



**UNIVERSIDAD MICHUACANA  
DE  
SAN NICOLÁS DE HIDALGO**



**Facultad de Químico Farmacobiología**

**TESIS:**

**Caracterización de péptidos en ingredientes y dietas  
para juveniles de pez blanco de Pátzcuaro (*Chirostoma  
estor*).**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:**

***Químico Farmacobiólogo***

**PRESENTA:**

***Alejandro Reyes López.***

**DIRECTORA DE TESIS:**

***Dra. en C. Elva Mayra Toledo Cuevas.***

**Co-DIRECTORA DE TESIS:**

***Dra. en C. María Gisela Ríos Durán***

**Morelia, Michoacán, noviembre 2016.**

## INDICE

|                                                                                   |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------|----|
| INDICE DE FIGURAS.....                                                            | 3  |
| INDICE DE TABLAS .....                                                            | 4  |
| ABSTRACT .....                                                                    | 5  |
| RESUM EN.....                                                                     | 6  |
| I. INTRODUCCIÓN.....                                                              | 7  |
| II. MARCO TEORICO .....                                                           | 9  |
| 2.1 PEZ BLANCO DE PÁTZCUARO.....                                                  | 9  |
| 2.2 ELECTROFORESIS EN GEL.....                                                    | 13 |
| III. JUSTIFICACIÓN .....                                                          | 16 |
| IV. OBJETIVOS .....                                                               | 17 |
| OBJETIVO GENERAL .....                                                            | 17 |
| OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....                                                       | 17 |
| V. MATERIALES Y MÉTODOS.....                                                      | 18 |
| 5.1 PREPARACIÓN DE LOS HOMOGENADOS.....                                           | 19 |
| 5.2 CUANTIFICACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA SOLUBLE.....                   | 20 |
| 5.2.1 Curva de patrón.....                                                        | 20 |
| 5.2.2 Cálculo de la Concentración de proteína .....                               | 21 |
| 5.3 CONCENTRACIÓN DE HOMOGENADOS .....                                            | 21 |
| 5.4 ELECTROFORESIS EN GEL DE TRICINA SDS- PAGE.....                               | 22 |
| 5.5 DETERMINACIÓN DE PESOS MOLECULARES .....                                      | 22 |
| VI. RESULTADOS .....                                                              | 23 |
| 6.1 CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA SOLUBLE DE DIETAS E INGREDIENTES. ....              | 23 |
| 6.2 CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA SOLUBLE DE LOS HOMOGENADOS DE LAS DIETAS.....       | 24 |
| 6.3 GELES DE POLIACRILAMIDA. ....                                                 | 25 |
| 6.4 PERFIL PÉPTIDICO DE DIETAS E INGREDIENTES .....                               | 27 |
| VII. DISCUSIÓN.....                                                               | 29 |
| VIII. CONCLUSIÓN .....                                                            | 32 |
| IX. BIBLIOGRAFÍA .....                                                            | 33 |
| X. APENDICE .....                                                                 | 39 |
| 10.1 PREPARACIÓN DE LOS GELES DE POLIACRILAMIDA Y CONDICIONES DE CORRIMIENTO..... | 39 |
| 10.1.1. Reactivos y soluciones utilizados en la Electroforesis.....               | 39 |
| 10.1.2 Preparación de los geles de poliacrilamida.....                            | 40 |
| 10.1.3.Carga de muestras en el gel.....                                           | 43 |
| 10.1.4. Corrimiento electroforético.....                                          | 44 |
| 10.2. FIJACIÓN, TEÑIDO Y REVELADO DE GELES .....                                  | 45 |

## INDICE DE FIGURAS

| Núm. | Descripción.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | Pág. |
|------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| 1    | Pez blanco de Patzcuaro, <i>Chirostoma estor</i> .                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 7    |
| 2    | Relación del tracto digestivo de <i>Chirostoma estor</i> respecto a su tamaño. Se aprecia la ausencia de un estómago verdadero.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 9    |
| 3    | Desnaturalización de proteínas por medio de Mercaptoetanol y SDS.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 14   |
| 4    | Esquema de un gel de poliacrilamida y de los polos eléctricos, utilizado en la técnica de Tricina SDS-PAGE                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 15   |
| 5    | Lector de microplacas "Eliread" (KONTROLab)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 20   |
| 6    | Curva patrón de concentración de proteína, utilizando albúmina sérica bovina.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 21   |
| 7    | Geles de Poliacrilamida, al 10 y 16% teñidos con azul de Coomassie a) Dietas e ingredientes: carril 1 marcador de peso molecular M3546 (1060-26600Da), carriles del 2 al 5: dieta 2(D2), dieta 3 (D3), dieta 4 (D4), dieta 5 (D5), carril 6: marcador de peso molecular LC5800 (3.5 – 360KDa), carril 7: Ingrediente 1 , carril 8: harina de pescado, carril 9: Ingrediente 2 , carril 10: Ingrediente 3. b) Ingredientes adicionales. Carril 1: marcador de peso molecular M3546, carril 2: Ingrediente 4, carril 3: Ingrediente 5, carril 4: Ingrediente 6, carril 5: marcador de peso molecular LC5800, carril 6: dieta 1 (D1), carril 7: harina de pescado. | 26   |
| 8    | Distribución de las concentraciones de poliacrilamida en el gel                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 41   |
| 9    | Soporte de la estructura para la polimerización de geles de poliacrilamida.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 41   |
| 10   | Ensamble de los vidrios, con el gel de acrilamida, en los electrodos                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 43   |
| 11   | Mini tanque de corrimiento y fuente de poder.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 44   |

