



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA**

**EVALUACIÓN DEL EFECTO DE DIETAS CON BASE VEGETAL Y EL PROBIÓTICO  
*Pediococcus acidilactici* EN EL CRECIMIENTO Y RESPUESTA INMUNE DE  
JUVENILES DE TRUCHA ARCOÍRIS (*Onchorhynchus mykiss*).**

## **TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA**

PRESENTA:

**BIÓL. SEGURA CAMPOS JESUS MANUEL**

**TUTOR PRINCIPAL:**

**DR. LUIS HÉCTOR HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ**

LABORATORIO DE PRODUCCIÓN ACUÍCULA, FES IZTACALA, UNAM

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:**

**DRA. CRISANTEMA HERNÁNDEZ GONZÁLEZ**

LABORATORIO DE NUTRICIÓN Y ALIMENTACIÓN DE PECES Y CAMARONES, CIAD

**DR. CARLOS ALFONSO ÁLVAREZ GONZÁLEZ**

LABORATORIO DE ACUACULTURA TROPICAL, UJAT

**DRA. MARTHA GABRIELA GAXIOLA CORTÉS**

MANEJO DE ZONAS COSTERAS UMDI SISAL

**DRA. MARÍA LETICIA ARENA ORTÍZ**

LABORATORIO DE ESTUDIOS ECOGENÓMICOS, UMDI SISAL

CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX., FEBRERO DE 2024



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.

AQUÍ VA LO DE LA BIBLIOTECA



**EVALUACIÓN DEL EFECTO DE DIETAS CON BASE VEGETAL Y EL PROBIÓTICO  
*Pediococcus acidilactici* EN EL CRECIMIENTO Y RESPUESTA INMUNE DE  
JUVENILES DE TRUCHA ARCOÍRIS (*Onchorhynchus mykiss*).**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:  
**MAESTRO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA**

PRESENTA:

**BIÓL. SEGURA CAMPOS JESUS MANUEL**

TUTOR

**DR. LUIS HÉCTOR HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ**  
LABORATORIO DE PRODUCCIÓN ACUÍCULA, FES IZTACALA, UNAM

COMITÉ TUTOR:

**DRA. CRISANTEMA HERNÁNDEZ GONZÁLEZ**  
LABORATORIO DE NUTRICIÓN Y ALIMENTACIÓN DE PECES Y CAMARONES, CIAD

**DR. CARLOS ALFONSO ÁLVAREZ GONZÁLEZ**  
LABORATORIO DE ACUACULTURA TROPICAL, UJAT

**DRA. MARTHA GABRIELA GAXIOLA CORTÉS**  
MANEJO DE ZONAS COSTERAS UMDI SISAL

**DRA. MARÍA LETICIA ARENA ORTÍZ**  
LABORATORIO DE ESTUDIOS ECOGENÓMICOS, UMDI SISAL

**CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX., FEBRERO DE 2024**

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero expresar mi profundo agradecimiento a la UNAM, en particular a la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, por haber sido el pilar de mi formación académica.

Al Dr. Luis Héctor Hernández Hernández, le agradezco sinceramente por su inquebrantable paciencia y apoyo a lo largo de la realización de este proyecto.

Mi reconocimiento especial a los profesores M en C. Mario Alfredo Fernández Araiza y Biol. Mauricio Castillo Domínguez, por su disposición para mejorar la tesis y su colaboración en la parte técnica de este trabajo han sido invaluable.

## **DEDICATORIAS**

Dedico este logro a todos los profesores y académicos que han guiado mi camino a lo largo de mi carrera, contribuyendo significativamente a mi proceso de aprendizaje.

Agradezco de corazón a mis padres por el constante apoyo y los sabios consejos que me han brindado a lo largo de toda mi vida, siendo un ejemplo excepcional para seguir.

A mis hermanas, mi gratitud por su constante respaldo, compañerismo, comprensión, consejos y valiosas enseñanzas.

A toda mi familia, incluyendo tíos, primos y abuelos, les agradezco por estar siempre presentes en los momentos en que más los necesitaba. Su apoyo ha sido fundamental en mi trayectoria académica.

Equipado con sus cinco sentidos, el  
hombre explora el universo que lo  
rodea y a sus aventuras las llama  
ciencia.

**Edwin Powell Hubble**

## RESUMEN

Durante los últimos años, el aumento en el cultivo de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) ha generado una creciente demanda de alimentos balanceados. Las harinas de origen vegetal surgen como una alternativa a la harina de pescado, pero su implementación se ve limitada debido a la presencia significativa de antinutrientes. En este contexto, la inclusión de probióticos como componentes funcionales en alimentos acuícolas representa un enfoque prometedor, aunque existe una escasa cantidad de información sobre su efectividad en dietas con elevados niveles de proteína vegetal. Por ende, el propósito de este estudio fue evaluar el impacto de dietas cuya principal fuente de proteína es vegetal, suplementada con diferentes niveles del probiótico *Pediococcus acidilactici*, en juveniles de trucha arcoíris.

Se diseñó una dieta basal con una substitución del 66% de harina de pescado por harina de soya. Se llevaron a cabo tres tratamientos experimentales involucrando un total de 156 organismos, con diferentes niveles de inclusión del probiótico:  $2 \times 10^6$  UFC/g (1A),  $2 \times 10^7$  UFC/g (2A) y  $2 \times 10^8$  UFC/g (3A), mientras que el grupo control recibió exclusivamente la dieta formulada. Los organismos fueron alimentados durante un período de 90 días, en el cual se les suministró alimento dos veces al día. Se realizaron evaluaciones en parámetros de crecimiento, composición proximal y la expresión de los genes *IL-1 $\beta$* , *IL-4*, *IL-10* e *IL-21*. Al concluir la fase de alimentación, se sacrificaron cinco organismos por tanque para determinar la composición proximal y la expresión genética. Todos los datos recopilados fueron sometidos a un análisis de varianza unidireccional (ANOVA) después de verificar la normalidad y homogeneidad de varianzas.

Los resultados revelaron la ausencia de diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) en la ganancia de peso (GP), tasa de crecimiento específico (TCE), tasa de conversión alimenticia (TCA) y tasa de ingesta (TI). No se observaron disparidades en la deposición de lípidos y proteínas en músculo e hígado. A nivel de expresión genética no se evidenciaron diferencias significativas en las interleucinas *IL-1 $\beta$* , *IL-4* e *IL-21*; sin embargo, la *IL-10* presentó una expresión significativamente mayor. Estos hallazgos sugieren que el probiótico desempeñó un papel crucial en la regulación del estado de inmunidad.

# ÍNDICE

## Contenido

Introducción .....	1
Antecedentes .....	4
Justificación .....	7
Objetivos .....	8
Materiales y método.....	9
Resultados.....	15
Parámetros de crecimiento.....	15
Composición proximal.....	16
Expresión de genes.....	20
Discusión .....	24
Conclusiones .....	30
Referencias.....	32
ANEXOS.....	43
Anexo 1. Información de la especie.....	43
Anexo 2. Determinación del contenido de cenizas (Olvera et al., 1993). .....	44
Anexo 3. Determinación del contenido de humedad (Olvera <i>et al.</i> , 1993).....	45
Anexo 4. Cuantificación del contenido de lípidos por la técnica de Bligh y Dyer (1959).....	46
Anexo 5. Obtención del contenido de proteínas totales por la técnica de Kjeldahl.....	48
Anexo 6. Expresión de genes.....	50

# EVALUACIÓN DEL EFECTO DE DIETAS CON BASE VEGETAL Y EL PROBIÓTICO *Pediococcus acidilactici* EN EL CRECIMIENTO Y RESPUESTA INMUNE DE JUVENILES DE TRUCHA ARCOÍRIS (*Onchorhynchus mykiss*).

## Introducción

La acuicultura, definida como la crianza de organismos acuáticos en ambientes controlados con el propósito de optimizar su crecimiento y desarrollo (Sahu *et al.*, 2008), ha emergido como una práctica de gran relevancia en la actualidad. En los últimos años, esta actividad ha experimentado un notable crecimiento y se ha consolidado como un pilar económico en diversas naciones (Fernandes y Kerkar, 2019). Según datos de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), en el año 2018, la producción acuícola mundial alcanzó una cifra de 114.5 millones de toneladas, destacando su contribución sustancial a la seguridad alimentaria global (FAO, 2020).

Esta forma de producción sostenible desempeña un papel multifacético en la sociedad actual. No solo genera empleo para miles de personas en comunidades costeras y rurales, sino que también impulsa la actividad económica y provee una fuente confiable de ingresos (Maite *et al.*, 2018). La demanda mundial de productos del mar continúa en aumento, y la acuicultura ha surgido como un medio fundamental para satisfacer esta necesidad (García-Diez *et al.*, 2016). El aporte de proteína animal proveniente de especies acuáticas se ha vuelto esencial en la dieta humana, y su importancia se magnifica en vista de la proyección de la población global, que se estima alcanzará los 10 mil millones de individuos para el año 2050 (Naciones Unidas, 2019).

Esta creciente demanda y su potencial para impulsar el desarrollo sostenible han llevado a un aumento en la investigación y la innovación en el campo de la acuicultura. Los avances en tecnologías de manejo, mejoramiento genético y nutrición animal han permitido optimizar la producción y mitigar posibles impactos ambientales negativos (Ape *et al.*, 2019). Además, la acuicultura ofrece oportunidades para la restauración de ecosistemas acuáticos degradados y la conservación de especies en peligro de extinción a través de programas de reproducción en cautiverio (Pereira *et al.*, 2019).

En México, la acuicultura tiene un potencial considerable y podría desempeñar un papel crucial al proporcionar alimentos de alta calidad a la población más vulnerable (Naciones Unidas, 2020). En el país, operan alrededor de 9,000 granjas registradas, con una tasa media anual de crecimiento del 15% (Cuéllar-Lugo *et al.*, 2018), lo que ha llevado a un aumento en la producción de 54,000 toneladas en el año 2000 a 243,000 toneladas en 2017. Esto ha posicionado a México como el cuarto productor acuícola más destacado en la región (Naciones Unidas, 2020). De esta producción, 8,655 toneladas corresponden a la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) (CONAPESCA, 2017).

La trucha arcoíris es un pez resistente, de crecimiento rápido y tolerante a una amplia gama de ambientes. Puede tener un ciclo de vida anádromo, así como habitar de manera permanente en cuerpos de agua dulce (FAO, 2021). Debido a estas características, es el salmónido más introducido en todo el mundo y una de las especies más utilizadas en acuicultura (Crawford y Muir, 2008). En México, se introdujo por primera vez en 1988 (Ortega y Valladares, 2017). Hasta la fecha, la trucha ocupa el puesto 21 en términos de volumen de producción pesquera, pero debido a su alto valor monetario, se encuentra en la décima posición. Además, presenta una tasa media de crecimiento anual del 5.99% (CONAPESCA, 2018).

Para la producción de trucha arcoíris y otras especies carnívoras se emplea harina de pescado, una fuente crucial de proteínas. Sin embargo, su precio en el mercado ha experimentado un incremento debido al crecimiento de la actividad acuícola y la creciente demanda (Choi *et al.*, 2019). En vista de esto, se han explorado fuentes alternativas de proteínas, y la harina de soya ha sido ampliamente investigada gracias a su bajo costo, alta disponibilidad y perfil equilibrado de aminoácidos (Voorhees *et al.*, 2019). No obstante, la harina de soya también contiene componentes antinutricionales que pueden dificultar la absorción de nutrientes y causar lesiones intestinales, vacuolización anormal, acortamiento del pliegue de la mucosa e infiltración de células inflamatorias en la lámina propia (Krogdahl *et al.*, 2010; Teng *et al.*, 2012).

Dentro de este contexto, la microbiota intestinal de los peces desempeña una función vital. Su capacidad para fermentar componentes no digeribles del alimento emerge como un factor determinante en la mejora de la digestibilidad de los piensos. Al promover el crecimiento de la microbiota, es plausible que se optimice la eficiencia en la absorción de nutrientes (Timmerman *et al.*, 2004).

Por otra parte, los probióticos se definen como complementos microbianos vivos con efectos beneficiosos en el huésped. Estos modifican la comunidad microbiana del huésped o su entorno, mejoran la utilización del alimento, aumentan su valor nutricional y fortalecen la resistencia a enfermedades, mientras también mejoran la calidad ambiental (Verschuere *et al.*, 2000). El papel crucial de los probióticos en el mantenimiento de la salud se manifiesta en su capacidad para estimular el sistema inmunológico, aumentar la resistencia contra patógenos a través de la producción de sustancias antimicrobianas y crear un ambiente óptimo para los animales acuáticos, mejorando su rendimiento sin imponer impactos negativos (Dawood *et al.*, 2016). Esta alternativa a los antibióticos, que pueden generar contaminación ambiental y resistencia bacteriana, demuestra la importancia de los probióticos en el mantenimiento de la salud sin afectar el sistema inmunológico del huésped (Van Doan *et al.*, 2020).

