

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

DIVISION DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES



**Efecto de la dieta formulada con aceite de soya y
probiótico sobre la actividad microbiciada de los
macrófagos esplénicos en tilapia del Nilo (*Oreochromis
niloticus*) y bagre de canal (*Ictalurus punctatus*)**

TRABAJO DE TITULACION EN LA MODALIDAD DE

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTA

DAVID DE LA MORA SHERER

Las Agujas, Zapopan, Jal., Junio 2012



Universidad de Guadalajara
Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias
Coordinación de Carrera de la Licenciatura en Biología

COORD-BIO-102/2011

C.DAVID DE LA MORA SHERER
PRESENTE

Manifiestamos a usted, que con esta fecha, ha sido aprobado su tema de titulación en la modalidad de **TESIS E INFORMES** opción: TESIS con el título: "Efecto de la dieta formulada con aceite de soya y probiótico sobre la actividad microbiana de los macrófagos esplénicos en tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) y bagre de canal (*Ictalurus punctatus*)", para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos, que ha sido aceptado como director de dicho trabajo a la Dra. Martha Cecilia Téllez Bañuelos y como asesores a: Dra. Galina P. Zaitseva y al M. C. Eduardo Juárez Carrillo.

Sin más por el momento, aprovechamos para enviarte un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"PIENSA Y TRABAJA"
Las Aguas, Nextipac, Zapopan, Jalisco, 10 de junio de 2011


DRA. TERESA DE JESUS ACEVES ESQUIVIAS
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN


M.C. GLORIA PARADA BARRERA
SECRETARIO DEL COMITÉ DE TITULACIÓN

Dra. Teresa de Jesús Aceves Esquivias.
 Presidente del Comité de Titulación.
 Licenciatura en Biología.
 CUCBA.
 Presente

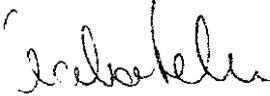
Nos permitimos informar a usted que habiendo revisado el trabajo de titulación, modalidad de: TESIS E INFORMES, opción TESIS con el título: "Efecto de la dieta formulada con aceite de soya y probiótico sobre la actividad microbicida de los macrófagos esplénicos en tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) y bagre de canal (*Ictalurus punctatus*)" que realizó el/la pasante David de la Mora Sherer con número de código 206197906 consideramos que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para autorizar su impresión.

Sin otro particular quedamos de usted con un cordial saludo.

Atentamente
 Lugar y fecha.

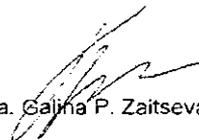
Las Agujas, Zapopan, Jal., 30 de Mayo del 2012

Director/a del trabajo,



Dra. Martha Cecilia Téllez Bañuelos

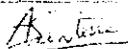
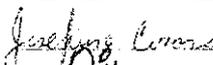
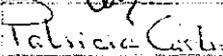
Asesor(es)



Dra. Galina P. Zaitseva



Dr. Eduardo Juárez Carrillo

Nombre completo de los Síndicos asignados por el Comité de Titulación	Firma de aprobado	Fecha de aprobación
Dra. Anne M. H. Santerre		20 Mayo 2012
Dra. Josefina Casas Solís		30 Mayo 2012
Dr. Edgardo Flores Torales		30 Mayo 2012
Supl. Dra. Luz Patricia Castro Félix		20c May 2012

Vo. [Handwritten signature] B^o 1/10

SEDE

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Biomarcadores Moleculares y Genética Molecular del Centro de Investigación en Genética Molecular y en los laboratorios de Inmunobiología y Microbiología del Instituto de Fisiología del Departamento de Biología Celular y Molecular del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Guadalajara, bajo la dirección de la Dra. Martha Cecilia Téllez Bañuelos y asesorías de la Dra. Galina P. Zaitseva y el M. en C. Eduardo Juárez Carrillo

El presente trabajo forma parte de los productos de un proyecto de investigación financiado por el Consejo Estatal de Ciencia y Tecnología de Jalisco-Universidad de Guadalajara (COECYTJAL-UDG) con clave 25-2008-609, titulado "Extensión de servicios de la Universidad de Guadalajara al Sector Acuícola de Jalisco: estudio integral del efecto de dietas a base de aceite vegetal y probióticos sobre la productividad y biología de la tilapia y del bagre de crianza en Jalisco". Además se contó con el apoyo del programa P3E de la Universidad de Guadalajara.

DEDICATORIA

A mi padre y a mi madre,
Por el amor y apoyo que siempre me han dado.

A mis maestros,
Por su invaluable guía.

INDICE

	Página
RESUMEN	viii
INTRODUCCIÓN	ix
ANTECEDENTES	1
La tilapia del Nilo	1
El bagre del canal	3
Producción pesquera	4
Alimentación de los peces de granja	5
Aceite de pescado	6
Modificación de la dieta	7
La soya	8
Análisis costo beneficio	9
Enfermedades en peces de crianza	10
Inmunidad de peces	12
Probiótico	14
Probióticos y sistema inmune	17
Explosión respiratoria	18
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	21
JUSTIFICACIÓN	22
HIPOTESIS	23
OBJETIVO GENERAL	24
OBJETIVOS PARTICULARES	25
MATERIALES Y MÉTODOS	26
RESULTADOS	33
DISCUSIÓN	37
CONCLUSIÓN	41
BIBLIOGRAFÍA	42

INDICE DE FIGURAS

Figura 1- Tilapia del Nilo	1
Figura 2- Bagre de canal	3
Figura 3- La soya <i>Glycine max</i>	8
Figura 4- Comparación de valor en dólares USD por tonelada de los aceites de pescado y soja en Alemania y los países bajos desde el año 1986 hasta el año 2010.	10
Figura 5- Membrana plasmática activada en fagocitos	20
Figura 6- Niveles basales de ROS producidas por macrófagos esplénicos de tilapia del Nilo.	33
Figura 7- Niveles basales de ROS producidas por macrófagos esplénicos de bagre de canal.	34
Figura 8- Efecto de la dieta en la producción de ROS en esplenocitos de tilapia por reducción de NBT.	35
Figura 9- Efecto de la dieta en la producción de ROS en esplenocitos de bagre por reducción de NBT.	36

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1: Tabla de alimentación para la tilapia ofrecidas por Purina.	6
Cuadro 2: Dietas experimentales.	27
Cuadro 3: Fórmula del probiótico bacterol shrimp forte.	28

RESUMEN

El pescado ofrece una alternativa alimenticia de gran valor nutricional y la acuicultura representa el sector de la producción de alimento de mayor crecimiento a nivel mundial. En Jalisco las especies dulceacuícolas más cultivadas son el bagre de canal (*Ictalurus punctatus*) y la tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*).

En el presente trabajo se alimentó a tilapias y bagres con dietas alternativas a base de aceite de soya y un probiótico comercial y se determinó la actividad microbicida de los macrófagos al medir los niveles de producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) como indicador de la respuesta inmune innata. Los datos experimentales indicaron que la sustitución de aceite en la dieta de la tilapia y del bagre no modificó los niveles de ROS. Sin embargo, el alimento a base de aceite de soya suplementado con probiótico disminuyó la producción de ROS en la tilapia pero no en bagre.

En conclusión, la dieta formulada con aceite de soya puede ser una alternativa para los acuicultores ya que no compromete la salud de tilapia del Nilo y bagre de canal. Además se sugiere continuar con la investigación al respecto de la dosificación del probiótico utilizado o seguir con búsqueda de otros probióticos diseñados para el cultivo de peces teleósteos dulceacuícolas.

INTRODUCCIÓN

La acuicultura ofrece una alternativa alimenticia de gran valor nutricional y representa el sector de la producción de alimento de mayor crecimiento, con una expansión de 6.6% medio anual en los últimos 40 años a nivel mundial. Sin embargo, el abasto de aceite de pescado, ingrediente básico en los alimentos balanceados (también llamados piensos) de los peces de cultivo, ha llegado a su límite y como consecuencia el valor de este insumo se ha incrementado; el uso de una fuente de aceites alternativa, como es el aceite de soya, para la formulación de estos alimentos podría reducir los costos de operación de las granjas acuícolas.

Existe el riesgo de que al sustituir el aceite de pescado por aceite de soya, se altere la salud del pez, reduciendo la productividad. Además, las condiciones de sistemas acuícolas de producción intensiva propician cuadros infecciosos, situación que solía controlarse con el uso de antibióticos, pero esta práctica puede generar patógenos resistentes a estas sustancias. Por lo que el uso de probióticos en la acuicultura ha tomado auge como medida preventiva contra los cuadros infecciosos, debido a que fortalece el sistema inmune de los peces. El presente trabajo evaluó el efecto de la dieta formulada con aceite de soya y probiótico sobre la actividad microbicida de los macrófagos esplénicos en tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) y bagre de canal (*Ictalurus punctatus*).

ANTECEDENTES

La tilapia del Nilo, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758)

Los restos fósiles mas antiguos de la tilapia datan de hace 18 millones de años y fueron encontrados en África Oriental, de donde es originaria (Camacho-Berthely, et al., 2000). El cultivo de la tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) puede rastrearse en tiempos egipcios como lo indican los bajo-relieves de una tumba de hace más de 4,000 años (FAO, 2011A).



Figura 1: Tilapia del Nilo, *O. niloticus* (FAO, 2011-B)

La tilapia del Nilo pertenece al género *Oreochromis* de la familia Cichlidae; este género es el cual a nivel mundial se denomina generalmente "tilapias". El nombre "tilapia" proviene de un vocablo africano que significa "pez" y se pronuncia "tula peu" derivado de la palabra "Thlapi" en el idioma "Swahili" de la población indígena

que habita a las orillas del lago Ngami (África), tiene numerosos nombre comunes como perca (perch), Saint Meter fish, bream, Cherry snapper, Nile perch, blanco del nilo, pargo rojo de agua dulce, mojarra y mojarra Lora entre otros (Zaitseva y León-Sánchez, 2006). Existen cinco variedades de tilapia de importancia económica en la acuicultura, distribuidas en tres especies: *Oreochromis mossambicus* (Peters, 1852), *Oreochromis aureus* (Steindachner, 1864), *Oreochromis niloticus* *Egyptia* (L., 1758) y dos híbridos *O. niloticus* *Rocky Mountain* (cruza de *O. niloticus* y *O. aureus*) y *O. niloticus* *Stirling* (cruza de *O. niloticus* y *O. mossambicus*) (Casas-Solís *et al.*, 2007).

En 1964 se introdujeron a nuestro país diferentes especies de tilapia (*Tilapia melanopleura*, *Tilapia aurea* y *Tilapia mossambica*), con crías procedentes del estado de Alabama, E.U.A., las cuales fueron llevadas al actual Centro Acuícola de Temazcal en el estado de Oaxaca. En 1978 se importó de Panamá un gran lote de ejemplares de *O. niloticus* que fueron depositados en este mismo Centro. En 1981 en México se intensificó la acuicultura, fomentándose el cultivo de 4 especies: tilapia, bagre, carpa y trucha. A partir de este periodo se superó la etapa de la piscicultura de siembra y propagación en aguas dulces y se comenzó a desarrollar una acuicultura intensiva en estanques. En 1986 nuevamente se importó un lote de *O. niloticus*, incluyendo algunos ejemplares de la variedad híbrido rojo, donados por la Universidad de Stirling, Escocia. La Secretaría de Pesca se encargó de suministrar estos peces en sus centros acuícolas; donde posteriormente fueron distribuidos en todo el territorio nacional (Camacho-Berthely, *et al.*, 2000).

