-----		-----DICTNC
IP2K	MDVHKEVNFVAYLLIVLGLLLVLSAMDVDAKACIRECGNLGFGICPRSEGSPE		NPICITNC *****
PT-1	CAGTKGCNTTSANGAFICEGQSDPKKPKACPLNCDPHIAYA		-----
IP2K	CAGYKGCNYY SANGAFICEGQSDPKKPKACPLNCDPHIAYS	KCPRSEGS	SLIYPTGCTTC *** ***) ***** :
PT-1	-----		
IP2K	CTGYKGCYYFGKNGKFVCEGESDEPKANMYPAM		
<b>Alineamiento de IP2K y SPT-1:</b> Identidad (%): 90.00; AA conservados (*): 27; AA con conservación similar (:): 0; AA conservados débilmente (.): 0			
SPT-1	-----		
IP2K	MDVHKEVNFVAYLLIVLGLLLVLSAMDVDAKACIRECGNLGFGICPRSEGSPE		NPICITNC
SPT-1	-AGTKGCNTTSANGAFICEGQSDPKKPKACP		-----
IP2K	CAGYKGCNYY SANGAFICEGQSDPKKPKACPLNCDPHIAYS	KCPRSEGS	SLIYPTGCTTC ** ***) *****
SPT-1	-----		
IP2K	CTGYKGCYYFGKNGKFVCEGESDEPKANMYPAM		
(*) : Indica AA con residuos completamente conservados, (:) : Indica AA con conservación similar, (.) : Indica AA conservación debil.			

El **Cuadro 18** muestra la información del Inhibidor de proteasa (IP21) (ID UniProt: P01079) de 51 aminoácidos (5.6 kDa), del CPP que tiene una identidad con el péptido PT-1 del 76.09% con 35 AA conservados, cinco AA de conservación similar y dos AA conservados débilmente. Entre los péptidos IP21 y el SPT-1 existe una identidad del 76.60 % respectivamente, donde 23 son AA conservados, tres AA con conservación similar y uno de conservación débil.

**Cuadro 18. Alineamiento entre PT-1 y SPT-1 con el Inhibidor de proteasa PTI**

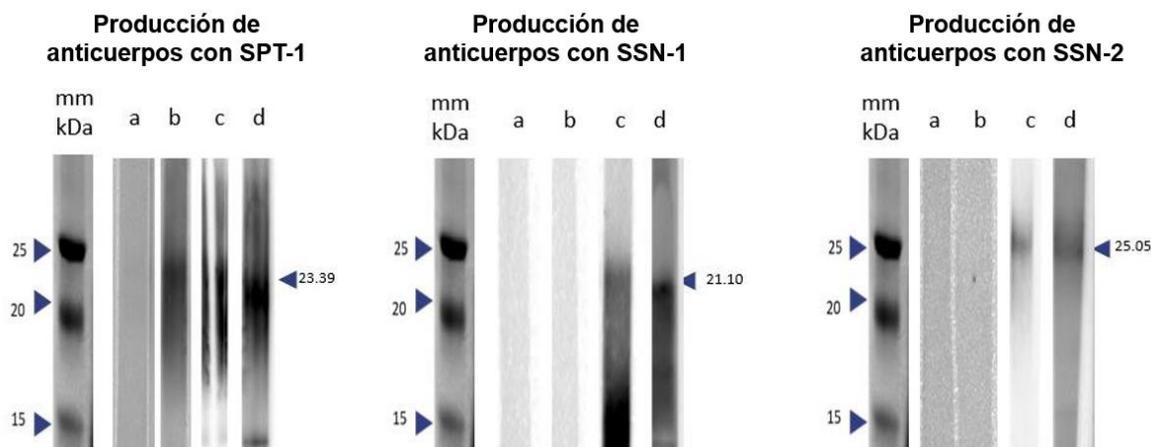
Péptido	Potamina – 1 (PT-1)	Sintético Potamina -1 (SPT-1)	Inhibidor de proteasa PTI (IP 21)
Masa (Da)	4,833		5,602
Longitud	47	30	51
<p><b>Alineamiento de IP21 y PT-1:</b> Identidad (%): 76.09; AA conservados (*): 35; AA con conservación similar (:): 5; AA conservados débilmente (.): 2</p> <pre> PT-1          DICTNCCAGTKGCNNTSANGAFICEGQSDPKKPKACPLNCDPHIAYA---- IP21          RICTNCCAGYKGCNYYSANGAFICEGESDPKNPNVCPRNCDTNIAYS KCLR *****      ****      *****:****:*.:**      ***.:***: </pre>			
<p><b>Alineamiento de IP21 y SPT-1:</b> Identidad (%): 76.67; AA conservación (*): 23; AA con conservación similar (:): 3; AA conservados débilmente (.): 1</p> <pre> SPT-1          -----AGTKGCNNTSANGAFICEGQSDPKKPKACP----- IP2K          RICTNCCAGYKGCNYYSANGAFICEGESDPKNPNVCPRNCDTNIAYS KCLR **   ****      *****:****:*.:** </pre>			
<p>(*): Indica AA con residuos completamente conservados, (:): Indica AA con conservación similar; (.): Indica AA conservación débil.</p>			

## Inmunodetección de PAM en el CPP y en la digesta de cerdos recién destetados mediante western blot

La estrategia experimental contempló la verificación de los PT-1, SN1 y SN-2 en el CPP a través de ensayos de inmunodetección (Western blot), utilizando las fracciones antigénica SPT-1, SSN1 y SSN-2 que se inocularon en conejos para producir anticuerpos policlonales. Los anticuerpos fueron utilizados también en ensayos con contenidos intestinales de animales que consumieron el CPP.

### Producción de anticuerpos anti-SPT-1, anti-SN-1 y anti-SN2 en conejos:

Los péptidos SPT-1, SSN-1 y SSN-2 se utilizaron para la producción de anticuerpos en conejos como se observa en la **Figura 13**, donde la producción de anticuerpos del péptido sintético de PT-1 (SPT-1) se detectó a partir del día 14 posterior a la primera inoculación y que se mantuvo hasta el día 43 con las consecuentes inoculaciones (refuerzos). La producción de anticuerpos de los péptidos SSN-1 y SSN-2 se detectó a partir del día 28 y manteniéndose al día 43.

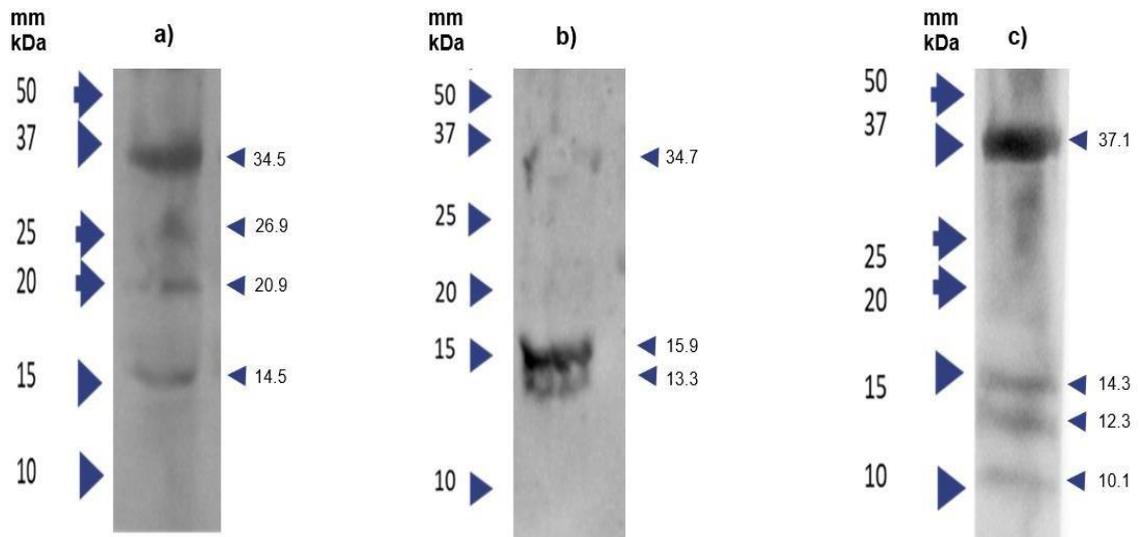


**Figura 13: Titulación de anticuerpos anti-SPT-1, anti-SSN-1 y anti-SSN-2 a través de Western blot.** mm= Marcador molecular; a= Suero preinmune; b= Suero inmune 1, d 14; c= Suero inmune 2, d 28; d= Suero inmune 3, d 43. Donde se utilizó 1  $\mu$ g de cada péptido sintético en la electroforesis como antígeno para el anticuerpo producido.

Inmunodetección del antígeno nativo en el CPP mediante Western blot:

Los anticuerpos obtenidos fueron utilizados para identificar los antígenos nativos (PT-1, SN-1 y SN-2) en el CPP mediante la técnica de western blot (**Figura 14**). Con la utilización del anticuerpo anti-SSN-1 (**Figura 14 a**) se identificaron 4 bandas de proteínas del CPP con masa molecular relativa de 34.5, 26.9, 20.9 y 14.5 kDa.

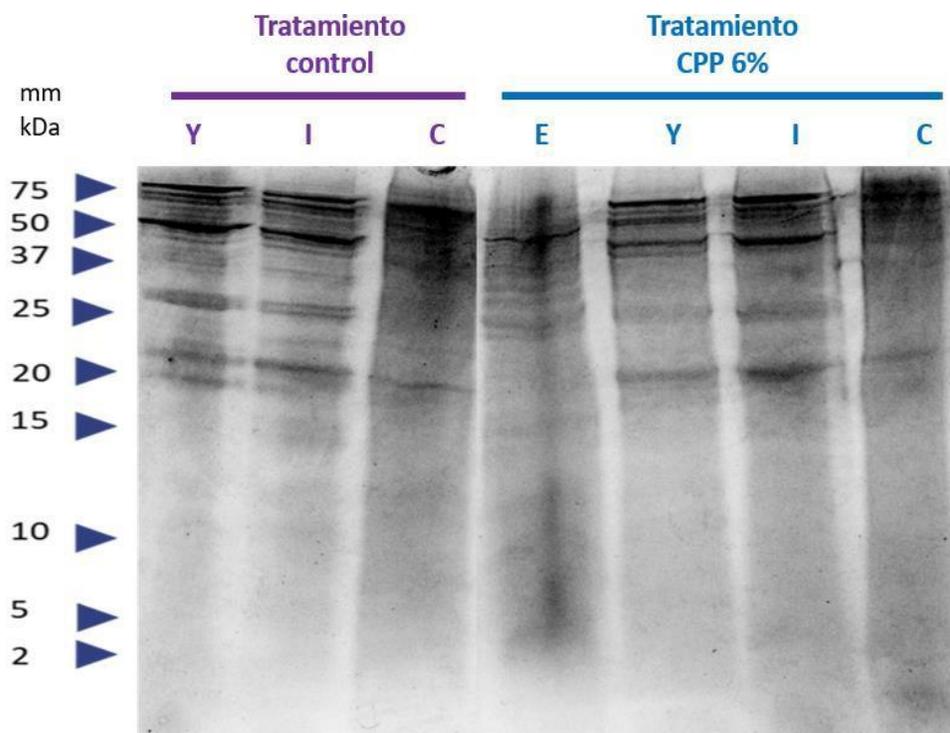
Respecto al uso del anticuerpo anti-SSN-2, con éste se detectaron 3 bandas de proteínas del CPP con masa molecular relativa de 34.7, 15.9 y 13.3 kDa (**Figura 14 b**). En cuanto al uso del anticuerpo anti-SPT-1 este detectó mediante la técnica de Western blot 4 bandas (**Figura 14 c**) con masas moleculares relativas de 37.1, 14.3, 12.3, 10.1 kDa.



**Figura 14: Identificación de antígenos nativos en CPP mediante Western blot con la utilización de los anticuerpos a) anti-SSN-1, b) anti-SSN-2 y c) anti-SPT-1.**

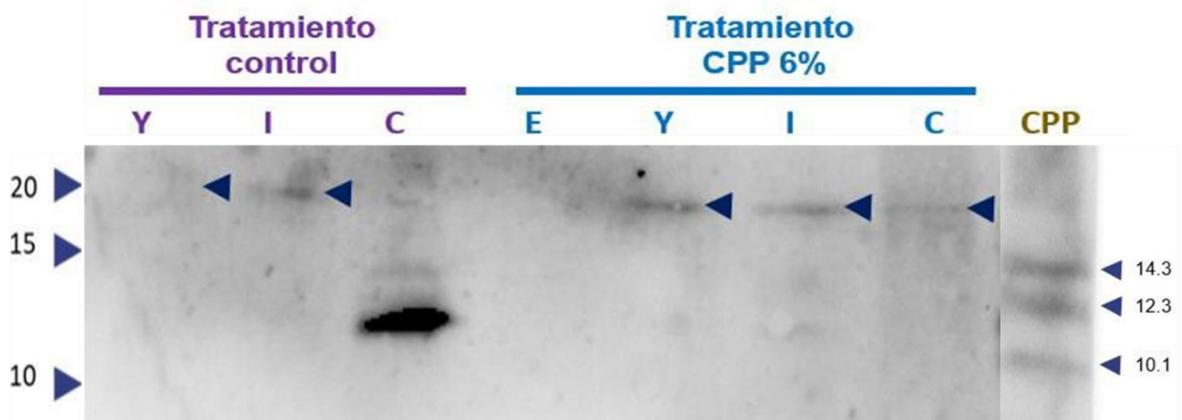
Inmunodetección de péptidos del CPP en la digesta de cerdos de destete alimentados con las dietas experimentales:

El objetivo de este ensayo fue determinar la presencia de péptidos reconocibles por los anticuerpos anti-SSN-1, anti-SSN-2 y anti-SPT-1 en la digesta de animales que consumieron las dietas experimentales. Para lo cual primero se realizó una electroforesis para conocer el patrón electroforético de las proteínas de la digesta de los animales en las dietas experimentales. El patrón de proteínas en animales en ambos tratamientos fue muy similar para el yeyuno, íleon y colon (**Figura 15**), con bandas desde los 75 kDa y hasta cerca de los 20 kDa. Adicionalmente, es posible observar bandas desde los 20 kDa y hasta los 2 kDa.