Dentro de los probióticos más ampliamente estudiados y utilizados, se encuentra el *Pediococcus acidilactici*. Ha sido probado en distintas especies como el pez roca (*Sebastes schlegelii*), la lubina asiática (*Lates calcarifer*) y el pez cebra (*Danio rerio*), demostrando resultados favorables en términos de crecimiento, inmunidad y estado general de salud (Rahimnejad *et al.*, 2018; Ashouri *et al.*, 2020; Ahmadifar *et al.*, 2020). Su inclusión en dietas para la trucha arcoíris ha evidenciado mejoras en la morfología de las microvellosidades intestinales, el aumento en la actividad endocítica de los enterocitos y el refuerzo de la actividad inmune innata intestinal (Al-Hisnawi *et al.*, 2019; Merrifield *et al.*, 2010).

No obstante, hasta la fecha no se han investigado los efectos de este probiótico utilizando una dieta basada en proteína vegetal para la trucha arcoíris. Por consiguiente, el propósito del presente estudio fue evaluar el impacto del uso de estos dos componentes en términos de crecimiento, respuesta inmune e inflamación.

## Antecedentes

Sealey *et al.*, 2009, investigaron los efectos de la incorporación del probiótico Mycolactor Dry Probiotic® en dietas basadas en vegetales para la alimentación de trucha arcoíris. Formularon una dieta práctica con un contenido de 48% de proteína cruda y 20% de grasa cruda, que incluía niveles de harina de soya (SBM) de 0 (S0), 10 (S10) o 20% (S20), y se complementó con el probiótico (S0P, S10P, S20P). Durante el período de crecimiento, se observaron cambios patológicos en los intestinos de los peces alimentados con un 43% de SBM; no obstante, estos cambios resultaron menos severos en los casos donde los peces habían estado expuestos previamente a la harina de soya en las dietas iniciales. Como conclusión, se determinó que la trucha arcoíris puede tolerar mayores cantidades de harina de soya a través de la alimentación con probióticos.

Merrifield *et al.*, 2011, llevaron a cabo un estudio con el propósito de evaluar los efectos del probiótico *Pediococcus acidilactici* en la trucha arcoíris. Los individuos se alimentaron con células vegetativas (Veg) o liofilizadas (Lyo), las cuales fueron incorporadas en una dieta basal a concentraciones de  $10^7$  (Lo) o  $10^8$  (Hi) UFC/g. No se observaron mejoras estadísticamente significativas en el rendimiento del crecimiento ni en la utilización del alimento, tampoco en la composición corporal de los peces alimentados con los probióticos ( $P > 0.05$ ). No obstante, se identificó una reducción significativa en el factor de condición (K) en los organismos que consumieron dietas liofilizadas. Adicionalmente, se observaron niveles elevados de leucocitos en los peces alimentados con la dieta suplementada con *P. acidilactici* vegetativo en baja concentración, aunque no se apreciaron efectos en los tipos de leucocitos presentes. Como conclusión, se destacó el potencial de la aplicación de *P. acidilactici* en la trucha arcoíris; no obstante, se reconoció la necesidad de realizar investigaciones adicionales para optimizar su implementación.

Ramos *et al.*, 2013, llevaron a cabo una evaluación de los efectos de la suplementación dietética con múltiples especies (A: *Bacillus* sp., *Pediococcus* sp., *Enterococcus* sp., *Lactobacillus* sp.) y un probiótico (B: *Pediococcus acidilactici*) en la trucha arcoíris. Durante un período de 96 días, se añadió la suplementación de probióticos A o B a una dieta basal, mientras que un grupo de control recibió la dieta sin suplementación. Después de 56 días de alimentación, se observó un aumento significativo en el peso de los peces alimentados con la dieta A en comparación con el grupo de control. Además, la suplementación con probióticos en la dieta ocasionó cambios en la

composición microbiana intestinal. Se llegó a la conclusión de que los probióticos tuvieron un impacto positivo y significativo en el rendimiento de crecimiento de las truchas arcoíris juveniles.

Ramos *et al.*, 2015, llevaron a cabo una evaluación de la influencia de dos probióticos comerciales en juveniles de trucha arcoíris. Los probióticos utilizados fueron los siguientes: A, una mezcla de múltiples especies (*Bacillus* sp., *Pediococcus* sp., *Enterococcus* sp., *Lactobacillus* sp.); y B, una especie única (*Pediococcus acidilactici*). En sus hallazgos, se evidenció que la dosis más baja del probiótico de múltiples especies resultó en una mejora en la tasa de crecimiento, mientras que ambos tipos de probióticos contribuyeron a una mejor tasa de conversión alimenticia. Además, no se observaron variaciones en la composición corporal entre los diferentes tratamientos. Cabe destacar que la actividad de la lisozima fue más elevada en los peces alimentados con la dieta A. Sin embargo, no se detectaron diferencias en la peroxidasa plasmática ni en el estallido respiratorio de las células de la cabeza del riñón. Asimismo, no se identificaron disparidades en la morfología intestinal entre los grupos. Se concluyó que ambos tipos de probióticos generan beneficios en términos de rendimiento zootécnico y respuestas inmuno-humorales.

Hoseinifar *et al.*, 2017, llevaron a cabo un estudio para investigar los efectos de la dieta prebiótica de galactooligosacárido [(GOS), 1%], la inclusión de un probiótico (*Pediococcus acidilactici*) [7.57 log UFC/g], y la combinación simbiótica (GOS + *P. acidilactici*) con relación a la actividad de enzimas antioxidantes y la resistencia a enfermedades en la trucha arcoíris. Los resultados obtenidos indicaron que los inmunoestimulantes no ejercieron un efecto significativo sobre los niveles de malondialdehído (MDA) en el hígado en comparación con el grupo de control ( $P > 0.05$ ). Sin embargo, las actividades de las enzimas hepáticas catalasa (CAT), glutatión S-transferasas (GST) y glutatión reductasa (GR) fueron significativamente mayores en los peces alimentados con los inmunoestimulantes. Como conclusión, se determinó que la administración de GOS y *P. acidilactici* resultó en un aumento de la actividad enzimática antioxidante y en la resistencia de la trucha arcoíris.

Al-Hisnawi *et al.*, 2019, llevaron a cabo una evaluación sobre el efecto del probiótico *Pediococcus acidilactici* MA18 / 5M en la trucha arcoíris. Durante un periodo de 4 semanas, los peces fueron alimentados con una dieta de control o una dieta complementada con *P. acidilactici* (a una concentración de  $2.4 \times 10^6$  UFC/g). Sus observaciones revelaron que *P. acidilactici* fue capaz de modular el microbioma intestinal de la trucha arcoíris. Además, demostraron que la alimentación con probióticos condujo a un aumento en las citocinas proinflamatorias, tales como la

interleucina-1 $\beta$  e interleucina-8, mientras que se evidenció una inhibición en la expresión de la interleucina-10, que es de naturaleza antiinflamatoria, en comparación con el grupo de control. Como resultado, se concluyó que el probiótico logró reducir la expresión intestinal de biomarcadores asociados al estrés celular, apoptosis y proliferación celular, lo que a su vez fortaleció la respuesta inmune innata en el intestino.

## Justificación

En los últimos años, la demanda de harina de pescado ha experimentado un incremento significativo, lo cual ha repercutido en un alza en los precios del mercado (De-Silva y Hasan, 2007; Choi *et al.*, 2020). Por ende, resulta crucial explorar alternativas de fuentes ricas en proteínas, como la harina de soya (Dersjant-Li, 2002); no obstante, esta presenta componentes antinutricionales que pueden obstaculizar la absorción de nutrientes y ocasionar trastornos en el organismo (Krogdahl *et al.*, 2010; Teng *et al.*, 2012).

El probiótico *Pediococcus acidilactici* ha demostrado resultados prometedores en términos de crecimiento, inmunidad y salud en los peces (Rahimnejad *et al.*, 2018; Ashouri *et al.*, 2020; Ahmadifar *et al.*, 2020). No obstante, hasta la fecha, no se han investigado los efectos de este probiótico en la trucha arcoíris cuando se emplea una dieta cuya principal fuente de proteínas proviene de fuentes vegetales. Por tanto, el objetivo de este trabajo fue investigar el efecto del probiótico *Pediococcus acidilactici* en términos de crecimiento e inmunidad de trucha arcoíris cuando se emplea una dieta cuya principal fuente de proteínas proviene de fuentes vegetales.

## Objetivos

### Objetivo general

- Evaluar el efecto de diferentes concentraciones del probiótico *Pediococcus acidilactici* en dietas con base vegetal en el desarrollo de juveniles de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*).

### Objetivos particulares

- Determinar el efecto de diferentes concentraciones del probiótico *Pediococcus acidilactici* en dietas con base vegetal en el crecimiento de juveniles de trucha arcoíris.
- Evaluar el efecto de diferentes concentraciones del probiótico *Pediococcus acidilactici* en dietas con base vegetal sobre la composición proximal de músculo e hígado de juveniles de trucha arcoíris.
- Determinar el efecto de diferentes concentraciones del probiótico *Pediococcus acidilactici* en dietas con base vegetal en la expresión de genes de juveniles de trucha arcoíris.

## Materiales y método

### Obtención de organismos.

Se adquirieron 156 juveniles de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) provenientes de la granja privada El Xote, situada en el municipio de Jilotzingo, Estado de México, y fueron trasladados al Laboratorio de Producción Acuícola de la UNAM FES Iztacala en Tlalnepantla, Estado de México. Allí, se les sometió a un período de aclimatación durante 3 semanas en un tanque de 500 L equipado con aireación y filtración continua. Durante esta fase, se les proporcionó alimento hasta la saciedad dos veces al día, utilizando una dieta comercial de la marca Malta Cleyton, BioFingerling®.

### Formulación y preparación de las dietas.

Se formuló una dieta basal con una composición de 67% de harina de soya y 33% de harina de pescado. A partir de esta dieta basal se establecieron cuatro tratamientos que incluyeron la suplementación del probiótico *Pediococcus acidilactici* en concentraciones de  $2 \times 10^6$  UFC/g (1A),  $2 \times 10^7$  UFC/g (2A) y  $2 \times 10^8$  UFC/g (3A), mientras que un cuarto grupo se mantuvo sin adición del probiótico (0A) (tabla 1).

**Tabla 1.** Formulación de la dieta basal. La composición próxima fue: proteína cruda (28.48%), humedad (8.21%) y cenizas (10.5%).

Ingredientes g / kg	Dietas			
	1A	2A	3A	0A
Harina de pescado (FM)	200	200	200	200
Harina de soya (SM)	400	400	400	400
Aceite de hígado de bacalao	50	50	50	50
Lecitina de soya	50	50	50	50
Dextrina	100	100	100	100
Mezcla de vitaminas y minerales	40	40	40	40
Gluten	50	50	50	50
$\alpha$ - celulosa	109	107.2	89.2	109.2
<i>P. acidilactici</i>	0.2	2	20	0

Las dietas se prepararon siguiendo el protocolo descrito por Sánchez *et al.* (2015). Los ingredientes sólidos fueron mezclados con aceite de pescado y un 40% de agua destilada para formar una masa húmeda, que posteriormente se pasó por un picador de carne para obtener gránulos. Estos gránulos se secaron en un horno a temperatura constante de 100 °C durante 1.5 horas y luego se almacenaron a una temperatura de -20 °C. Se organizaron lotes de 250 g de alimento para, posteriormente, agregar la bacteria cada 23 días, garantizando así la frescura del alimento en la medida de lo posible (Al-Hisnawi *et al.*, 2019).

### **Cultivo bacteriano.**

Se procedió a pesar 0.2 g (1A), 2 g (2A) y 20 g (3A) del probiótico *P. acidilactici* (Bactocell®, Lallemand,  $1 \times 10^{10}$  UFC/g) y se diluyó en agua destilada. Esta solución se roció de manera uniforme sobre la dieta basal precalentada a 40 °C, siguiendo la metodología de Harper *et al.* (2011). De esta manera, se obtuvieron concentraciones finales de  $2 \times 10^6$  UFC/g,  $2 \times 10^7$  UFC/g y  $2 \times 10^8$  UFC/g, respectivamente.

### **Prueba de alimentación.**

Se establecieron cuatro grupos, cada uno con tres repeticiones, y en cada repetición se alojaron trece peces, lo que sumó un total de 156 organismos. Estos fueron colocados en tanques de 100 L de capacidad. A cada grupo se le proporcionó una ración diaria equivalente al 7% de su biomasa, suministrada en dos ocasiones: a las 9:00 y a las 16:00 horas. Treinta minutos después de cada ración, se llevó a cabo el sifonado de los tanques para eliminar los residuos de alimento.

Durante el período de alimentación, la temperatura mantuvo un promedio matutino de 20.54 °C y vespertino de 21.30°C. El contenido de oxígeno disuelto en el agua se mantuvo en un 92.04%, y el pH presentó un promedio de 8.58.

Se realizó el registro del peso de los organismos al comienzo del experimento y posteriormente cada 10 días hasta completar los 90 días de estudio. La ración de alimento se ajustó según la biomasa total dentro de cada tanque. Con el propósito de asegurar una evacuación gástrica adecuada, se suspendió la alimentación durante 24 horas previas a cada toma de medidas biométricas.

Al finalizar la prueba de alimentación se sacrificaron cinco organismos por tanque. De estos, a tres se les extrajo el intestino medio con la finalidad de analizar la expresión genética. A los dos restantes se les retiró únicamente el hígado, mientras que a los cinco se les obtuvo una muestra de tejido muscular para la posterior evaluación del contenido proteico y lipídico.