## INDICE DE TABLAS

| Núm.      | Descripción                                                                                                                                                                                                                                                    | Pág.         |
|-----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| <b>1</b>  | Composición porcentual de Harina de pescado y fuentes de proteína soluble de las dietas experimentales.                                                                                                                                                        | <b>18</b>    |
| <b>2</b>  | Composición de las dietas experimentales, elaboradas por Pérez <i>et al.</i> (2011). Los datos se expresan en g/Kg. HP75-PS25                                                                                                                                  | <b>18</b>    |
| <b>3</b>  | Cantidad de muestra y volumen de agua utilizados para la preparación de homogenados.                                                                                                                                                                           | <b>19</b>    |
| <b>4</b>  | Concentración de proteína soluble y porcentaje de proteína soluble en las dietas, con respecto al 100% de proteína total de estas.                                                                                                                             | <b>23</b>    |
| <b>5</b>  | Concentración de proteína soluble y porcentaje de proteína soluble con respecto al 100% de proteína total en los ingredientes.                                                                                                                                 | <b>24</b>    |
| <b>6</b>  | Concentración de proteína soluble en los homogenados concentrados de las dietas e ingredientes.                                                                                                                                                                | <b>24-25</b> |
| <b>7</b>  | Cantidad de proteína cargada en los pocillos de los geles.                                                                                                                                                                                                     | <b>25</b>    |
| <b>8</b>  | Pesos moleculares de polipéptidos y proteínas en las dietas.                                                                                                                                                                                                   | <b>26</b>    |
| <b>9</b>  | Pesos moleculares de polipéptidos y proteínas en los ingredientes: Ingrediente 1 (I1), Harina de pescado (HP), Ingrediente 2 (I2), Ingrediente 3 (I3), Ingrediente 4 (I4), Ingrediente 5 (I5), Ingrediente 6 (I6).                                             | <b>27</b>    |
| <b>10</b> | Composición porcentual del perfil péptidico de las proteínas solubles de las dietas, en un intervalo de peso molecular de 1 – 350 KDa.                                                                                                                         | <b>27</b>    |
| <b>11</b> | Composición porcentual del perfil péptidico de ingredientes, en un intervalo de peso molecular de 1 – 350 KDa. Ingrediente 1 (I1), Harina de pescado (HP), Ingrediente 2 (I2), Ingrediente 3 (I3), Ingrediente 4 (I4), Ingrediente 5 (I5), Ingrediente 6 (I6). | <b>28</b>    |
| <b>12</b> | Reactivos y soluciones utilizados en la Electroforesis en gel de Tricina SDS-PAGE, según el método de Schägger (2006).                                                                                                                                         | <b>39-40</b> |
| <b>13</b> | Preparación de los geles concentrador y separadores.                                                                                                                                                                                                           | <b>42</b>    |
| <b>14</b> | Polipéptidos y proteínas presentes en marcador comercial M3546                                                                                                                                                                                                 | <b>44</b>    |
| <b>15</b> | Voltajes y tiempos empleados en el corrimiento de los geles.                                                                                                                                                                                                   | <b>44-45</b> |