El bagre de canal, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque, 1818).

El bagre de canal (figura 2) pertenece al género *Ictalurus*, de la familia Ictaluridae; tiene una amplia distribución geográfica, desde Canadá hasta la parte Norte de México. En el estado de Jalisco se reporta la presencia de peces del genero *Ictalurus* en registros fósiles desde el pleistoceno medio. Las especies nativas son el bagre de balsas *Ictalurus balsanus* (Jordan y Snyder 1899), el bagre de chapala *Ictalurus ochoterenai* (de Buen 1946) y el bagre del Lerma *I. dugesii* (Bean, 1880). Para fines de siglo XIX había gran actividad pesquera en el lago de Chapala, el bagre que se pescaba de abril a julio se utilizaba tanto para alimentación como para extraer aceite, que en la medicina de la región suplió al aceite de hígado de bacalao (Ortiz-Segura, 2001).

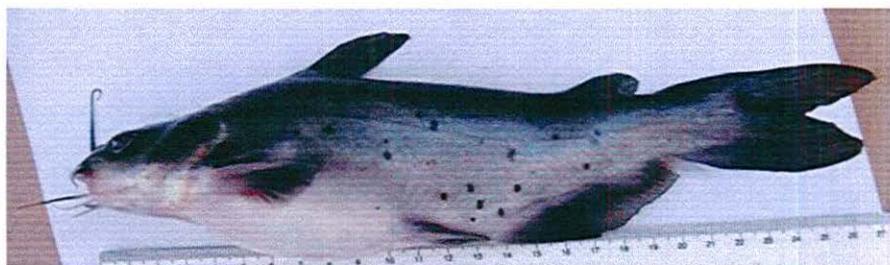


Figura 2: Bagre de canal, *Ictalurus punctatus*

México es uno de los principales países productores de bagre a nivel mundial (FAO, 2011B), su cultivo se ha extendido en diversas regiones del país. Este pez es una de las siete principales especies cultivadas en Jalisco, en 2009 la producción fue de 130 toneladas de bagre en peso vivo (CONAPESCA, 2010). Su consumo es muy apreciado en ríos y lagos en particular en las zonas lacustres del Estado (Chapala y Sayula) donde reemplazó al bagre nativo (Guzmán-Arroyo y Lyons, 2003).

Producción pesquera

Los sistemas de acuicultura intensiva moderna son en muchas maneras comparables a los sistemas intensivos de producción de animales terrestres ya que los dos dependen de un mercado global para proveer los insumos, por ejemplo, actualmente el 40% de la producción de la acuicultura depende de alimentos industriales (dietas balanceadas) que en su gran mayoría provienen de especies marinas (Deutsch, 2007).

En 2008 la pesca de captura y la acuicultura suministraron al mundo unos 142 millones de toneladas de pescado. De ellos, 115 millones se destinaron al consumo humano y proporcionaron un suministro per cápita aproximado de 17.8 kg (equivalente en peso vivo), lo cual constituye un máximo histórico. En este mismo año, la acuicultura generó el 46% del suministro total de pescado comestible, creció más rápido que cualquier otro sector de producción de alimentos de origen animal y a mayor ritmo que la población mundial, con un incremento del suministro acuícola per cápita desde 0.7 kg en 1970 hasta 17.8 kg, lo que representó un crecimiento medio anual del 6.6 %; por lo que se espera que supere a la pesca de captura como fuente de pescado comestible. La región de América Latina y el Caribe presentaron el mayor crecimiento medio anual en el período 1970-2008 (21.1 %), seguida por el Cercano Oriente (14.1 %) y África (12.6 %) (FAO, 2010).

En México el total de producción acuícola en el 2009 fue de 280,699 toneladas, de los cuales se destaca la producción de tilapia con 70,176 toneladas y de bagre con 3,057 toneladas, lo cual representa respectivamente el 25 % y el 1.08 % del volumen de producción pesquera acuícola a nivel nacional. En este mismo año Jalisco reporta 12,086 toneladas de producción pesquera, de los cuales el 66.7% son tilapia y el 1.07% son bagres (CONAPESCA, 2010).

Alimentación de los peces de granja

La alimentación es el gasto que más agrava los costos de producción de todos los animales de granja, representando del 50 al 85 % de los mismos. En producción acuícola la alimentación puede ser natural o artificial; la primera es a base de plancton el cual puede ser promovido con fertilizantes; en el caso de la artificial, se trata de una alimentación balanceada proporcionada acorde a la especie y etapa productiva a través de alimento peletizado o extruido. En los sistemas intensivos, los peces dependen del alimento balanceado y muy poco de la productividad del agua (Zaitseva y León-Sánchez, 2006). El crecimiento del pez, la conversión alimenticia y la composición corporal son generalmente afectados por la especie, raza, sexo y fase del ciclo reproductor que suponen diferentes necesidades nutricionales. Por lo que todos los tipos de dietas de peces formuladas deben satisfacer las necesidades nutritivas en términos de proteínas (aminoácidos: AA), lípidos (ácidos grasos: AG), carbohidratos (energía), vitaminas y minerales (Watanabe, 1999).

Las casas comerciales como Purina[®], Alimentos Super[®], Anderson Clayton[®] proporcionan alimentos balanceados de acuerdo a las necesidades nutricionales en cada fase de desarrollo donde varían las proporciones de proteínas, grasa y fibra. En el cuadro 1 se muestran las opciones comerciales que proporciona Purina[®] para el cultivo de la tilapia, diseñadas para las diferentes etapas de crecimiento del pez.

Cuadro 1: Tabla de alimentación para la tilapia por Purina (Cargill, 2012)

PRODUCTO	CARACTERÍSTICAS		USOS
	PROTEÍNA (%)	GRASA (%)	RANGO DE PESO (g)
Nutripec 4510 H	45	10	< 4
Nutripec 4510 A	45	10	4 a 8
Nutripec 4415 0.8 mm	44	15	4 a 8
Nutripec 4415 C	44	15	8 a 30
Nutripec 4009 L	40	09	30 a 60
Nutripec 3508	35	08	60 a 150
Nutripec 3206 AP	32	06	150 a 250
Nutripec 3006	30	06	150 a 250
Nutripec 2506 AP	25	06	> 250
Nutripec 3206 R *	32	06	> 250

*Nota: Alimentar únicamente para reproductores.

Aceites de pescado

Los aceites de pescado son la base para la formulación de los alimentos para el sector acuícola, debido a que constituyen la fuente más común de ácidos grasos (AG) poli-insaturados de cadena larga (PUFA) (Tacon, 2004) entre ellos, destacan: el ácido docosahexaenoico (DHA, 22:6n-3), el ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:5n-3) y el ácido araquidónico (ARA:20:4n-6) los cuales juegan papeles funcionales importantes en peces, comparables a los descritos para vertebrados (Izquierdo, 2005). A nivel internacional, todo un sector industrial está dedicado a la producción de aceites de pescado a partir de especies marinas (sardinas, anchovetas y anguilas principalmente) y una cantidad impresionante de peces se captura para abastecer a las granjas acuícolas del mundo (Tacon, 2004). El porcentaje de aceite de pescado destinado a la acuicultura es mayor que el de la harina de pescado. En 2009, cerca del 85% de la producción mundial de aceite de pescado se usó como ingrediente en los alimentos para la acuicultura (FAO,

2010). Sin embargo, el desabasto de estos aceites será pronto un factor limitante para el desarrollo de la industria por lo que una producción acuícola sostenible debe de incluir un cambio en la formulación del alimento comercial de los peces de granja a través del reemplazo parcial o total de los aceites de pescado por aceites de otro origen (Tacon *et al.*, 2006).

En especies carnívoras se ha logrado reemplazar hasta el 75% de la harina de pescado por proteínas alternativas (principalmente provenientes de plantas terrestres) y se determinó además que el uso de harina de pescado en el cultivo de especies tanto omnívoras como herbívoras era innecesario. La sustitución de aceite de pescado representa un reto más complicado, ya que los AG omega3 HUFA (ácidos grasos altamente insaturados; EPA y DHA) presentes en el aceite de pescado no están disponibles en ninguna otra fuente comercial que no sea el aceite de pescado (Bostock *et al.*, 2010).

Modificación de la dieta

El rápido desarrollo del sector acuícola ha incrementado la demanda por los componentes que entran en la composición del alimento comercial para peces de crianza y los precios de la harina y aceites de pescado necesarios para su formulación se han elevado (Naylor *et al.*, 2009). Por ejemplo, el suministro de harina y aceite de pescado se había mantenido relativamente constante durante 20 años (1985-2005) 5 a 6 y 1 millón de toneladas por año, respectivamente, sin embargo, en 2008 aproximadamente el 90% del aceite de pescado y el 71% de la harina de pescado disponibles en el mercado mundial fueron consumidos por el sector acuícola, la oferta superó a la demanda y el costo de los alimentos para el sector acuícola aumentó drásticamente (Bostock *et al.*, 2010). De la misma manera, entre 2006 y 2008 los precios del aceite de pescado se duplicaron a 1,800 USD por tonelada, y superaron los del aceite vegetal. Las alternativas al uso de aceite de pescado son por ejemplo el uso de suplementos a base de proteínas provenientes de especies animales terrestres, pero, algunas regulaciones no permiten su incorporación en la formulación de alimentos balanceados para

especies acuáticas, debido al riesgo de transmisión de enfermedades como es el caso de la encefalopatía spongiforme bovina (BSE, por sus siglas en inglés), por lo cual el material vegetal (semillas), rico en proteínas y lípidos, es una alternativa (Delgado *et al.*, 2003). En la última década se ha observado la incorporación de aceites de plantas terrestres tales como canola, soya, aceite de palma, para sustituir total o parcialmente el uso de aceites de pescado en la formulación de alimentos para peces. Una ventaja de los aceites de plantas terrestres es que se pueden producir en cantidades suficientes para satisfacer la demanda creciente de la acuicultura (Naylor *et al.*, 2009).

Generalidades de la soya, *Glycine max* ((L.) Merrill, 1917))

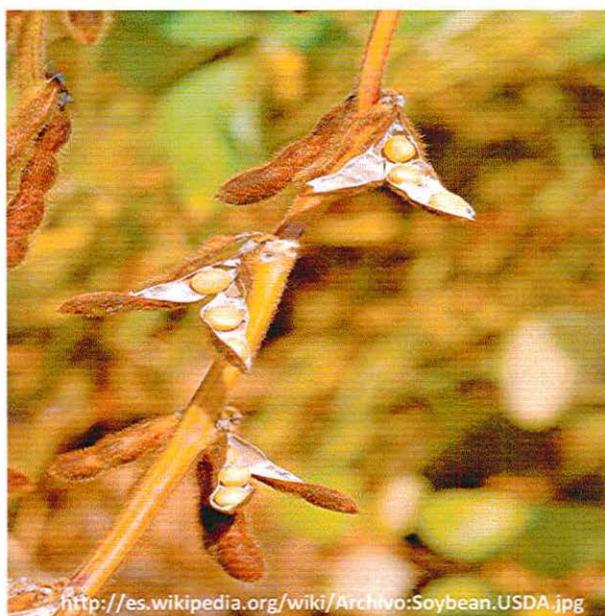


Figura 3: Soya *Glycine max* (L.) Merrill, 1917.

El origen del cultivo de la soya se remonta a más de 4,000 años en China, y en la actualidad su cultivo se practica alrededor del mundo. En el 2007 la producción de

soya mundial fue alrededor de 223 millones de toneladas; el cual representa aproximadamente el 60% de la proteína vegetal y el 30% del aceite vegetal producido en el mundo. A nivel mundial la soya es una de las fuentes más importantes de proteína, aceite y fitoquímicos utilizados en la nutrición humana y en la elaboración de alimento balanceado para la industria pecuaria (Ali, 2010).