### **Parámetros de crecimiento.**

Se calculó la ganancia en peso (GP), tasa de crecimiento específico (TCE) y la tasa de conversión alimenticia (TCA), de la siguiente manera:

- Ganancia en Peso (GP) %

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

Donde:

PF= Peso final, PI= Peso inicial

- Tasa de crecimiento específico (TCE) (%)

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

Donde:

ln= logaritmo natural, PF= peso final, PI= peso inicial, t= tiempo de alimentación

- Tasa de conversión alimenticia (TCA)

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

Donde:

GP= ganancia en peso (g), a= total de alimento consumido en base seca (g)

- Tasa de ingesta

$$TI = (g)/pez/día$$

### **Composición proximal.**

Se determinó la composición proximal, incluyendo las concentraciones de cenizas y humedad en las dietas, siguiendo las técnicas previamente reportadas por Olvera *et al.* (1993). Para la cuantificación del contenido total de lípidos en los tejidos musculares, hepáticos y en las dietas, se empleó el método de cloroformo y etanol descrito por Bligh y Dyer (1959). La estimación de las proteínas totales se llevó a cabo a través de la técnica de Kjeldahl (1983).

### **Extracción de ARN, síntesis de cDNA y qPCR.**

Se determinaron los genes *IL-1β*, *IL-4*, *IL-10* e *IL-21*. Para cada tratamiento, se extrajo el ARN total de nueve intestinos medios homogenizados en TRIzol y resuspendidos en agua libre de nucleasas siguiendo el protocolo de Nakano *et al.* (2013). La concentración del ARN se cuantificó espectrofotométricamente utilizando un Qubit 4 Fluorometer de ThermoFisher y se almacenó a -20°C hasta su utilización. El ARN fue tratado con 10 µL de DNAsa I, Amplification Grade, de

Invitrogen a 65°C durante 10 minutos. Se utilizaron 2 µg de ARN para la técnica de retrotranscripción, conforme a lo descrito por Fuentes *et al.* (2013). La síntesis de cDNA se realizó utilizando el kit High Capacity cDNA Reverse Transcription de Appliedbiosystems, con incubación a 25°C durante 10 minutos, seguida de 37°C durante 120 minutos y una etapa final a 85°C durante 5 minutos. La calidad del cDNA se determinó mediante la relación de absorbancia 260/280 nm con espectrofotometría utilizando un Nanodrop One UV-Vis de ThermoFisher.

Para la determinación de la expresión de los genes, se prepararon concentraciones de cDNA de 100 ng/µL. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo utilizando el kit SensiFast™ SYBR® No-ROX KIT de BIOLINE en un termociclador MyGo Mini. Cada muestra se sometió a duplicado y la mezcla de reacción para cada muestra consistió en 1.3 µL de agua libre de nucleasas, 7.5 µL de SensiFast™ SYBR® No-ROX KIT, 5 µL de muestra y 0.6 µL (10 µM) de primers directo e inverso cuyas secuencias específicas se detallan en la tabla 2. El perfil térmico estandarizado incluyó una etapa inicial de 2 minutos a 95°C, seguida de 40 ciclos de 5 segundos a 95°C y 30 segundos a 60°C, finalizando con una extensión de 60 segundos a 60°C y una etapa de disociación de 15 segundos a 95°C. Los valores obtenidos para cada gen se normalizaron utilizando el gen de referencia ( $\beta$ -actina). Para el análisis de los datos, se empleó el software MyGo Mini version 3.6.

**Tabla 2.** Primers usados para la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.

Gen	Número GenBank	Tamaño*	Forward Primer	Reverse Primer
<i>IL-1<math>\beta</math></i>	AJ223954	21	ACATTGCCAACCTCATCATCG	TTGAGCAGGTCCTTGCCTTG
<i>IL-4</i>	AB574337	27 - 25	ACCACCACAAAGTGCAAGGAGTT CT	CACCTGGTCTTGGCTCTTCACAAC
<i>IL-10</i>	AB118099	27	GGATTCTACACCACTTGAAGAGCC C	GTCGTTGTTGTTCTGTGTCTGTTGT
<i>IL-21</i>	FM883701	24 - 27	CAACAGTGTGATGTGCAACGCTC	CCTTGGCAGACTGTTTTCTCTCCC
<i>B-actin</i>	AJ438158	24 - 18	TGGGGCAGTATGGCTTGTATG	CTTGGCACCTAATCACTCT

\*Numero de nucleótidos de la cadena.

### **Análisis estadístico.**

Los datos fueron analizados para determinar su distribución normal utilizando la prueba de Shapiro-Wilk. A continuación, se realizaron comparaciones a través de un análisis de varianza (ANOVA) de un solo factor, y las disparidades significativas entre los tratamientos se evaluaron empleando la prueba de comparación múltiple de Tukey, utilizando el programa Prism 8 de GraphPad Software. Para considerar diferencias como significativas, se aplicó un nivel de significancia del 5% ( $P < 0.05$ ), siguiendo la metodología de Zar (1999).

## Resultados

### Parámetros de crecimiento.

Los valores biométricos, que incluyen la ganancia en peso, la tasa de crecimiento específico, la tasa de conversión alimenticia y la tasa de ingesta, se presentan en la tabla 3. Se observan valores más altos de ganancia en peso (GP), tasa de crecimiento específico (TCE), tasa de conversión alimenticia (TCA) y tasa de ingesta (TI) en el grupo de tratamiento 0A, seguido por el grupo 3A, mientras que los valores más bajos se evidencian en el tratamiento 2A. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos ( $P < 0.05$ ).

**Tabla 3.** Valores de ganancia en peso (GP), tasa de crecimiento específico (TCE), tasa de conversión alimenticia (TCA) y tasa de ingesta (TI) en juveniles de trucha arcoíris alimentados con las dietas A0, A1, A2 y A3 durante un período de 90 días. Los datos representan la media de tres repeticiones  $\pm$  el error estándar. No se observaron diferencias significativas a este nivel ( $P < 0.05$ ).

Tratamiento	GP (%) <sup>1</sup>	TCE (%/día) <sup>2</sup>	TCA <sup>3</sup>	TI (g/pez/día) <sup>4</sup>
0A	132.09 $\pm$ 38.13	0.90 $\pm$ 0.18	0.79 $\pm$ 0.25	0.27 $\pm$ 0.05
1A	72.40 $\pm$ 12.28	0.59 $\pm$ 0.07	0.46 $\pm$ 0.05	0.20 $\pm$ 0.02
2A	70.25 $\pm$ 3.62	0.59 $\pm$ 0.02	0.42 $\pm$ 0.04	0.18 $\pm$ 0.00
3A	110.82 $\pm$ 10.30	0.82 $\pm$ 0.05	0.58 $\pm$ 0.04	0.22 $\pm$ 0.2

<sup>1</sup>GP: ganancia en peso = ((peso final – peso inicial) / peso inicial) x 100

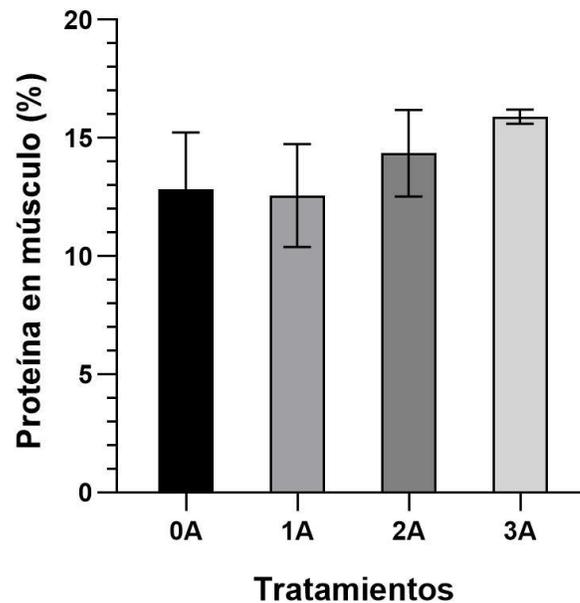
<sup>2</sup>TCE: tasa de crecimiento específico = ((ln de peso final – ln de peso inicial) / 90) x 100

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

<sup>4</sup>TI: total de alimento consumido / número de organismos / 90

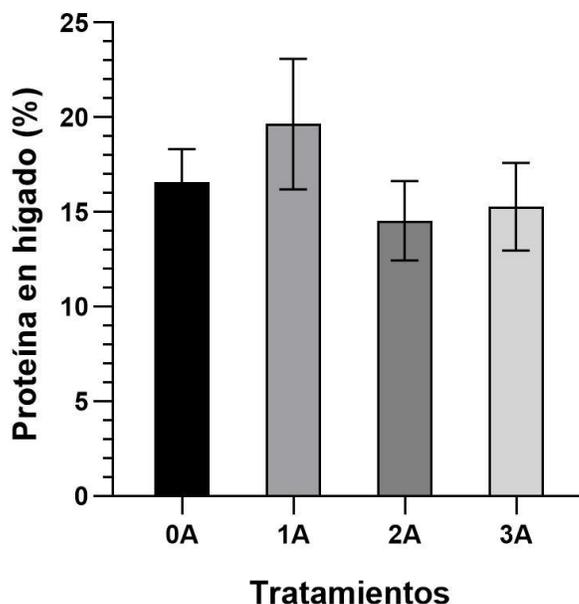
## Composición proximal.

El contenido de proteína en el tejido muscular se muestra en la figura 1. Aunque no se presentaron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre los diversos tratamientos, se observa una evidente tendencia al aumento a medida que se incrementa la cantidad de probiótico en la dieta, alcanzando su punto máximo en la dieta 3A con un valor de 15.9%.



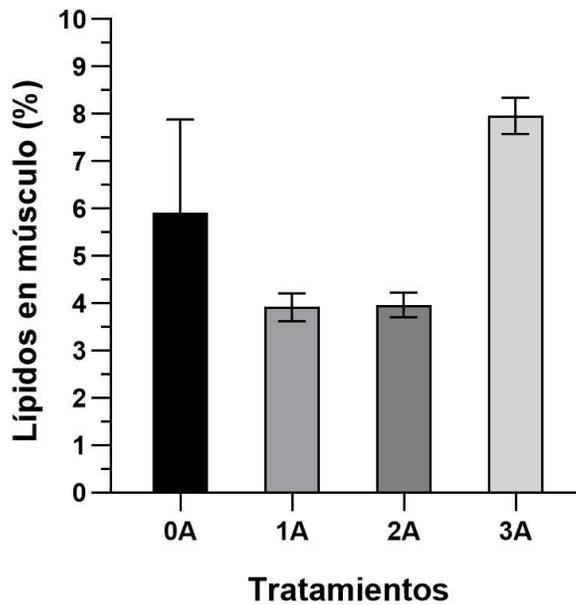
**Figura 1.** Contenido de proteína en el tejido muscular de juveniles de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*). Las barras representan la media de tres repeticiones  $\pm$  el error estándar. No se detectaron diferencias significativas a este nivel ( $P < 0.05$ ).

Con relación al contenido de proteína en el hígado (Figura 2), se puede observar que los organismos alimentados con la dieta 1A presentaron el valor más elevado, alcanzando un 19.65%. Por otro lado, el tratamiento 2A exhibió el menor contenido de proteína, con un porcentaje de 14.5%. No obstante, esta diferencia no alcanzó significancia estadística.



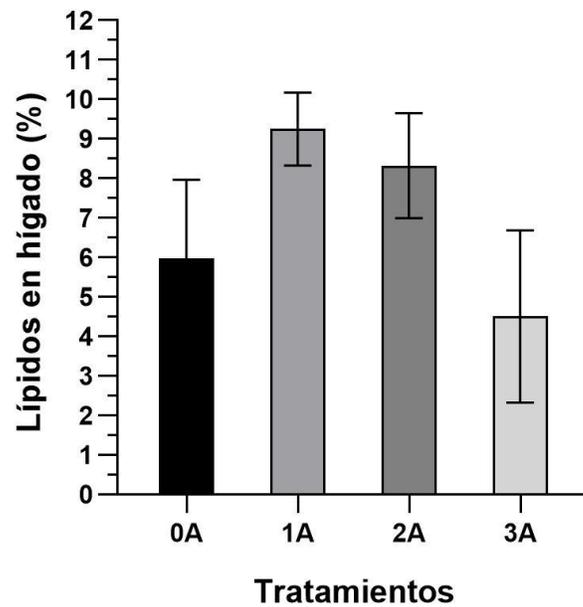
**Figura 2.** Contenido de proteína en el hígado de juveniles de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*). Media de tres repeticiones  $\pm$  error estándar. No se observan diferencias significativas ( $P < 0.05$ ).

Los valores del porcentaje de lípidos en el músculo se presentan en la figura 3. No se observan diferencias significativas entre los tratamientos. Se observa que los organismos alimentados con las dietas 0A y 3A mostraron los valores más altos, mientras que el tratamiento 1A y 2A presentó el valor más bajo.



**Figura 3.** Contenido de lípidos en el músculo expresado en porcentaje para los juveniles de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*). Los valores representan el promedio de tres repeticiones  $\pm$  el error estándar. No se observaron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre los tratamientos a este nivel.