## ABSTRACT

The pike silverside (*Chirostoma estor*) is an important endemic fish species from Pátzcuaro Lake, Michoacán, México, with a high commercial, ecological and cultural value. This is an endangered species caused by immoderate fishing and habitat deterioration. Aquaculture is one alternative to preserve this species. *C. estor* is an agastric fish with a short intestine, therefore intestinal citosolic digestion takes great importance. Several studies have been conducted in order to develop balanced diets to produce optimum fish performance, in which the use of soluble protein sources has provided favorable results in terms of growth and survival. In the present work, the soluble protein concentration and polypeptidic profile were determined in feed ingredients, and diets with different proportions of soluble protein sources (Pérez *et al.*, 2011). The objective of these evaluations were to contribute to the knowledge of the kind of optimal protein sources for the species. Five experimental diets with different proportions of Fishmeal (HP, fibrous protein source) and soluble protein sources (PS) were analyzed: 100HP, 75HP-25PS, 50HP-50PS, 25HP-75PS and 12.5HP-87.5PS (values indicating the percentage of dietary protein provided by such sources). Soluble protein concentration in ingredients and diets was determined by Bradford method. The polypeptidic profile of diets and ingredients was determined in polyacrylamide gels, using the tricine SDS-PAGE technique, and the molecular weight of the obtained bands (below 30 kDa) was calculated using Gel Analyzer 2010® software. Diets 75HP-25PS and 50HP-50PS, which produced better survival and growth results in *C. estor* juveniles, in a previous study (Pérez *et al.*, 2011), contain 6.76 and 27.38% of soluble protein respectively, relative to total protein. Diets 100HP, 25HP-75PS and 12.5HP-87.5PS, which produced lower survival and growth (Pérez *et al.*, 2011), contain 2.10, 43.99 y 56.61% of soluble protein, respectively. Soluble protein fraction below 30 KDa, for diets 75HP-25PS and 50HP-50PS, was 34.1 and 26.9%, respectively; while for diets 100HP, 25HP-75PS and 12.5HP-87.5PS the soluble protein fraction was 100, 29.9 and 33.5% respectively. Relating the results with those obtained by Pérez *et al.* (2011), it can be concluded that soluble protein dietary levels between 6.76 and 27.38% of total protein promote the growth and survival of *C. estor* juveniles. The soluble protein fraction reveals that approximately one third of these diets contains polypeptides and proteins between 14,346 and 36,500 Da.

**Palabras clave:** *Chirostoma estor*, agastric fish, dietary soluble protein, molecular weight profile, Tricine SDS-PAGE.

## RESUMEN

El pez blanco (*Chirostoma estor*) es una especie endémica del lago de Patzcuaro, Michoacán, de gran importancia debido a su alto valor comercial, ecológico y cultural. Su pesca inmoderada y diversos factores que alteran su hábitat han puesto al pez blanco en peligro de extinción por lo que se busca preservar la especie a través de su cultivo. Esta especie es un pez agástrico con intestino corto, por lo que la digestión citosólica intestinal toma gran importancia. Se han realizado diversos estudios para generar dietas balanceadas que puedan producir desempeños óptimos, en las que el uso de fuentes de proteína soluble ha ofrecido resultados favorables en cuanto a crecimiento y supervivencia. En el presente estudio se determinó la proporción de proteína soluble y el perfil polipeptídico en ingredientes y dietas elaboradas con diferentes proporciones de fuentes de proteína soluble (Pérez *et al.*, 2011) con la finalidad de aportar al conocimiento sobre el tipo de fuentes de proteína óptimas para la especie. Se analizaron 5 dietas experimentales y sus ingredientes, con diferentes proporciones de harina de pescado (HP, fuente de proteína fibrosa) y fuentes de proteína soluble (PS): 100HP, 75HP-25PS, 50HP-50PS, 25HP-75PS, 12.5HP-87.5PS, que indican los diferentes porcentajes de la proteína dietaria que aportan dichas fuentes. Se determinó la cantidad de proteína soluble presente en ingredientes y dietas, mediante el método de Bradford. Se realizaron corrimientos electroforéticos de las dietas e ingredientes en geles de poliacrilamida, empleando la técnica de tricina SDS-PAGE y se calculó el peso molecular de las bandas obtenidas en los geles, con el programa Gel Analyzer 2010®. Con esto se determinó el perfil de pesos moleculares de dietas e ingredientes por debajo de 30 kDa. Las dietas 75HP-25PS, 50HP-50PS que mostraron mejores resultados de supervivencia y crecimiento en juveniles de pez blanco en un estudio previo (Pérez *et al.*, 2011), contienen 6.76 y 27.38% de proteína soluble respectivamente, respecto a la proteína total. Las dietas 100HP, 25HP-75PS y 12.5HP-87.5PS, que produjeron bajos crecimientos y supervivencias en el estudio de Pérez *et al.* (2011), contienen 2.10, 43.99 y 56.61% de proteína soluble, respectivamente. La fracción de proteína soluble por debajo de 30 KDa, para las dietas 50HP-50PS y 75HP-25PS (que resultaron en los mejores desempeños), es de 26.9% y 34.1%, respectivamente; mientras que para las dietas 100HP, 25HP-75PS y 12.5HP-87.5PS es de 100, 29.9 y 33.5% respectivamente. Al relacionar los resultados del presente estudio con los de Pérez *et al.* (2011), se concluye que niveles dietéticos de proteína soluble de 6.76 a 27.38% de la proteína total, favorecen el crecimiento y supervivencia del pez blanco de Patzcuaro (*Chirostoma estor*). La fracción de proteína soluble revela que aproximadamente una tercera parte de estas dietas contienen polipéptidos y proteínas que van de 14,346 hasta 36,500 Da.