Para producir aceite de soya, la semilla se rompe, se clasifica según su contenido de humedad, después se prensa para formar hojuelas y se extrae el aceite con solventes comerciales como el hexano. El aceite se refina y en ocasiones es hidrogenado (Raghuvanshi y Bisht, 2010). En promedio, el grano seco contiene 40% de proteína y 20% de aceite (el cual está compuesto aproximadamente por 48-58% de ácido linoleico (18:2n-6), 4-10% de ácido α -linolenico (18:3n-3), 19-30% de ácido oleico (18:1n-9), 7-10% de ácido palmítico (16:0), 2-5% de ácido esteárico y menos del 0.5% de ácido palmitoleico (Brown y Hart, 2011); además contiene vitamina E (aun después del proceso de extracción de aceite), el cual es un antioxidante natural que ayuda a conservar el aceite (Raghuvanshi y Bisht, 2010).

A la fecha el aceite de soya no presenta la tendencia mundial de insuficiencia en su producción y su costo no ha incrementado tan rápidamente como el de pescado (Brown y Hart, 2011). Estos aspectos, hacen del aceite de soya un excelente candidato para sustituir al aceite de pescado ya que mantiene un bajo costo, y una composición nutricional adecuada.

Análisis costo beneficio

La sustitución parcial o total del aceite de pescado por aceite de soya es una opción atractiva para el sector acuícola que permitirá a los productores reducir los costos de producción, ya que es un producto de gran valor nutritivo (rico en AG n-6), con disponibilidad global que mantiene precios competitivos (Brown y Hart, 2011)

En la figura 4 se comparan los precios de los aceites de pescado y de soja; se observa que aun si los precios de ambos aceites han aumentado en los últimos años, el precio del aceite de soja es menor que el de pescado. Por ejemplo en el año 2010 el aceite de pescado costaba 1200 USD por tonelada, mientras que el aceite de soja costaba 900 USD por tonelada.



Figura 4: Comparación de valor en dólares USD por tonelada de los aceites de pescado y soja en Alemania y los países bajos desde el año 1986 hasta el año 2010. (FAO, 2010).

Enfermedades en peces de crianza

Como en todos los sistemas de producción animal, las enfermedades suponen una considerable limitación de la producción, desarrollo y expansión de la industria acuícola (Southgate, 2000), por ejemplo, la escala de mortalidad en ciertas infecciones víricas o bacterianas puede alcanzar el 30% o más al cabo de pocos días (Shepherd, 1999).

En las condiciones estresantes de las granjas acuícolas, se pueden presentar cuadros infecciosos (Das, et al., 2008). Las enfermedades pueden dividirse globalmente en dos categorías: no infecciosas e infecciosas. Las enfermedades no infecciosas incluyen el efecto directo de todos los factores del ambiente en la salud del pez. Pueden desencadenarse brotes de enfermedades infecciosas debido a situaciones ambientales adversas, que incluyen cualquier estrés que afecte al pez por cambios en el medio físico o por la manipulación, clasificación, hacinamiento e incluso la administración de los alimentos a estos organismos. De los factores ambientales directos se encuentran la temperatura, el pH, sólidos en suspensión, toxinas endógenas (amoníaco y nitrito), toxinas exógenas y enfermedades nutricionales como la desnutrición y la toxicidad de la dieta (Southgate, 2000).

La descripción de una enfermedad como "infecciosa" presupone la intervención en el proceso patológico de una o más especies de agentes infecciosos. Los agentes infecciosos pertenecen generalmente a uno de los cuatro grupos: bacterias, hongos, parásitos y virus (Shepherd, 1999)

Como en cualquier granja agrícola, la profilaxis se logra a través de una alimentación adecuada además de mantener la calidad del agua y evitar el estrés. Sin embargo, si el acuicultor se enfrenta con un cuadro infeccioso, tiene que aplicar medidas curativas, por lo que generalmente procede al uso de antibióticos. El prevenir y controlar brotes infecciosos ha llevado al uso excesivo de estas sustancias; practica no recomendada debido a la evolución de bacterias patógenas resistentes a antibióticos (Balcazar, 2003). En años recientes surge interés en el uso de probióticos que favorecen y estimulan el sistema inmune del pez y aumentan su resistencia a enfermedades, por ejemplo; se ha demostrado que suplementar el alimento de peces teleósteos de cultivo (cabrilla sardinera *Mycteroperca rosácea* y dorada *Sparus aurata*) con la levadura marina *Debaryomyces hansenii* (CBS 8339) estimula el sistema inmune innato (actividad peroxidasa, fagocitosis, citotoxicidad y explosión respiratoria en leucocitos del

rión anterior) y específico (inmunoglobulina M (IgM), hemoglobulina y proteína plasmática) (Tovar-Ramírez *et al.*, 2008).

Inmunidad de peces

El papel fundamental del sistema inmune es reconocer lo propio de lo no propio; discriminando las moléculas extrañas de la gran diversidad de patrones moleculares y complejidad intrínseca del hospedero. El mecanismo de reconocimiento de lo no propio es un prerrequisito inherente para la supervivencia de cualquier organismo, y se encuentra hasta en los organismos más simples como en micoplasmas, los cuales poseen enzimas de restricción que degradan ADN extraño (Belosevic *et al.*, 2009).

El sistema de defensa de los peces, al igual que en los vertebrados superiores, puede ser dividido en dos tipos:

La respuesta inmune innata, que se caracteriza por la capacidad de reconocer rasgos comunes a los patógenos más frecuentes sin necesidad de haber estado previamente expuestos a los mismos, está formada de componentes celulares: macrófagos, granulocitos, células eosinofílicas y las células citotóxicas no específicas (NCC, del inglés *non-specific cytotoxic cells*); y por componentes humorales: lisozima y proteasas, factores de complemento, proteína C reactiva, lectinas, interferones, eicosanoides, transferinas y péptidos como piscidinas (Rubio, 2010).

Y la respuesta inmune específica, el cual involucra la producción de anticuerpos a través de un reconocimiento específico del antígeno; los linfocitos, células T y B son responsables del reconocimiento específico de patógenos y de iniciar la respuesta inmune específica. Las células B se involucra en la respuesta inmune específica humoral y las células T en la respuesta inmune específica celular (Magnadottir, 2010).

Los peces son un grupo ampliamente divergente representado por aproximadamente 20,000 especies. Estudios filogenéticos indican una divergencia entre protostomos (anélidos, moluscos, artrópodos) y deuterostomos (equinodermos, tunicados, cordados) que tuvo lugar hace 500 a 600 millones de años y es a partir de este último grupo que se han desarrollado los peces en distintas direcciones. Los sistemas inmunitarios capaces de desarrollar respuesta inmunitarias adaptativa aparecieron con los peces cartilaginosos (clase Chondrichthyes) (Rubio, 2010) que presentan inmunoglobulinas y moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (Peregrina-Sandoval *et al.*, 2006), y con los peces óseos o teleósteos (clase Osteichthyes) (Rubio, 2010) (donde se encuentran tilapia y bagre) que además presentan el sistema complemento y la proteína C reactiva (Peregrina-Sandoval *et al.*, 2006). La respuesta inmune de los peces en general está bien desarrollada e integrada, y en teleósteos es donde se encuentran muchas similitudes funcionales con la respuesta observada en los vertebrados superiores, aunque presenta algunas diferencias en los órganos linfoides:

1) Timo, es un órgano par y homogéneo, responsable de la diferenciación y selección de los linfocitos T,

2) Riñón anterior, en el cual aparece un gran número de macrófagos y linfocitos B, tiene capacidad hematopoyética y por sus características funcionales y ultraestructurales se considera un análogo de la médula ósea en mamíferos,

3) Bazo tiene funciones similares a las del riñón anterior y no se encuentra una clara diferencia entre la pulpa blanca y roja de este órgano a diferencia del bazo de los vertebrados superiores. Opuesto a los mamíferos, los peces carecen de médula ósea y ganglios linfáticos (Téllez-Bañuelos, 2010).

Los peces en general dependen más de los mecanismos de defensa del sistema inmune innato que los vertebrados superiores (Denev, 2010). Las principales células del sistema inmune innato en los peces son los macrófagos y los neutrófilos (Magnadottir, 2010). Los macrófagos son fagocitos con núcleo grande que ocupa más de la mitad del volumen celular; tienen una participación

importante en la presentación antigénica y en cooperación celular forman una importante red de defensa inmunológica integral que neutraliza la invasión de patógenos y partículas materiales. Como en mamíferos, los fagocitos de peces interiorizan agentes extraños y normalmente los eliminan en un fenómeno denominado estallido respiratorio liberando compuestos citotóxicos reactivos de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés de reactive oxygen species) (Téllez-Bañuelos, 2010).

Probióticos:

La palabra probiótico proviene del griego “pro” a favor y “bios” vida, que significa a favor de la vida (Denev, 2009). El uso empírico de probióticos es tan viejo como los métodos prehistóricos de preservación de alimentos (Gatesoupe, 2000), sin embargo, el concepto de probióticos apareció por primera vez en el *Best-seller* del ganador del Premio Nobel Elie Metchnikoff “The prolongation of life” en 1907, en donde sostiene que los microorganismos presentes en alimentos fermentados contribuyen a la salud y bienestar de los humanos (Cross, 2002; Denev, 2009). El término de probiótico lo propuso por primera vez Werner-Koillath (1953), en oposición al término antibiótico, y lo definió como “Sustancias activas que son esenciales para el desarrollo sano de la vida” (Denev, 2009); Parker (1974) introdujo el término al contexto de la nutrición animal al referirlo como “organismos y sustancias que contribuyen al balance intestinal microbiano” basándose principalmente en observaciones de la variación de la flora intestinal ocasionada por factores de estrés como la temperatura, densidad de población, la alimentación artificial y el manejo, lo cual se refleja en pérdida de apetito, enfermedades y bajo crecimiento (Denev, 2009; Lara-Flores *et al.*, 2002; Tovar-Ramirez *et al.* 2008). La FAO (2001), definió a los probióticos como microorganismos vivos, que al ser suministrados en dosis adecuada, confieren un beneficio de salud al receptor, a través de su acción directa o indirecta sobre la modulación de la flora endógena así como sobre el sistema inmune del hospedero.

Tras ser administrados los probióticos son capaces de colonizar y multiplicarse en el tracto gastrointestinal del hospedero y proveer numerosos efectos benéficos al modular varios sistemas biológicos en el hospedero. La mayoría de los estudios desarrollados para comprobar los efectos favorables de los probióticos se han realizado en vertebrados terrestres, principalmente cerdos, pollos, ratas y humanos (Escobar-Briones *et al.*, 2006). Los primeros trabajos del uso de probióticos en alimentos para acuicultura los realizó Kozasa (1986) quien utilizó preparaciones comerciales diseñadas para organismos de crianza terrestres en anguila japonesa, reportando incremento en la tasa de sobrevivencia (Gatesoupe, 2000).

Al considerar el uso de probióticos en un sistema acuícola se debe tener en cuenta ciertos factores que son fundamentalmente diferentes de los probióticos usados en sistemas con animales terrestres, ya que los organismos acuáticos tienen una relación muy íntima con el ambiente exterior y este tiene un efecto mucho más directo a nivel de interacción entre la microbiota intestinal y el ambiente (Denev, 2009; Kesarcodi-Watson *et al.*, 2008). La primera historia exitosa en la selección de probióticos del medio acuático fue de Nogami y Maeda (1992), quienes aislaron una cepa bacteriana que reprime el crecimiento del *Vibrio spp.* patógeno, e incrementa la producción de la larva del cangrejo *Portunus trituberculatus* (Gatesoupe, 2000).