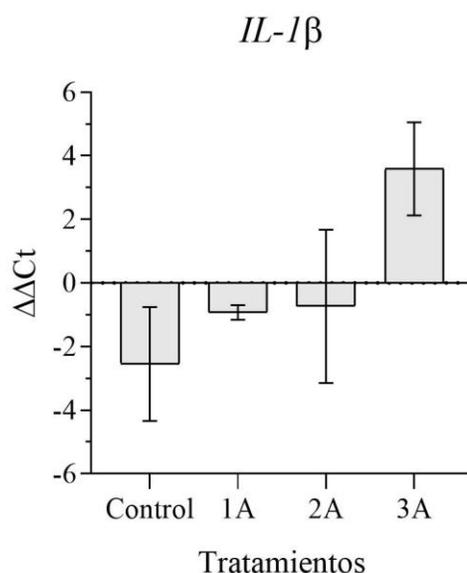
Por otro lado, el porcentaje más alto de lípidos en el hígado se observó en los organismos alimentados con las dietas 1A y 2A, mientras que los tratamientos OA y 3A obtuvieron el porcentaje más bajo. Estos resultados difieren de los obtenidos anteriormente; sin embargo, ningún tratamiento mostró diferencias significativas (figura 4).



**Figura 4.** Porcentaje de lípidos en el hígado de juveniles de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) alimentados con dietas a base de proteína vegetal. Los valores representan el promedio de tres repeticiones  $\pm$  el error estándar. No se observaron diferencias significativas a este nivel ( $P < 0.05$ ).

## Expresión de genes.

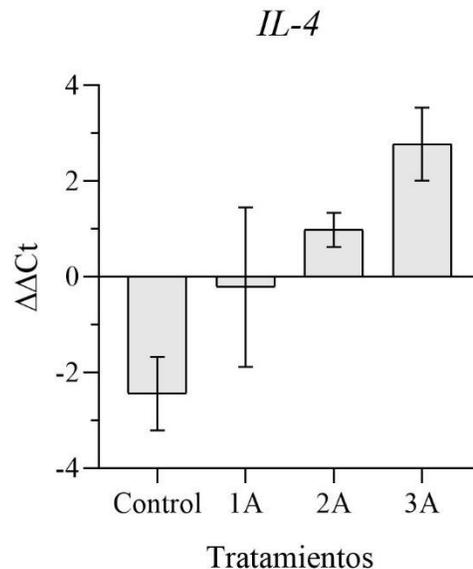
La figura 5 presenta la expresión relativa del gen *IL-1 $\beta$*  en juveniles de trucha arcoíris que recibieron diferentes porcentajes de *P. acidilactici* en su alimentación. Se observó que los organismos alimentados con una concentración de  $2 \times 10^8$  UFC/g (3A) mostraron los niveles más altos de expresión de este gen. En contraste, se registró una subexpresión en los grupos que recibieron concentraciones de probiótico de  $2 \times 10^7$  UFC/g (2A) y  $2 \times 10^6$  UFC/g (1A), siendo aún menor en el grupo de control en comparación con el gen de referencia.



**Figura 5.** Expresión relativa del gen *IL-1 $\beta$*  en juveniles de trucha arcoíris alimentados con diferentes porcentajes de inclusión del probiótico *P. acidilactici*. Se uso como gen de referencia a la  $\beta$ -actina. Los valores representan el promedio de tres repeticiones  $\pm$  el error estándar. A este nivel de análisis, no se observaron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ).

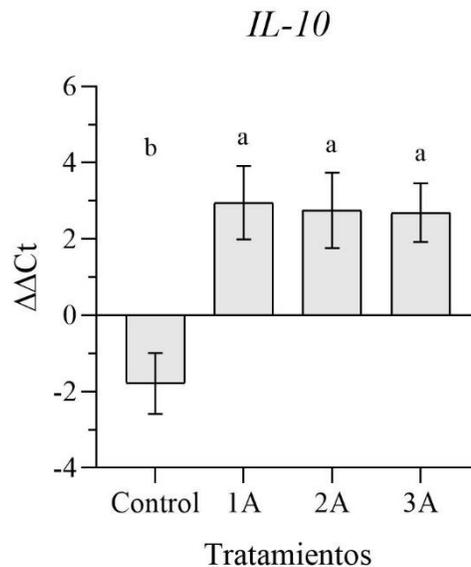
En la Figura 6 se presentan los niveles de expresión del gen *IL-4* en juveniles de trucha arcoíris que fueron alimentados con distintas concentraciones de *P. acidilactici*. Se observó que el nivel

de expresión de IL-4 se mantuvo subexpresado en la dieta de control y en aquellos alimentados con una concentración de probiótico de  $2 \times 10^6$  UFC/g (1A). En contraste, los grupos 2A y 3A mostraron una expresión del gen *IL-4* superior a la del gen de referencia, sugiriendo una tendencia clara hacia un aumento en la expresión a medida que se incrementa la cantidad de probiótico. No obstante, es importante destacar que no se observaron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre los grupos.



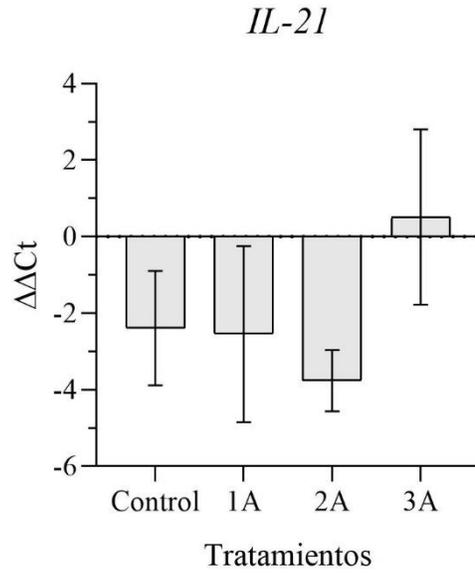
**Figura 6.** Expresión relativa del gen *IL-4* en juveniles de trucha arcoíris alimentados con diferentes porcentajes de inclusión del probiótico *P. acidilactici*, utilizando la  $\beta$ -actina como gen de referencia. Los valores presentados son el promedio de tres repeticiones  $\pm$  error estándar. En este nivel de análisis, no se encontraron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ).

La Figura 7 muestra los niveles de expresión del gen *IL-10* en juveniles de trucha arcoíris que fueron alimentados con diversas concentraciones de *P. acidilactici*. Se destacó una sobreexpresión de IL-10 en los individuos que consumieron las dietas 1A, 2A y 3A, mientras que el grupo control mantuvo una subexpresión con relación al gen de referencia. En este análisis, se observaron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre los tres tratamientos y el grupo control.



**Figura 7.** Se muestra la expresión relativa del gen *IL-10* en juveniles de trucha arcoíris, los cuales experimentaron diferentes niveles de inclusión del probiótico *P. acidilactici* en su alimentación. Para fines de estandarización, se empleó la  $\beta$ -actina como gen de referencia. Los valores presentados reflejan el promedio calculado a partir de tres repeticiones  $\pm$  error estándar. En este análisis, hubo diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre los tratamientos y el grupo control.

En la Figura 8, se representa la expresión relativa del gen *IL-21*. Se evidenció una subexpresión en el grupo control y en los tratamientos 1A y 2A, siendo más pronunciada en el 2A. En contraste, el grupo 3A mostró un aumento significativo en la expresión génica con respecto al gen de referencia. No obstante, es importante mencionar que no se encontraron diferencias significativas en este análisis ( $P < 0.05$ ).



**Figura 8.** Expresión relativa del gen *IL-21* en juveniles de trucha arcoíris alimentados con diferentes porcentajes de inclusión del probiótico *P. acidilactici*, utilizando la  $\beta$ -actina como gen de referencia. Los valores presentados son el promedio de tres repeticiones  $\pm$  error estándar. En este nivel de análisis, no se encontraron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ).

## Discusión

Las preparaciones bacterianas ofrecen la posibilidad de adaptar a los peces a nuevas fuentes de nutrientes, representando una innovadora aplicación probiótica propuesta por Heikkinen *et al.* (2006). Los mecanismos probióticos, que incluyen la producción de compuestos inhibidores antibacterianos, la competencia por sustancias químicas y sitios de adhesión para lograr un equilibrio microbiano "mejorado", y la modulación inmune del huésped junto con la modificación de los componentes de la dieta para mejorar su utilización (Verschuere *et al.*, 2000), cobran relevancia, especialmente en peces carnívoros cuya dieta se plantea ser modificada por harinas vegetales (Choi *et al.*, 2020). En el presente estudio, los resultados indican que no hay diferencias significativas en los parámetros de crecimiento entre los tratamientos, lo que sugiere un rendimiento uniforme. Sealey *et al.* (2009) investigaron los efectos de la incorporación del probiótico Mycolactor Dry Probiotic® en dietas vegetales para trucha arcoíris, concluyendo que estos peces pueden tolerar mayores cantidades de harina de soya cuando se incluye el probiótico. Por otro lado, Ramos *et al.* (2013) observaron que la dosis de probiótico, en particular 1.5 g / kg de *P. acidilactici*, influía en el crecimiento, mientras que el suministro de 3 g / kg de un probiótico multi especie tenía resultados menos favorables. Este hallazgo se asemeja a investigaciones previas que demuestran que *P. acidilactici* no afectó el aumento de peso de truchas arcoíris juveniles en diferentes periodos de tiempo de alimentación (Aubin *et al.*, 2005; Shelby *et al.*, 2007; Merrifield *et al.*, 2010; Merrifield *et al.*, 2011). Por tanto, los resultados sugieren que la inclusión de *P. acidilactici* en dietas con harina de soya para trucha arcoíris no perjudica a los organismos, pero la dosis (Li *et al.*, 2012) y otros factores como la temperatura y la frecuencia de alimentación pueden influir en los resultados, lo que destaca la complejidad de los mecanismos probióticos en la acuicultura (Ramos *et al.*, 2013).

Diversos estudios han investigado los efectos de los probióticos en la calidad corporal de las especies de peces en la acuicultura (Naseri *et al.* 2013; Gisbert *et al.* 2013; Abedi *et al.*, 2022). Esta suplementación ha demostrado ser una estrategia beneficiosa, ya que enriquece la dieta con vitaminas, ácidos grasos de cadena corta y enzimas digestivas, lo que conlleva un impacto positivo en la nutrición de los peces (John *et al.*, 2006). En esta investigación, los resultados reflejaron un aumento proporcional en la cantidad de proteína en el músculo a medida que se incrementaba la concentración del probiótico. En contraste, en el hígado, se observó una mayor cantidad de proteína en el tratamiento 1A, aunque sin diferencias significativas. Esto sugiere que

el aumento en la concentración del probiótico se relaciona con una mayor deposición de proteína en el músculo. Mientras que estudios previos, como el de Lara-Flores *et al.* (2003), no encontraron efectos significativos de las dietas con probióticos en la composición corporal de la tilapia del Nilo, *Oreochromis niloticus*, otras investigaciones, como la de Bagheri *et al.* (2008) y Azari *et al.* (2011), indicaron niveles más altos de proteína corporal en la trucha arcoíris alimentada con suplementos probióticos. Además, EL-Haroun *et al.* (2006) no identificaron diferencias estadísticamente significativas en el contenido de proteínas entre los tratamientos al usar un probiótico comercial en la alimentación de la tilapia del Nilo. Por lo tanto, los resultados obtenidos en esta investigación concuerdan con los autores mencionados, ya que, a pesar de la falta de diferencias significativas, la dieta con una mayor concentración de probiótico incrementó la cantidad de proteínas depositadas en el músculo. Esto implica que los probióticos pueden reducir la cantidad de alimento requerida para el crecimiento de los peces, lo que podría resultar en una disminución de los costos de producción. Esta mejora podría deberse al hecho de que las bacterias grampositivas secretan una amplia gama de exoenzimas (Moritarty, D.J.W, 1998), que podrían suministrar enzimas digestivas y nutrientes esenciales, facilitando una mejor asimilación de los nutrientes (Azari *et al.*, 2011).

Al mismo tiempo la aplicación de probióticos en la acuicultura ha demostrado una mejora general en la utilización del alimento (Lara-Flores *et al.*, 2003). Paralelamente, se ha observado que el aumento en la cantidad de harina de soya en las dietas de peces conlleva a un incremento en la deposición de lípidos en sus tejidos (Abedi *et al.*, 2022). En el marco de esta investigación, los resultados indican que no se registraron diferencias significativas en la cantidad de lípidos en el músculo entre los distintos tratamientos, aunque el tratamiento 3A mostró el porcentaje más alto. Por otro lado, los lípidos en el hígado fueron más prominentes en el tratamiento 1A, aunque sin diferencias significativas. Estos resultados sugieren una relación inversa entre la deposición de lípidos en el músculo y el hígado. Investigaciones previas, como la de Naseri *et al.* (2013), señalaron que la alimentación de trucha arcoíris con un probiótico y suplementos de hierro no afectaba significativamente el contenido de lípidos en comparación con el grupo control. De manera similar, Merrifield *et al.* (2010) utilizaron *Chlorogloeopsis cyanobacteria* como probiótico en la dieta de *O. niloticus* y no observaron un efecto significativo en la composición corporal, incluyendo el contenido de lípidos de los peces tratados. Además, Hoseinifar *et al.* (2011) y Merrifield *et al.* (2011) obtuvieron resultados similares en *H. huso* y *O. mykiss*, respectivamente, al utilizar *Saccharomyces cerevisiae* y *P. acidilactici* como probióticos. Contrariamente, Moslehi

*et al.* (2016) estudiaron el impacto de *P. pentosaceus* como probiótico en la dieta del esturión siberiano y encontraron que influyó en la composición corporal en términos de grasa de los peces tratados. Se ha observado que dosis elevadas de probióticos en la alimentación de peces pueden llevar a una composición corporal significativamente mayor en lípidos (Yones *et al.* 2019; El-katcha *et al.* 2014). La variabilidad en estos hallazgos puede deberse a diferencias en las cepas bacterianas y los hospedadores. En la presente investigación, no se detectaron efectos adversos en la deposición de lípidos en función de las diversas concentraciones de *P. acidilactici*. Es importante señalar que la concentración del probiótico también influye en los resultados positivos (Merrifield, *et al.* 2010; Gisbert *et al.* 2013).