**Palabras clave:** Pez blanco de Pátzcuaro, pez agastrico, proteína soluble, perfil de pesos moleculares, Tricina SDS-PAGE.

## I. INTRODUCCIÓN

*Chirostoma estor*, conocido como pez blanco (figura 1), es una especie endémica del Lago de Pátzcuaro, ubicado en el estado de Michoacán, México. Perteneció a la familia **Atherinopsidae**, que está conformada por alrededor de 150 especies (representadas principalmente por peces marinos y estuarinos) y a la subfamilia **Menidiinae**. Es una especie de agua dulce que posee características en común con los Atherinópsidos marinos, ya que al parecer se originó de una población marina que quedó aislada en las aguas interiores de la meseta central de México, debido a los movimientos tectónicos del temprano cuaternario, aproximadamente hace 1.6 millones de años (Dyer- Chernoff, 1966; Barbour, 1973).



Figura 1. Pez blanco de Patzcuaro, *Chirostoma estor* (www.google.com/images, 24/03/15)

El pez blanco tiene gran importancia debido a su alto valor comercial, ecológico y cultural; es apreciado por tener un sabor característico agradable y por su alta calidad nutritiva, además de que es uno de los platillos representativos del estado de Michoacán, formando parte sustancial de la cultura Purépecha. Hasta hace algunos años la pesquería de esta especie era una importante actividad en el Lago de Pátzcuaro, siendo una de las principales fuentes de alimento y de ingresos para los indígenas ribereños. Sin embargo, diversas acciones han prácticamente llevado a la especie a la desaparición. Entre estas se encuentran su pesca exhaustiva y poco selectiva, capturando peces de todas las tallas, alterando así su ciclo biológico. Otras causas son la tala inmoderada de la cuenca, que reduce el volumen del lago, y la contaminación y deterioro de su hábitat. Adicionalmente, la introducción de especies exóticas, como la carpa común (*Cyprinus carpio*) y la tilapia (*Oreochromis spp*), que por su alta fecundidad y crecimiento compiten y en consecuencia desplazan a las especies nativas. Finalmente, la introducción de depredadores carnívoros, como la Lobina (*Micropterus salmoides*) (García de León, 1984; Toledo, 1988).

Todo esto ha colocado al pez blanco en riesgo de peligro de extinción, por lo que la Norma Oficial Mexicana NOM-036-SAG/PESC-2015 “Pesca responsable, en el Lago de Patzcuaro, ubicado en el estado de Michoacán. Especificaciones para el aprovechamiento de los recursos pesqueros” especifica en el punto 4.4.4 que solo se podrá capturar un máximo de 5kg diarios de pez blanco por pescador.

A partir del año de 1999, el Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales (IIAF), de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH), ha implementado estrategias sistemáticas, realizando diversos estudios sobre esta especie, teniendo como objetivo el desarrollo de técnicas para lograr su cultivo y por ende, la preservación del pescado blanco de Pátzcuaro (Martínez- Palacios *et al.*, 2002).

Entre los estudios se encuentran investigaciones para el desarrollo de dietas balanceadas adecuadas para la especie, utilizando diferentes fuentes de proteína, aunque no se había logrado obtener crecimiento y supervivencia óptimos. Recientemente se han utilizado ingredientes ricos en proteínas solubles como fuentes de proteína, observando una notoria mejoría en el crecimiento y supervivencia de juveniles de la especie (López-García *et al.*, 2010; Pérez *et al.*, 2011).

El presente estudio se realizó con el fin de analizar el perfil de polipéptidos solubles en ingredientes y dietas formuladas desarrolladas para juveniles, en un estudio realizado por Pérez *et al.* (2011). Este estudio permitiría entender de mejor manera los resultados obtenidos en el desempeño de los juveniles de pez blanco alimentados con dichas dietas, las cuales contienen fuentes de proteínas solubles. El perfil peptídico fue determinado utilizando la técnica de Electroforesis en geles desnaturalizantes de Tricina, SDS-PAGE.