La manipulación de la flora gastrointestinal a través de dietas suplementadas con microbiota benéfica es una práctica relativamente nueva para el sector acuícola, no solo desde el punto de vista nutricional, sino también como una alternativa terapéutica para reducir los efectos adversos del uso excesivo de los antibióticos y fármacos (Cross, 2002; Denev, 2009). Tras ser administrados, los probióticos intestinales son capaces de colonizar y multiplicarse en el tracto gastrointestinal del hospedero y ejecutar numerosos efectos benéficos al modular varios sistemas biológicos en el hospedero (Nayak, 2010).

Existen básicamente dos tipos de probióticos en la acuicultura:

a) Probióticos intestinales, que pueden ser mezclados con el alimento y administrados vía oral para aumentar la flora benéfica del intestino (Sahu *et al.*, 2008), La flora intestinal juega un papel importante e influye de manera directa sobre la nutrición y la salud de los animales en general. Por lo que al alterarla se afecta el estatus fisiológico de los organismos incluyendo la inmunidad, el crecimiento, su desarrollo general y la calidad final del producto (Escobar-Briones, *et al.*, 2006)

b) Probióticos de agua, los cuales pueden proliferar en medio acuático y eliminar a bacterias patógenas al consumir los nutrientes disponibles con mayor eficiencia; fenómeno conocido como exclusión competitiva (Gatesoupe, 2000; Sahu *et al.*, 2008), También existe el uso de "probióticos", principalmente bacterias nitrificantes (Panigrahi y Azad, 2007), con la finalidad de mejorar la calidad del agua al utilizar microorganismos capaces de degradar y metabolizar contaminantes o desechos (Nayak, 2010; Tovar-Ramirez *et al.*, 2008; Das *et al.*, 2008). El uso de estas bacterias se considera en el concepto de biorremediación (Gatesoupe, 2000).

Dentro de los probióticos utilizados en la acuicultura se encuentran principalmente las bacterias productoras de ácido láctico y las levaduras (Panigrahi y Azad, 2007), estos últimos son hongos ubicuos diseminados por los animales, el aire y las corrientes de agua, por lo que pueden ser detectados en el tracto digestivo, tanto de peces silvestres como cultivados. Su presencia es considerada como incidental a pesar de que son muchos los géneros de levaduras que han sido detectados en peces sanos. A pesar de la gran diversidad de levaduras existentes en el tracto digestivo, solo dos especies han sido utilizadas como probióticos para peces: *Debaryomyces hansenii* y *Saccharomyces cerevisiae* y *S. cerevisiae* var. *Boulardii* (Tovar-Ramirez *et al.*, 2008).

Existen muchos microorganismos que han sido identificados como probióticos para el uso en prácticas acuícolas, muchos difieren considerablemente en el modo de acción por el cual confieren su beneficio al hospedero; no obstante, la mayoría de las cepas probióticas reportan los mismos mecanismos de acción:

- a) Mejoran la eficiencia de conversión alimenticia y la ganancia en peso vivo.
- b) Confieren protección contra patógenos a través de varios mecanismos, como la exclusión competitiva de los sitios de adhesión en la mucosa intestinal, producción de ácidos orgánicos y varios otros compuestos tales como antibióticos, bacteriocinas, sideroforos y lisosimas.
- c) Modulan el sistema inmune (Nayak, 2010; Sahu *et al.*, 2008; Panigrahi y Azad, 2007, Escobar-Briones *et al.*, 2006).

Estos mecanismos pueden presentarse de manera individual o en conjunto (Escobar-Briones *et al.*, 2006).

Se ha demostrado que las levaduras inducen inmunoestimulación debido a que proveen β -Glucanos y nucleótidos (Tovar-Ramirez *et al.*, 2008), y además producen compuestos inhibitorios (Das, *et al.*, 2008).

Probióticos y sistema inmune

Los probióticos modulan varios parámetros de la respuesta inmune innata así como la específica en teleósteos a través de varios mecanismos (Panigrahi y Azad, 2007; Nayak, 2010), que incluyen:

- 1 Estimulación de células secretoras de anticuerpos específicos.
- 2 Modificación de la producción de citoquinas (Panigrahi y Azad, 2007).
- 3 Aumento de la fagocitosis y la actividad microbicida en fagocitos (Nayak, 2010; Sahu *et al.*, 2008)

Los probióticos al interactuar con células inmunocompetentes tales como fagocitos mononucleares (monocitos y macrófagos), leucocitos polimorfonucleares (neutrófilos) y células citotóxicas naturales (NCC) estimulan la respuesta inmune innata en algunos peces (Nayak, 2010).

El estallido respiratorio de las células fagocíticas es un mecanismo innato de defensa importante en peces teleósteos, Nikoskelainen *et al.* (2003) demostraron que esta actividad se incrementaba significativamente en trucha arcoiris al administrar una cepa probiótica *Lactobacillus rhamnosus* (ATCC 53103).

Explosión respiratoria

El fenómeno de explosión respiratoria o también conocido como estallido respiratorio se observó por primera vez en 1933, principalmente en neutrófilos polimorfonucleares (PMN) de humanos, los cuales presentaban un incremento marcado en el consumo de oxígeno o "estallido respiratorio" durante la fagocitosis, pronto se estableció que este fenómeno era necesario para que los PMNs eliminen de manera eficiente las bacterias fagocitadas. Fue en 1967 cuando estos descubrimientos cobraron importancia, ya que se identificó la enfermedad granulomatosa crónica (CGD, del inglés *chronic granulomatous disease*) la cual se caracteriza por la ausencia de explosión respiratoria, baja capacidad bactericida y muerte como resultado de infecciones abrumadoras. (Sheppard *et al.*, 2005). Los defectos en la actividad de los fagocitos, sean cualitativos o cuantitativos, predispone a infecciones por ciertas bacterias y hongos (Muñoz y Alfaro, 2000)

El proceso de la fagocitosis en los teleósteos es muy similar al observado en los vertebrados superiores: incluye un reconocimiento, contacto, ingestión, procesamiento, eliminación y presentación del antígeno. Las células efectoras son los neutrófilos y los macrófagos; estos además colaboran con los linfocitos como células presentadoras de antígeno y como secretoras de citoquinas. La fagocitosis

se estimula mediante la opsonización; por ello, las lectinas, la proteína C reactiva, el complemento y los anticuerpos facilitan la internalización del antígeno a la célula inmunocompetente (Rubio-Godoy, 2010).

Las células fagocíticas, como los neutrófilos, monocitos y macrófagos logran destruir a los agentes infecciosos una vez formado el fagolisosoma, por la producción de compuestos tóxicos por medio de vías dependientes del oxígeno y vías independientes del oxígeno (Muñoz y Alfaro, 2000), siendo la primera la más importante (Rubio-Godoy, 2010). En las vías dependientes del oxígeno, la célula aumenta sus requerimientos de oxígeno (estallido respiratorio) para convertirlo enzimáticamente en metabolitos de alta toxicidad liberados directamente en la vacuola fagocítica (Muñoz y Alfaro, 2000). Como se muestra en la figura 5, durante este proceso la NADPH oxidasa de los fagocitos acepta un electrón del fosfato de nicotinamida adenina dinucleótido reducido (NADPH) y lo donan a oxígeno molecular al otro lado del fagolisosoma o del ambiente extracelular, generando el anión superóxido O_2^- , el cual puede ser convertido en otros compuestos citotóxicos, principalmente H_2O_2 .

La NADPH oxidasa está conformada por subunidades oxidantes llamadas phox (oxidasa de fagocitos, del inglés *phagocytic oxidase*) ubicados en la membrana plasmática y en el citoplasma. Los componentes de la membrana son gp91^{phox} y p22^{phox}, juntos forman el citocromo b₅₅₈, el cual es una flavohemoproteína. Al activarse la oxidasa, los componentes del citoplasma p47^{phox}, p67^{phox} y p22^{phox} se translocan a la membrana donde se unen al citocromo b₅₅₈. Rac2, Cdc42 y Rap1A son pequeñas proteínas con actividad GTPasa que se involucran en el ensamblaje y activación de la NADPH oxidasa (Sheppard *et al.*, 2005).

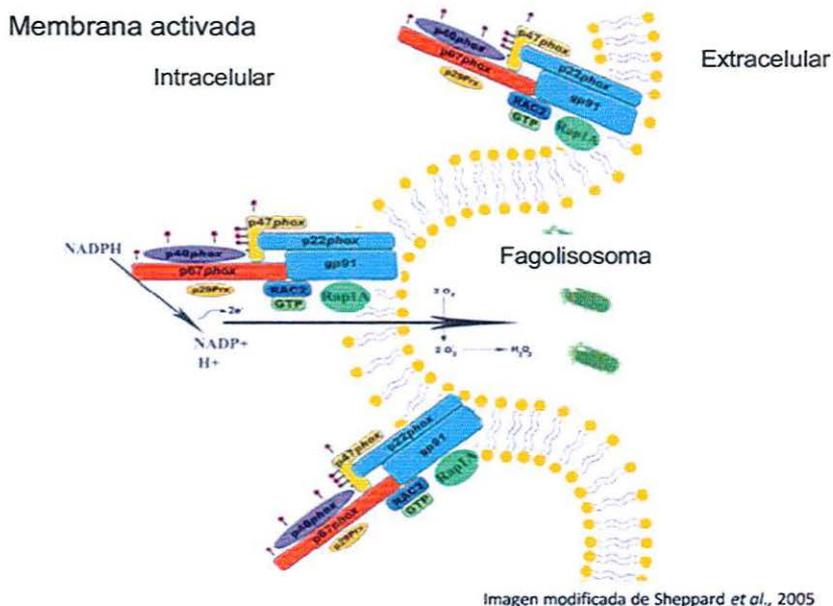


Imagen modificada de Sheppard *et al.*, 2005

Figura 5. Membrana plasmática activada en fagocitos. Los componentes oxidantes forman el complejo NADPH oxidasa el cual inicia actividad con la oxidación de la molécula NADPH a NADP y genera dos electrones, los cuales cruzan la membrana y producen O_2^- en un fagolisosoma (Imagen modificada de Sheppard *et al.*, 2005).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El desabasto de aceites de pescado es una limitante económica para el desarrollo de la acuicultura; por lo que se requieren propuestas para una producción sostenible donde se incluya un cambio en la formulación del alimento comercial de los peces de granja a través del reemplazo parcial o total de los aceites de pescado por aceites de origen vegetal.

Las malas prácticas de producción en sistemas intensivos y la falta de calidad del agua alteran la salud del pez, lo cual provoca altos porcentajes de mortalidad, baja la producción en las granjas y conllevan al uso excesivo de antibióticos que favorece la aparición de patógenos resistentes. La adición de probiótico a la dieta durante las etapas juveniles y de engorda podría fortalecer la respuesta inmune del pez, limitando la necesidad del uso de antibióticos.

En Jalisco no se cuenta con trabajos de investigación aplicada que ofrezcan dietas alternativas adaptadas a las necesidades de las granjas acuícolas, por lo que, se propone evaluar el efecto de una dieta alterna a base de aceite vegetal (soya) más un probiótico comercial (bacterol-shrimp forte), se utilizara como indicador la actividad microbicida de los macrófagos esplénicos a través de la medición de las especies reactivas de oxígeno (ROS) en dos peces importantes para la acuicultura de Jalisco: tilapia del Nilo y bagre de canal.