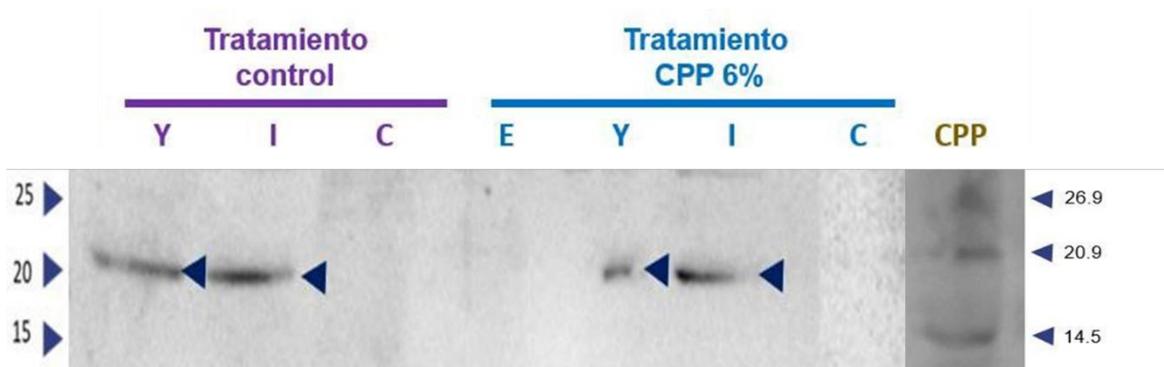
**Figura 15: SDS/PAGE de contenidos intestinales de animales en la dieta control y CPP 6%. (8 mg proteína / pozo; a partir de concentraciones iguales por cada animal de cada tratamiento). E= Contenido de estómago; Y = contenido de yeyuno; I = contenido de íleon; C = contenido de colon.**

Posteriormente a la verificación del patrón electroforético del CPP, se realizó la técnica de Western blot para detectar la presencia de antígenos en la digesta de animales que consumieron la dieta CPP 6%. La **Figura 16** muestra las bandas de proteínas reconocidas con el anticuerpo producido a partir del SPT-1. Para ambos tratamientos en los contenidos de yeyuno, íleon y colon se observa una banda con una masa relativa de 19.4 kDa. Adicionalmente en contenido de colon del grupo control mostró reacción del anticuerpo con proteínas con peso de 11.7 kDa.



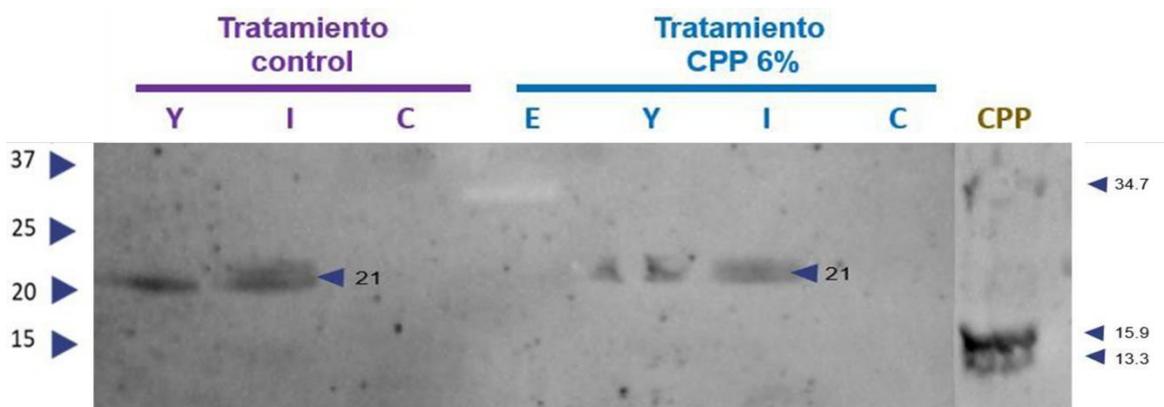
**Figura 16. Determinación de antígenos reconocibles por los anticuerpos del péptido sintético de potamina-1 (SPT-1).** E= contenido de estómago; Y = contenido de yeyuno; I = contenido de íleon; C =contenido de colon. CPP = Concentrado de proteína de papa.

En cuanto a la identificación de antígenos por parte de los anticuerpos producidos con el SSN-1 la **Figura 17** muestra para el tratamiento control, y CPP 6% bandas de pesos aproximados de 20.8 kDa para el contenido de yeyuno e íleon.



**Figura 17. Determinación de antígenos reconocibles por los anticuerpos del péptido sintético de Snakina-1 (SSN-1).** E= contenido de estómago; Y = contenido de yeyuno; I = contenido de íleon; C =contenido de colon. CPP = Concentrado de proteína de papa.

Respecto a los antígenos identificados por los anticuerpos a partir del SSN-2 en los contenidos de yeyuno e íleon para los tratamientos control y CPP 6% se encontraron bandas con péptidos de masas de 21 kDa. (**Figura 18**).



**Figura 18. Determinación de antígenos reconocibles por los anticuerpos del péptido sintético de Snakina-2 (SSN-2).** E= contenido de estómago; Y = contenido de yeyuno; I = contenido de íleon; C =contenido de colon. CPP = Concentrado de proteína de papa.

Análisis de identidad de los péptidos reconocibles por los anticuerpos anti-PT-1, anti-SN-1 y anti-SN-2 en el ambiente intestinal de los animales experimentales:

Los resultados de la identificación de antígenos en los contenidos intestinales indican que los anticuerpos anti-SPT1, anti-SSN-1 y anti-SSN-2 están reconociendo péptidos en el ambiente intestinal de animales en ambos tratamientos, para lo cual se realizó un análisis bioinformático para determinar la identidad entre los péptidos empleados para la producción de anticuerpos con proteínas en el ambiente intestinal de cerdos de destete (provenientes de cerdo y/o microorganismos). Para esto se empleó la herramienta de búsqueda de alineación local BLAST (por sus siglas en inglés) del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) (Stephen y col. 1997). Como resultado, el SPT-1 y la proteína hipotética parcial (ID NCBI: WP\_176232761) de *E. coli* con una masa molecular de 23.982 kDa y 220 AA, tienen una identidad del 83.3% (**Figura 19**). Donde 25 de los 30 de AA del SPT-1 respecto a la proteína hipotética parcial son conservados y un AA de conservación similar.

SPT-1	-----
ProteínaHipotéticaParcial	RKEKKENKVKRIYNMAVHKQVSFLAYLLLVLGLLLLSTVEHVDAKACTK
SPT-1	-----AGTKGCNTTSANGAFICEGQSDPK
ProteínaHipotéticaParcial	ECGNLGYGICPRSEGSTENPICTNCCAGYKGCNYYSANGIFICEGQSDPK
	* * * * * * * * * * * * * * * * * *
SPT-1	KPKACP-----
ProteínaHipotéticaParcial	NPKACPRNCDPHIAYSKCLRSRGKTLIYPTGCTTCTCTGYKDCYYFGKDGK
	:*****
SPT-1	-----
ProteínaHipotéticaParcial	FVCEGESIEPKACTLECDSRVSYMTCPSSGMAKLNQVCVNCCTAGEGCKL
SPT-1	-----
ProteínaHipotéticaParcial	YGHGDSLICTGEPQSYISTT

**Figura 19. Identidad entre SPT-1 y la proteína hipotética parcial (ID NCBI: WP\_176232761) de *E. coli*.** (\*): Indica AA con residuos completamente conservados, (:): Indica AA con conservación similar; (.): Indica AA conservación débil.



SSN2	-----
ProteínaHipotética	MAISKFLLVTMVLISLFFCLVEADDDGDNLVVYTPGPEGANNPTYIPTSECGTACEAR
SSN2	-----NCVPPGTSNGTETPCYASLTTHGNKRKCP
ProteínaHipotética	CSLASRHKMCLRACGTCCTRCNCVPPGTSNGQDLCPCYRDMLTHHGKHKCP
	***** : **** .: ** .*:**

**Figura 21. Identidad entre SSN-2 y la proteína hipotética (ID NCBI: WP\_176232843) de E. coli.** (\*): Indica AA con residuos completamente conservados, (:): Indica AA con conservación simular; (.): Indica AA conservación débil.

## Discusión

### **BNyE y comportamiento zootécnico**

Lo estudios de balance de nitrógeno evalúan el valor biológico de distintos alimentos y/o dietas para determinar un requerimiento de aminoácidos (proteína) y del contenido de energía metabolizable (Just y col. 1982). En teoría un estudio de balance de nitrógeno debe mostrar resultados idénticos al análisis químico de la masa corporal de un animal. Sin embargo, es importante conocer y esclarecer los alcances y limitantes de éste; para ejemplo de esto Just y col (1982) con cientos de resultados de distintos estudios muestran discrepancias entre los resultados de estudios de balance de nitrógeno y energía con métodos como los sacrificios seriales. Dentro de las discrepancias con el método del balance se encuentra la pérdida de nitrógeno (5.5%) al secar con altas temperaturas las heces. En la mayoría de los casos el balance de nitrógeno para cerdos de 20 a 90 kg de acuerdo con Just y col (1982) sobre estima la deposición de nitrógeno (11 a 20%, y de energía hasta en 22.5%) por alimento, heces y orina no detectados, respecto a estudios de sacrificios comparativos. Por lo que ellos mencionan que el termino balance se debe reservar para estudios de sacrificios comparativos y el termino balance bruto para el balance de nitrógeno común (Just y col. 1982). Por otra parte, una ventaja de este método en cerdos es que la perdida de N puede ser mínima en comparación con otras especies que pueden perder N por otras vías que no sean las heces y orina, como el sudor a razón de 1.5 g de N por día (en humanos). Los cerdos al no tener glándulas sudoríparas efectivas no presentan este problema o sesgo para la recolección de muestras.

Existe gran variación entre días en el uso del nitrógeno digestible, por lo que el número de animales de experimentación o el periodo debe ser grande en comparación con los sacrificios comparativos, contemplando al menos 7 días de adaptación. En relación la cantidad de heces dependerá del tipo y composición de

la dieta, que influirá sobre los resultados del balance, donde la discrepancia en deposición de proteína entre los métodos de balance y sacrificios puede ser hasta del 14.7%.

El consumo de alimento en cerdos de 25 a 31 días de edad con dietas tipo caseína se ha reportado con una disminución lineal ante el incremento de la cantidad de caseína en la dieta como lo observó Carlson y Bayley (1970), al pasar de una dieta baja en PC (7% PC; como caseína) con un consumo de 242 g/d a una dieta alta en PC (21 % PC; como caseína) con un consumo de 146 g/d. Este consumo de una dieta de alta concentración en proteína (como caseína) es similar al del presente estudio donde las dietas fueron altas en proteína (22.8 %) basada en caseína obteniendo consumos de 128 g/d para la dieta control y de 133 g/d para la dieta CPP 6% durante los primeros 8 días posteriores al destete (día 24 a 32 de edad).

La digestibilidad de la MS, energía y N de la dieta para ambos tratamientos del presente estudio fue >90%, datos similares a los reportados por Otto y col (2003) quienes mostraron aunque en animales de mayor edad y peso (50kg), con dietas con caseína como única fuente de proteína, una digestibilidad aparente del 94.4%, esto probablemente por su baja proporción de materia seca excretada (106.5 g/d de MS fecal de 1912 g/d de MS consumida), similar a la del presente estudio con 93.2% (16.7 g/d de MS excretada de 257.43 g/d de MS consumida) para la dieta control basada en caseína como única fuente de proteína, y del 93.1% ( 13.8 g/d de materia seca excretada de 267 g/d de materia seca consumida) para la dieta CPP 6% donde la fuente mayoritaria de proteína provino a partir de caseína y solo 6 % del CPP, por lo que este cambio en la fuente de proteína no perjudicó de manera significativa la digestibilidad de la MS, donde la dieta CPP 6% favoreció la digestibilidad de la MS de la dieta de igual manera y tanto como una dieta basada en caseína.

Los resultados para proteína se reflejaron en el presente estudio en 96.22 y 95.07

% de nitrógeno digestible para las dietas control y CPP 6%, similar a lo reportado para una dieta con caseína con 95.9 % de N digestible de acuerdo con Otto y col (2003) y con Carlson y Bayley (1970) en sus estudios con dietas de 21 % PC para lechones (25 a 31 días de edad) basadas en caseína como fuente de proteína, que mostraron una digestibilidad para el N del 95 a 99%, similar a lo reportado por el presente estudio para los tratamientos control y CPP 6% respectivamente. Estudios más recientes y detallados (Mariscal-Landín y Reis de Souza, 2006) observan que la digestibilidad ileal verdadera (DIV) del N y AA de la caseína en cerdos destetados de 6.4 kg, fue superior al 90%, con los valores más altos para leucina, isoleucina, valina, así como en fenilalanina, ácido aspártico y prolina y en comparación con cerdos de crecimiento. Dentro de los resultados de este estudio para el N en heces no todo corresponde al N no absorbido de la dieta, pues de acuerdo con Reis de Souza y col. (2013) la pérdida de nitrógeno endógeno basal en lechones es cerca de 16,9 g/kg de MS consumida en cerdos destetados y hasta los 37 días de edad, similar a la edad de los animales del presente para el BNyE (32 - 37 días de edad). Reis de Souza y col. (2013) detallan que la proteína que confirma las pérdidas endógenas es rica en ácido glutámico, ácido aspártico y arginina y que representa hasta el 32,7% de la pérdida de proteínas endógenas en lechones al destete.

Interesantemente Mariscal-Landín y Reis de Souza (2006) años atrás ya mostraban datos similares al observar que animales en dietas tipo caseína las perdidas ileales se componen mayoritariamente de ácido glutámico, prolina, ácido aspártico, arginina y treonina, y en cuanto a los de menor proporción reportan cisteína, metionina, histidina, tirosina y fenilalanina. Estos aminoácidos son resultado posiblemente a una mayor descamación celular del epitelio intestinal causado por al destete y al cambio de dieta líquida por alimento seco lo que implica una menor capacidad digestiva al inicio y consecuente adaptación (Mariscal-Landín y Reis de Souza, 2006). En el presente estudio de manera general para el N, no pudimos detectar mayor pérdida de N en heces con la dieta

CPP 6% respecto a la dieta control (caseína), por lo que el CPP a una inclusión del 6% parece no modificar la digestibilidad aparente del N ni su excreción en heces.

Este estudio demuestra entonces en concordancia con Carlson y Bayley (1970) así como con Otto y *col* (2003) que dietas basadas en caseína como fuente de proteína ésta es casi completamente digerida. Para el tratamiento con la inclusión relativamente baja de CPP al 6%, ésta no modificó la digestibilidad de la MS y N de la dieta, además que por sí sola la PC del CPP en la dieta CPP6% de acuerdo con la metodología de Fan y Sauer (1995) tiene un valor de digestibilidad aparente del 90.37%. Por lo que parece ser una fuente de proteína de una adecuada digestibilidad, sin afectar la digestibilidad de la MS y N total de la dieta, efecto similar a los datos presentados por Carlson y Bayley (1970), donde con dietas desde 7 a 21% de PC basada en una proteína vegetal como pasta de soya mostraron un consumo creciente, aunque con valores para la digestibilidad del 86 al 89% para la MS y del 80 al 83% para el N, valores muy por debajo de los alcanzados con caseína como fuente proteica.