## II. MARCO TEORICO

### 2.1 Pez blanco de Pátzcuaro.

En cuanto a su alimentación, el pez blanco *Chirostoma estor* es considerado básicamente un filtrador zooplancófago durante toda su vida, debido a que presenta un sistema de filtración complejo que está conformado por una boca pequeña en posición terminal, con una abertura máxima en etapa adulta de 21mm. Cuenta además con dientes mandibulares pequeños unicúspides y dientes faríngeos unicúspides, así como dientes y branquiaespinas ornamentados, con haces de dientes pequeños diseñados para filtrar partículas pequeñas desde temprana edad (Ross *et al.*, 2006). Su tracto digestivo está conformado por el esófago, que es un tubo corto y musculoso, y el intestino que lo conforman tres regiones: la parte anterior donde se encuentran los conductos biliares, la parte posterior del intestino donde se lleva a cabo la hidrólisis de proteínas por medio de pinocitosis y la digestión intracelular y, finalmente el recto, que está constituido por capas musculares gruesas (Ross *et al.*, 2006).

El intestino del pez blanco en etapa juvenil y adulta tiene una proporción 1:0.3 respecto al tamaño de su cuerpo (figura 2), lo que es característico de un pez carnívoro. Sin embargo, esta especie no posee un estómago verdadero ni ciegos pilóricos, lo cual indica que carece de digestión ácida, manteniendo el pH de su tracto digestivo entre neutro y alcalino (6.5 – 8) (Ross *et al.*, 2006).



Figura 2. Relación del tracto digestivo de *Chirostoma estor* respecto a su tamaño. Se aprecia la ausencia de un estómago verdadero. (Fuente: Martínez-Palacios *et al.*, 2002).

Las características de su sistema digestivo sugieren que estos peces deben presentar diferencias en su proceso digestivo, en comparación con peces que poseen con un estómago verdadero. En el caso de los peces con estómago la digestión comienza con la ayuda de las glándulas de la mucosa que secretan HCl y pepsinógeno; el HCl proporciona un medio ácido para la actividad óptima de la pepsina. Gracias a estas secreciones se efectúa una digestión preliminar

de las proteínas, que facilita la hidrólisis completa de las proteínas, a péptidos y amino ácidos, en el intestino medio y posterior por enzimas digestivas pancreáticas (como la tripsina y la quimiotripsina) e intestinales (como la aminopeptidasa), en un ambiente alcalino (Lehninger, 1981; Steffens, 1987).

En los peces que no poseen estómago, como es el caso de *Chirostoma estor*, la digestión presenta diferencias ya que estos no pueden secretar HCl ni pepsinógeno, lo que conlleva a una degradación de proteínas en el lumen intestinal. La ausencia de pepsina en el proceso es compensada por una alta actividad proteolítica alcalina, producida por enzimas pancreáticas, así como por enzimas intestinales localizadas en la membrana apical de los enterocitos, conocidas como enzimas de borde de cepillo, tales como la leucin-amino peptidasa y fosfatasa alcalina. Debido a la falta de dicha digestión preliminar o digestión ácida pueden quedar macromoléculas de proteína parcialmente o no digeridas en el intestino, por lo que el proceso digestivo es también complementado por la adquisición de proteínas a través de procesos de pinocitosis y su digestión intracelular, llevada a cabo por enzimas intracelulares o citosólicas, tales como la leucin- alanin peptidasa (Govoni *et al.*, 1986; Stroband y Van Der Veen, 1981).

Debido a la ausencia de estómago se han realizado diversos estudios con esta especie para poder caracterizar su bioquímica digestiva. En un primer estudio, realizado en larvas de pez blanco se encontró la presencia de alta actividad proteolítica alcalina de tipo tripsina, desde estadios tempranos (Ríos-Durán, 2000). En estudios posteriores, durante la ontogenia larvaria de la especie, se encontró una alta actividad proteolítica (tipo tripsina y quimiotripsina) en estadios tempranos, confirmando que esta especie es capaz de digerir proteínas a temprana edad gracias a que posee este equipo enzimático (Martínez-Palacios *et al.*, 2008). Adicionalmente, se encontró que el pez blanco de Pátzcuaro mantiene mayor actividad enzimas digestivas citosólicas respecto a las membranales, de acuerdo a estudios realizados por Toledo-Cuevas *et al.* (2011). Hernández-González (2011) realizó un estudio más detallado durante el desarrollo larvario del pez blanco y reportó una alta actividad proteolítica y lipolítica desde la apertura de la boca de estos organismos, siendo la tripsina y la lipasa pancreática las enzimas digestivas de mayor relevancia. Estos hallazgos evidencian que en etapas larvarias estos peces ya cuentan con la capacidad de digerir lípidos y proteínas necesarios para la supervivencia y el crecimiento.