JUSTIFICACIÓN

Noventa y cinco por ciento del alimento que se consume durante la vida de un pez ocurre durante las etapas de juvenil y engorda. Sustituir en parte el aceite de pescado por fuentes alternativas en estas etapas, reducirá el costo del cultivo y la dependencia del sector acuícola por los alimentos comerciales clásicos de origen marino. Los peces de agua dulce más cultivados en Jalisco son tilapia y bagre. En granjas acuícolas de explotación intensiva donde los peces se exponen a condiciones de estrés surgen problemas relacionados con enfermedades y deterioro del ambiente. Prevenir y controlar esta situación ha llevado al uso excesivo de antibióticos. Esta práctica es controversial ya que promueve la resistencia de bacterias patógenas a antibióticos. En años recientes surge el interés en el uso de probióticos que favorecen y fortalecen el sistema inmune del pez y aumentan su resistencia a enfermedades, por lo que la evaluación integral del efecto de dietas alternativas a base de aceites de origen vegetal sobre parámetros productivos y biológicos de la tilapia y del bagre es necesaria antes de su transferencia y aplicación en granjas acuícolas en Jalisco. Los peces dependen más del sistema inmune innato que del sistema inmune adaptativo, siendo las principales células efectoras los macrófagos, estos eliminan a los patógenos principalmente a través del estallido respiratorio, produciendo grandes cantidades de especies reactivas de oxígeno (ROS); Medir los niveles de ROS nos permitirá determinar el efecto de las dietas experimentales sobre este parámetro tan importante del sistema inmune innato.

HIPÓTESIS

La dieta formulada con aceite de soya en tilapia del Nilo y bagre de canal no afecta la actividad microbicida de macrófagos esplénicos, en tanto en los alimentados con dieta comercial suplementado con probióticos incrementa el estallido respiratorio.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la dieta formulada con aceite de soya y probiótico sobre la actividad microbicida de los macrófagos esplénicos en tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) y en bagre de canal (*Ictalurus punctatus*)

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Medir la producción basal de ROS en macrófagos esplénicos de tilapia del Nilo.
- 2.- Medir la producción basal de ROS en macrófagos esplénicos de bagre de canal.
- 3.- Cuantificar la producción de ROS en macrófagos esplénicos de tilapia del Nilo alimentados con dieta control, dieta control suplementada con probiótico, dieta alternativa y dieta alternativa suplementada con probiótico.
- 4.- Cuantificar la producción de ROS en macrófagos esplénicos de bagre del canal alimentados con dieta control, dieta control suplementada con probiótico, dieta alternativa y dieta alternativa suplementada con probiótico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo de peces (Tilapia y Bagres)

Las tilapias y bagres fueron proporcionadas por la granja Aquamol S.C. de R.L. (ubicada en el Municipio de Ajijic, Jalisco). Los peces se cultivaron desde alevines durante 20 semanas en el invernadero del Laboratorio de Ecosistemas Marinos del Departamento de Ecología del CUCBA bajo los cuidados del Dr. Eduardo Juárez Carrillo. El experimento se realizó en un sistema cerrado con recirculación de agua formado por 12 tanques de 1000 L y uno de sedimentación, con filtro biológico. El sistema contó con ambiente controlado a 22°C, con foto periodo natural y el agua se mantuvo a una temperatura de 28°C.

Una vez terminado el periodo de aclimatación las dietas experimentales se distribuyeron de manera aleatoria entre los tanques con tres réplicas para cada una y se suministraron *ad libitum* tres veces al día durante 20 semanas.

Al término de las 20 semanas los organismos se sacrificaron con aceite esencial de clavo (Taylor y Roberts, 1999).

Formulación de dietas para peces

Las cuatro dietas utilizadas durante este estudio se maquilaron en una empresa jalisciense denominada Consorcio Super S.A., bajo la siguiente formulación:

Cuadro 2. Dietas experimentales

Dieta	Formula
(C), Dieta control	Alimento comercial con 32% de proteína cruda, 8% de lípidos de los cuales 2% son de pescado y 6% son de aceite de soya
(CP) Dieta comercial suplementada con probiótico	Alimento comercial suplementado con el probiótico bacterol-shrimp forte en razón de 1g/kg de alimento.
(S) Dieta alternativa	Dieta alternativa con 32% de proteína cruda y 8% de aceite de soya.
(SP) Dieta alternativa suplementada con probiótico	Dieta alternativa suplementada con el mismo probiótico, en razón de 1g/kg de alimento.

Probiótico

En este trabajo se utilizó el probiótico intestinal comercial "Bacterol-shrimp forte", el cual contiene una mezcla de *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus acidophilus* y *Bacillus spp.*

Cuadro 3. Formula del probiótico bacterol shrimp forte:

Ingrediente	Cantidad
Lactobacillus acidophilus	5×10^8 ufc/g
Bacillus spp.	5×10^8 ufc/g
Saccharomyces cerevisiae.	5×10^8 ufc/g
Proteasa	1,000 UI
Amilasa	1,000 UI
Celulasa	200 UI
Lipasa	200 UI
Pectinasa	200 UI
Vitamina A	2'200,000 UI
Vitamina E	1,650 UI
Vitamina B1	330 mg
Vitamina C	11,550 µg
Vitamina B12	15,400 µg
Biotina	16,500 µg

El probiótico bacteroi-shrimp forte esta diseñado para la producción acuícola y se encuentra disponible en el mercado jalisciense. Es fabricado por Dukay S.A., en Santiago de Chile, Chile y comercializado por la empresa Karakoram Ecuador S.A.

Calendarización de muestreos

En marzo del 2010 se muestreo 6 tilapias del Nilo alimentados con la dieta control para medir los niveles basales de ROS. En septiembre de 2010 se colectaron 7 tilapias del Nilo de 20 semanas de cada grupo alimentado con diferentes dietas, de los cuales se obtuvieron 17 muestras compuestas.

En septiembre del 2010 se muestreo 6 bagres de canal alimentados con la dieta control para medir los niveles basales de ROS. En Enero de 2011 se colectaron 11 bagres de canal de 20 semanas de cada grupo alimentado con diferentes dietas, de los cuales se obtuvieron 12 muestras compuestas.

Obtención de macrófagos esplénicos

Los peces (tilapia del Nilo y bagre de canal) se sacrificaron con aceite esencial de clavo. Con la finalidad de obtener suficiente esplenocitos para el ensayo, se prepararon acumulados de 2 o 3 bazos, de los cuales se obtuvieron las muestras compuestas. El acumulado de bazos se disgregó con una malla de nylon de 100µm en 4mL de solución buffer fosfato salina (PBS) 1X (Sigma Aldrich D-5652). Los macrófagos esplénicos se obtuvieron por separación en gradiente de densidad colocando 4mL de la suspensión celular y 4mL de Histopaque 1077 (Sigma Aldrich densidad: 1.007g/mL) en tubos cónicos de 15mL y se centrifugaron a 2,000 rpm durante 30 min. Las células inmunocompetentes se colectaron de la interfase y se lavaron con 10mL de PBS 1X en una segunda centrifugación durante 10 min a 2,000 rpm. Se resuspendió el botón celular en 1mL de medio de cultivo RPMI 1640 (Gibco No. Cat. 21870) suplementado con 10% de suero fetal bovino.

Conteo y viabilidad de macrófagos esplénicos

Se tomaron 10 μ L de suspensión celular en adición con 10 μ L de azul tripano (preparación 1:1) para posteriormente montar una alícuota de 10 μ L de la mezcla en una cámara de Neubauer (Optik Labor, Neubauer improved bright-line). Se observó al microscopio (Axiostar, Zeiss) a 40X y se contabilizaron los macrófagos esplénicos, los cuales se caracterizan por el tamaño de 20 μ m, con abundantes gránulos y núcleo abarcando más de la mitad del citoplasma, las células muertas se observaron teñidas de color azul oscuro. La concentración celular se determinó como el promedio de células viables (no teñidas) en los cuatro cuadrantes de la cámara de Neubauer $\times (10,000) \times (10) \div 1$ (volumen final).

Cultivo de *Aeromonas hydrophila*

Se reactivó la cepa de *Aeromonas hydrophila* (ATCC: 7966, Microbiologics CE, USA) resuspendiendo una muestra en agua destilada e incorporándola sobre una caja de petri con medio de cultivo agar soya tripticaseína (DIBICO, SA de CV). Se incubó el cultivo a 35°C durante 48 hrs, para después tomar con asa microbiológica una muestra del cultivo e inocular 4mL de caldo soya tripticaseína (DIBICO, SA de CV) contenido en tubos de vidrio, se incubó durante 24 hrs a 35°C. De este vial se tomaron alícuotas de 1mL para inocular 4 viales 24 hrs antes del experimento de ROS.

Obtención de suero autólogo

El suero para opsonizar debe ser autólogo. Se extrajo sangre (de tilapia del Nilo y de bagre de canal) por punción de la vena caudal. La sangre se depositó en microtubos; retirando los coágulos con una pinza estéril para después centrifugar a 3,000 rpm durante 10 min. El sobrenadante (que es el suero) se recuperó y almacenó a -80°C para su posterior uso en la opsonización de *Aeromonas hydrophila*.

Opsonización de *Aeromonas hydrophila*

Se contabilizó *Aeromonas hydrophila* con cámara Neubauer y estableció el volumen necesario para obtener 250'000,000. Se centrifugó a 2,000 rpm por 10 minutos y se decantó el sobrenadante, dejando únicamente el botón celular. Inmediatamente después se incorporaron 700µL de suero autólogo para opsonizar durante 1 hora.

Medición de los niveles basales de ROS en macrófagos esplénicos de tilapia del Nilo y bagre de canal.

Previo a la separación de los peces por grupos experimentales se realizó el protocolo de estallido respiratorio para establecer los valores basales de ROS. El diseño experimental fue: grupo blanco (NBT) al cual solo se le añadió el NBT; el grupo control (SIN AERO) contiene NBT y células inmunocompetentes sin *Aeromonas hydrophila*; y el grupo experimental (CON AERO) protocolo con NBT, macrófagos esplénicos y *A. hydrophila*.

Cuantificación de la producción de ROS en macrófagos esplénicos por reducción de NBT

Para medir la actividad microbicida que se desencadena por la estimulación de la membrana plasmática de los macrófagos durante la fagocitosis, se aplicó el protocolo originalmente descrito por Fátima y Ahmad (2000), con pequeñas modificaciones de Téllez-Bañuelos *et al.* (2009). Brevemente, por duplicado 1×10^6 macrófagos esplénicos se incorporaron en 500µL de PBS el cual contiene 0.1% de Nitroblue tetrazolium (NBT) (Sigma, N-6876) y 25×10^6 células de *Aeromonas hydrophila* opsonizadas con suero autólogo, en un volumen final de 60µL. La mezcla se incubó a temperatura ambiente en oscuridad y con agitación ocasional durante 2 hrs. Posteriormente se centrifugó (Hermle, Z200 M/H) a 3,000 rpm durante 5 min; la reacción se detuvo con 500µL de metanol al 70% y después

se centrifugó (Hermle, Z200 M/H) a 3,000 rpm durante 5 min, el metanol se decanto y el botón celular se secó a 60° C durante 5 min, en seguida se incorporaron 500µL de hidróxido de sodio 1M y se sonicó (Bransonic, Mod. 2510R-MTH) durante 15 min. Inmediatamente se incorporaron 480µL de dimetilsulfoxido (DMSO) (Sigma, D-5879) y se incubó durante 10 min a temperatura ambiente, después se centrifugo a 4,500 rpm por 5 min. El resultado es una solución homogénea azul, se pipetearon 300µL de esta solución por triplicado en placas de cultivo de 96 pozos (Costar 3596) y se tomó la lectura a 630nm en un Elisometro (Opsys MR, Dynex Technologies). Los niveles de ROS se reportan en A₆₃₀.