Los resultados de Otto y *col* (2003) en cuanto al N retenido como porcentaje del consumido (70.08%) y para el nitrógeno retenido como porcentaje del absorbido (73.07 %) no concuerdan a lo reportado en este estudio para las dietas control y CPP 6% que tuvieron 96.4 y 95.8% para el N retenido como porcentaje del consumido y para el nitrógeno retenido como porcentaje del absorbido con 99.7 y 99.74%. Los resultados del presente estudio pueden apoyarse de estudios previos (Cervantes-Pahm y Stein, 2010) que muestran con cerdos de 10.9 kg destetados y canulados que la digestibilidad ileal estandarizada (DIE) de la PC y de los aminoácidos esenciales de la caseína es superior al 95%, siendo esto en promedio superior a la DIE de otras fuentes de PC como pasta de soya, pasta de soya tratada enzimáticamente, pasta de soya fermentada así como también de harina de pescado, debido a su ausencia en factores antinutricionales y adecuado perfil de AA. En apoyo a esto, debe quedar claro que las similitudes entre el

estudio antes mencionado y el presente son para un rango tan amplio como la digestibilidad total de la MS y N, y que muy probablemente de analizar la digestibilidad individual de los aminoácidos esta sería variable entre una fuente de origen animal (caseína) y una vegetal (CPP) como lo observó Carlson y Bayley (1970) con caseína y pasta de soya, donde la fuente de proteína modificó la cantidad de aminoácidos colectados en heces, efecto directamente relacionado con la modificación en las poblaciones bacterianas del tracto intestinal. Carlson y Bayley (1970) mencionan que la digestibilidad de fuentes de proteína animal es mayor a la de fuentes de proteína vegetal, ya que estas últimas pueden presentar mayor resistencia a la digestión, aunque la edad del animal y adaptación previa son factores que pueden ser también determinantes para este proceso.

#### **Actividad del concentrado de proteína de papa sobre coliformes y lactobacillus en heces**

La microbiota está conformada por un alto número de bacterias y cumple funciones como la producción de enzimas y el metabolismo de algunos nutrientes (Pohl *et al.* 2015; McCormack, 2017), además de la exclusión competitiva, impidiendo la adhesión de patógenos (Mach *et al.* 2015). Sin embargo, su composición no es definitiva, se desarrolla gradualmente y sufre cambios drásticos en todo momento y sobre todo durante el destete.

La caseína ( $\alpha_{s1}$ -caseína,  $\alpha_{s2}$ -caseína,  $\beta$ -caseína y  $\kappa$ -caseína) es la proteína bovina más abundante en productos lácteos. Algunos estudios (Helm *et al.* 2007) han observado *in vitro* e *in vivo* una relación lineal de concentraciones crecientes de péptidos de caseína para reducir la adhesión de ETEC K88 al epitelio intestinal, además de mejorar las concentraciones de *Lactobacillus* en íleon y colon de cerdos destetados de 24 días (6.9 kg).

En cuanto a la excreción de bacterias en heces, el presente estudio mostró que la dieta CPP 6% estimuló en cuanto a coliformes y bacterias lácticas poblaciones

similares a las de animales con la dieta control basada en caseína. Rist y col. (2014) mencionan que en el colon porcino los géneros bacterianos involucrados en la fermentación de proteína no digerida son *Bacteroides*, coliformes y *Clostridium*, haciendo que el crecimiento y salud intestinal se perturben. Estudios previos muestran que el destete es un evento crucial para el cambio en microbiota, debido al cambio en el sustrato alimenticio entre otros factores, pues como se menciona en la revisión de Csáky y Fekete (2003), con lechones infectados por 5 días con *E. coli* patógena durante la lactancia, no fue hasta el destete donde la excreción de esta bacteria y la presencia de diarrea fue observada para animales con una dieta con pasta de soya, y no siendo así para animales con una alimentación basada en productos lácteos. Por lo que podemos inferir en el presente estudio que la inclusión al 6 % del CPP a una dieta basada en caseína, no es un nivel que propicie una disbiosis para bacterias lácticas y coliformes en el tracto gastrointestinal que pudiera haberse manifestado como diarrea.

### **Peso y pH de órganos**

El CPP es rico en algunos factores antinutricionales (FA) como glicoalcaloides de solaninas (927 - 2632 mg/kg) e inhibidores de tripsina (IT) (0.97 - 3.70mg/kg), donde la concentración puede ser variable de acuerdo con las condiciones de procesamiento de la papa (Pastuszewska y col. 2009). Los IT son altamente resistentes al procesamiento térmico típico (100°C/ 15 min) aunque este es capaz de inactivar del 22 al 48% de los inhibidores de proteasa y hasta el 89% de los glicoalcaloides, pero afecta la concentración de AA (Wojnowska y col. 1982).

Estudios previos (en ratas) (Csáky y Fekete, 2003) han mostrado que la presencia de IT (provenientes de soya) algunos de los cuales son de familias de IT presentes también en el CPP, causan hiperplasia del páncreas (Csáky y Fekete, 2003), dato que no pudimos observar macroscópicamente en este estudio, lo que posiblemente pueda verse relacionado con la cantidad de IT presentes de acuerdo con lo mencionado por Pastuszewska y col. (2009). Esto es similar a los

resultados de un estudio más reciente realizado por Aguilera y col. (2014) con lechones destetados, donde el peso relativo del páncreas de animales en una dieta tipo caseína por 14 días después del destete no fue distinto a peso relativo del páncreas de animales con dietas con pasta ajonjolí y pasta de soya. Sin embargo, el peso del estómago y del intestino delgado se desarrolló más para los animales de las dietas con proteínas vegetales, que de acuerdo con los autores se debe al contenido de fibra de dichos ingredientes.

El pH de los órganos del aparato gastrointestinal en cerdos de destete está relacionado con la concentración de PC de la dieta, así como con la edad de destete, donde dietas decrecientes en el nivel de PC resultan en valores de pH menores y mayor proporción de la relación lactobacillus:coliformes (Wellock y col. 2008). El pH del estómago, duodeno, yeyuno e íleon en el presente estudio no mostró diferencias entre las dietas caseína y CPP 6%. Aguilera y col. 2014 con dietas con fuentes de proteína vegetal mostraron valores de pH más bajos para el estómago (entre 2.5 a 3.5) que en lechones en dietas con caseína (pH 3.8), mencionándose que esto pudo ser ocasionado por una alta capacidad amortiguadora de la caseína por su alta concentración de aminoácidos con radicales carboxilo y fosfato.

### **Morfología de vellosidades y criptas intestinales**

En cuanto a las vellosidades de yeyuno de cerdos de destete de acuerdo con Csáky y Fekete (2003) su altura puede ser hasta 20% distinta en dietas enriquecidas con distintos ingredientes vegetales en comparación con dietas tipo caseína. Concluyendo además una mejor tasa de crecimiento asociada a una mayor altura de vellosidades. Los factores antinutricionales de distintos ingredientes están asociados a la atrofia de las vellosidades intestinales y esto a los procesos inflamatorios y de diarrea Csáky y Fekete, (2003). El presente estudio no muestra este daño en la altura de las vellosidades intestinales con la dieta CPP 6% y respecto a los animales con la dieta caseína, sin embargo en

otros estudios (Aguilera y col, 2014) con fuentes vegetales con altos contenidos de FA (pasta de soya, 20%) en lechones de 35 días de edad (destetados a los 21 días) se observó una menor altura de vellosidades (solo de yeyuno) en comparación con animales con dietas con caseína como dieta de referencia, fenómeno que no se observó en animales con dietas con pasta de ajonjolí, siendo la altura de las vellosidades de yeyuno de los animales de esta última dieta tan altas como las de animales en dietas con caseína.

El estudio de (Aguilera y col, 2014) muestra que tanto la pasta de soya a 20.0% y de ajonjolí al 17.4% favorecieron una altura de las vellosidades intestinales y profundidad de las criptas en duodeno e íleon similar a la de animales que consumieron una dieta con ingredientes similares a la leche, con una dieta a base de caseína. Evento que se pudo observar con las dietas experimentales del presente estudio sobre la altura de las vellosidades intestinales del intestino delgado y la profundidad de las criptas, donde la inclusión del 6% de CPP en una dieta no afectó la altura de las vellosidades intestinales y las profundidades de las criptas.

### **Verificación de PAM en el CPP mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC/MS)**

#### *Patrón electroforético de proteínas de bajo peso molecular del CPP*

De acuerdo con la literatura, los PAM de origen vegetal comprenden bajas masas moleculares, Benko-Iseppon y col. (2010) mencionan que estos polipéptidos son de menos de 200 AA, aunque la mayoría son menores a 50 AA, con masas cerca de los 10 kDa (básicos y cationes a pH fisiológico de acuerdo con sus residuos de AA). Con los resultados observados en este estudio a partir de cuatro bandas, de acuerdo con la estimación por migración relativa. con masas de 2.67 kDa en la banda 1, de 3.57 kDa para la 2, de 4.79 para la banda 3 y de 10.87 kDa con la banda 4 y en un gel de electroforesis SDS- PAGE, podemos concordar con

estudios previos como los de Bártová y col. (2018) y Waglay y Karboune (2016) que en ensayos de electroforesis con CPP lograron detectar bandas de pesos moleculares entre los 20 y 6.5 kDa, y en su revisión un año después desglosando distintas fracciones de la proteína de papa con masas de 20, siete y cuatro kDa (Bártová y col. 2019). Para la visualización del patrón electroforético en este estudio se realizaron dos protocolos de extracción, uno al re suspender la muestra del CPP en PBS1x y otro con el empleo de TCA sin observar una diferencia aparente en el patrón electroforético de ambos, dato que coincide con el estudio realizado por Waglay y Karboune (2016) quienes probaron hasta seis métodos de extracción de proteínas de papa, como precipitación con sales, etanol, sulfato de amonio, carboximetil celulosa, ácidos, y la combinación de estos métodos, donde todos muestran un rendimiento y purificación de proteínas similar.

#### *Péptidos identificados por LC/MS*

Waglay y Karboune (2016) mencionan que las proteínas de papa se clasifican en tres grandes grupos, el primero de Patatina/Tuberina comprendiendo del 9 al 37% el segundo grupo son los Inhibidores de proteasa/Tuberinina, conformando del 5 al 38% del total de proteínas de papa, y el tercer grupo del 5 al 41% pertenece a Otras/Proteínas de alto peso molecular. Revisiones como las de Waglay y col. (2014) y Bártová y col. (2019) clasifican a los PAM de papa dentro de los inhibidores de proteasa predominantemente de serina, cisteína, aspartato y tipo Kunitz, así como isoformas específicas de patatinas y péptidos de bajo peso molecular contemplando las defensinas, tioninas y snakinas. Ante estos datos nuestro estudio concuerda con lo mencionado previamente, ya que, al analizar las proteínas de las cuatro bandas en conjunto, el 45.5% de las proteínas detectadas por LC/MS corresponde a inhibidores de proteasa, un 15.6% a proteínas en el grupo de patatinas y el 36.4% con una gran proporción dentro del total del 2.6% para defensinas.

Sin embargo, este estudio no fue determinante para detectar la presencia de los

péptidos objetivos; PT-1 SN-1 y SN-2, aunque es importante destacar que en la banda 1, de 32 péptidos reportados el 9.4% corresponden a inhibidores de proteasas de serina, un 15.6% de inhibidores proteasas de cisteína, 9.4% son inhibidores de proteasas de asparagina, el 3.1% son inhibidores de quimiotripsina y el 15.6% son otros inhibidores de proteasa. en la banda 2 el 19% son inhibidores de proteasa de serina y de cisteína. El 4.9% son inhibidores de proteasa de asparagina, un 2.4% de inhibidores de quimotripsina y el 12.2% son otros inhibidores de proteasas, en la banda 3 los inhibidores de proteasas de serina tienen una proporción del 10.8%, los inhibidores de proteasas de cisteína contemplan el 8.1%, los inhibidores de proteasa de asparagina el 5.4%, los inhibidores de quimotripsina el 2.7% y otros inhibidores de proteasa el 24.3% y en la banda 4 los péptidos reportados por LC/MS corresponden en un 6.8% a inhibidores de proteasa de serina, un 9.1% para los inhibidores de proteasas de cisteína, un 9.1% para los inhibidores de proteasas de asparagina y el 15.9% para otros inhibidores de proteasas. Con estos datos observamos que contamos una gran proporción y variedad de inhibidores de proteasas de péptidos similares a los snakinas, por lo que se procedió a realizar un análisis de identidad.

*Análisis bioinformático de secuencias obtenidas por LC/MC para determinar el grado de conservación con los PAM:*

Kim y col. (2005) reportaron por primera vez a partir de proteínas de *Solanum tuberosum* L cv. Gogu el PT-1 con 47 AA y 7 residuos de cisteína y con capacidad antimicrobiana, esta actividad ampliamente relacionada a los puentes disulfuro, ya que al ser sometido a un agente reductor gran parte en su actividad contra microorganismos y como proteasa se vio mermada, lo que indicó que los puentes disulfuro son esenciales para su actividad inhibidora de proteasa y antibacteriana. Interesantemente Kim y col. (2005) en este primer artículo donde describen al PT-1 mencionan un 62% de homología con un inhibidor de proteasa de serina, dato muy parecido a los reportados por nuestro estudio bioinformático entre péptidos reportados mediante LC/MS en el CPP con el PT-1. Donde el PT-1 CPP tienen

una identidad del 86.9%, 82.6% y 76.6% respectivamente con los péptidos IP25 IP2X e IP2K del CPP. Kim y col. (2005) en su estudio deja abierta la posibilidad de que el PT-1 no sea un péptido completo, si no que sea parte o una fracción de un péptido de mayor longitud. De ser un péptido de mayor longitud y/o formar alguna unión con otro u otros péptidos en la electroforesis se encontraría en bandas de mayor peso molecular (no analizadas). Esto puede tomar mayor fuerza, ya que en la literatura años después, en una revisión por Kim y col. (2009) menciona un dato sumamente relevante, que deja claro que los inhibidores de tripsina/quimiotripsina comúnmente son capaces de formar dímeros gracias a sus puentes disulfuro. Interesantemente en la publicación de Kim y col. (2009) revelan que el PT-1 nativo mostró un peso molecular dimérico en electroforesis SDS pero dejando clara su capacidad por formar uniones disulfuro intermoleculares.