Toledo-Cuevas *et al.* (2011) reportaron altos niveles de enzimas digestivas membranales y citosólicas del tipo leucin aminopeptidasa N y leucin alanin peptidasa, durante el desarrollo larvario del pez blanco. Los altos niveles de actividad, esta y otras actividades proteolíticas sugieren que éstas podrían estar compensando la ausencia de estómago y su intestino delgado y corto,

permitiendo a los organismos permite tener una digestión eficiente de proteínas.

Teniendo esto como antecedente, la nutrición y alimentación se han vuelto aspectos de estudio importantes para el desarrollo de dietas idóneas para el crecimiento y supervivencia óptimos del pez blanco en cultivo.

Una dieta puede ser considerada ideal cuando pueda cubrir totalmente los requerimientos nutricionales, que brinde la energía necesaria para poder realizar todos los procesos metabólicos de los organismos y les permita desarrollarse, crecer y reproducirse de una manera óptima; que sea biodisponible, de fácil digestión y asimilación, y en la que se utilice un gasto de energía mínimo para su adquisición, ingestión, digestión y asimilación. (Ríos-Duran *et al* en prensa)

La proteína es uno de los elementos más importantes en la formulación de las dietas para peces, puesto que además de ser vitales para su mantenimiento y crecimiento, son la principal fuente de energía para estos organismos (Moyle y Cech, 2000). Según Ronnestad *et al.* (1999), son necesarias grandes cantidades de aminoácidos para poder producir las proteínas que estarán encargadas de conformar el músculo durante el crecimiento del pez y para suplir la energía que necesita para su metabolismo.

Rust (1995) realizó un estudio con varias especies de peces sin estómago, reportando que los aminoácidos libres son mayormente absorbidos y metabolizados que los nutrientes más complejos, presentando un orden de asimilación de la siguiente forma: aminoácidos libres > péptidos > proteínas. Los enterocitos pueden llevar a cabo más fácilmente la absorción de aminoácidos (aa) libres, di-péptidos y tri-péptidos, y por lo tanto pueden entrar al organismo en mayor cantidad que las proteínas, que necesitan ser digeridas por enzimas proteolíticas antes de que estén disponibles para su absorción (Ganapathy *et al.*, 1994). Por lo anterior, se espera que para el caso de los peces agástricos (así como para la mayoría de las larvas de peces marinos, agástricas hasta que se completa el desarrollo de su sistema digestivo), las dietas en donde se encuentren presentes aa libres, péptidos o proteínas pre-hidrolizadas tengan una mejor absorción, aunque hasta cierta concentración ya que podría tener lugar una saturación de los mecanismos transportadores intestinales, debido a la alta concentración de aa libres y péptidos a nivel luminal (Cahu *et al.*, 1999).

Cahu *et al.* (2004) realizaron un estudio con larvas de la Lubina Europea (*Dicentrarchus labrax*), en el que reportaron que la inclusión de proteína hidrolizada en las dietas, a bajas concentraciones (14%), estimula la actividad de tripsina, así como el crecimiento, en estas etapas en las que los peces aún no han desarrollado el estómago.

Con el fin de mejorar la disponibilidad de la proteína, se han utilizado proteínas solubles en las dietas, con las que se ha pretendido mejorar la supervivencia y crecimiento de las larvas de peces. Si bien esto se ha observado también se ha encontrado que al utilizar niveles superiores de 25 a 30% de proteína soluble en la dieta se experimenta una depresión del crecimiento de la lubina (*D. labrax*) (Carvalho *et al.*, 1997; Cahu *et al.*, 1999; Cahu y Zambonino-Infante, 2001).

En el caso del pez blanco de Pátzcuaro, se han realizado diversos estudios para generar dietas balanceadas que puedan producir desempeños óptimos, en términos de crecimiento y supervivencia. En un principio se utilizaron dietas de muy buena calidad, con fuentes de proteína fibrosas, como músculo de pescado y calamar, obteniendo poco crecimiento y baja supervivencia en los juveniles de esta especie (Ríos-Duran com.pers.).

En búsqueda de mejorar las respuestas de los peces a las dietas balanceadas, se realizó un estudio donde se probó el uso de ensilado ácido de Bagre armado (*Pterygoplichthys disjunctivus*) como fuente de proteína alterna, en dietas para juveniles de pez blanco, con un nivel de inclusión de 0, 10, 20, 40 y 60%. Los resultados fueron poco favorables, en cuanto a crecimiento y eficiencia alimenticia, puesto que los peces alimentados con dietas sin inclusión de ensilado mostraron mejores resultados en los parámetros mencionados. En cuanto a la supervivencia las dietas de 0, 10 y 20% de inclusión de ensilado no mostraron diferencias significativas en la supervivencia, mientras que con mayores niveles de inclusión se observaron efectos negativos (Pimentel, 2009).