En lo que respecta a las interleucinas, estas constituyen un subgrupo esencial de citocinas que desempeñan un papel fundamental en la regulación intercelular del sistema inmunológico (Secombes *et al.*, 2011). Aunque se ha demostrado que una amplia variedad de tipos celulares es capaz de producir interleucinas, muchas de ellas son sintetizadas principalmente por células T auxiliares CD4+, macrófagos/monocitos y células endoteliales (Pérez-Cordón *et al.*, 2014). En tiempos recientes, se ha establecido claramente que la expresión de genes relacionados con citocinas y el sistema inmunitario puede considerarse un indicador valioso para evaluar las respuestas inmunológicas (Alejo, A. y Tafalla, C. 2011). Dado que el intestino es el principal órgano afectado durante la administración de una dieta suplementada con probióticos (Secombes *et al.*, 2011), el enfoque de la presente investigación se centró en la expresión de genes relacionados con el sistema inmunológico en el intestino.

En particular, las citocinas proinflamatorias que involucran a la IL-1 $\beta$  son genes inmunorreguladores ampliamente estudiados en la trucha arcoíris (Gioacchini *et al.*, 2010; Pérez Sánchez *et al.*, 2011). La IL-1 $\beta$  desempeña un papel fundamental participando en la regulación de los mecanismos de defensa inmunológica tanto innatos como adaptativos (Dinarello, 1997). En el presente estudio, los niveles más elevados de expresión de IL-1 $\beta$  se observó un aumento proporcional en la expresión del gen conforme se incrementa la concentración del probiótico. Además, estudios *in vitro* han demostrado que los macrófagos de peces expresan IL-1 $\beta$  después de la estimulación con probióticos (Zou *et al.*, 2000; Engelsma *et al.*, 2001). También se han reportado mejoras en las expresiones de IL-1 $\beta$  en la tilapia del Nilo (Standen *et al.*, 2013) y la lubina europea (Torrecillas *et al.*, 2018) alimentados con dietas suplementadas con *P. acidilactici*.

Además, se ha evidenciado que los simbióticos de manano oligosacáridos y *P. acidilactici* inducen transcripciones significativamente más altas de IL-1 $\beta$  (Torrecillas *et al.*, 2018). En este contexto, los resultados de esta investigación concuerdan con estudios previos que muestran que la adición de probióticos aumenta la expresión de IL-1 $\beta$ , lo que sugiere que la inclusión de *P. acidilactici* en dietas basadas en vegetales para trucha arcoíris tiene la capacidad de estimular el sistema inmunológico de estos organismos, dado que se ha identificado que macrófagos, células epiteliales y fibroblastos son potenciales fuentes de IL-1 $\beta$  en teleósteos (Sigh, J., Lindenstrøm, T. y Buchmann, K. 2004). Por lo tanto, las dietas suplementadas con *P. acidilactici* podrían inducir respuestas inmunitarias que contribuyen a la protección contra patógenos (Foe y Picchiatti, 2014).

Las citocinas proinflamatorias, como la IL-4, desempeñan un papel fundamental en la hematopoyesis, las respuestas inflamatorias y la inmunidad adaptativa de los peces (Secombes, C.J., Hardie, L.J. y Daniels, G. 1996). Además, inducen la proliferación de células B, la producción de anticuerpos y la expresión de citocinas y factores de transcripción relacionados con Th2 (Abdel-Tawwab, M. y Hamed, H. 2020), y también se ha observado que aumentan el número de células CD209 (Irkin *et al.*, 2014). En el contexto de esta investigación, se observa una correlación positiva entre la cantidad de probiótico y la expresión de IL-4. Yi *et al.* (2018) demostraron que el probiótico *B. velezensis* aumentó significativamente la expresión del ARNm de IL-4 en *C. auratus*. Del mismo modo, Makled *et al.* (2020) encontraron una regulación al alza de IL-4 en tilapia del Nilo alimentada con probióticos, lo que sugiere que las preparaciones bacterianas pueden estimular eficazmente la inmunidad de los peces. Además, se ha informado sobre la estimulación de la expresión génica de citocinas en trucha arcoíris (Perez-Sanchez *et al.*, 2011) y larvas de dorada (Avella *et al.*, 2010) alimentadas con dietas suplementadas con probióticos. Liu *et al.* (2013) y Makled *et al.* (2017) también encontraron que la suplementación con bacterias probióticas mejoraba la abundancia de citocinas proinflamatorias en la tilapia. Por lo tanto, los hallazgos de este estudio respaldan la afirmación de que la adición de *P. acidilactici* en dietas basadas en vegetales para trucha arcoíris tiene la capacidad de estimular las citoquinas proinflamatorias, como la IL-4, en estos organismos. Por lo que, los probióticos pueden modular la inmunidad del huésped al alterar la expresión de citocinas proinflamatorias (Li *et al.*, 2007; Hamdan *et al.*, 2016).

Por otro lado, la IL-10, una citocina con propiedades antiinflamatorias desempeña un papel crucial en la regulación de la respuesta inflamatoria para prevenir respuestas excesivas que

puedan dañar al huésped (Foey y Picchiatti, 2014). Esta citocina ha sido objeto de estudio en peces de manera común (Gioacchini *et al.*, 2010; Pérez Sánchez *et al.*, 2011). En el presente trabajo, se observó un marcado aumento en la expresión génica en los tratamientos con probiótico, con diferencias significativas en comparación con el grupo control. Esto indica que *P. acidilactici* influye en la expresión de IL-10 en juveniles de trucha arcoíris alimentados con una dieta basada en vegetales. Yi *et al.*, (2018) encontraron un aumento estadísticamente significativo en la expresión de IL-10 con *B. velezensis* en *C. auratus*, lo que podría estar relacionado con las diversas bioactividades de esta citocina. Del mismo modo, Choi *et al.*, (2022) evaluaron los niveles de expresión génica de IL-10 en lenguado oliva juvenil que fueron alimentados con dietas suplementadas con *B. subtilis* y encontraron niveles significativamente más altos en los peces que consumieron dietas con el probiótico, lo que indica un mayor efecto inmunomodulador de las bacterias. Además, diversos estudios han demostrado que la suplementación dietética con bacterias probióticas en los peces aumenta la expresión génica de IL-10, respaldando así la afirmación sobre la capacidad antiinflamatoria de los probióticos en los peces (Hasan *et al.*, 2019; Guafack *et al.*, 2020). Por otro lado, Al-Hisnawi *et al.*, (2019) llevaron a cabo un estudio con truchas arcoíris grandes de más de 300 gramos alimentadas con una dieta enriquecida con *P. acidilactici* y encontraron una regulación a la baja de la IL-10. Concluyeron que los probióticos podrían ser más beneficiosos para individuos más grandes. Los resultados anteriores guardan similitudes con la presente investigación, ya que, en este estudio la regulación positiva de IL-10 sugiere que se inhibe en mayor medida la inflamación en los organismos alimentados con las dietas que contenían el probiótico. Cabe mencionar que existen diversos factores que pueden influir en la expresión de IL-10, entre los que destacan la estimulación con lipopolisacáridos, infección bacteriana y la administración de inmunoestimulantes (Zhang *et al.*, 2009).

Finalmente, la IL-21 tiene la función de inducir la expresión de algunas citocinas y genes marcadores de células T/B (June *et al.*, 1989). Además, También se ha producido la rIL-21 de trucha (Wang *et al.*, 2011) y se ha demostrado que aumenta la expresión de IL-10, IL-22 e IFN- $\gamma$ , y en menor medida de IL-21. Por tanto, la IL-21 puede actuar como factor de supervivencia para las células T y B de peces (Secombes *et al.*, 2011). En el presente estudio, se encontró que no hubo diferencias significativas entre los tratamientos ni con respecto al grupo control. Los resultados sugieren que el probiótico *P. acidilactici* no influyó en la expresión del gen *IL-21*. Dang *et al.*, 2023, encontraron que la suplementación con aceite esencial de orégano influyó en la

expresión del ARNm de genes como *IL-6*, *IL-21* e *IL-34* lo que promovió la salud y el bienestar de los organismos. De forma similar, Yi *et al.*, 2019 investigaron los efectos del probiótico *C. aquaticum* en peces cebras y encontraron un aumento en la expresión de *IL-21* así como de otras interleucinas por lo que aumentó la respuesta inmunológica innata y una mayor resistencia a la infección por *A. hydrophila* y *S. iniae*. Del mismo modo, Lin *et al.*, 2019, evaluaron los efectos en los cíclidos de la suplementación dietética con el probiótico *Bacillus amyloliquefaciens* y encontraron aumentos significativos en los niveles de expresión génica de *IL-1 $\beta$* , *IL-6*, *IL-21* y *TNF- $\alpha$* . Contrario a estos resultados en la presente investigación no se encontraron incrementos significativos en la expresión de *IL-21*. Esto puede estar influenciado por la concentración del probiótico (Aubin *et al.*, 2005), falta de reto frente a organismos patógenos (Secombes *et al.*, 2011) que pudieran detonar la expresión del gen o el tiempo de exposición al probiótico (Biswas *et al.*, 2013).

Los resultados de este estudio representan la primera vez que se informa sobre los efectos de incluir el probiótico *Pediococcus acidilactici* en concentraciones de hasta  $2 \times 10^8$  UFC/g en dietas para trucha arcoíris con una sustitución parcial de harina de pescado por harina de soya. Estos hallazgos presentan una similitud notable con investigaciones previas que han abordado la suplementación con diferentes especies de probióticos en diversas especies. Lo más destacado es la ausencia de efectos negativos o adversos derivados de la suplementación combinada de estos ingredientes, por el contrario, los resultados mostraron un impacto positivo en el estado de inmunidad de los organismos estudiados. Como consideración final, se plantea la posibilidad de llevar a cabo investigaciones posteriores que combinen el probiótico con un prebiótico adecuado, dado que se han observado efectos beneficiosos significativos en la utilización de simbiosis en otros contextos.

## Conclusiones

En este estudio, se determinó que la suplementación con el probiótico *P. acidilactici* de hasta  $2 \times 10^8$  UFC/g en dietas para juveniles de trucha arcoíris no tiene efectos negativos en su desarrollo ni en los distintos parámetros de crecimiento, por lo que el rendimiento con respecto a la dieta sin probióticos fue uniforme.

Las dietas con las diferentes concentraciones del probiótico no influyeron negativamente en la deposición de proteínas en músculo e hígado de los peces. Sin embargo, es notable la relación positiva entre la cantidad de probiótico y la cantidad de proteína que se acumuló en el músculo.

Los resultados sobre la deposición de lípidos en músculo e hígado revelaron que las dietas a base de harinas vegetales y con la adición de *P. acidilactici* en distintas concentraciones no tuvieron una influencia negativa en la acumulación de lípidos en los organismos en el tejido muscular y hepático.

En el estudio actual se encontró que las dietas con *P. acidilactici* no tuvieron diferencias significativas con respecto al grupo control en lo referido a la expresión del gen *IL-1 $\beta$* , pero es importante notar que la cantidad de expresión de la *IL-1 $\beta$*  se incrementa conforme se incrementa la cantidad del probiótico. Por lo tanto, la inclusión de la bacteria tiene el potencial de fortalecer las respuestas inmunitarias en *Oncorhynchus mykiss*.

La administración dietética de *P. acidilactici* en trucha arcoíris no tuvo efectos perjudiciales en cuanto a la expresión de *IL-4*. El probiótico reguló al alza la expresión de dicho gen, y se sugiere en estudios futuros incrementar la concentración de *P. acidilactici* para medir en qué punto la *IL-4* tiene una diferenciación significativa en la expresión.

Los resultados obtenidos en la actual investigación mostraron un efecto positivo significativo de la suplementación de la dieta a base vegetal de juveniles de trucha arcoíris con *P. acidilactici* sobre la expresión de *IL-10* del intestino. Estos aditivos alimentarios regulan positivamente la expresión del gen.

Los resultados en la expresión del gen *IL-21* en el intestino de la trucha arcoíris mostraron que no existen efectos negativos de la suplementación de *P. acidilactici* cuando se suministra en dietas cuya principal fuente de proteína es vegetal.