### **Identificación de PAM en el CPP y en la digesta de cerdos recién destetados mediante western blot**

#### *Síntesis de péptidos antigénicos múltiples (MAPs):*

De acuerdo con el Anexo 3 donde se desglosan los péptidos inmunogénicos para los PT-1, SN-1 y SN-2, se puede observar que existen distintas posibles opciones de epítomos con potencial inmunogénico para cada uno de los PT-1, SN-1 y SN-2, esto permitió el diseño de MAP's para cada uno, y para posteriormente emplearlos como antígenos para la producción de anticuerpos en conejos. La síntesis de MAP's es una técnica que se describe desde 1988, producto de los avances en la síntesis de péptidos en esa década y la necesidad de métodos para la presentación de antígenos al sistema inmune de alta afinidad (Heegaard y col. 2010). De acuerdo con Joshi y col. (2013) y Heegaard y col. (2010) los MAP's tienen una matriz o núcleo central de la que surgen ramificaciones, y distintos AA's pueden formar parte del núcleo, sin embargo, el AA lisina es preferido por sus grupos amino alfa ( $\alpha$ ) y épsilon ( $\epsilon$ ) pues le proporciona flexibilidad y facilidad para crear distintas estructuras y que incrementa su capacidad como antígeno

para pruebas diagnósticas. En nuestro estudio evaluamos la integridad de los MAP's, donde la cadena para el péptido sintético de PT-1 (SPT-1) por sus 240 residuos de aminoácidos (AGTKGCNTTSANGAFICEGQSDPKKPKACP) con una masa molecular de 23.86 kDa, en la electroforesis de acuerdo con su migración relativa mostró una masa molecular de 23.39 kDa. El péptido sintético de SN-2 (SSN-2) (NCVPPGTSGNTETCPCYASLTTHGNKRKCP x8) con una masa molecular de 25.09 kDa en la electroforesis mostró 25.05 kDa de acuerdo con su migración relativa. Sin embargo, la cadena para el péptido sintético de SN-1 (SSN-1) (PSLIQTTMAGSSFCDKCKLRCSKAGLADR) con una masa molecular calculada en 25.40 kDa, en la electroforesis de acuerdo con su migración relativa mostró una masa molecular de 21.10 kDa y de acuerdo con la Figura 12 se observa cierta degradación de este.

*Producción de anticuerpos anti-PT-1, anti-SN-1 y anti-SN2 en conejos:*

De acuerdo con Joshi y *col.* (2013) los péptidos se organizan en moléculas de gran tamaño como dendrímeros, esta organización estructural explica gran parte de su función y también incrementa su la eficacia al emplearse en pruebas diagnósticas respecto a péptidos lineales (Joshi y *col.* 2013). El diseño de MAP's de una fracción de los PT-1, SN-1 y SN-2 se realizó para empelarlos como antígenos en conejos para la producción de anticuerpos. Heegaard y *col.* (2010) describen que los MAP's han reportado ser eficientes en la producción de anticuerpos específicos y en su uso para la producción de vacunas. Joshi y *col.* (2013) mencionan que con concentraciones tan bajas como 0.11 µg/ml de MAP's hay reactividad específica para la producción de anticuerpos monoclonales y policlonales en comparación con péptidos lineales, posiblemente al diseño de los MAP's, que permite que tengan más de un epítipo. Según Heegaard y *col.* (2010) la mayoría de las inmunizaciones MAP's reportadas su revisión se han realizado con adyuvantes tradicionales, incluido el adyuvante de Freud, como lo realizamos en este estudio. Sin embargo, como lo describe Heegaard y *col.* (2010) el éxito en la inmunización además de la elección del adyuvante depende también de la dosis

y la vía de administración. En nuestro estudio realizamos la inmunización de conejos como previamente fue descrita por Díaz y col, 2014; García – Casanova y col. 2008; Gómez Soto y col. (2017). En nuestros resultados podemos observar que el suero preinmune no tiene actividad biológica con los anticuerpos anti-SPT-1, anti-SSN-1 y anti-SSN2, lo que permitió seguir con la evaluación y observar a partir del día 14 posterior a la primera inoculación con los MAP's del SPT-1 producción de anticuerpos de acuerdo con la técnica Western blot (Figura 13). Respuesta que seguimos observando hasta el día del sacrificio, sin observar signos clínicos de inflamación en los sitios de inoculación en los animales experimentales. Este tipo de respuesta es similar a lo reportado por Almazán y col. (2020) donde al día 14 después de la inoculación con MAP's en su estudio (con ratones) observan titulación de anticuerpos. La detección de anticuerpos en el estudio de Almazán y col. (2020) si bien es a partir del día 14 se mantiene en los mismos niveles hasta el día 28, día en que en nuestro estudio también pudimos observar a través de la técnica de western blot la presencia de anticuerpos anti SSN-1 y anti-SSN-2, y para los 3 tipos de anticuerpos seguimos detectando presencia hasta el día del sacrificio al día 43, que para el estudio de Almazán y col. (2020) logra seguir detectando anticuerpos anti MAP's en crecimiento logarítmico hasta el día 90. En el estudio de Almazán y col. (2020) se llega al pico de producción/detección de anticuerpos entre el día 42 y 56, días que coinciden con la obtención del suero inmune 3 de nuestro estudio por lo que, de acuerdo con los datos de Almazán y col. (2020) en nuestro estudio probablemente colectamos el suero inmune 3 en el momento del mayor pico de anticuerpos.

#### *Inmunodetección del antígeno nativo en el CPP mediante Western blot:*

Nuestro estudio mediante LC/MS para detectar los PT-1, SN-1 y SN2 en el CPP no fue concluyente, sin embargo, si se reporta identidad entre ciertos péptidos con el PT-1 como se describió anteriormente y donde dejamos abierta la hipótesis de que el PT-1 pueda formar parte de un péptido de mayor tamaño. Una segunda estrategia se realizó con el uso de los anti-SPT-1, anti-SSN-1 y anti-SSN-2 y la

técnica de western blot. La revisión de Joshi y col. (2013) menciona que se ha documentado una adecuada producción de anticuerpos policlonales anti MAP's y su eficacia para la detección de antígenos nativos de distintos agentes infecciosos. Los anticuerpos en nuestro estudio fueron utilizados con la idea de identificar los antígenos nativos (PT-1, SN-1 y SN-2) en el CPP mediante la técnica de western blot. Como podemos ver en los resultados no encontramos bandas cerca de las masas moleculares de péptidos de interés, sin embargo, es interesante que con el uso de nuestros tres anticuerpos si encontramos respuesta ante antígenos nativos en el CPP como se ve en la figura 14. Con el anticuerpo anti-SSN-1 se detectaron 4 bandas de proteínas del CPP con masa molecular relativa de 34.5, 26.9, 20.9 y 14.5 kDa, con el anti-SSN-2 se detectaron 3 bandas de proteínas del CPP con masa molecular relativa de 34.7, 15.9 y 13.3 kDa y con el anticuerpo anti-SPT-1 se detectaron mediante la técnica de Western blot 4 bandas con masas moleculares relativas de 37.1, 14.3, 12.3, 10.1 kDa. Estos datos son relevantes ya que concuerdan con nuestra explicación previa, pues logramos detectar antígenos nativos en el CPP con nuestros anticuerpos, dando mayor peso a nuestra explicación para el PT-1 donde parece estar uniéndose entre sí para formar una molécula de mayor tamaño y/o ser una fracción de un péptido más grande.

*Inmunodetección de péptidos del CPP en la digesta de cerdos de destete alimentados con las dietas experimentales:*

Los resultados de la inmunodetección demostraron actividad biológica del los anticuerpos con los antígenos nativos en el CPP. Por lo que se verificó la presencia de estos péptidos en el contenido intestinal de los animales que consumieron el CPP, pues al ser el CPP positivo a la presencia de péptidos similares los PAM objetivos de este estudio, fue de nuestro interés conocer si estos podrían mantenerse en el ambiente intestinal de los animales, es decir, que fueran capaces de soportar las condiciones digestivas del ambiente intestinal sin ser hidrolizados y absorbidos, lo que reforzaría la hipótesis de este estudio, pues de mantenerse en el ambiente intestinal y ser detectados por nuestros anticuerpos

producidos después de 14 días de consumir el CPP, tiempo suficiente para ser desafiados ante las distintas enzimas digestivas del cerdo probarían ser una opción de péptidos que son capaces de resistir las condiciones gastrointestinales cuando es de mayor interés el uso de agentes antimicrobianos por las condiciones del proceso de destete descritas en la literatura (Pohl y col. 2015; Moeser y col. 2017).

El primer paso de esta estrategia fue conocer el patrón electroforético de los contenidos intestinales de los animales experimentales, donde no se aprecia un patrón distinto entre tratamientos (no contamos con muestra de estómago de los animales del grupo control). La figura 16, 17 y 18 muestran reacción positiva de los anticuerpos anti-SPT-1, anti-SSN-1 y anti-SSN-2 con péptidos en los contenidos intestinales de animales en ambos tratamientos. Por lo que se procedió a realizar un análisis bioinformático para determinar la identidad entre los péptidos empleados en la producción de anticuerpos con proteínas en el ambiente intestinal de cerdos de destete (de cerdo y/o microorganismos).

*Análisis de identidad de los péptidos reconocibles por los anticuerpos anti-PT-1, anti-SN-1 y anti-SN-2 en el ambiente intestinal de los animales experimentales:*

Generalmente se infiere una relación evolutiva entre secuencias que tienen una alta identidad, adicionalmente, péptidos o proteínas de la misma familia homóloga que comparten un plegamiento común puede significar que sus estructuras tridimensionales son similares y con ello las funciones (May, 2004). Debido a que no todas las secuencias son de la misma longitud, es realmente útil expresar la identidad como porcentaje, y es común que proteínas que pertenecen a la misma familia homóloga se puedan alinear para producir un porcentaje de identidad al menos del 30% (May, 2004). De acuerdo con nuestros resultados del análisis bioinformático el SPT-1 tiene una identidad del 83.3% con la proteína hipotética parcial (ID NCBI: WP\_176232761) de *E. coli*, el SSN-1 con la fosfatasa de serina/treonina (ID NCBI: MBL1008534) de *E. coli* una identidad del 46.7% y el

SSN-2 una identidad del 66.7% con la proteína hipotética (ID NCBI: WP\_176232843) de *E. coli*. De acuerdo con esto podemos sugerir la posibilidad que los PAM's objetivos de este estudio y algunas proteínas producidas por *E. coli* u otras bacterias compartan estructura y función similar dado su porcentaje de identidad. Motivo por el cual encontramos una reacción positiva en la inmunodetección mediante Western blot en los contenidos intestinales de los animales del grupo control y del grupo CPP6%.

De acuerdo con Culp y Wright (2016) y García-Gonzalez y col. (2019) distintas bacterias en el ambiente intestinal secretan péptidos como las proteasas las cuales son altamente conservadas entre patógenos. García-González y col. (2019) menciona que las proteasas de serina son el conjunto más amplio de enzimas proteolíticas. Las proteasas se pueden clasificar de acuerdo con dos mecanismos: las que emplean una molécula de agua para hidrolizar el enlace peptídico y las que emplean su residuo aminoacídico para ligar covalentemente el sustrato proteico a la enzima (liberando una fracción de la proteína) y activando (por un intermediario) una molécula de agua que hidroliza la unión enzima – sustrato (liberando otra fracción de la proteína) (García-González y col. 2019). Los microorganismo tienen esta capacidad de producción de proteasas para alterar el epitelio intestinal como el caso de las proteasas Pet, EspC y SigA de los enteropatógenos *E. coli* enteroagregativa (ECEA), *E. coli* enteropatógena (ECEP) y *S. flexneri* respectivamente, otras proteasas dañan el citoesqueleto, como es el caso de la proteasa ES<sub>P</sub> de *E. coli* enterohemorrágica (ECEH), mecanismos ampliamente relacionados con el desarrollo de desórdenes digestivos (García-González y col. 2019). Otras proteasas pueden inducir la muerte celular o alterar las uniones estrechas en el epitelio intestinal. Por otra parte, algunas proteasas se relacionan con la lisis de ciertos sustratos para evadir la respuesta del sistema inmune y establecerse en la mucosa (García-González y col. 2019).

Por otra parte, como lo describe Clemente y col. (2019) los inhibidores de proteasas (IP) son indispensables para regular la actividad proteolítica y mantener

la homeostasis. Los inhibidores de proteasas se han descrito no solo en microorganismos, sino que para los animales algunos IP tiene funciones como promotores de crecimiento y como señalizadores celulares. Por lo tanto y de acuerdo con lo citado anteriormente, se puede entender que existe una gran cantidad de proteasas e inhibidores de estas en el ambiente intestinal de los animales, algunos de estos péptidos propios del animal y otros productos de los microorganismos que lo habitan, factores que pueden ser la causa de encontrar reacción positiva con los anticuerpos anti-MAP's producidos en este estudio en los contenidos de los animales del grupo control y del grupo CPP6%.

## CONCLUSIONES

La dieta con la inclusión del CPP a 6% para cerdos recién destetados no deprimió el consumo voluntario de alimento y la ganancia de peso respecto a los animales con la dieta control, efecto soportado por una alta digestibilidad de la proteína del CPP y su aporte al BNyE que fue similar al de los cerdos alimentados con la dieta con caseína como única fuente de proteína. Por lo que la adición de CPP en dietas de cerdos recién destetados es una adecuada fuente de aminoácidos para estos animales que no demerita la integridad intestinal. Sin embargo, no se observó el efecto antibacteriano por parte de PAM's del CPP sobre la concentración de bacterias coliformes en heces ni sobre las bacterias lácticas.

En cuanto a los PAM's en el CPP no se identificaron los péptidos PT-1 SN-1 y SN-2, , aunque es importante destacar que se determinó una identidad superior al 70% entre péptidos de mayor masa molecular y el PT-1, por lo que se pudo inferir que su estructura y función puede ser similar. Estos datos y los de la literatura soportan la hipótesis de que el PT-1 sea una fracción de un péptido de mayor masa. . Sin embargo, son necesarios más ensayos funcionales para comprobar este hecho.

Respecto a los ensayos de inmunodetección en los contenidos intestinales y el análisis bioinformático soportan evidencia de que existen péptidos con un alto porcentaje de identidad (estructura y función) entre PAM's de papa y péptidos bacterianos como los de *E. coli*, por lo que se sigue que en futuros estudios se considere este fenómeno para el diseño de los anticuerpos empleados en las técnicas de inmunodetección, así como la identificación de las principales familias bacterianas en el contenido intestinal de los animales experimentales para conocer los PAM que se estén produciendo por esta microbiota y diferencias de los PAM en el CPP.