Análisis estadístico

Las medias ± ES se determinaron en cada grupo de estudio por experimento. Los datos fueron analizados por ANOVA una vía y prueba de Tukey (HSD), utilizando el software Statgraphics 5.1. Valores con $p < 0.05$ fueron considerados significativamente diferentes, entre grupos. Los resultados estadísticos de ROS se muestran en graficas de caja y bigotes, en donde los datos se separan en 4 áreas de frecuencias iguales, la caja muestra el 50% de los datos donde la línea horizontal de la caja muestra la media, la cruz dentro de la caja muestra la mediana, las líneas verticales se conocen como bigote, el bigote inferior se traza desde el cuartil inferior hasta el valor más bajo que se encuentre dentro de 1.5 veces el rango intercuartilico del cuartil inferior. El bigote superior se traza desde el cuartil superior hasta el valor mas alto que se encuentre dentro de 1.5 veces el rango intercuartilico del cuartil superior. Los grupos con diferencia significativa se muestran con un asterisco.

RESULTADOS

Niveles basales de ROS en tilapia del Nilo

En la figura 6 se observan los niveles basales de ROS producida por macrófagos esplénicos de tilapia del Nilo. El grupo control (SIN AERO) presentó una mínima producción de ROS ($A_{630} 0.044 \pm 0.009$), en tanto el grupo experimental (CON AERO) presentó un incremento significativo ($A_{630} 0.205 \pm 0.004$), con un nivel de confianza del 95% ($n=6$).

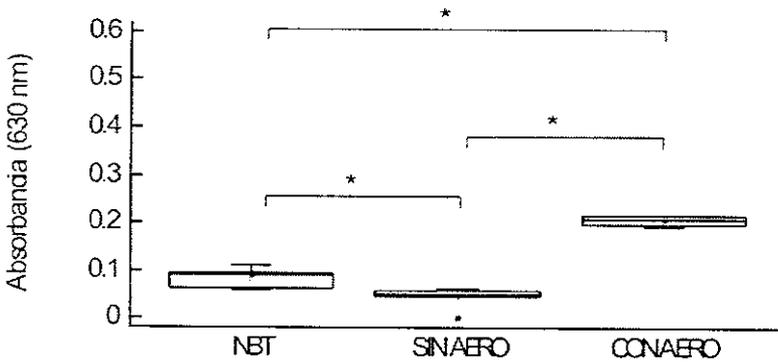


Figura 6. Niveles basales de ROS en macrófagos esplénicos de tilapia del Nilo.

Niveles basales de ROS en bagre de canal

En la figura 7 se observan los niveles basales de ROS producida por macrófagos esplénicos de bagre de canal. El grupo control (SIN AERO) presentó una producción de ROS ($A_{630} 0.11 \pm 0.001$), en tanto el grupo experimental (CON AERO) presentó un incremento significativo ($A_{630} 0.121 \pm 0.002$), con un nivel de confianza del 95%. (n=6).

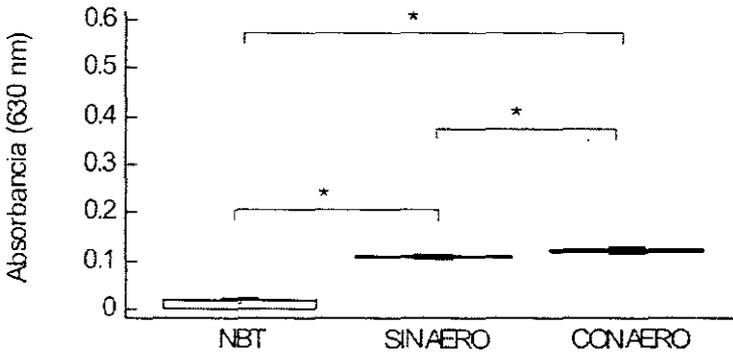


Figura 7. Niveles basales de ROS producidas por macrófagos esplénicos de bagre de canal.

Efecto de la dieta en la producción de ROS por macrófagos esplénicos de tilapia del Nilo

Durante el ensayo se valoraron cuatro dietas en tilapia del Nilo durante 20 semanas reportando una producción de ROS en esplenocitos para el grupo C de ($A_{630}0.268 \pm 0.32$); CP ($A_{630}0.250 \pm 0.037$); S ($A_{630}0.336 \pm 0.047$); y SP ($A_{630}0.219 \pm 0.027$). Con un nivel de confianza del 95% la prueba de Tukey muestra diferencia estadística entre el grupo C con el grupo SP.

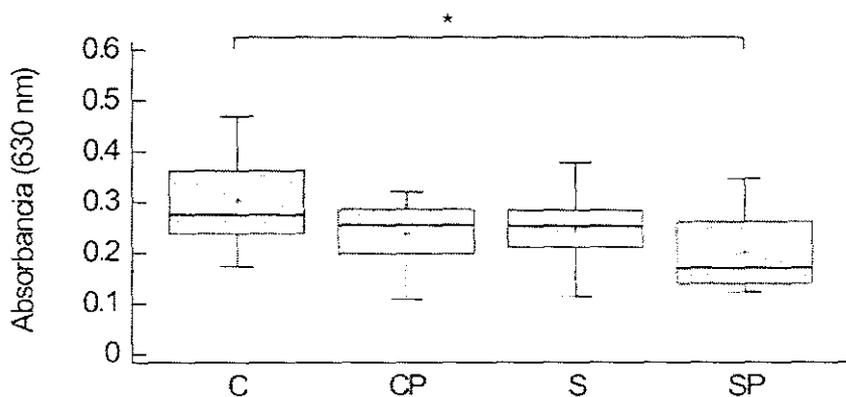


Figura 8. Efecto de la dieta sobre la producción de ROS por reducción de NBT en esplenocitos de tilapia del Nilo. C, dieta control; CP, dieta comercial suplementada con probiótico; S, dieta alternativa a base de aceite de soja; SP, dieta alternativa a base de aceite de soja con probiótico (n= 16).

Efecto de la dieta en la producción de ROS por macrófagos esplénicos de bagre de canal

Durante el ensayo se valoraron cuatro dietas en bagre de canal durante 20 semanas reportando una producción de ROS en esplenocitos para el grupo C de (0.268 ± 0.32); CP (0.250 ± 0.037); S (0.336 ± 0.047); y SP (0.219 ± 0.027). Con un nivel de confianza del 95% la prueba de ANOVA de una vía no mostró diferencias significativas entre grupos.

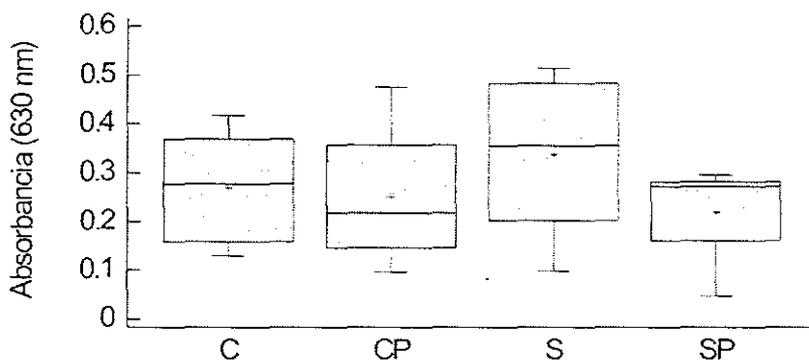


Figura 9. Efecto de diferentes dietas sobre la producción de ROS en esplenocitos de bagre de canal. C, dieta control; CP, dieta comercial suplementada con probiótico; S, dieta alternativa a base de aceite de soya; SP, dieta alternativa a base de aceite de soya con probiótico (n= 12).

DISCUSIÓN

Un alimento a base de aceite de soya que sustituya completamente el aceite de pescado para el cultivo de peces disminuye los costos de producción. Sin embargo, el cambio de dieta puede alterar la inmunidad y en consecuencia la salud de los peces cultivados, por lo que en el presente trabajo se evaluó el efecto de dietas alternativas con aceite de soya y un probiótico comercial sobre la producción de ROS que refleja la actividad microbicida de los macrófagos como biomarcador de la respuesta inmune innata de los peces.

Los niveles basales de ROS fueron evaluados antes de iniciar el experimento, cuando los peces eran alimentados con la dieta comercial. Los macrófagos expuestos a *Aeromonas hydrophila* presentaron un incremento en la producción de ROS estadísticamente significativo comparado con las células sin exponer a la bacteria tanto en tilapia del Nilo como en bagre de canal; además los niveles basales de ROS mostraron un comportamiento uniforme entre muestras individuales de 6 peces en ambas especies, por lo que se consideró que el protocolo de ROS estaba puesto a punto en las condiciones del laboratorio.

Se observó en primer lugar que no existe diferencia significativa entre el grupo control (C) alimentado con dieta comercial convencional y el grupo alimentado con dieta a base de aceite de soya (S) tanto en tilapia del Nilo como en bagre de canal, por lo que el cambio de dieta comercial por la dieta alternativa de soya no afecta este importante parámetro inmunológico; lo cual era de esperar, ya que el aceite de soya es rico en AG n-6 (Brown y Hart, 2011) y al ser los organismos estudiados omnívoros de agua dulce, su sistema inmune es más sensible a una dieta con exceso de AG n-3 y no al exceso de AG n-6 (Montero e Izquierdo, 2011).

En relación a la adición del probiótico a la dieta se observó que no existe diferencia estadística al comparar la producción de ROS entre el grupo control (C) y el grupo alimentado con dieta comercial y probióticos (CP), tanto en tilapia del Nilo como en bagre de canal; aunque se observó un decremento significativo de la

producción de ROS en el grupo de tilapia de Nilo alimentado con dieta de aceite de soya y probióticos (SP) comparado con el grupo alimentado con dieta a base de aceite de soya (S); en contraste, no se observó ninguna diferencia estadística entre los grupos S y SP de bagre de canal. El hecho de que el probiótico no tenga ningún efecto entre los grupos C y CP en ambas especies nos indica con seguridad que este probiótico en las dosis utilizadas no tiene ningún efecto sobre la producción de ROS, el cual puede ser explicado por la dosis misma; se sabe que el administrar dosis inadecuadas de probióticos puede alterar el resultado deseado (Vollstad *et al.*, 2006), en ocasiones el sistema inmune del pez puede responder al probiótico de manera dosis dependiente, entre mayor la dosis mayor será la respuesta inmune (Nayak, 2010). Sin embargo, en ocasiones una dosis alta no produce ningún efecto: Qinghui *et al.* (2007) cultivaron *Pseudosciaena crocea* suplementando con dos dosis de probióticos, una baja de 0.09% y una alta de 0.18% de la dieta, la dosis baja incremento la explosión respiratoria significativamente, mientras que la dosis alta no mostró diferencia. Es muy probable que se requiera ajustar la dosis apropiada para poder observar efectos positivos sobre la producción de ROS de los macrófagos de estos organismos.