Los resultados de la presente investigación muestran que las dietas a base vegetal suplementadas con *P. acidilactici* tienen efectos positivos sobre el estado de inmunidad de los juveniles de trucha arcoíris, además de no afectar de manera negativa el crecimiento ni la deposición de proteínas y lípidos en el músculo e hígado.

## Referencias

Abdel-Tawwab, M., Hamed, H.S. 2020. Antagonistic effects of dietary guava (*Psidium guajava*) leaves extract on growth, hemato-biochemical, and immunity response of cypermethrin-intoxicated Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fingerlings. *Aquaculture*, 529: 735668.

Abedi, S. Z., Yeganeh, S., Moradian, F. y Ouraji, H. 2022. The influence of probiotic (isolated based on phytase activity) on growth performance, body composition, and digestibility of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 53(5); 1006-1030.

Ahmadifar, E., Dawood, M., Moghadam, M., Shahrestanaki, A., Van Doan, H., Saad, A., Aboubakr, M., Abdelhiee, E. y Fadl, S. 2020. The effect of *Pediococcus acidilactici* MA 18/5M on immune responses and mRNA levels of growth, antioxidant, and immune-related genes in zebrafish (*Danio rerio*). *Aquaculture Reports*, 17.

Alejo A. y Tafalla C. 2011. Chemokines in teleost fish species. *Developmental & Comparative Immunology*. 35: 1215-1222.

Al-Hisnawi, A., Rodiles, A., Rawling, M., Castex, M., Waines, P., Gioacchini, G., Carnevali, O. y Merrifield, D. 2019. Dietary probiotic *Pediococcus acidilactici* MA18/5M modulates the intestinal microbiota and stimulates intestinal immunity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of the World Aquaculture Society*, 50: 1133–1151.

Ape, F., Manini, E., Quero, G. M., Luna, G. M., Sara, G., Vecchio, P., Brignoli, P., Anferri, S. y Mirto, S. 2019. Biostimulation of in situ microbial degradation processes in organically-enriched sediments mitigates the impact of aquaculture. *Chemosphere*, 226: 715-725.

Ashouri, G., Soofiani, N., Hoseinifar, S., Hossein, S., Morshedi, V., Valinassab, T., Bagheri, D., Van Doan, H., Mozanzadeh, M. y Carnevali, O. 2020. Influence of dietary sodium alginate and *Pediococcus acidilactici* on liver antioxidant status, intestinal lysozyme gene expression, histomorphology, microbiota, and digestive enzymes activity, in Asian sea bass (*Lates calcarifer*) juveniles. *Aquaculture*, 518.

Aubin, J., Gatesoupe, F.J., Labbé, L., Lebrun, L. 2005. Trial of probiotics to prevent the vertebral column compression syndrome in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). *Aquaculture Research*, 36: 758–767.

- Avella, M.A., Gioacchini, G., Decamp, O., Makridis, P., Bracciatelli, C., Carnevali, O. 2010. Application of multi-species of *Bacillus* in sea bream larviculture. *Aquaculture*, 305(1–4): 12–19.
- Azari, A. H., Hashim, R., Habibi Rezaei, M., Sharifzadeh Baei, M., Najafpour, S., Roohi, A., y Darvishi, M. 2011. The effects of commercial probiotic and prebiotic usage on growth performance, body composition and digestive enzyme activities in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *World Appl Sci J*, 14: 26-35.
- Bagheri, T., Hedayati, S.A., Yavari, V., Alizade, M., Farzanfar, A. 2008. Growth, survival and gut microbial load of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry given diet supplemented with probiotic during the two months of first feeding. *Turk. J. Fish. Aquat. Sci.*, 8: 43–48.
- Biswas, H., Korenaga, R., Nagamine, H., Takayama, S., Kawahara, S., Takeda, Y., Kikuchi, Y., Dashnyam, B., Kono, T. y Sakai, M. 2013. Cytokine responses in the Japanese pufferfish (*Takifugu rubripes*) head kidney cells induced with heat-killed probiotics isolated from the Mongolian dairy products. *Fish & Shellfish Immunology*, 34(5).
- Bligh, E. & Dyer, W. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37(8): 911–917.
- Choi, D., He, M., Fang, H., Wang, X., Li, X. y Leng, X. 2020. Replacement of fish meal with two fermented soybean meals in diets for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture Nutrition*, 26: 37–46.
- Choi, W.; Moniruzzaman, M.; Bae, J.; Hamidoghli, A.; Lee, S.; Choi, Y.-H.; Min, T.; Bai, S.C. 2022. Evaluation of Dietary Probiotic Bacteria and Processed Yeast (GroPro-Aqua) as the Alternative of Antibiotics in Juvenile Olive Flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Antibiotics*, 11: 129.
- CONAPESCA. 2017. La Acuicultura en México, Retos y Oportunidades. Copia de 05 Situación actual de la acuicultura en México comisionado Mario Aguilar Sánchez CONAPESCA. [Enlace](#).
- CONAPESCA. 2018. Anuario Estadístico de Acuicultura y Pesca. Anuario Estadístico. [Enlace](#).
- Crawford, S. y Muir, A. 2008. Global introductions of salmon and trout in the genus *Oncorhynchus*: 1870–2007. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 18: 313–344.
- Cuéllar-Lugo, M., Asiain-Hoyos, A., Juárez-Sánchez, J., Reta-Mendiola, J., y Gallardo-López, F. 2018. Evolución normativa e institucional de la acuicultura en México. *Agricultura, Sociedad y Desarrollo*, 15(4): 541-564.

Dang, Y., Zhao, C., Kuan, K.C.S., Cao, X., Wang, B., y Ren, Y. 2023. Effects of dietary oregano essential oil-mediated intestinal microbiota and transcription on amino acid metabolism and *Aeromonas salmonicida* resistance in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture International*, 1-21.

Dawood, M., Koshio, S., Ishikawa, M., El-Sabagh, M., Esteban, M. y Zaineldin, A. 2016. Probiotics as an environment-friendly approach to enhance red sea bream (*Pagrus major*) growth, immune response, and oxidative status. *Fish & Shellfish Immunology*, 57: 170–178.

De-Silva, S. y Hasan, M. 2007. Feeds and fertilizers: The key to long-term sustainability of Asian aquaculture. *Study and Analysis of Feeds and Fertilizers for Sustainable Aquaculture Development*, FAO, 497: 19-47.

Dersjant-Li, Y. 2002. The use of soy protein in aquafeeds. En: Cruz-Suárez, L. E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Gaxiola-Cortés, M. G., Simoes, N. (Eds.). *Avances en Nutrición Acuícola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*. 3 al 6 de septiembre del 2002. Cancún, Quintana Roo, México.

Dinareello, CA. 1997. Interleukin-1. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 8: 253-265.

EL-Haroun, E. R., Goda, A. M., y Kabir, C. M. A. 2006. Effect of dietary probiotic Biogen® supplementation as a growth promoter on growth performance and feed utilization of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). *Aquaculture Research*, 37: 1473–1480.

El-katcha, M. I., Soltan, M. A., Sharaf, M. M., y Hasen, A. 2014. "Influence of probiotic on growth, feed utilization, hematological and biochemical indices of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)." En *Proceedings of the Second International Conference on Biotechnology Applications in Agriculture*. 65–73.

Engelsma MY, Stet RJM, Schipper H, Verburg-van Kemenade BML. 2001. Regulation of interleukin-1 beta RNA expression in the common carp, *Cyprinus carpio* L. *Dev Comp Immunol*, 25: 195-203.

FAO. 2020. El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2020. Versión resumida. La sostenibilidad en acción. Roma.

FAO. 2024. *Oncorhynchus mykiss*. Programa de información de especies acuáticas. Texto de Cowx, I. G. División de Pesca y Acuicultura [en línea]. Roma. Consultado el 10 de enero de 2024, recuperado de [https://www.fao.org/fishery/es/culturedspecies/oncorhynchus\\_mykiss\\_es/es](https://www.fao.org/fishery/es/culturedspecies/oncorhynchus_mykiss_es/es)

Fernandes, S. y Kerkar, S. 2019. Bacterial probiotics over antibiotics: A boon to aquaculture en M. Nandan y M. Mohan (Ed.), *Advances in Biological Science Research* (pp. 215 - 232). Academic Press.

Fuentes, E., Safian, D., Valdés, J., Molina, A. 2013. Isolation and selection of suitable reference genes for real-time PCR analyses in the skeletal muscle of the fine flounder in response to nutritional status: assessment and normalization of gene expression of growth-related genes. *Fish Physiology and Biochemistry*, 39: 765-777.

Foey, A., Picchiatti, S. 2014. Immune defences of teleost fish. En D. L. Merrifield y E. Ringø (Eds.), *Aquaculture Nutrition: Gut Health, Probiotics and Prebiotics*, pp. 14–52. Londres, Inglaterra: Wiley.

García-Diez, C., Remiro, J., Ojeda, J., Simard, F., Simoes, S. 2016. Aproximación a la sostenibilidad acuícola del Mediterráneo mediante el uso de indicadores. *AquaTIC*, 35.

Gioacchini, G., Lombardo, F., Avella, M. A., Olivotto, I., y Carnevali, O. 2010. Welfare improvement using alginic acid in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) juveniles. *Chemistry and Ecology*, 26: 111–121.

Gisbert, E., Castillo, M., Skalli, A., Andree, K.B., Badiola, I. 2013. *Journal of Animal Science*, 91: 2766–2774.

Guafack, T.T., Jang, W.J., Hasan, M.T., Choi, Y.H., Bai, S.C., Lee, E.W., Lee, B.J., Hur, S.W., Lee, S.H. y Kong, I.S. 2020. Effects of dietary non-viable *Bacillus sp. SJ-10*, *Lactobacillus plantarum*, and their combination on growth, humoral and cellular immunity, and streptococcosis resistance in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Res. Vet. Sci.*, 131: 177–185.

Hamdan, A.M., El-Sayed, A.F.M., Mahmoud, M.M. 2016. Effects of a novel marine probiotic, *Lactobacillus plantarum* AH 78, on growth performance and immune response of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Journal of Applied Microbiology*, 120 (4): 1061–1073.

- Harper, G.M., Monfort, M., Saoud, I.P., Emery, M., Mustafa, S., Rawling, M., Eynon, B., Davies, S., Merrifield, D. 2011. An ex vivo approach to studying the interactions of *Pediococcus acidilactici* and *Vibrio (Listonella) anguillarum* in the anterior intestine of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of Aquaculture Research and Development*, S1: 004.
- Hasan, M.T., Jang, W.J., Lee, B., Kim, K.W., Hur, S.W., Lim, S.G., Bai, S.C., Kong, I. 2019. Heat-killed *Bacillus sp. SJ-10* probiotic acts as a growth and humoral innate immunity response enhancer in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Fish Shellfish Immunol.*, 88: 424–431.
- Heikkinen, J., Vielma, J., Kemiläinen, O., Tirola, M., Eskelinen, P., Kiuru, T., Navia-Paldanius, D., von Wright, A. 2006. Effects of soybean meal-based diet on growth performance, gut histopathology, and intestinal microbiota of juvenile rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture*, 261(1): 259-268.
- Hoseinifar S.H., Mirvaghefi A., Merrifield D.L. 2011. The effects of dietary inactive brewer's yeast *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus* on the growth, physiological responses and gut microbiota of juvenile beluga (*Huso huso*). *Aquaculture*, 318: 90-94.
- Hoseinifar, S., Hoseini, S., y Bagheri, D. 2017. Effects of Galactooligosaccharide and *Pediococcus acidilactici* on Antioxidant Defence and Disease Resistance of Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Annals of Animal Science*. 17: 2017-227.
- Irkin, L. C., Yigit, M., Yilmaz, S., y Maita, M. 2014. Toxicological evaluation of dietary garlic (*Allium sativum*) powder in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. *Food and Nutrition Sciences*.
- John, F. J., Rice, J. D., y Preston, J. F. 2006. Characterization of XynC from *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* strain 168 and analysis of its role in depolymerization of glucuronoxylan. *Journal of Bacteriology*, 188(24): 8617-8626.
- June C., Ledbetter J.A., Lindsten T., y Thompson C.B. 1989. Evidence for the involvement of three distinct signals in the induction of IL-2 gene expression in human T lymphocytes. *J. Immunol.*, 143: 153–161.
- Kjeldahl, J. (1883) A New Method for the Determination of Nitrogen in Organic Matter. *Zeitschrift für Analytische Chemie*, 22: 366-382.

Krogdahl, Å., Penn, M., Thorsen, J., Refstie, S., Bakke, A.M. 2010. Important antinutrients in plant feedstuffs for aquaculture: an update on recent findings regarding responses in salmonids. *Aquaculture Research*, 41: 333-344.

Lara-Flores, M., Olvera-Novoa, M. A., Guzmán-Méndez, B. E., y López-Madrid, W. 2003. Use of the bacteria *Streptococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus*, and the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as growth promoters in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, 216: 193–201.

Li, J.H., Shao, J.Z., Xiang, L.X., Wen, Y. 2007. Cloning, characterization, and expression analysis of pufferfish interleukin-4 cDNA: the first evidence of Th2-type cytokine in fish. *Molecular Immunology*, 44(8): 2078–2086.