## Referencias

- 1) Aguilera BA, Reis de Souza TC, Mariscal – Landín G, Guerrero CMJ, Escobar, KG, y col. Morphophysiological adaptations of the gastrointestinal tract in piglets fed a sesame meal or soybean meal diet. *Am. J. Anim. Vet.* 2014; 9 (1): 28 - 35.
- 2) Almazán C, Šimo L, Fourniol L, Rakotobe S, Borneres J, y col. Multiple Antigenic Peptide-Based Vaccines Targeting *Ixodes ricinus* Neuropeptides Induce a Specific Antibody Response but Do Not Impact Tick Infestation. *Pathogens.* 2020; 9 (11): 2 - 16.
- 3) AOAC. Official Methods of Analysis. 17th ed. Association of Official Analytical Chemists. Arlington. VA. 2002.
- 4) Ball RO y Aherne FX. Influence of dietary nutrient density level of feed intake and weaning age on young pig. II. Apparent nutrient digestibility and incidence and severity of diarrhea. *Can J Anim Sci.* 1986; 67 (4): 1105 - 1115.
- 5) Bártová V, Bárta J, Vlačihová A, Šedo O, Zdráhal Z, y col. Proteomic characterization and antifungal activity of potato tuber proteins isolated from starch production waste under different temperature regimes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2018; 102 (24): 10551 - 10560.
- 6) Bártová V, Bárta J y Jarošová M. Antifungal and antimicrobial proteins and peptides of potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers and their applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2019; 103 (4): 5533 - 5547.
- 7) Bateman JV. 1970. Nutrición animal. Manual de métodos analíticos. Herrero Hnos. Sucesores, S.A. México.
- 8) Benko-Iseppon M, Galdino SL, Calsa T, Kido A, Tossi A, y col. Overview on plant antimicrobial peptides. *Curr Protein Pept Sci.* 2010; 11 (3): 181 - 188.

- 9) Berrocal-Lobo M, Segura A, Moreno M, López G, García-Olmedo F, y col. Snakin-2, an Antimicrobial Peptide from Potato Whose Gene Is Locally Induced by Wounding and Responds to Pathogen Infection. *Plant Physiology*. 2002; 128 (3): 951 - 961.
- 10) Blow DM, Janin J y Sweet RM. Mode of action of soybean trypsin inhibitor (Kunitz) as a model for specific protein–protein interactions. *Nature*. 1974; 249 (452): 54 - 57.
- 11) Buddington RK, Sangild PT, Hance B, Huang EY y Black DD. Prenatal gastrointestinal development in the pig and responses after preterm birth. *Sci. J. Anim. Sci*. 2012; 90 (4) :290 - 298.
- 12) Campbell JM, Crenshaw DJ y Polo J. The biological stress of early weaned piglets. *J Anim Sci Biotechnol*. 2013; 4 (1): 1 - 4.
- 13) Carlson KH y Bayley HS. Nitrogen and amino acids in the feces of young pigs receiving a protein-free diet and diets containing graded levels of soybean oil meal or casein. *J Nutr*. 1970; 100 (11) :1353- 1361.
- 14) Casas GA, Huang C, y Stein HH. Nutritional value of soy protein concentrate ground to different particle sizes and fed to pigs. *Sci. J. Anim. Sci*. 2017; 95 (2): 827 - 836.
- 15) Castanon JIR. History of the Use of Antibiotic as Growth Promoters in European Poultry Feeds. *Poult. Sci*. 2007; 86 (11): 2466- 2471.
- 16) Cervantes-Pahm SK y Stein HH. Ileal digestibility of amino acids in conventional, fermented, and enzyme-treated soybean meal and in soy protein isolate, fish meal, and casein fed to weanling pigs<sup>1</sup>. *Sci. J. Anim. Sci*. 2010; 88 (8): 2674 - 2683.
- 17) Clemente M, Corigliano MG, Pariani SA, Sánchez-López EF, Sander VA, y col.

- Plant Serine Protease Inhibitors: Biotechnology Application in Agriculture and Molecular Farming. *Int. J. Mol. Sci.* 2019; 20 (6):1345 – 1366-
- 18) Contreras P, Diaz C, y Taron D. Ciclotidos, proteínas circulares producidas por plantas con potencial farmacológico. *Rev Cubana Farm.* 2015; 49 (2): 384 - 393.
- 19) Cotten B, Regland D, Thomson JE, y Adeola O. Amino acid digestibility of plant protein feed ingredients for growing pigs. *Sci. J. Anim. Sci.* 2016; 94 (3) 1073 - 1082.
- 20) Cromwell GL. Why and how antibiotics are used in swine production. *Anim. Biotechnol.* 2002; 13 (1): 7 – 27.
- 21) Culbertson MS, Herring WO, Holl JW, Casey D. Genetic improvement and dissemination for the global commercial swine industry. *Anim. Prod. Sci.* 2017; 57 (12): 2366 - 2369.
- 22) Culp E, Wright G. Bacterial proteases, untapped antimicrobial drug targets. *J Antibiot.* 2016; 70 (84) 366 - 377.
- 23) Csáky I y Fekete S. Soybean: feed quality and safety. Part 2: pathology of soybean feeding in animals. A review. *Acta Vet Hung.* 2003; 52 (3): 315 - 326.
- 24) Díaz LE, Aguilera A, Reis T, Gómez J, AnayaL, y col. Producción de anticuerpos policlonales de proteínas de pasta de ajonjolí. XI encuentro Participación de la mujer en la ciencia. León, Guanajuato. 2014.
- 25) Edwards SJ. Effect of streptomycin on the growth rate and intestinal flora (*Escherichia coli*) of piglets. *J Comp Pathol.* 1961; 71: 243 - 252.
- 26) Fan MZ y Sauer WC. Determination of apparent ileal amino acid digestibility in barley and canola meal for pigs with the direct, difference, and regression methods. *J Anim Sci* 1995; 73: 2364-2374.

- 27) Foster TJ. Plasmid-determined resistance to antimicrobial drugs and toxic metal ions in bacteria. *Microbiol Rev.* 1983; 47 (3): 361 - 409.
- 28) Froidmont E, Wathelet B, Oger R, Romnée JM, Colinet A, y col. Nutritional properties of potato protein concentrate compared with soybean meal as the main protein source in feed for the double-muscled Belgian Blue bull. *Animal.* 2008; 3 (2): 200 - 208.
- 29) García – Casanova L, Severiano JH, Hernández CL, Mariscal – Landín G, Reis de Souza TC y col. Producción y caracterización de un anticuerpo policlonal contra Kafirinas del sorgo. *Memorias: XLIV Reunión Nacional de Investigación Pecuaria.* Yucatán 2008.
- 30) García – González G, Gonzáles G y Palma J. Las proteasas de serina bacterianas y su implicación en la fisiopatología de la infección. *Rev Lab Clin.* 2019; 12 (3): 137 -146.
- 31) Grant G. Anti-nutritional effects of soyabean: A review. *Prog Food Nutr Sci.* 1989; 13 (3): 317- 48.
- 32) Gresse R, Chaucheyras-Durand F, Fleury MA, Van de Wiele T, Forano E y col. Gut Microbiota Dysbiosis in Postweaning Piglets: Understanding the Keys to Health. *Trends Microbiol.* 2017; 25 (10): 851 - 873.
- 33) Gumbmann MR, Dugan GM, Spangler WL, Baker E y Rackis JJ. Pancreatic Response in Rats and Mice to Trypsin Inhibitors from Soy and Potato After Short- and Long-Term Dietary Exposure. *J Nutr.* 1998; 119 (11): 1598 -1609.
- 34) Gómez Soto JG, Reis de Souza TC, Mariscal Landin G, Aguilera AB, Bernal MG y col. Gastrointestinal morphophysiology and presence of kafirins in ileal digesta in growing pigs fed sorghum-based diets. *J. Appl. Anim. Res.* 2017; 46 (1): 618 – 625.

- 35)Gonzalez RM y Angeles HJC. Antibiotic and synthetic growth promoters in animal diets: Review of impact and analytical methods. *Food Control*. 2016; 72: 255 - 267.
- 36)Heegaard PMH, Boas U y Sorensen NS. Dendrimers for Vaccine and Immunostimulatory Uses. A Review. *Bioconjugate Chemistry*. 2010; 21 (3): 405- 418.
- 37)Helm RM, Golden C, McMahon M. Thampi P, Badger T y col. Diet regulates the development of gut-associated lymphoid tissue in neonatal piglets. *Neonatology*. 2007; 91 (4): 248 - 55.
- 38)Hummel R, Tschäpe, H y Witte W. Spread of plasmid-mediated nourseothricin resistance due to antibiotic use in animal husbandry. *Anton Leeuw Int J G*. 1986; 26 (8): 461 - 466.
- 39)Insuasti ASG, Collazos DV, Argote F. Efecto de la dieta y edad del destete sobre la fisiología digestiva del lechón. *Rev Fac Cienc Agrar*.2008; 6 (1): 32 - 41.
- 40)Jayaraman B y Nyachoti, CM. Husbandry practices and gut health outcomes in weaned piglets: A review. *Animal Nutrition*. 2017; 3 (3): 205 - 211.
- 41)Jezierny, D, Mosenthin, R y Bauer, E. The use of grain legumes as a protein source in pig nutrition: A review. *Anim. Feed Sci. Technol*. 2010: 157 (3 - 4): 111- 128.
- 42)Jin Z, Shinde PL, Yang YX, Choi JY, Yoon SY, y col. Use of refined potato (*Solanum tuberosum* L. cv. Gogu valley) protein as an alternative to antibiotics in weanling pigs. *Livest. Sci*. 2009; 124 (1-3): 26 - 32.
- 43)Jin Z, Shinde PL, Yang YX, Choi JY, Yoon SY y col. Potato (*Solanum tuberosum* L. cv. Gogu valley) protein as a novel antimicrobial agent in

- weanling pigs. *J. Anim. Sci.* 2008; 87 (6): 1562 – 1572.
- 44) Joshi VG, Dighe VD, Thakuria D, Malik YS y Kumar S. Multiple antigenic peptide (MAP): a synthetic peptide dendrimer for diagnostic, antiviral and vaccine strategies for emerging and re-emerging viral diseases. *Indian J Virol.* 2013; 24 (3): 312 - 320.
- 45) Just A, Fernandez AJ y Jorgensen H. Nitrogen balance studies and nitrogen retention. *INRA.* 1982; 12: 111 – 122.
- 46) Kerr C, Goodband A, Smith R, Musser JW, Bergström RE, y col. Evaluation of potato proteins on the growth performance of early-weaned pigs. *Journal of Animal Science.* 1998; 76 (12): 3024 - 3033.
- 47) Kim JY, Park SC, Kim MH, Lim HT, Park Y y col. Antimicrobial activity studies on a trypsin–chymotrypsin protease inhibitor obtained from potato. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005; 330 (3): 921 - 927.
- 48) Kim JY, Park SC, Hwang I, Cheong H, Nah JW, y col. Protease Inhibitors from Plants with Antimicrobial Activity. *Int. J. Mol. Sci.* 2009; 10 (6): 2860 - 2872.
- 49) Koch BJ, Hungate BA, y Price LB. Food-animal production and the spread of antibiotic resistance: the role of ecology. *Front. Ecol. Environ.* 2017; 15 (6): 309 - 318.
- 50) Koressaar, T y Remm M. Enhancements and modifications of primer design program Primer3. *Bioinformatics.* 2007; 23 (10): 1289 - 1291.
- 51) Li J. Current status and prospects for in-feed antibiotics in the different stages of pork production — A review. *Asian-Australas J Anim Sci.* 2017; 30 (12): 1667 - 1673.
- 52) Liu Y, Li F, Kong X, Tan B, Li Y, Duan Y, et al. Signaling Pathways Related to

- Protein Synthesis and Amino Acid Concentration in Pig Skeletal Muscles Depend on the Dietary Protein Level, Genotype and Developmental Stages. *PloS One*. 2015; 10 (9): 1-21.
- 53) Lu X, Zhang M, Zhao L, Ge K, Wang Z, y col. Growth Performance and Post-Weaning Diarrhea in Piglets Fed a Diet Supplemented with Probiotic Complexes. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2018; 28 (11): 1791-1799.
- 54) Levin BR, Antia R, Berllner E, Bloland P, Bonhoeffer S, y col. Resistance to Antimicrobial Chemotherapy: A Prescription for Research and Action. *Am J Med Sci.* 1998; 315 (2): 87 - 94.
- 55) Levy SB y Marshall B. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nature Medicine*. 2004; 10 (12): 122 - 129.
- 56) Mach N, Berri M, Estellé J, Levenez F, Lemonnier CD, y col. Early-life establishment of the swine gut microbiome and impact on host phenotypes. *Environ. Microbiol. Rep.* 2015; (3): 554 - 569.
- 57) Mariscal-Landín G, De Souza TC. Endogenous ileal losses of nitrogen and amino acids in pigs and piglets fed graded levels of casein. *Arch Anim Nutr.* 2006; 60 (6): 454 - 466.
- 58) Mariscal-Landín G, De Souza TC, Hernández AD, Escobar, GK, Pérdidas endógenas de nitrógeno y aminoácidos en cerdos y su aplicación en la estimación de los coeficientes de digestibilidad ileal de la proteína y aminoácidos de las materias primas. *Revisión. Téc Pecu Méx.* 2009; 47 (4): 371 – 388.
- 59) Marshall BM y Levy SB. Food Animals and Antimicrobials: Impacts on Human Health. *Clin. Microbiol. Rev.* 2011; 24 (4): 718 - 733.
- 60) Mateu E. y Martin M. Why is Anti-Microbial Resistance a Veterinary Problem as

- Well?. J. Vet. Med. B. 2001; 48 (8): 569 - 581.
- 61) May AC. Percent Sequence Identity. Structure. 2004; 12 (5): 737–738.
- 62) McCormack U. Investigation and subsequent manipulation of the intestinal microbiota of pigs, with a view to optimising feed efficiency. [PhD tesis]. Waterford (IE) Waterford institute of technology; 2017.
- 63) Medel P, Latorre MA, Mateos GG. Nutrición y alimentación de lechones destetados precozmente. Memorias XV Curso de especialización FEDNA; 1999: Madrid España.
- 64) Myers WD, Ludden PA, Nayigihugu V y Hess BW. Technical Note: A procedure for the preparation and quantitative analysis of samples for titanium dioxide. J. Anim. Sci. 2004; 82 (1): 179 -183.
- 65) Moeser AJ, Pohl SC y Rajput M. Weaning stress and gastrointestinal barrier development: implications for lifelong gut health in pigs. Anim Nutr. 2017; 3 (4): 313 - 321.
- 66) Mu TH, Tan SS y Xue YL. The amino acid composition, solubility and emulsifying properties of sweet potato protein. Food Chemistry. 2009; 112 (4): 1002 - 1005.
- 67) Muns R. y Magowan E. The effect of creep feed intake and starter diet allowance on piglets gut structure and growth performance after weaning. J Anim Sci. 2018; 96 (9): 3815 - 3823.
- 68) Norma Oficial Mexicana NOM-113-SSA1-1994. Método para la cuenta de microorganismos coliformes totales en placa.
- 69) Norma Oficial Mexicana NOM-033-ZOO-1995, Sacrificio humanitario de los animales domésticos y silvestres.