Posteriormente, se realizó otro estudio en juveniles de pez blanco, utilizando dietas con proteína hidrolizada de Bagre armado (*Pterygoplichthys disjunctivus*). En este caso tampoco se observaron mejoras en el crecimiento de los juveniles (Avalos, 2010). El mismo resultado se obtuvo con el uso de dos hidrolizados comerciales, en las dietas de juveniles de pez blanco (Ospina, 2013). La falta de mejoría en el desempeño puede estar relacionada con un alto porcentaje de proteína hidrolizada y/o péptidos pequeños en la dieta o las condiciones de maduración digestiva de estos organismos en el momento del ensayo –juveniles de 3 meses de post-eclosión (Zambonino-Infante *et al.*, 1997). Hernández-González (2014) encontró evidencias bioquímicas que sugieren una maduración intestinal a los 3.5 meses en los peces blancos.

Con base en el conocimiento de que los peces blancos poseen una alta actividad citosólica (Toledo-Cuevas *et al.*, 2011), tanto en el estudio de Avalos, (2010) como en otro llevado a cabo para determinar la proporción óptima entre proteína y energía, se utilizaron ingredientes ricos en proteínas solubles, como fuentes de proteína. El resultado fue una notoria mejoría en el crecimiento y supervivencia de los peces, con respecto a los obtenidos con las dietas

anteriormente ensayadas (López-García *et al.*, 2010). Estos hallazgos sirvieron de base para ensayar el efecto del uso de proteínas solubles, en el crecimiento y supervivencia de los juveniles de esta especie.

Así, se llevó a cabo un experimento de alimentación con juveniles de pez blanco, donde se implementaron cinco dietas isoenergéticas conformadas por fuentes de proteína soluble (PS) y harina de pescado (HP, como fuente de proteína fibrosa) en diferentes proporciones (% de proteína de la dieta), a saber: HP100, HP75-PS25, HP50-PS50, HP25-PS75 y HP12.5-PS87.5. Los mejores resultados se obtuvieron con las dietas con el HP75-PS25 y HP50-PS50, mientras que la dieta que contenía HP100 y HP12.5-PS87.5 mostraron los más bajos crecimientos (Pérez *et al.*, 2011).

Con la finalidad de entender de mejor manera los resultados obtenidos en el desempeño de esos juveniles de pez blanco, y para conocer el tamaño de polipéptidos (y péptidos) que pueden aprovechar mejor estos peces, lo cual se puede ver traducido en un mejor crecimiento, en el presente estudio se analizó el perfil péptidico de los ingredientes y de las dietas evaluadas en el estudio realizado por Pérez *et al.* (2011), utilizando la técnica de Electroforesis en geles desnaturizantes de Tricina (SDS-PAGE).

## **2.2 Electroforesis en gel**

La electroforesis es un método analítico, utilizado por primera vez por Tiselius en el año 1937. Para el año 1959 Raymond y Weintraub utilizaron un gel de poliacrilamida como soporte para la electroforesis. Este método se basa en la separación de biomoléculas bajo la acción de un campo eléctrico, de tal forma que dependiendo de la combinación de su carga, su masa molecular y su estructura tridimensional migrarán hacia el cátodo ( - ) ó ánodo ( + ) (Tovar, 2003). La velocidad de migración que presentan las moléculas va a depender de la densidad de carga de la molécula, de su relación masa/carga, del voltaje que se le aplique y del tamaño de poro del gel de poliacrilamida (Lomonte *et al.*, 1990).

Los geles utilizados están formados por la polimerización de dos componentes: acrilamida + Bisacrilamida = poliacrilamida. Estos geles son utilizados como medio de soporte para llevar a cabo las separaciones electroforéticas ya que presentan propiedades idóneas como la transparencia, que permite una buena visualización de las bandas, la elasticidad y compatibilidad con gran cantidad de compuestos químicos (Lomonte *et al.*, 1990). Además, pueden ser preparados de manera rápida y reproducible, y tiene como ventaja poder cambiar el tamaño del poro de una forma controlada, variando la concentración de los monómeros, acrilamida y bis-acrilamida (García-Pérez, 2000).