Li, X. Q., Zhu, Y. H., Zhang, H. F., Yue, Y., Cai, Z. X., Lu, Q. P., y Wang, J. F. 2012. Risks associated with high-dose *Lactobacillus rhamnosus* in an *Escherichia coli* model of piglet diarrhoea: intestinal microbiota and immune imbalances. *PLoS ONE*, 7(7): e40666.

Lin, Y.S., Saputra, F., Chen, Y.C., y Hu, S.Y. 2019. Dietary administration of *Bacillus amyloliquefaciens* R8 reduces hepatic oxidative stress and enhances nutrient metabolism and immunity against *Aeromonas hydrophila* and *Streptococcus agalactiae* in zebrafish (*Danio rerio*). *Fish & Shellfish Immunology*, 86: 410-419.

Liu, W., Ren, P., He, S., Xu, L., Yang, Y., Gu, Z., y Zhou, Z. 2013. Comparison of adhesive gut bacteria composition, immunity, and disease resistance in juvenile hybrid tilapia fed two different *Lactobacillus* strains. *Fish & Shellfish Immunology*, 35: 54–62.

Maite, C., Peral, I.P., Ramos, S., Basurco, B., López-Francos, M.A., Cavallo, M., Perez, J., Aguilera, C., Fu-rones, D., Reverté, C. 2018. Deliverable 1.2 of the Horizon 2020 Project MedAID. Disponible en: <https://archimer.ifremer.fr/doc/00515/62630> (Consultado el 10 de agosto de 2023).

Makled, S. O., Hamdan, A. M., El-Sayed, A. F. M., y Hafez, E. E. 2017. Evaluation of marine psychrophile, *Psychrobacter namhaensis* SO89, as a probiotic in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) diets. *Fish & Shellfish Immunology*, 61: 194–200.

Makled, S. O., Hamdan, A. M., & El-Sayed, A. F. M. 2020. Growth promotion and immune stimulation in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fingerlings following dietary administration of a novel marine probiotic, *Psychrobacter maritimus* S. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 12: 365-374.

Merrifield, D., Harper, G., Dimitroglou, A., Ringø, E. y Davies, S. 2010. Possible influence of probiotic adhesion to intestinal mucosa on the activity and morphology of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) enterocytes. *Aquaculture Research*. 41: 1268-1272.

Merrifield, D., Bradley, G., Harper, G., Baker, R., Munn, C. y Davies, S. 2011. Assessment of the effects of vegetative and lyophilized *Pediococcus acidilactici* on growth, feed utilization, intestinal colonization and health parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). *Aquaculture Nutrition*. 17: 73-79.

Moritary, D.J.W. 1998. Control of Luminous *Vibrio* species in panaeid aquaculture ponds.

Moslehi, F., Sattari, M., y Masouleh, A. S. 2016. Effects of *Pediococcus pentosaceus* as a probiotic on intestinal microbiota and body composition of Siberian sturgeon, *Acipenser baerii* Brandt, 1869. *International Journal of Aquatic Biology*, 4(1): 11-16.

Naciones Unidas. 2019. Department of Economic and Social Affairs, Population Division. World Population Prospects 2019: Highlights (ST/ESA/SER.A/423).

Naciones Unidas. 2020. La acuicultura puede impulsar el Hambre Cero en México. *Naciones Unidas México*. <https://www.onu.org.mx/la-acuicultura-puede-impulsar-el-hambre-cero-en-mexico/>

Nakano, T., Afonso, L., Beckman, B., Iwama, G., Devlin, R. 2013. Acute Physiological Stress Down-Regulates mRNA Expressions of Growth-Related Genes in Coho Salmon. *PLoS ONE*, 8(8): 1-7.

Naseri, S., Khara, H., & Shakoori, M. 2013. Effects of probiotics and Fe ion on the growth and survival and body composition of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) fry. *Journal of Applied Animal Research*, 41(3): 318-325.

Olvera, M., Martínez, C. y Real de León, E. 1993. Manual de Técnicas para Laboratorio de Nutrición de Peces y Crustáceos. México: FAO.

Ortega, C. y Valladares, B. 2017. Analysis on the development and current situation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) farming in Mexico. *Rev Aquacult*. 9: 194-202.

- Pereira, D., y Henriques, M. 2019. Economic feasibility for producing Imperial Zebra pleco (*Hypancistrus zebra*) in recirculating aquaculture systems: An alternative for a critically endangered ornamental fish. *Aquaculture Economics & Management*, 23(4): 428-448.
- Pérez-Cordón, G., Estensoro, I., Benedito-Palos, L., Calduch-Giner, J. A., Sitjà-Bobadilla, A. y Pérez-Sánchez, J. 2014. Interleukin gene expression is strongly modulated at the local level in a fish–parasite model. *Fish & Shellfish Immunology*, 37(2): 201-208.
- Perez-Sanchez, T., Balcazar, J. L., Merrifield, D. L., Carnevali, O., Gioacchini, G., de Blas, I., y Ruiz-Zarzuela, I. 2011. Expression of immune-related genes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) induced by probiotic bacteria during *Lactococcus garvieae* infection. *Fish & Shellfish Immunology*, 31: 196–201.
- Rahimnejad, S., Guardiola, F., Leclercq, E., Esteban, M., Castex, M., Sotoudeh, E. y Lee, S. 2018. Effects of dietary supplementation with *Pediococcus acidilactici* MA18/5M, galactooligosaccharide and their synbiotic on growth, innate immunity, and disease resistance of rockfish (*Sebastes schlegeli*). *Aquaculture*. 482: 36-44.
- Ramos, M., Weber, B., Gonçalves, J., Santos, G., Rema, P. y Ozório R. 2013. Dietary probiotic supplementation modulated gut microbiota and improved growth of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology*. 166(2): 302-307.
- Ramos, M., Gonçalves, J., Batista, S., Costas, B., Pires, M., Rema, P. y Ozório, R. 2015. Growth, immune responses, and intestinal morphology of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) supplemented with commercial probiotics. *Fish Shellfish Immunol*. 45(1): 19-26.
- Sahu, M.K., Swarnakumar, N.S., Sivakumar, K., Thangaradjou, T., Kannan, L. 2008. Probiotics in aquaculture: importance and future perspectives. *Indian J Microbiol*, 48: 299–308.
- Sánchez, A.D., Arvizu, S.E., Hernández, H.L.H., Fernández, A.M.A., Angeles, L.O. 2015. Addition of yeast and/or phytase to diets with soybean meal as main protein source: effects on growth, P excretion and lysozyme activity in juveniles rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 15: 215-222.

- Sealey, W. M, Barrows, F. T, Smith, C. E, Overturf, K., y LaPatra, S. E. 2009. Soybean meal level and probiotics in first feeding fry diets alter the ability of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* to utilize high levels of soybean meal during grow-out. *Aquaculture*. 293: 195-203.
- Secombes, C.J., Hardie, L.J., Daniels, G. 1996. Cytokines in fish: an update. *Fish Shellfish Immunol.*, 6(4): 291–304.
- Secombes, C. J., Wang, T., y Bird, S. 2011. The interleukins of fish. *Developmental & Comparative Immunology*, 35(12): 1336-1345.
- Shelby, R.A., Lim, C., Yildirim-Aksoy, M., Klesius, P.H. 2007. Effects of probiotic bacteria as dietary supplements on growth and disease resistance in young Channel catfish (*Ictalurus punctatus* Rafinesque). *J Appl. Aquaculture*, 19: 81–91.
- Sigh, J., Lindenstrøm, T., y Buchmann, K. 2004. Expression of pro-inflammatory cytokines in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during an infection with *Ichthyophthirius multifiliis*. *Fish & Shellfish Immunology*, 17(1): 75-86.
- Standen, B.T., Rawling, M.D., Davies, S.J., Castex, M., Foey, A., Gioacchini, G., Carnevali, O., Merrifield, D.L. 2013. Probiotic *Pediococcus acidilactici* modulates both localised intestinal- and peripheral-immunity in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fish Shellfish Immunol.*, 35(4): 1097–1104.
- Tellez, M.L. 2016. Respuestas fisiológicas de dos líneas de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) alimentadas con proteínas y lípidos de origen vegetal. Tesis de Maestra, Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología, Universidad Nacional Autónoma de México. 68 pp.
- Teng, D., Gao, M., Yang, Y., Liu, B., Tian, Z., y Wang, J. 2012. Bio-modification of soybean meal with *Bacillus subtilis* or *Aspergillus oryzae*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 1: 32-38.
- Timmerman, H.M., Koning, C.J.M., Mulderc, L., Romboutsd, F.M. y Beynen, A.C. 2004. Monostrain, multistrain and multispecies probiotics - a comparison of functionality and efficacy. *Int. J. Food Microbiol.*, 96: 219–233.
- Torrecillas, S., Rivero-Ramírez, F., Izquierdo, M. S., Caballero, M. J., Makol, A., Suárez-Bregua, P. y Montero, D. 2018. Feeding European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles with a functional synbiotic additive (mannan oligosaccharides and *Pediococcus acidilactici*): An effective

tool to reduce low fishmeal and fish oil gut health effects? *Fish & Shellfish Immunology*, 81: 10-20.

Van Doan, H., Hoseinifar, S., Ringø, E., Esteban, M., Dadar, M., Mahmoud, A., Dawood O. y Faggio, C. 2020. Host-Associated Probiotics: A Key Factor in Sustainable Aquaculture. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*, 28(1): 16-42.

Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P., y Verstraete, W. 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(4): 655–671.

Voorhees, J., Barnes, M., Chipps, S. y Brown, M. 2019. Bioprocessed soybean meal replacement of fish meal in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) diets. *Cogent Food & Agriculture*, 5: 1.

Wang, T., Diaz-Rosales, P., Costa, M.M., Campbell, S., Snow, M., Collet, B., Martin, S.A.M., y Secombes, C.J. 2011. Functional Characterization of a Nonmammalian IL-21: Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) IL-21 Upregulates the Expression of the Th Cell Signature Cytokines IFN- $\gamma$ , IL-10, and IL-22. *J Immunol*, 186(2): 708–721.

Yi, Y., Zhang, Z., Zhao, F., Liu, H., Yu, L., Zha, J., & Wang, G. 2018. Probiotic potential of *Bacillus velezensis* JW: antimicrobial activity against fish pathogenic bacteria and immune enhancement effects on *Carassius auratus*. *Fish & Shellfish Immunology*, 78: 322-330.

Yi, C.C., Liu, C.H., Chuang, K.P., Chang, Y.T., y Hu, S.Y. 2019. A potential probiotic *Chromobacterium aquaticum* with bacteriocin-like activity enhances the expression of indicator genes associated with nutrient metabolism, growth performance, and innate immunity against pathogen infections in zebrafish (*Danio rerio*). *Fish & Shellfish Immunology*, 93: 124-134.

Yones, M. A.-M., Hussein, M. S., Ali, M. W., y Abdel-Azem, A.-A. M. 2019. "Effect of dietary Lacto cel-con probiotic on growth performance and hematology indices of fingerlings mono-sex Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)." *Egyptian Journal of Aquatic Biology and Fisheries*. 23, 2: 227–239.

Zhang, Z.B., Swain, T., Bogwald, J., Dalmo, R.A., y Kumari, J. 2009. Bath immunostimulation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry induces enhancement of inflammatory cytokine transcripts, while repeated bath induces no changes. *Fish Shellfish Immunol.*, 26: 677–684.

Zar, J.H. 1999. Biostatistical Analysis. NJ, USA: Prentice Hall. pp 663.

Zou, J., Holland, J., Pleguezuelos, O., Cunningham, C., y Secombes, CJ. 2000. Factors influencing the expression of interleukin-1b in cultured rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) leucocytes. *Dev Comp Immunol*, 24: 575-582.

## ANEXOS

### Anexo 1. Información de la especie.

**Reino:** Animalia

**Filo:** Chordata

**Clase:** Actinopterygii

**Orden:** Salmoniformes

**Familia:** Salmonidae

**Subfamilia:** Salmoninae

**Género:** *Oncorhynchus*

**Especie:** *O. mykiss* Walbaum, 1792

La trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) se distingue por su resistencia y facilidad de desove, con un cuerpo fusiforme y la presencia de una aleta adiposa. Su coloración varía desde tonos azules hasta verde oliva, destacando una banda rosada a lo largo de la línea lateral y una tonalidad plateada en la parte inferior. El lomo, los costados, la cabeza y las aletas están adornados con pequeños puntos negros. Reconocida por su rápido crecimiento, la trucha arcoíris exhibe una notable tolerancia a diversos ambientes y manipulaciones, desde ciclos de vida anádromos hasta la residencia permanente en lagos. Los juveniles se adaptan fácilmente a la alimentación con dietas artificiales, alcanzando un peso de hasta 4.5 kg en tan solo tres años (FAO, 2024).

Esta especie presenta una considerable capacidad para soportar variaciones de temperatura, abarcando desde 0 °C hasta 27 °C, con una temperatura óptima situada entre los 10 °C y 18 °C. Por ende, su cultivo se realiza a altitudes superiores a 1300 msnm, asegurando la presencia de oxígeno en el agua cercano a la saturación y libre de contaminantes (FAO, 2019). Originaria de las cuencas que drenan al Pacífico en América del Norte, desde Alaska hasta México, la trucha arcoíris ha sido introducida en las aguas de todos los continentes, con excepción de la Antártica, desde 1874.