- 70) NRC Nutrient Requirements of Swine: Eleventh Revised Edition. The National Academies Press, Washington, DC. (2012).
- 71) Oliveira ER, Silva CA, Da Castro-Gómez RJH, Lozano AP, Gavioli DF y col. Chito-oligosaccharide as growth promoter replacement for weaned piglets: performance, morphometry, and immune system. *Semin Cienc Agrar*. 2017; 38 (5): 3253.
- 72) Otto ER, Yokoyama M, Ku PK, Ames NK y Trottier NL. Nitrogen balance and ileal amino acid digestibility in growing pigs fed diets reduced in protein concentration. *Sci. J. Anim. Sci.* 2003; 81 (7): 1743 - 1753.
- 73) Pastuszewska B, Tuśnio A, Taciak M y Mazurczyk W. Variability in the composition of potato protein concentrate produced in different starch factories - A preliminary survey. *Anim. Feed Sci. Technol.* (2009); 154 (3-4): 260 - 264.
- 74) Pierce KM, Callan JJ, McCarthy P y O'Doherty JV. The interaction between lactose level and crude protein concentration on piglet post-weaning performance, nitrogen metabolism, selected faecal microbial populations and faecal volatile fatty acid concentrations. *Anim. Feed Sci. Technol.* 2007; 132 (3-4), 267 - 282.
- 75) Pohl CS, Medland JE, Moeser AJ. Early-life stress origins of gastrointestinal disease: animal models, intestinal pathophysiology, and translational implications. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2015; 309 (12): 927- 941.
- 76) Pluske J. Feed- and feed additives-related aspects of gut health and development in weanling pigs. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 2013; 4 (1): 2 -7.
- 77) Rhouma M, Fairbrother JM, Beaudry F y Letellier A. Post weaning diarrhea in pigs: risk factors and non-colistin-based control strategies. *Acta Vet Scand*. 2017; 59 (31): 2 -19.

- 78) Refstie S y Tiekstra, HA. Potato protein concentrate with low content of solanidine glycoalkaloids in diets for Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*. 2003; 216 (1-4): 283–298.
- 79) Reis de Souza TC, Aguilera AB, Rubio SR, Machado WG, Escobar KG, y col. Growth performance, diarrhoea incidence, and nutrient digestibility in weaned piglets fed an antibiotic-free diet with dehydrated porcine plasma or potato protein concentrate. *Ann. Anim. Sci.* 2019; 19 (1): 59 -172.
- 80) Reis de Souza TC, Aguilera MAB, Aguilera AB, Mariscal GL y Guerrero MJC. Morfología del tracto digestivo de lechones alimentados con proteínas de soya aislada o concentrada. *Arch. Latinoam. Prod. Anim.* 2007; 15 (4): 139 – 146.
- 81) Reis de Souza TC, Aguilera AB, Mariscal-Landín G. Estimation of endogenous protein and amino acid ileal losses in weaned piglets by regression analysis using diets with graded levels of casein. *J Anim Sci Biotechnol.* 2013; 4 (1): 36.
- 82) Rist VT, Weiss E, Sauer N, Mosenthin R, Eklund M. Effect of dietary protein supply originating from soybean meal or casein on the intestinal microbiota of piglets. *Anaerobe*. 2014; 25 (1): 72 - 79.
- 83) SAS Institute, Inc. *SAS/STAT Users Guide*, version 9.1 ed. Cary, North Carolina, USA: SAS institute Inc., 2003.
- 84) Saha, S y Raghava G. Predicción de epítomos continuos de células B en un antígeno utilizando una red neuronal recurrente. *Proteínas*. 2006; 65 (1): 40-48.
- 85) Stokstad ER, Jukes TH, Pierce F, Page AC y Franklin AL. The multiple nature of A.P.F. *Journal of Biological Chemistry*. 1949; 180 (82): 647 - 654.
- 86) Stephen F, Altschul L, Madden S, Jinghui Z, Zheng Z, y col. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 1997; 25 (17): 3389 - 3402.

- 87) Tam, P, Wang S, Wong H y Tan L. Antimicrobial Peptides from Plants. Pharmaceuticals (Basel). 2015; 8 (4): 711 - 757.
- 88) Thacker PA. Alternatives to antibiotics as growth promoters for use in swine production: a review. J Animal Sci Biotechnol. 2013; 4 (35): 1 - 12.
- 89) Tay J. Efecto del hidrolizado de pescado seco por aspersión en reemplazo de plasma porcino en dietas de pre-inicio de lechones destetados. [Ingeniería] Lima. (PE): Universidad Nacional Agraria la Molina; 2015.
- 90) Thompson J, Higgins D, Gibson T. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res. 1994; 22(22): 4673 - 4680.
- 91) Tuśnio A, Pastuszewska B. Świąch y Taciak M. Response of young pigs to feeding potato protein and potato fibre - nutritional, physiological and biochemical parameters. J. Anim. Feed Sci. 2011; 20 (3): 361 - 378.
- 92) Vente-Spreuwenberg MAM, Verdonk JMAJ, Beyenen AC y Verstegen MWA. Interrelationships between gut morphology and faeces consistency in newly weaned piglets. Anim. Sci. J. 2003; 77(1): 85 - 94.
- 93) Vondruskova H, Slamova R, Trckova M, Zraly Z y Pavlik I. Alternatives to antibiotic growth promoters in prevention of diarrhoea in weaned piglets: a review. Vet Med-Czech. 2010; 55 (5): 199 -224.
- 94) Waglay A, Karboune S, Alli I. Potato protein isolates: Recovery and characterization of their properties. Food Chem. 2014; 142: 373–382
- 95) Waglay A, y Karboune S. Potato Proteins Functional Food Ingredients. Advances in Potato Chemistry and Technology. Second Edition. Academic Press; 2016. 75–104.

- 96) Wellock IJ, Fortomaris PD, Houdijk JG y Kyriazakis I. Effects of dietary protein supply, weaning age and experimental enterotoxigenic *Escherichia coli* infection on newly weaned pigs: Performance. *Animals*. 2008; 2(6): 825 -833.
- 97) Wijesinha-Bettoni R, Mouillé B. The Contribution of Potatoes to Global Food Security, Nutrition and Healthy Diets. *Am. J. Potato Res.* 2019; 96 (1): 139–149.
- 98) Wojnowska I, Poznanski S y Bednarski W. Processing of Potato Protein Concentrates and Their Properties. *Food Sci.* 1982; 47 (1): 167 - 172.
- 99) Woyengo TA, Beltranena E y Zijlstra RT. Effect of anti-nutritional factors of oilseed co-products on feed intake of pigs and poultry. *Anim. Feed Sci. Technol.* 2016; 233 (1): 76–86.
- 100) Zhao J, Harper AF, Estienne MJ, Webb JKE, McElroy AP, y col. Growth performance and intestinal morphology responses in early weaned pigs to supplementation of antibiotic-free diets with an organic copper complex and spray-dried plasma protein in sanitary and nonsanitary environments. *J Anim Sci.* 2007; 85 (5): 1032 - 1310.

## Anexos

### Anexo 1: Protocolo de extracción de proteínas con TCA

A partir de la muestra descrita para el procedimiento PBS en material y metidos, se colectaron 160 µl en un tubo de 1.5 ml.

- 1) En la solución de 160 µl se añadieron 40 µl de TCA (ácido tricloroacético) y se mantuvo por 10 minutos a 4°C.
- 2) La solución fue centrifugada a 14000 rpm por 5 minutos.
- 3) Se formo un pellet y el solvente fue retirado.
- 4) Se realizo un lavado con 200 µl de acetona (almacenada a -20°C).
- 5) La solución fue centrifugada a 14000 rpm por 5 minutos.
- 6) Se formo un pellet y la acetona fue retirada.
- 7) Se repitieron los pasos 4 a 6 para un total de 2 lavados con acetona.
- 8) La muestra fue calentada a 90°C/ 5 segundos para retirar la acetona remanente.
- 9) El pellet formado fue suspendido en 100 µl de PBS 1x con inhibidor de proteasa.
- 10) La muestra fue almacenada a 4°C por 5 horas.
- 11) Se cuantifico la concentración de proteína en un espectrofotómetro (Genova Nano, Jenway®) mediante el método UV directo.

**Anexo 2: Péptidos identificados en bandas 1, 2, 3 y 4 de gel electroforesis Tris-Tricina a partir de la muestra de CPP mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas.**

N	Unused	Acceso	Bandas	kDa	Nombre	Péptidos (95%)
6	41.12	sp P58514 SP11_SOLTU	1,2,3,4	24009	Serine protease inhibitor 1 OS=Solanum tuberosum OX=4113 PE=1 SV=2	49
7	40.23	sp Q3YJT4 PT1K2_SOLTU	1,2,3,4	24009	Patatin-1-Kuras 2 OS=Solanum tuberosum OX=4113 GN=pat1-k2 PE=1 SV=1	65
11	18.39	sp P58519 AP15_SOLTU	1,4	24303	Aspartic protease inhibitor 5 OS=Solanum tuberosum OX=4113 PE=3 SV=1	33
12	16.79	sp P20347 CP11_SOLTU	1,2,3,4	24684	Cysteine protease inhibitor 1 OS=Solanum tuberosum OX=4113 PE=1 SV=3	25
13	16.13	sp Q3YJT3 PT2K1_SOLTU	1,2,3,4	41108	Patatin-2-Kuras 1 OS=Solanum tuberosum OX=4113 GN=pat2-k1 PE=1 SV=1	43
14	12.01	sp P08454 CID_SOLTU	1,2,3,4	12145	Wound-induced proteinase inhibitor 1 OS=Solanum tuberosum OX=4113 PE=1 SV=2	15
16	11.49	sp O22508 LOX18_SOLTU	1, 2,3	97020	Probable linoleate 9S-lipoxygenase 8 OS=Solanum tuberosum OX=4113 GN=LOX1.8 PE=2 SV=1	15
17	10.02	sp P30941 SP17_SOLTU	1,2,3,4	24018	Serine protease inhibitor 7 OS=Solanum tuberosum OX=4113 PE=1 SV=2	36
20	6	sp P01052 CIA_SOLTU	1,2,3	8033	Chymotrypsin inhibitor I, A, B and C subunits OS=Solanum tuberosum OX=4113 PE=1 SV=1"	14
21	5.8	sp P19595 UGPA_SOLTU	1,2,3,4	51874	UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase OS=Solanum tuberosum OX=4113 PE=1 SV=3	4
22	4.19	sp O24385 CP17_SOLTU	1	19977	Cysteine protease inhibitor 7 (Fragment) OS=Solanum tuberosum OX=4113 PE=2 SV=1	14
23	4.11	sp P58521 AP19_SOLTU	1,2,4	20368	Aspartic protease inhibitor 9 OS=Solanum tuberosum OX=4113 PE=1 SV=1	33
24	4.06	sp O24383 CP110_SOLTU	1,2,4	20962	Cysteine protease inhibitor 10 (Fragment) OS=Solanum tuberosum OX=4113 PE=2 SV=1	22
25	4.02	sp Q41488 IP25_SOLTU	1,2,3,4	16660	Proteinase inhibitor type-2 P303.51 OS=Solanum tuberosum OX=4113 PE=2 SV=1	2
25	0	sp P01080 IP2K_SOLTU	1,2,3,4	16505	Proteinase inhibitor type-2 K OS=Solanum tuberosum OX=4113 GN=PIN2K PE=1 SV=2	2
27	4	sp Q43190 LOX14_SOLTU	1,2	96969	Probable linoleate 9S-lipoxygenase 4 OS=Solanum tuberosum OX=4113 GN=LOX1.4 PE=2 SV=1	14
28	4	sp Q00783 CI1_SOLTU	1,2,3,4	12063	Proteinase inhibitor 1 OS=Solanum tuberosum OX=4113 PE=3 SV=1	7
29	4	sp P58602 CP14_SOLTU	1,2	2520	Cysteine protease inhibitor 4 (Fragment) OS=Solanum tuberosum OX=4113 PE=1 SV=1	6

30	4	sp P55312 CA TA2_SOLTU	1,2,4	56461	Catalase isozyme 2 OS=Solanum tuberosum OX=4113 GN=CAT2 PE=3 SV=1	2
31	4	sp P20346 DF 322_SOLTU	1,2,3,4	8414	Defensin-like protein P322 OS=Solanum tuberosum OX=4113 PE=2 SV=1	2
34	2.13	sp Q41484 SP I5_SOLTU	1,2,3,4	23137	Serine protease inhibitor 5 OS=Solanum tuberosum OX=4113 PE=1 SV=1	45
36	2.01	sp P46300 RS 4_SOLTU	1,2,3	29958	40S ribosomal protein S4 OS=Solanum tuberosum OX=4113 GN=RPS4 PE=2 SV=1	1
37	2	sp Q41480 AP I1_SOLTU	1,4	24546	Aspartic protease inhibitor 1 OS=Solanum tuberosum OX=4113 PE=1 SV=2	37
38	2	sp Q00652 CP I9_SOLTU	1,2,4	24734	Cysteine protease inhibitor 9 OS=Solanum tuberosum OX=4113 PE=2 SV=1	16
40	2	sp P37831 LO X11_SOLTU	1	96967	Linoleate 9S-lipoxygenase 1 OS=Solanum tuberosum OX=4113 GN=LOX1.1 PE=2 SV=1	15
43	2	sp Q00782 IP 2X_SOLTU	1,2,3,4	17132	Proteinase inhibitor type-2 OS=Solanum tuberosum OX=4113 PE=3 SV=1	2
44	2	sp P93586 AC T2_SOLTU	1	37089	Actin-46 (Fragment) OS=Solanum tuberosum OX=4113 PE=3 SV=1	1
45	2	sp P42055 VD AC1_SOLTU	1,2	29573	Mitochondrial outer membrane protein porin of 34 kDa OS=Solanum tuberosum OX=4113 PE=1 SV=2	1
47	2	sp Q2VEE4 R K14_SOLTU	1	13578	50S ribosomal protein L14, chloroplastic OS=Solanum tuberosum OX=4113 GN=rpl14 PE=3 SV=1"	1
48	2	sp P62981 RS 27A_SOLTU	1,2,3,4	17702	Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a OS=Solanum tuberosum OX=4113 GN=UBI3 PE=2 SV=2	1
49	2	sp P23509 GL GS_SOLTU	1,2	57250	Glucose-1-phosphate adenylyltransferase small subunit, chloroplastic/amyloplastic OS=Solanum tuberosum OX=4113 PE=1 SV=2"	1
52	1.33	sp Q00081 GL GL1_SOLTU	1,2	52253	Glu+E2:E94-phosphate adenylyltransferase large subunit 1 (Fragment) OS=Solanum tuberosum OX=4113 GN=AGPS1 PE=1 SV=1	1
5	40.03	sp Q41433 SP I6_SOLTU	2,3	24097	Probable serine protease inhibitor 6 OS=Solanum tuberosum OX=4113 PE=2 SV=1	95
7	29.1	sp O22508 LO X18_SOLTU	1,2,3	97020	Probable linoleate 9S-lipoxygenase 8 OS=Solanum tuberosum OX=4113 GN=LOX1.8 PE=2 SV=1	29
9	21.15	sp Q3YJT4 PT 1K2_SOLTU	1,2,3,4	24009	Patatin-1-Kuras 2 OS=Solanum tuberosum OX=4113 GN=pat1-k2 PE=1 SV=1	82
12	19.09	sp P20347 CP I1_SOLTU	1,2,3,4	24684	Cysteine protease inhibitor 1 OS=Solanum tuberosum OX=4113 PE=1 SV=3	28
13	17.5	sp Q42502 PT 2K3_SOLTU	2,3,4	42465	Patatin-2-Kuras 3 OS=Solanum tuberosum OX=4113 GN=pat2-k3 PE=1 SV=1	51
14	15.74	sp P58521 AP I9_SOLTU	1,2,4	20368	Aspartic protease inhibitor 9 OS=Solanum tuberosum OX=4113 PE=1 SV=1	39
16	11.59	sp Q41488 IP 25_SOLTU	1,2,3,4	16620	Proteinase inhibitor type-2 P303.51 OS=Solanum tuberosum OX=4113 PE=2 SV=1	8