El decremento observado en la producción de ROS en el grupo de tilapia de Nilo alimentado con dieta de aceite de soya y probióticos (SP) comparado con el grupo alimentado con dieta comercial (C), es un resultado controversial, ya que no se observa este comportamiento respecto a los grupos control con probiótico de ambas especies, por lo que debe de haber una relación entre utilizar un alimento a base de aceite de soya con el efecto de los probióticos en tilapia de Nilo. Una posible explicación puede ser lo encontrado en un estudio realizado por Esteban *et al.* (2011) en macrófagos humanos: Dectin-1 es una lectina de tipo C, el cual es un receptor en macrófagos de β -glucanos de la superficie de la pared celular de la mayoría de las levaduras como *Saccharomyces cerevisiae*. La activación de esta lectina estimula una respuesta celular de macrófagos *in vitro* (fagocitosis, explosión respiratoria y producción de citocinas proinflamatorias). Sin embargo, *in vivo* no se presenta esta respuesta celular si no existe unión entre β -1,2

oligomanosas (molécula expresada en la pared celular de algunos hongos patógenos) a galectin-3 (un receptor de reconocimiento de patógenos o PRR), de esta manera diferenciando hongos patogénicos de hongos no patogénicos. Es posible que hay un mecanismo similar en peces, en donde algún compuesto del aceite de soya actué en sinergia con los mecanismos de reconocimiento de patógenos de los macrófagos y no permita montar una adecuada respuesta.

La diferencia de comportamiento de este parámetro en grupos SP entre tilapia de Nilo y bagre de canal puede deberse a que el efecto de los probióticos puede ser afectado por la afinidad del probiótico al huésped, ya que estos son por lo general especie-específicos en cuanto a su modo de acción (Nayak, 2010).

Nuestros resultados respecto al efecto de diferentes dietas sobre la respuesta inmune de peces correlacionan con los resultados preliminares del laboratorio de ecosistemas marinos del CUCBA a cargo del M. en C. Eduardo Juárez Carrillo en donde no se encontró diferencia significativa de peso y longitud estándar tanto en tilapia del Nilo como en bagre de canal cultivados con dietas mencionadas (Horta-Fernández, Santerre y Juárez-Carrillo, 2011). En concordancia con lo anterior, también se han realizado otros estudios sin encontrar diferencias significativas al evaluar el crecimiento tanto de tilapia del Nilo (Gaber, 1996), Tilapia híbrida (*Oreochromis niloticus* x *O. aureus*) (Huang *et al*, 1998) y bagre de canal (Gatlin y Stickney, 1982) con dietas a base de aceite de soya, reemplazando así en su totalidad el aceite de pescado en el alimento (Brown y Hart, 2011).

Por todo lo anterior, tanto para la tilapia del Nilo como para el bagre del canal, se recomienda al acuicultor el cambio de dieta comercial a la dieta con base de aceite de soya que le permitirá disminuir en el gasto de alimentación sin que afecte el rendimiento del cultivo, ya que el 2% de ahorro del aceite de pescado representa un ahorro importante en costo de alimentación a nivel de una granja. En tilapia de Nilo cultivada con dieta a base de aceite de soya no se recomienda adicionar el probiótico comercial Bacterol Shrimp forte a una dosis de 1g/kg de alimento. Se sugiere continuar con la investigación al respecto de la dosificación de este

probiótico comercial o seguir con búsqueda de otros probióticos diseñados para el cultivo de peces teleósteos dulceacuícolas.

CONCLUSIONES

Se evaluó el efecto de la dieta formulada con aceite de soya y probiótico sobre la actividad microbicida de los macrófagos esplénicos en tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) y bagre de canal (*Ictalurus punctatus*)

- ❖ En macrófagos esplénicos de tilapia del Nilo
 - Se determinó el nivel basal de ROS bajo dieta comercial.
 - El alimento comercial en combinación con probiótico bacterol shrimp forte no afectó el estallido respiratorio.
 - La dieta a base aceite de soya no afecto la actividad microbicida.
 - El alimento a base de aceite de soya adicionado con probiótico bacterol shrimp forte disminuyó la actividad microbicida.

- ❖ En macrófagos de bagre de canal
 - Se determinó el nivel basal de ROS bajo dieta comercial.
 - El alimento comercial en combinación con probiótico bacterol shrimp forte no afectó el estallido respiratorio.
 - La dieta a base de aceite de soya no afectó la actividad microbicida.
 - El alimento comercial en combinación con probiótico bacterol shrimp forte no incrementó la actividad microbicida.

Por lo anterior consideramos que la dieta formulada con aceite de soya pude ser una alternativa para los acuicultores ya que no compromete la salud y estándares productivos para tilapia del Nilo y bagre de canal.

BIBLIOGRAFIA:

Ali, Nawab. 2010. Capitulo 16: Soybean processing and utilization. Pp. 345- 375.

En: Singh, Gurigbal (Ed.). 2010. The soybean: botany, production and uses. CAB International. UK. Pp 494.

Balcazar J. L. 2003. Evaluation of probiotic bacterial strains in *Litopenaeus vannamei*. Final Report, National Center for Marine and Aquaculture Research, Guayaquil, Ecuador

Belosevic, M.; G. Haddad; J. G. Walsh; L. Grayfer; B. A. Katzenback; P. C. Hanington; N. F. Neumann; Y J. L. Stafford. 2009. Innate immunity of fish: antimicrobial responses of fish macrophages. Pp. 145-184. En: Zacccone, G.; M. J. Manning; C. J. Secombes; B. G. Kapor. 2009. Fish defenses volume I: Immunology. Science publishers. USA. Vol.1..

Bostock, J.; B. Mcandrew; R. Richards; K. Jauncey; T. Telfer; K. Lorenzen; D. Little; L. Ross; N. Handisyde; I. Gatward Y R. Corner. 2010. Aquaculture: Global status and trends. Review. Philosophical Transactions of the Royal Society B. 365: 2897–2912.

Brown, P. B. y S. D. Hart. 2011. Capitulo 5 Soybean oil and other n-6 polyunsaturated fatty acid-rich vegetable oils. Pp. 133-150. En: Turchini, Giovanni M.; Wing-Keong Ng Y D. R. Tocher (Eds.). 2011. Fish oil replacement and alternative lipid sources in aquaculture feeds. CRC Press. USA. Pp. 522.

Camacho-Berthely, E; C. Luna-Romo; M. A. Moreno-Rodríguez. 2000. Guía para el cultivo de tilapia: *Oreochromis spp* (Gunter, 1984). México, D.F., Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales y Pesca.

Cargill. 2012. Tilapia clima cálido/ sistema de cultivo. Purina. En: https://www.nutrimientospurina.com/archivos_aplicaciones/files_fkceditor/image/Peces/Tilapia_calido2.jpg. (Consultado: 14 Septiembre 2011).

Casas-Solís, J; A. Santerre; M. I. Girón-Pérez; R. Reynoso-Orozco y G. Zaitseva. 2007. Brief communications: A comparative study of phagocytic activity and lymphoproliferative response in five varieties of tilapia *Oreochromis spp*. *Journal of Fish Biology* 71: 1541–1545.

CONAPESCA. 22 de octubre de 2010. Estadística pesquera y acuícola.

(Disponible en:

http://www.conapesca.sagarpa.gob.mx/wb/cona/cona_estadistica_pesquera_y_acuicola. Consultado el : 5 de abril de 2011.

Cross M.L. 2002. Microbes versus microbes: immune signals generated by probiotic lactobacilli and their role in protection against microbial pathogens. Minireview. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 34: 245-253.

Das S., Ward L.R., Burke C. 2008. Prospects of using marine Actinobacteria as probiotics in aquaculture. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 81:419-429.

Delgado, Christopher L; N. Wada; M. W. Rosengrant; S. Meijer; M. Ahmed. 2003. capítulo 6 Implications for fisheries: technology needs and prospects. En: Delgado, Christopher L; N. Wada; M. W. Rosengrant; S. Meijer; M. Ahmed. 2003. *Fish to 2020: Supply and demand in changing global markets*. Washington, D.C. International Food Policy Research Institute and WorldFish Center. Pp. 81-104.

Denev S. 2009. Microbial ecology of the gastrointestinal tract of fish and the potencial application of probiotics an prebiotics in finfish aquaculture. *International Aquatic Research*. 1: 1-29.

Deutsch, L. 2007. Feeding aquaculture growth through globalization: Exploitation of marine ecosystems for fishmeal. *Global Environmental Change*. 17: 238–249.

Escobar-Briones, L.; M. A. Olvera-Novoa; C. Puerto-Castillo. 2006. Avances sobre la ecología microbiana del tracto digestivo de la tilapia y sus potenciales implicaciones. En: Cruz-Suárez, L. E.; D. Ricque-Marie; M. Tapia-Salazar; M. G. Nieto-López; D. A. Villareal-Cavazos; A. C. Puello-Cruz; A. García-Ortega (Eds.). *Avances en nutrición acuícola VIII. VIII Simposium internacional de nutrición acuícola*. 15-17 Nov. Universidad autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, México.

Esteban, Alexandre; Maximilian W. Popp; Valmik K. Vyas; Karin Strijbis; Hidde L. Ploegh Y Gerald R. Fink. 2011. Fungal recognition is mediated by the association of dectin-1 and galectin-3 in macrophages. *Proceedings of the Nacional Academy of Sciences*. 108(34):14270-14275.

FAO. 2001. *Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria*. In the Joint FAO/WHO Expert Consultation report on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria (October 2001).

FAO. 2010. Informe SOFIA 2010. *El Estado Mundial De La Pesca Y La Acuicultura*. Roma. Food And Agriculture Organization Of The United Nations Fao.

FAO. 2011-A. Programa de información de especies acuáticas *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758). FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS FAO Departamento de pesca y acuicultura. (Disponible en: http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Oreochromis_niloticus/es. Consultado el: 5 de abril de 2011).

FAO. 2011-B. Programa de información de especies acuáticas *Ictalurus punctatus* (Rafinisque, 1818). FAO Departamento de pesca y acuicultura. (Disponible en: http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Ictalurus_punctatus/es. Consultado el: 5 de abril de 2011).

FAO. 2012. Perfiles sobre la pesca y la acuicultura por países: México. Departamento de pesca y acuicultura. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS FAO En: http://www.fao.org/fishery/countrysector/FI-CP_MX/3/es. (Consultado: 3 de Enero de 2012)

Fátima, M. y I. I. Ahmad. 2000. Pollutant-induced over-activation of phagocytes is concomitantly associated with peroxidative damage in fish tissues. *Aquatic Toxicology* 49(4): 243-250

Gaber, M. M. A. 1996. Effect of oil sources on growth, feed conversion and body composition of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Annals of Agricultural Sciences, Moshtohor* 34, 1549–1562.

Gatesoupe, F. J. 2000. Uso de probióticos en acuicultura. pp 463-472 En: Civera-Cerecedo, R.; C. J. Pérez-Estrada; D. Ricque-Marie; Y L. E. Cruz-Suárez (Eds.). Avances en Nutrición Acuícola IV. Memorias del IV Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. Noviembre 15-18, 1998. La Paz, B.C.S., México.

Gatfin, D.M. y R. R. Stickney. 1982. Fall-winter growth of young channel catfish in response to quantity and source of dietary lipid. Transactions of American Fisheries Society 111: 90-93.

Guzmán-Arroyo, M. y J. Lyons. 2003. Los peces de las aguas continentales del estado de Jalisco, México. Análisis Preliminar. e-Gnosis [online e] Vol. 1 Art.12

Horta-Fernández, J. L.; A. Santerre y E. Juárez-Carrillo. 2011. Resultados preliminares del uso de probióticos sobre el crecimiento de bagre de canal (*Ictalurus punctatus*, Rafinesque 1810). En: XXII Semana de la investigación científica y tecnológica. 2011. CUCBA. Universidad de Guadalajara.