## Anexo 2. Determinación del contenido de cenizas (Olvera et al., 1993).

Materiales y equipo.

- Crisoles de porcelana.
- Mufla.
- Desecador.
- Procedimiento

Procedimiento:

1. Los crisoles de porcelana deben limpiarse previamente y llevarse a peso constante sin tapa.
2. Pesar la muestra seca y colocarla en los crisoles, etiquetándolos.
3. Colocar los crisoles en una mufla a 100°C e incrementar la temperatura gradualmente hasta alcanzar una calcinación a 550°C durante 6 horas. Posteriormente, permitir que se enfríen y transferirlos a un desecador.
4. Realizar una nueva medición del peso de los crisoles y llevar a cabo los cálculos pertinentes.

$$\text{Contenido de ceniza (\%)} = \frac{A-B}{C} \times 100$$

A = Peso del crisol (g)

B = Peso del crisol con ceniza (g)

C = Peso de la muestra (g)

### Anexo 3. Determinación del contenido de humedad (Olvera *et al.*, 1993).

Materiales y equipo.

- Crisoles.
- Horno de secado.
- Desecador.

Procedimiento:

1. Lavar los crisoles con jabón libre de fosfatos y alcohol.
2. Colocar los crisoles en el horno de secado durante 2 horas, transfíralos al desecador para eliminar la humedad, pesar y registrar los valores.
3. volver a poner los crisoles en el horno de secado a 100°C durante 24 horas y pesar. Repetir este paso hasta que la diferencia de peso de los crisoles sea menor a 0.001g.
4. Sacar los crisoles del horno y colocarlos en un desecador durante 1 hora.
5. Pesar la muestra y colocarla en los crisoles, tapándolos.
6. Introducir la muestra en el horno a 80°C durante 12 horas.
7. Sacar la muestra del horno y colocarla en el desecador.
8. Pesar la muestra y realizar los cálculos correspondientes.

$$\text{Contenido de humedad (\%)} = \frac{MH - MS}{MH} \times 100$$

Donde:

MH = Peso de la muestra inicial húmeda (g)

MS = Peso final de los crisoles con la muestra – peso de los crisoles (g)

#### **Anexo 4. Cuantificación del contenido de lípidos por la técnica de Bligh y Dyer (1959).**

##### Material y equipo.

- Homogeneizador
- Sonicador
- Vasos de precipitados
- Tubos de ensaye
- Embudo de separación
- Frascos Viales
- Bomba de vacío

##### Reactivos.

- Cloroformo.
- Metanol.

##### Procedimiento:

1. Lavar los frascos viales y los tubos de ensaye con jabón libre de fosfatos en un sonicador durante 10 minutos. Secar a 70°C durante 2 horas.
2. Pesar las muestras en la balanza analítica y colocar en los tubos de ensaye con tapa.
3. Agregar 1.5 ml de cloroformo y 3 ml de metanol.
4. Homogenizar cada tubo durante 2 minutos, manteniendo una temperatura baja para evitar la evaporación de los solventes.
5. Colocar 1.5 ml de cloroformo en cada tubo para obtener una proporción 1:1 metanol-cloroformo y homogenizar por otros 2 minutos.
6. Filtrar el contenido de cada tubo en una bomba de vacío con un filtro de membrana.
7. Verter la mezcla en un embudo de separación y colocar 0.8 mL de agua destilada. Agitar hasta que se observe la separación (la parte de arriba queda transparente y la de abajo amarillenta).
8. Al separarse, vaciar la parte de abajo en un frasco vial. Enjuagar el embudo con agua destilada cada vez que se utilice. Los frascos viales deben ser previamente pesados.

9. Colocar los frascos viales en aireación constante durante 12 horas o hasta que el diluyente se evapore completamente.
10. Pesar los frascos viales y realizar el cálculo correspondiente.

$$\% \text{ de lípidos} = \frac{Y_i - V_i}{M_i L} \times 100$$

Donde:

$Y_i$  = Peso final de las muestras.

$V_i$  = Peso inicial de los viales.

$M_i L$  = Peso inicial de las muestras.

## **Anexo 5. Obtención del contenido de proteínas totales por la técnica de Kjeldahl.**

Previamente se preparan las siguientes soluciones:

- Solución neutralizadora de ácidos: 2L NaOH 15% para el scrubber.
- Solución alkali: NaOH 40% que va en el bidón conectado al destilador.
- Solución indicadora: (0.22g Rojo de Metilo/ 100 mL de etanol) + (0.11g de verde de bromocresol/50 mL de Etanol).
- Solución de ácido bórico: (40g de  $H_3BO_3$ /700 mL agua) + 200mL etanol + 17 mL de solución indicadora. Aforar a 1L.
- Solución de Ácido Sulfúrico 0.1N para la titulación.
- Ácido sulfúrico concentrado (96%) 15mL/muestra.

Etapas de digestión:

1. Pesar entre 1 a 2g de muestra seca y colocarla en los tubos de digestión, dejando uno de los tubos sin muestra (blanco).
2. Añadir 2 kjeltabs a cada tubo.
3. Antes de colocar los tubos en el digestor, cambiar el agua destilada y la solución neutralizadora del scrubber.
4. A cada tubo agregar 10 mL de  $H_2O_2$  y 10 mL de  $H_2SO_4$ .
5. Colocar los tubos en el digestor, ponerles las tapas y encender el scrubber. Encender el digestor y configurarlo a 420°C.
6. Una vez alcanzada esta temperatura, dejar los tubos durante 1 hora. NOTA: tener puesta la mascarilla anti-gas y la campana de extracción encendida durante toda esta etapa.
7. Al terminar el proceso, apagar el digestor y dejar enfriar los tubos durante 1 hora.

Etapas de destilación:

1. En el Kjeltec, colocar un tubo limpio con 150 mL de agua destilada y un matraz erlenmeyer de 250 mL para la purga inicial. Nota: Realizar una purga por cada destilación.
2. Colocar en cada matraz erlenmeyer 25 mL de solución indicadora de ácido bórico.
3. En cada uno de los tubos de digestión, agregar 70 mL de agua destilada y colocarlos en el Kjeltec, cada uno con un matraz que ya contiene solución indicadora.

4. En cada destilación, desechar el contenido del tubo digestor y conservar el matraz para titular.

Etapas de titulación:

Colocar un agitador magnético en el matraz y titular con ácido sulfúrico hasta que el color cambie de rosa a verde. Registrar los mL de titulación. Realizar el cálculo.

$$\%N = \frac{(MT - MB) * 140.07}{\text{mg de la muestra}}$$

Donde:

MT = Mililitros de titulante usado

MB = Mililitros del blanco

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

## Anexo 6. Expresión de genes.

### Extracción de RNA

#### MATERIAL REQUERIDO:

- 1 tubo de 2 ml de fondo redondo y 2 tubos de 1.5 ml de fondo cónico para cada una de las muestras. (Marcar cada uno de los tubos antes de empezar).
- Puntas de micropipeta de 10  $\mu$ L y 200  $\mu$ L con filtro.
- Micropipetas de 10 y 200  $\mu$ L.
- Centrifuga refrigerada.
- spinner.
- Pelotas de macerado (una por cada tubo).

#### PROCEDIMIENTO

1. Preparar todos los tubos destinados a las muestras y marcarlos.
2. Limpiar las superficies y micropipetas con RNAzap.
3. En un tubo de 2 ml con fondo redondo, colocar una pelota de acero para el macerado.
4. Transferir las muestras del tubo original (que contiene RNAlater) a sus respectivos tubos. Agregar 500  $\mu$ L de TRIZOL y mezclar suavemente.
5. Colocar los tubos en el homogenizador Bullet Blender durante 3 minutos a la máxima velocidad. Repetir hasta que el tejido se haya macerado completamente.
6. Centrifugar los tubos a 4°C durante 10 minutos a 12,000 rpm.
7. Después de este centrifugado, se forman tres capas; debe obtenerse cuidadosamente la capa superficial. Transferir esta capa a un nuevo tubo con fondo cónico.
8. Agregar 500  $\mu$ L de isopropanol (grado molecular) y mezclar por inversión durante 20 segundos.
9. Almacenar los tubos durante un período de 12-24 horas a -20°C para permitir que la mayor cantidad de ácidos nucleicos precipiten.
10. Pasadas las 24 horas, centrifugar los tubos durante 10 minutos a 12,000 rpm.

11. Retirar los tubos e identificar la ubicación de la pastilla. Recoger la mayor cantidad del sobrenadante y desecharlo. Permitir que la mayor parte del isopropanol se evapore (10 a 15 minutos a temperatura ambiente con la tapa de los tubos abierta).
12. Agregar 1 ml de etanol al 75% (grado molecular) frío (4 °C) y resuspender la pastilla mediante inversión o utilizando el vortex.
13. Centrifugar a 4°C durante 5 minutos a 7,500 rpm.
14. Desechar el sobrenadante y permitir que el residuo se evapore sin dejar que se seque completamente.
15. Agregar 200 µL de agua libre de nucleasas y esperar a que los ácidos nucleicos se disuelvan.
16. Almacenar las muestras a -30°C.

## **Medición en QUBIT™**

### **MATERIAL REQUERIDO**

- Fluorómetro QUBIT™
- Reactivo QUBIT™
- Buffer QUBIT™
- Tubos de ensayo QUBIT™

### **PROCEDIMIENTO**

1. Preparar la solución de trabajo con el reactivo y el buffer en una proporción de 1:200.
2. Etiquetar los tubos y considerar 2 adicionales para los tubos blancos.
3. En cada uno de los tubos, agregar 190 µL de solución de trabajo y 10 µL de muestra. Para los blancos, en lugar de la muestra, colocar el estándar 1 y el estándar 2.
4. Realizar cinco toques de vortex y centrifugar durante 5 segundos.
5. Incubar durante 2 minutos.
6. Medir en el fluorómetro QUBIT™, primero los dos estándares y luego las muestras.

## **DNase y Reverso transcriptasa**

### **MATERIAL REQUERIDO**

- Kit Thermo Scientific DNase I
- Kit Thermo Scientific High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit
- Termociclador MYyGo Mini
- Tubos para MyGo Mini
- Nanodrop

### **PROCEDIMIENTO**

#### **DNase**

1. A cada uno de los tubos, se les agrega el agua libre de nucleasas correspondiente según los resultados obtenidos en el QUBIT™.
2. Posteriormente, se añade la muestra y 1 µL de DNase buffer junto con la enzima DNase.
3. Los tubos se colocan en el vortex y se agitan con 5 toques continuos, luego se centrifugan por 5 segundos.
4. Se dejan incubando a temperatura ambiente durante 15 minutos.
5. Después de la incubación, se les agrega 1 µL de EDTA.
6. Nuevamente, se ponen los tubos en el vortex y se agitan con 5 toques continuos, seguido de una centrifugación por 5 segundos.
7. Finalmente, los tubos se colocan en el termociclador a 65°C durante 10 minutos.

#### **Reverso transcriptasa**

1. En un tubo Eppendorf, se preparan los siguientes reactivos multiplicados por el total de muestras: 10XRT Buffer (2 µL), 25x dNTP Mix (0.8 µL), 10xRT Random Primers (2 µL), Multiscribe Reverse Transcriptase (1 µL) y agua libre de nucleasas (3.2 µL).
2. Los tubos se colocan en el vortex y se agitan con 5 toques continuos, luego se centrifugan durante 5 segundos.
3. Se añaden 9 µL de la mezcla en cada uno de los tubos que previamente tienen la DNase.
4. Nuevamente, los tubos se ponen en el vortex y se agitan con 5 toques continuos, seguido de una centrifugación por 5 segundos.

5. Los tubos se colocan en el termociclador con las siguientes temperaturas y tiempos: 25°C por 10 minutos, 37°C por 120 minutos, y 85°C por 5 minutos.
6. Después de medir la concentración de cDNA en un nanodrop, se almacenan a -20°C.

## qPCR

### MATERIAL REQUERIDO

- Termociclador MyGo Mini
- Tubos para MyGo Mini
- SensiFAST™ SYBR No-ROX Kit
- Primers

### PROCEDIMIENTO

1. Se marcan los tubos por duplicado en la parte de la tapa.
2. Se diluyen los primers con agua libre de nucleasas hasta obtener una concentración de 10 µM.
3. Se preparan las muestras de cDNA con agua libre de nucleasas hasta tener una concentración de 100 ng/µl.
4. Se prepara la master mix a una concentración de primer de [0.4], lo que incluye por cada muestra: agua libre de nucleasas (1.3 µL), Forward primer (0.6 µL), Reverse primer (0.6 µL) y SensiFAST™ SYBR No-ROX (7.5 µL). En el vortex, se agitan con 5 toques continuos, luego se centrifugan durante 5 segundos.
5. A cada uno de los tubos marcados se les agrega 10 µL de la master mix y 5 µL de las muestras.
6. Se leen en el termociclador con los siguientes parámetros: Hold (95°C, 120 segundos), 2-STEP amplification (40 ciclos, 95°C durante 5 segundos y 60°C durante 30 segundos), Melting (60°C durante 60 segundos a 95 °C durante 15 segundos).

NOTA: Todo se trabaja en frío, y se realiza un vortex al cDNA antes de su utilización.