16	0	sp P01080 IP2 K_SOLTU	1,2,3,4	16505	Proteinase inhibitor type-2 K OS=Solanum tuberosum OX=4113 GN=PIN2K PE=1 SV=2	7
17	11.03	sp P19595 UG PA_SOLTU	1,2,3,4	51874	UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase OS=Solanum tuberosum OX=4113 PE=1 SV=3	7
18	8.3	sp P08454 ICI D_SOLTU	1,2,3,4	12145	Wound-induced proteinase inhibitor 1 OS=Solanum tuberosum OX=4113 PE=1 SV=2	27
19	8.02	sp P58514 SP I1_SOLTU	1,2,3,4	24009	Serine protease inhibitor 1 OS=Solanum tuberosum OX=4113 PE=1 SV=2	72
22	7.1	sp Q3YJT3 PT 2K1_SOLTU	1,2,3,4	41108	Patatin-2-Kuras 1 OS=Solanum tuberosum OX=4113 GN=pat2-k1 PE=1 SV=1	61
22	0	sp Q2MY39 P AT12_SOLTU	2	42595	Patatin-12 OS=Solanum tuberosum OX=4113 PE=2 SV=1	61
23	6.03	sp Q00783 ICI 1_SOLTU	1,2,3,4	12063	Proteinase inhibitor 1 OS=Solanum tuberosum OX=4113 PE=3 SV=1	15
24	5.76	sp P49284 CA TA1_SOLTU	2	56370	Catalase isozyme 1 OS=Solanum tuberosum OX=4113 GN=CAT1 PE=2 SV=1	3
24	0	sp P55312 CA TA2_SOLTU	1,2,4	56461	Catalase isozyme 2 OS=Solanum tuberosum OX=4113 GN=CAT2 PE=3 SV=1	3
25	4.85	sp P46300 RS 4_SOLTU	1,2,3	29958	40S ribosomal protein S4 OS=Solanum tuberosum OX=4113 GN=RPS4 PE=2 SV=1	5
26	4.47	sp P23509 GL GS_SOLTU	1,2	57240	Glucose-1-phosphate adenylyltransferase small subunit, chloroplastic/amyloplastic OS=Solanum tuberosum OX=4113 PE=1 SV=2"	3
27	4.22	sp P04045 PH SL1_SOLTU	2,3,4	109506	Alpha-1,4 glucan phosphorylase L-1 isozyme, chloroplastic/amyloplastic OS=Solanum tuberosum OX=4113 PE=1 SV=2"	2
28	4.08	sp Q43190 LO X14_SOLTU	1,2	96969	Probable linoleate 9S-lipoxygenase 4 OS=Solanum tuberosum OX=4113 GN=LOX1.4 PE=2 SV=1	22
29	4.01	sp Q41448 AP I7_SOLTU	2,3	24485	Aspartic protease inhibitor 7 OS=Solanum tuberosum OX=4113 PE=2 SV=1	39
30	4.01	sp P62981 RS 27A_SOLTU	1,2,3,4	17702	Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a OS=Solanum tuberosum OX=4113 GN=UBI3 PE=2 SV=2	2
31	4	sp P30941 SP I7_SOLTU	1,2,3,4	24018	Serine protease inhibitor 7 OS=Solanum tuberosum OX=4113 PE=1 SV=2	82
32	4	sp P42055 VD AC1_SOLTU	1,2	29573	Mitochondrial outer membrane protein porin of 34 kDa OS=Solanum tuberosum OX=4113 PE=1 SV=2	3
33	4	sp P25083 AD T1_SOLTU	2	42058	ADP, ATP carrier protein, mitochondrial OS=Solanum tuberosum OX=4113 GN=ANT PE=2 SV=1"	3
34	3.96	sp P20346 DF 322_SOLTU	1,2,3,4	8414	Defensin-like protein P322 OS=Solanum tuberosum OX=4113 PE=2 SV=1	4
38	3.17	sp O24383 CP I10_SOLTU	1,2,4	20962	Cysteine protease inhibitor 10 (Fragment) OS=Solanum tuberosum OX=4113 PE=2 SV=1	18
39	3.09	sp Q00652 CP I9_SOLTU	1,2,4	24734	Cysteine protease inhibitor 9 OS=Solanum tuberosum OX=4113 PE=2 SV=1	19

41	2.05	sp Q2MY56 P ATD2_SOLTU	2,3	42687	Patatin group D-2 OS=Solanum tuberosum OX=4113 PE=2 SV=1	34
41	0.01	sp P15478 PA TT5_SOLTU	2,4	42338	Patatin-T5 OS=Solanum tuberosum OX=4113 PE=1 SV=1	34
42	2.03	sp P58602 CP I4_SOLTU	1,2	2520	Cysteine protease inhibitor 4 (Fragment) OS=Solanum tuberosum OX=4113 PE=1 SV=1	2
43	2.02	sp Q41484 SP I5_SOLTU	1,2,3,4	23137	Serine protease inhibitor 5 OS=Solanum tuberosum OX=4113 PE=1 SV=1	88
44	2.02	sp P01052 ICI A_SOLTU	1,2,3	8033	Chymotrypsin inhibitor I, A, B and C subunits OS=Solanum tuberosum OX=4113 PE=1 SV=1"	13
46	2	sp O22507 LO X17_SOLTU	2,4	97065	Probable linoleate 9S-lipoxygenase 7 OS=Solanum tuberosum OX=4113 GN=LOX1.7 PE=2 SV=1	29
49	2	sp Q00782 IP 2X_SOLTU	1,2,3,4	17132	Proteinase inhibitor type-2 OS=Solanum tuberosum OX=4113 PE=3 SV=1	4
51	2	sp Q00081 GL GL1_SOLTU	1,2	52253	Glucose-1-phosphate adenyltransferase large subunit 1 (Fragment) OS=Solanum tuberosum OX=4113 GN=AGPS1 PE=1 SV=1	1
53	2	sp Q06801 DP EP_SOLTU	2	64951	4-alpha-glucanotransferase, chloroplastic/amyloplastic OS=Solanum tuberosum OX=4113 GN=DPEP PE=1 SV=1"	1
54	2	sp P46269 QC R8_SOLTU	2,3	8317	Cytochrome b-c1 complex subunit 8 OS=Solanum tuberosum OX=4113 PE=1 SV=2	2
55	2	sp P00061 CY C_SOLTU	2,4	11982	Cytochrome c OS=Solanum tuberosum OX=4113 PE=1 SV=1	1
56	1.89	sp O24379 LO X12_SOLTU	2,3,4	97067	Linoleate 9S-lipoxygenase 2 OS=Solanum tuberosum OX=4113 GN=LOX1.2 PE=1 SV=1	29
57	1.39	sp P01079 IP2 1_SOLTU	2,3,4	5602	Proteinase inhibitor PTI OS=Solanum tuberosum OX=4113 PE=1 SV=1	2
5	46.17	sp Q41433 SP I6_SOLTU	2,3	24097	Probable serine protease inhibitor 6 OS=Solanum tuberosum OX=4113 PE=2 SV=1	56
7	38.04	sp Q00783 ICI 1_SOLTU	1,2,3,4	12063	Proteinase inhibitor 1 OS=Solanum tuberosum OX=4113 PE=3 SV=1	
10	26.43	sp O22508 LO X18_SOLTU	1,2,3	97020	Probable linoleate 9S-lipoxygenase 8 OS=Solanum tuberosum OX=4113 GN=LOX1.8 PE=2 SV=1	18
12	23.51	sp Q3YJT3 PT 2K1_SOLTU	1,2,3,4	41108	Patatin-2-Kuras 1 OS=Solanum tuberosum OX=4113 GN=pat2-k1 PE=1 SV=1	19
14	18.21	sp Q3YJT4 PT 1K2_SOLTU	1,2,3,4	24009	Patatin-1-Kuras 2 OS=Solanum tuberosum OX=4113 GN=pat1-k2 PE=1 SV=1	19
15	18.15	sp P20347 CP I1_SOLTU	1,2,3,4	24684	Cysteine protease inhibitor 1 OS=Solanum tuberosum OX=4113 PE=1 SV=3	14
16	16.49	sp Q41448 AP I7_SOLTU	2,3	24485	Aspartic protease inhibitor 7 OS=Solanum tuberosum OX=4113 PE=2 SV=1	35
18	16.05	sp P08454 ICI D_SOLTU	1,2,3,4	12145	Wound-induced proteinase inhibitor 1 OS=Solanum tuberosum OX=4113 PE=1 SV=2	52

19	10	sp P58514 SP11_SOLTU	1,2,3,4	24009	Serine protease inhibitor 1 OS=Solanum tuberosum OX=4113 PE=1 SV=2	51
20	9.08	sp P04045 PHSL1_SOLTU	2,3,4	109506	Alpha-1,4 glucan phosphorylase L-1 isozyme, chloroplastic/amyloplastic OS=Solanum tuberosum OX=4113 PE=1 SV=2"	6
22	6.53	sp Q00782 IP2X_SOLTU	1,2,3,4	17132	Proteinase inhibitor type-2 OS=Solanum tuberosum OX=4113 PE=3 SV=1	4
23	6.01	sp P01052 CIA_SOLTU	1,2,3	8033	Chymotrypsin inhibitor I, A, B and C subunits OS=Solanum tuberosum OX=4113 PE=1 SV=1"	31
26	6	sp Q3YJT5 PAT05_SOLTU	3, 4	42528	Patatin-05 OS=Solanum tuberosum OX=4113 GN=pat1-k1 PE=1 SV=1	17
27	5.69	sp P62981 RS27A_SOLTU	1,2,3,4	17702	Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a OS=Solanum tuberosum OX=4113 GN=UBI3 PE=2 SV=2	4
29	4.45	sp Q24384 CP18_SOLTU	3	24694	Cysteine protease inhibitor 8 (Fragment) OS=Solanum tuberosum OX=4113 PE=2 SV=1	14
30	4.22	sp Q24385 CP17_SOLTU	3,4	19977	Cysteine protease inhibitor 7 (Fragment) OS=Solanum tuberosum OX=4113 PE=2 SV=1	9
32	4	sp Q41484 SP15_SOLTU	1,2,3,4	23137	Serine protease inhibitor 5 OS=Solanum tuberosum OX=4113 PE=1 SV=1	38
34	4	sp Q42502 PT2K3_SOLTU	2,3,4	42465	Patatin-2-Kuras 3 OS=Solanum tuberosum OX=4113 GN=pat2-k3 PE=1 SV=1	16
35	3.74	sp P20346 DF322_SOLTU	1,2,3,4	8414	Defensin-like protein P322 OS=Solanum tuberosum OX=4113 PE=2 SV=1	2
36	3.19	sp P17979 AP18_SOLTU	3	24190	Aspartic protease inhibitor 8 OS=Solanum tuberosum OX=4113 PE=2 SV=1	26
37	3.1	sp Q41488 IP25_SOLTU	1,2,3,4	16620	Proteinase inhibitor type-2 P303.51 OS=Solanum tuberosum OX=4113 PE=2 SV=1	4
37	0	sp P01080 IP2K_SOLTU	1,2,3,4	16505	Proteinase inhibitor type-2 K OS=Solanum tuberosum OX=4113 GN=PIN2K PE=1 SV=2	4
37	0	sp Q43652 IP27_SOLTU	3	16868	Proteinase inhibitor type-2 CM7 OS=Solanum tuberosum OX=4113 GN=PIN2-CM7 PE=3 SV=1	2
37	0	sp Q41489 IP2Y_SOLTU	3	15935	Proteinase inhibitor type-2 OS=Solanum tuberosum OX=4113 PE=3 SV=1	2
37	0	sp Q41435 IP2T_SOLTU	3,4	15860	Proteinase inhibitor type-2 T OS=Solanum tuberosum OX=4113 GN=PIN2T PE=2 SV=1	2
38	2.45	sp P46270 QCR9_SOLTU	3	8048	Cytochrome b-c1 complex subunit 9 OS=Solanum tuberosum OX=4113 PE=1 SV=1	2
39	2.27	sp P37831 LOX11_SOLTU	3	96967	Linoleate 9S-lipoxygenase 1 OS=Solanum tuberosum OX=4113 GN=LOX1.1 PE=2 SV=1	17
40	2.1	sp P31427 AMPL_SOLTU	3,4	60122	Leucine aminopeptidase, chloroplastic OS=Solanum tuberosum OX=4113 GN=LAP PE=2 SV=2"	1
41	2.04	sp P19595 UGPA_SOLTU	1,2,3,4	51874	UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase OS=Solanum tuberosum OX=4113 PE=1 SV=3	1