Huang, C. H.; M. C. Huang; P. C. Hou. 1998. Effect of dietary lipids on fatty acid composition and lipid peroxidation in sarcoplasmic reticulum of hybrid tilapia, *Oreochromis niloticus* × *O. aureus*. Comparative Biochemistry Physiology 120B: 331-336.

Izquierdo, M. 2005. Essential fatty acid requirements in Mediterranean fish species. Cahiers Options Méditerranéennes, Volume 63: Mediterranean Fish Nutrition. Proceedings of the Workshop on Mediterranean Fish Nutrition, organized by the Mediterranean network on Aquaculture Nutrition, the Hellenic National Centre for Marine Research (HCMR) and the CIHEAM, IAMZ, with the contribution of Perseus Special Food Products S.A., Rho17des, Greece, 1-2 June 2002. Eds D. Montero, B. Basurco, I. Nengas, Alexis, M. Izquierdo. Zaragoza: CIHEAM/HCRM. 2005. 158 p.

Jonson M. 2000. Enfoque veterinario de la cría del pez gato. En: Brown, L. Acuicultura para veterinarios; producción y clínica de peces. España. Editorial Acribia. Pp. 259-281.

Kesarcodi-Watson, Aditya; Hinrich Kaspar; M. Josie Lategan Y Lewis Gibson. 2008. Probiotics in aquaculture: the need, principles and mechanisms of action and screening processes. Aquaculture. 274: 1-14.

Kozasa, M. (1986) Toyocerin (*Bacillus toyoi*) as growth promotor for animal feeding. Microbiologie-Aliments-Nutrition 4, 121-135.

Lara-Flores, Maurilio; Laura Escobar-Briones; Miguel A. Olvera-Novoa. 2002. Avances en la utilización de probióticos como promotores de crecimiento en tilapia nilotica (*Oreochromis niloticus*). . 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.

Magnadottir, B. 2010. Immunological Control of Fish Diseases. Marine Biotechnology 12: 361-379.

Montero, D. y M. Izquierdo. 2011. Capitulo 14: Welfare and health of fish fed vegetable oils as alternative lipid sources to fish. En: Turchini, Giovanni M.; Wing-Keong Ng Y D. R. Tocher (Eds.). 2011. Fish oil replacement and alternative lipid sources in aquaculture feeds. CRC Press. USA. Pp. 522.

Muñoz, Rodrigo; Wilbert Alfaro. 2000. Estandarización de la técnica de reducción del NBT mediante lectura en placas de microEIIISA. Revista Medica del Hospital Nacional de Niños. 35(12).

Nayak S.K. 2010. Probiotics and immunity: A fish perspective. Fish and Shellfish Immunology. 29: 2-14

Naylor, L. Rosamond; R. W. Hardy; D. P. Bureau; A. Chiu; M. Elliott; A. P. Farrell; I. Foster; D. M. Gatlin; R. J. Goldberg; K. Hua Y P. D. Nichols. 2009. Feeding aquaculture in an era of finite resources. Proceedings of the Nacional Academy of Sciences. 6 (36): 15103-15110.

Nikoskelainen, S; A. Ouwehand; G. Bylund; S. Salminen Y E. M. Lilius. 2003. Immune enhancement in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by potential probiotic bacteria (*Lactobacillus rhamnosus*). Fish and Shellfish Immunology. 15:443-452

Nogami, K. and Maeda, M. (1992) Bacteria as biocontrol agents for rearing larvae of the crab *Portunus trituberculatus*. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 49, 2373-2376.

Ortiz Segura, C. 2001. Todo tiempo pasado fue mejor, o la pesca en el lago de Chapala antes de la desecación de su ciénaga. Gazeta de Antropología. N. 17, artículo 26.

Panigrahi A. E I.S. Azad. 2007. Microbial intervention for better fish health in aquaculture: the Indian scenario. *Fish Physiol Biochem.* 33: 429-440.

Parker, R.B. 1974. Probiotics, the other half of the antibiotic story. *Animal Nutrition and Health* 29:4-8.

Peregrina-Sandoval, J.; J. Casas-Solis Y E. Flores-Toraies. 2006. El sistema inmune en peces. En: Zaitseva, G.P.; A. Santerre-Lucas; J. Casas-Solis; J. Peregrina-Sandoval; R. Leon-Sanchez. 2006. Tilapia aspectos biológicos y productivos. Universidad de Guadalajara. México.

Qinghui, A. ; Kangsen Mai; Lu Zhang; Beiping Tan; Wenbing Zhang; Wei Xu Y Huitao Li. 2007. Effects of dietary β -1, 3 glucan on innate immune response of large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea*. *Fish and Shellfish immunology.* 22(4): 394-402.

Raghuvanshi, Rita S. Y K. Bisht. 2010. Capitulo 18 Uses of soybean: Products and preparation. Pp. 404-427. En: Singh, Gurigbal (Ed.). 2010. The soybean: botany, production and uses. CAB International. UK. Pp 494.

Rubio-Godoy, M. 2010. Inmunología de los peces óseos. Revisión. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias.* 1(1):47-57.

Sahu, Maloy K; N. S. Swarnakumar; K. Sivakumar; T. Thangaradjou Y L. Kannan. 2008. Probiotics in aquaculture: importante and future perspectivas. *Indian Journal of Microbiology.* 48: 299-308.

Shepherd J. 1999. Capitulo 6 Salud y enfermedad en los peces. En: Shepherd, J; N. Bromage. 1999. Piscicultura intensiva. Zaragoza. Editorial Acribia. Pp. 195- 231

Sheppard, F. R.; M. R. Kelher; E. E. Moore; Nathan J. D. McLaughling; A. Banerjee; C. C. Silliman. 2005. Structural organization of the neutrophil NADPH oxidase: phosphorylation and translocation during priming and activation. *Journal of Leukocyte Biology*. Vol 78 (November). Pp. 1025- 1042.

Southgate P. 2000. Enfermedades en acuicultura. En: Brown, L. *Acuicultura para veterinarios; producción y clínica de peces*. España. Editorial Acribia. Pp. 95-136.

Tacon G. J. Albert; M. R. Hasan; R. P. Subasinghe. 2006. Use of fishery resources as feed inputs for aquaculture development: trends and policy implications. Rome. FAO Fisheries Circular No.1018. FAO. 99p.

Tacon, G. J. Albert. 2004. Use of fish meal and fish oil in aquaculture: a global perspective. *Aquatic Resources, Culture and Development* 1(1): 3–14.

Taylor, P. W.; S. D. Roberts. 1999. Clove oil: an alternative anesthetic for aquaculture. *North American Journal of Aquaculture*. 61(2):150-5.

Tellez-Bañuelos, M. C. 2010. Efecto del endosulfán *in vivo* en IL-2L sérica e IgM específica para *Aeromonas hydrophila*, e *in vitro* sobre la proliferación, expresión de ERK1/2, apoptosis y senescencia en esplenocitos de tilapia nilótica, Tesis de grado de maestría. Universidad de Guadalajara. Guadalajara, Jalisco, México.

Tellez-Bañuelos, M. C.; A. Santerre; J. Casas-Solis; A. Bravo-Cuellar Y G. Zaitseva. 2009 Oxidative stress in macrophages from spleen of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to sublethal concentration of endosulfan. *Fish and Shellfish Immunology*. 27:105–111.

Tovar-Ramirez, D.; M.C. Reyes-Becerril; L. Guzmán-Villanueva; V. Gleaves-López; R. Civera-Cerecedo; F. Ascencio-Valle; V. Gracia-López; V. Barbosa-Solomieu; E. Gisbert-Casas; K. B. Andree; C. A. Alvarez- González; F. J. Moyano-López; J. L. Ortiz-Galindo; P. Hinojosa-Baltazar; J.N. Gutiérrez-Rivera; A. A. Millán-Martínez; M. Linares-Aranda. 2008. Probióticos en acuicultura: Avances recientes del uso de levaduras en peces marinos En: Avances en nutrición acuícola IX del IX simposio internacional acuícola. Universidad Autonoma de Nuevo Leon, Monterrey, Nuevo Leon, Mexico, Pp. 237-257.

Vollstad, D; J. Bogwald; O. Gaserod Y R. A. Dalmo. 2006. Influence of high-M alginate on the growth and survival of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) and spotted wolf fish (*Anarhichas minor* Olafsen) fry. *Fish and Shellfish Immunology* 20:548-561.

Watanabe, T. 1999. Capitulo 5 nutrición y crecimiento. En: Shepherd, J; N. Bromage. 1999. Piscicultura intensiva. Zaragoza. Editorial Acribia. Pp. 151-192

Zaitseva, Galina P. Y R. León- Sánchez. 2006. Aspectos ambientales, nutricionales y reproductivos de la tilapia. En: Zaitseva, G.P.; A. Santerre-Lucas; J. Casas-Solis; J. Peregrina-Sandoval; R. Leon-Sanchez. 2006. Tilapia aspectos fisiológicos y productivos. Universidad de Guadalajara. México. Pp 150.

ANEXO

A continuación se muestran las lecturas tomadas del elisómetro a una absorbancia de 630nm de los 4 ensayos (basales tanto de tilapia y bagre como experimentales de los mismos).

Tabla 1. Lecturas basales en tilapia. Grupos: NBT, blanco; Sin aero, control; Con aero, ensayo.

NBT	Sin aero	Con aero
0.095	0.206	0.346
0.112	0.204	0.343
0.094	0.203	0.363
0.057	0.190	0.359
0.088	0.191	0.361
0.061	0.131	0.336

Tabla 2. Lecturas basales en bagre. Grupos: NBT, blanco; Sin aero, control; Con aero, ensayo.

NBT	Sin aero	Con aero
0	0.107	0.122
0.018	0.109	0.116
0.021	0.113	0.117
0	0.105	0.127
0.024	0.11	0.12
0.022	0.116	0.129

Tabla 3. Lecturas del ensayo experimental en tilapia del Nilo. Grupos: C, Control; CP, Control Probiótico; S, Soya; SP, Soya Probiótico.

C	CP	S	SP
0.351	0.32	0.301	0.122
0.234	0.256	0.207	0.131
0.24	0.254	0.212	0.134
0.273	0.274	0.252	0.139
0.279	0.283	0.265	0.139
0.254	0.303	0.246	0.145
0.264	0.288	0.252	0.145
0.367	0.302	0.262	0.158
0.192	0.107	0.291	0.18
0.174	0.145	0.276	0.19
0.206	0.179	0.214	0.231
0.47	0.213	0.113	0.255
0.426	0.188	0.187	0.267
0.444	0.224	0.143	0.276
0.327	0.206	0.378	0.339
0.358	0.256	0.357	0.348

Tabla 4. Lecturas del ensayo experimental en bagre de canal. Grupos: C, Control; CP, Control Probiótico; S, Soya; SP, Soya Probiótico.

C	CP	S	SP
0.129	0.476	0.478	0.27
0.133	0.436	0.467	0.231
0.136	0.405	0.431	0.255
0.179	0.136	0.099	0.055
0.204	0.173	0.133	0.046
0.22	0.188	0.1	0.088
0.335	0.247	0.272	0.277
0.34	0.267	0.282	0.296
0.366	0.309	0.271	0.272
0.373	0.095	0.506	0.271
0.385	0.12	0.514	0.287
0.418	0.154	0.489	0.285

BIBLIOTECA CUCBA