42	2.01	sp P30941 SP I7_SOLTU	1,2,3,4	24018	Serine protease inhibitor 7 OS=Solanum tuberosum OX=4113 PE=1 SV=2	42
45	2	sp Q24379 LO X12_SOLTU	2,3,4	97067	Linoleate 9S-lipoxygenase 2 OS=Solanum tuberosum OX=4113 GN=LOX1.2 PE=1 SV=1	16
46	2	sp Q3YJS9 P T3K1_SOLTU	3,4	41193	Probable inactive patatin-3-Kuras 1 OS=Solanum tuberosum OX=4113 GN=pat3-k1 PE=1 SV=1	6
48	2	sp P01079 IP2 1_SOLTU	2,3,4	5602	Proteinase inhibitor PTI OS=Solanum tuberosum OX=4113 PE=1 SV=1	2
49	2	sp P46300 RS 4_SOLTU	1,2,3	29958	40S ribosomal protein S4 OS=Solanum tuberosum OX=4113 GN=RPS4 PE=2 SV=1	1
50	2	sp P46269 QC R8_SOLTU	2,3	8317	Cytochrome b-c1 complex subunit 8 OS=Solanum tuberosum OX=4113 PE=1 SV=2	1
53	1.59	sp P43349 TC TP_SOLTU	3,4	18846	Translationally controlled tumor protein homolog OS=Solanum tuberosum OX=4113 GN=TCTP PE=2 SV=2	1
54	1.44	sp Q2MY56 P ATD2_SOLTU	2,3	42687	Patatin group D-2 OS=Solanum tuberosum OX=4113 PE=2 SV=1	13
5	45.53	sp P58514 SP I1_SOLTU	1,2,3,4	24009	Serine protease inhibitor 1 OS=Solanum tuberosum OX=4113 PE=1 SV=2	187
6	30.63	sp P20347 CP I1_SOLTU	1,2,3,4	24684	Cysteine protease inhibitor 1 OS=Solanum tuberosum OX=4113 PE=1 SV=3	39
8	29.44	sp Q24379 LO X12_SOLTU	2,3,4	97067	Linoleate 9S-lipoxygenase 2 OS=Solanum tuberosum OX=4113 GN=LOX1.2 PE=1 SV=1	17
9	28.65	sp Q3YJT3 PT 2K1_SOLTU	1,2,3,4	41108	Patatin-2-Kuras 1 OS=Solanum tuberosum OX=4113 GN=pat2-k1 PE=1 SV=1	37
11	25.95	sp P58519 AP I5_SOLTU	1,4	24303	Aspartic protease inhibitor 5 OS=Solanum tuberosum OX=4113 PE=3 SV=1	70
15	16.9	sp P30941 SP I7_SOLTU	1,2,3,4	24018	Serine protease inhibitor 7 OS=Solanum tuberosum OX=4113 PE=1 SV=2	146
16	12.78	sp Q3YJT4 PT 1K2_SOLTU	1,2,3,4	24009	Patatin-1-Kuras 2 OS=Solanum tuberosum OX=4113 GN=pat1-k2 PE=1 SV=1	30
17	12.59	sp Q00782 IP 2X_SOLTU	1,2,3,4	17132	Proteinase inhibitor type-2 OS=Solanum tuberosum OX=4113 PE=3 SV=1	13
18	10.68	sp Q24383 CP I10_SOLTU	1,2,4	20962	Cysteine protease inhibitor 10 (Fragment) OS=Solanum tuberosum OX=4113 PE=2 SV=1	34
24	7.57	sp Q41484 SP I5_SOLTU	1,2,3,4	23137	Serine protease inhibitor 5 OS=Solanum tuberosum OX=4113 PE=1 SV=1	145
25	7.21	sp P04045 PH SL1_SOLTU	2,3,4	109506	Alpha-1,4 glucan phosphorylase L-1 isozyme, chloroplastic/amyloplastic OS=Solanum tuberosum OX=4113 PE=1 SV=2"	4
26	6.91	sp P00061 CY C_SOLTU	2,4	11982	Cytochrome c OS=Solanum tuberosum OX=4113 PE=1 SV=1	6
27	6.8	sp P58521 AP I9_SOLTU	1,2,4	20368	Aspartic protease inhibitor 9 OS=Solanum tuberosum OX=4113 PE=1 SV=1	64

28	6.13	sp Q41488 IP25_SOLTU	1,2,3,4	16620	Proteinase inhibitor type-2 P303.51 OS=Solanum tuberosum OX=4113 PE=2 SV=1	13
28	0	sp P01080 IP2K_SOLTU	1,2,3,4	16505	Proteinase inhibitor type-2 K OS=Solanum tuberosum OX=4113 GN=PIN2K PE=1 SV=2	13
29	6	sp Q2MY43 PAT08_SOLTU	4	42686	Patatin-08 OS=Solanum tuberosum OX=4113 PE=2 SV=1	34
30	5.08	sp P55312 CATA2_SOLTU	1,2,4	56461	Catalase isozyme 2 OS=Solanum tuberosum OX=4113 GN=CAT2 PE=3 SV=1	3
31	4.98	sp P08454 ICID_SOLTU	1,2,3,4	12145	Wound-induced proteinase inhibitor 1 OS=Solanum tuberosum OX=4113 PE=1 SV=2	5
33	4.74	sp P31427 AMPL_SOLTU	3,4	60122	Leucine aminopeptidase, chloroplastic OS=Solanum tuberosum OX=4113 GN=LAP PE=2 SV=2"	3
34	4.72	sp Q42502 PT2K3_SOLTU	2,3,4	42465	Patatin-2-Kuras 3 OS=Solanum tuberosum OX=4113 GN=pat2-k3 PE=1 SV=1	38
35	4.67	sp O22507 LOX17_SOLTU	2,4	97065	Probable linoleate 9S-lipoxygenase 7 OS=Solanum tuberosum OX=4113 GN=LOX1.7 PE=2 SV=1	17
37	4.04	sp O24385 CPI7_SOLTU	3,4	19977	Cysteine protease inhibitor 7 (Fragment) OS=Solanum tuberosum OX=4113 PE=2 SV=1	25
39	4	sp P15478 PATT5_SOLTU	2,4	42338	Patatin-T5 OS=Solanum tuberosum OX=4113 PE=1 SV=1	29
40	3.42	sp P07745 PAT0_SOLTU	4	42490	Patatin OS=Solanum tuberosum OX=4113 PE=3 SV=1	35
41	3.21	sp P62981 RS27A_SOLTU	1,2,3,4	17702	Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a OS=Solanum tuberosum OX=4113 GN=UBI3 PE=2 SV=2	2
44	2.9	sp P19595 UGPA_SOLTU	1,2,3,4	51874	UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase OS=Solanum tuberosum OX=4113 PE=1 SV=3	2
45	2.84	sp P20346 DF322_SOLTU	1,2,3,4	8414	Defensin-like protein P322 OS=Solanum tuberosum OX=4113 PE=2 SV=1	2
46	2.72	sp Q41435 IP2T_SOLTU	3,4	15860	Proteinase inhibitor type-2 T OS=Solanum tuberosum OX=4113 GN=PIN2T PE=2 SV=1	7
47	2.63	sp Q43645 API4_SOLTU	4	24375	Aspartic protease inhibitor 4 OS=Solanum tuberosum OX=4113 PE=2 SV=2	55
48	2.46	sp P56336 IF5A4_SOLTU	4	17318	Eukaryotic translation initiation factor 5A-4 OS=Solanum tuberosum OX=4113 GN=EIF5A4 PE=2 SV=1	2
49	2.17	sp Q41480 API1_SOLTU	1,4	24546	Aspartic protease inhibitor 1 OS=Solanum tuberosum OX=4113 PE=1 SV=2	81
50	2.11	sp P43349 TCTP_SOLTU	3,4	18846	Translationally controlled tumor protein homolog OS=Solanum tuberosum OX=4113 GN=TCTP PE=2 SV=2	1
51	2.05	sp Q2MY44 PAT07_SOLTU	4	42648	Patatin-07 OS=Solanum tuberosum OX=4113 PE=2 SV=1	24
51	0	sp Q3YJT5 PAT05_SOLTU	3,4	42528	Patatin-05 OS=Solanum tuberosum OX=4113 GN=pat1-k1 PE=1 SV=1	24

53	2	sp Q43189 LOX13_SOLTU	4	96974	Probable linoleate 9S-lipoxygenase 3 OS=Solanum tuberosum OX=4113 GN=LOX1.3 PE=2 SV=1	16
54	2	sp Q2MY51 PATM3_SOLTU	4	42618	Patatin group M-3 OS=Solanum tuberosum OX=4113 PE=2 SV=1	35
55	2	sp Q00652 CPI9_SOLTU	1,2,4	24734	Cysteine protease inhibitor 9 OS=Solanum tuberosum OX=4113 PE=2 SV=1	27
56	2	sp Q3YJS9 PT3K1_SOLTU	3,4	41193	Probable inactive patatin-3-Kuras 1 OS=Solanum tuberosum OX=4113 GN=pat3-k1 PE=1 SV=1	15
57	2	sp P01079 IPT21_SOLTU	2,3,4	5602	Proteinase inhibitor PTI OS=Solanum tuberosum OX=4113 PE=1 SV=1	4
58	2	sp Q00783 ICI1_SOLTU	1,2,3,4	12063	Proteinase inhibitor 1 OS=Solanum tuberosum OX=4113 PE=3 SV=1	3
59	2	sp P93564 GPA1_SOLTU	4	44922	Guanine nucleotide-binding protein alpha-1 subunit OS=Solanum tuberosum OX=4113 GN=GPA1 PE=2 SV=1	1
60	2	sp P48502 QCR7_SOLTU	4	14471	Cytochrome b-c1 complex subunit 7 OS=Solanum tuberosum OX=4113 PE=1 SV=1	1
63	2	sp Q2VEE4 RK14_SOLTU	4	13578	50S ribosomal protein L14, chloroplastic OS=Solanum tuberosum OX=4113 GN=rp14 PE=3 SV=1"	1
64	1.44	sp P93784 14335_SOLTU	4	28936	14-3-3-like protein 16R OS=Solanum tuberosum OX=4113 PE=2 SV=1	2

### Anexo 3: Predicción de epítomos antigénicos para la selección de péptidos a sintetizar para la producción de anticuerpos.

Predicción de epítomos antigénicos de Potamina -1 y selección de péptido sintético.			
Secuencia	DICTNCCAGTKGCNTTSANGAFICEGQSDPKKPKACPLNCDPHIAYA		
Largo de la secuencia	47		
Rango	Secuencia	Posición inicial	Puntuación antigénica
1	FICEGQSDPKKPKACP	21	0.87
2	AGTKGCNTTSANGAFI	7	0.85
3	PKKPKACPLNCDPHIA	29	0.53

**DICTNCCAGTKGCNTTSANGAFICEGQSDPKKPKACPLNCDPHIAYA**

-----FICEGQSDPKKPKACP-----

-----AGTKGCNTTSANGAFI-----

-----PKKPKACPLNCDPHIA--

Aminoácidos marcados en azul determinan el péptido seleccionado por su antigenicidad para la producción del péptido sintético y 8 MAPS.

Predicción de epítomos antigénicos de Snakina -1 y selección de péptido sintético.			
Secuencia	MKLFLLTLLLVTLVITPSLIQTTMAGSSFCDKCKLRCSKAGLADRCLKYCGICCEECKCVPSGTYGNKH ECPCYRDKKNSKGKSKCP		
Largo de la secuencia	88		
Rango	Secuencia	Posición inicial	Puntuación antigénica
1	PSLIQTTMAGSSFCDK	17	0.95
2	PCYRDKKNSKGKSKCP	73	0.92
3	GNKHECPCYRDKKNSK	67	0.91
3	CKCVPSGTYGNKHECP	58	0.91
3	AGLADRCLKYCGICCE	41	0.91
4	CDSKCKLRCSKAGLAD	30	0.74
5	TMAGSSFCDKCKLRC	23	0.73

**MKLFLLTLLLVTLVITPSLIQTTMAGSSFCDKCKLRCSKAGLADRCLKYCGICCEECKCVPSGTYGNKHECPCYRDKKNSKGKSKCP**

-----PSLIQTTMAGSSFCDK-----

-----PCYRDKKNSKGKSKCP

-----GNKHECPCYRDKKNSK-----

-----CKCVPSGTYGNKHECP-----

-----AGLADRCLKYCGICCE-----

-----CDSKCKLRCSKAGLAD-----

-----TMAGSSFCDKCKLRC-----

Aminoácidos marcados en azul determinan el péptido seleccionado por su antigenicidad para la producción del péptido sintético y 8 MAPS.

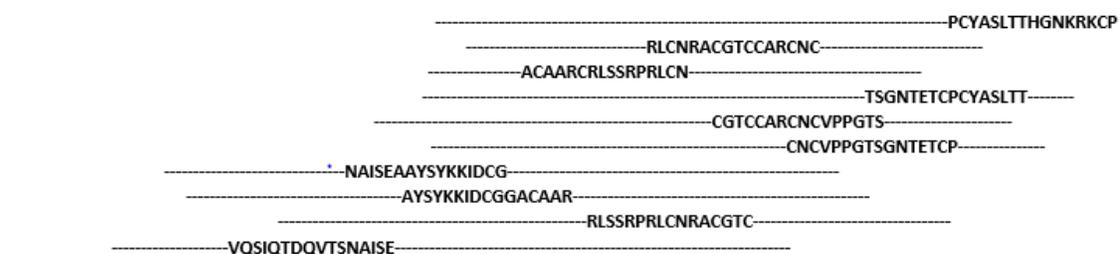
Predicción de epítomos antigénicos de Snakina -2 y selección de péptido sintético.

Secuencia MAISKALFASLLLSLLLLLEQVQSIQTDQVTSNAISEAA  
 YSYKKIDCGGACAARCRLSSRPRLCNRACGTCCAR  
 CNCVPPGTSGNTETPCYASLTTHGNKRKCP

Largo de la secuencia 104

Rango	Secuencia	Posición inicial	Puntuación antigénica
1	PCYASLTTHGNKRKCP	89	0.93
2	RLCNRACGTCCARCNC	61	0.88
2	ACAARCRLSSRPRLCN	49	0.88
3	TSGNTETPCYASLTT	81	0.87
4	CGTCCARCNCVPPGTS	67	0.86
5	CNCVPPGTSGNTETCP	74	0.85
5	NAISEAASYKKIDCG	32	0.85
6	ASYKKIDCGGACAAR	38	0.82
7	RLSSRPRLCNRACGTC	55	0.79
8	VQSIQTDQVTSNAISE	21	0.76

MAISKALFASLLLSLLLLLEQVQSIQTDQVTSNAISEAASYKKIDCGGACAARCRLSSRPRLCNRACGTCCARC **CNCVPPGTSGNTETPCYASLTTHGNKRKCP**



Aminoácidos marcados en azul determinan el péptido seleccionado por su antigenicidad para la producción del péptido sintético y 8 MAPS.