El dodecil sulfato de sodio (SDS) fue introducido en esta técnica en el año 1970. Ya para el año 1972, con la utilización de agentes reductores y SDS se realizaba la determinación del peso molecular de proteínas, denominándole electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) (Garfin, 1990; García-Pérez, 2000). El SDS, al ser un agente desnaturizante, provoca la pérdida de las estructuras terciarias de las proteínas, pero sin alterar su estructura primaria. Además les confiere una carga neta negativa, en proporción a su masa, facilitando su migración hacia el polo positivo (cátodo), de acuerdo a su relación masa/carga (Laemmli *et al.*, 1970). Sin la adición de SDS las proteínas que tienen masas similares migrarán de manera distinta, debido a las diferencias en su relación carga/masa (Shapiro *et al.*, 1967).

La reacción de polimerización de los geles de poliacrilamida es catalizada por la amina terciaria N, N, N, N'-tetrametilen-diamina (TEMED) (García-Pérez, 2000). El buffer de carga (es decir aquel que se adiciona a las muestras antes de ser separadas en los geles) contiene varios reactivos como son: mercaptoetanol, que es utilizado como agente reductor y tiene como función eliminar los puentes disulfuro que se encuentran en las estructuras terciarias de las proteínas; el SDS, un detergente que actúa desnaturizando a las proteínas, hasta que pierdan su forma nativa, y las recubre, aportándoles su carga negativa y el colorante azul de Coomassie, cuya carga es negativa, que tiene como función marcar el frente de electroforesis (Figura 3) (Horka, 2011).

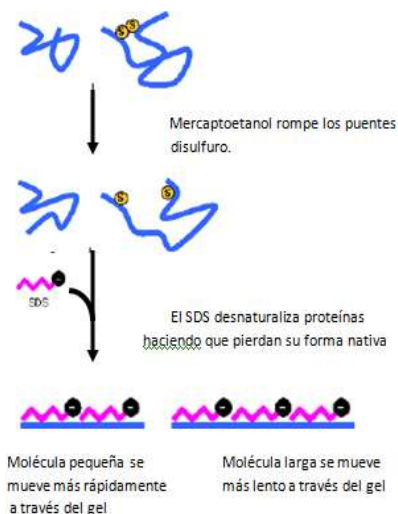


Figura 3. Desnaturalización de proteínas por medio de Mercaptoetanol y SDS.  
(Fuente: Palomino, 26/12/12)

Una modificación a esta técnica es la implementación del compuesto orgánico Tricina, utilizado en el buffer de corrimiento en la electroforesis. La tricina presenta una alta carga negativa y una elevada fuerza iónica. Debido a estas

características facilita la migración de iones y péptidos de bajo peso molecular, en un intervalo de 1 – 100 kDa. (Schägger, 2006)

La técnica Tricina SDS-PAGE tiene un alto poder de resolución, esto debido a que utiliza un sistema electroforético discontinuo (figura 4) formado por tres geles de diferente concentración y pH, para aumentar el poder de resolución. Dichos geles cumplen diferentes funciones: el gel superior o concentrador tiene como función compactar las muestras; los geles inferiores o separadores es en donde se efectúa la separación de proteínas de los diversos pesos moleculares (Schägger, 2006).

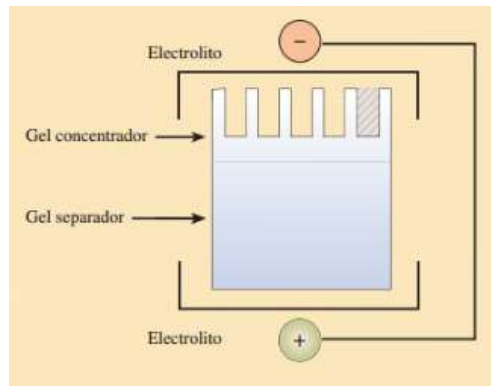


Figura 4. Esquema de un gel de poliacrilamida y de los polos eléctricos, utilizado en la técnica de Tricina SDS-PAGE (Fuente: Fernández, 15/12/15)

### III. JUSTIFICACIÓN

El pez blanco de Pátzcuaro *Chirostoma estor* se encuentra en peligro de extinción, debido a su pesca inmoderada y a diversos factores que alteran su hábitat natural, por lo que se ha tratado de preservar la especie.

Se ha caracterizado a esta especie como un pez agástrico de intestino delgado y corto, en el cual la digestión citosólica intestinal es de gran importancia. Se han evaluado distintas dietas utilizando diferentes fuentes de proteína, como músculo de pescado, hidrolizados y ensilados, sin obtener resultados óptimos de crecimiento. El uso de proteínas solubles en la dieta de juveniles ha ofrecido resultados más favorables, viéndose reflejado en un mejor crecimiento y supervivencia en cultivo.

En la búsqueda de mejorar el conocimiento sobre el tipo de fuentes de proteína óptimas para la especie, para poder desarrollar dietas apropiadas que permitan un óptimo desempeño de los peces, se hace necesario determinar la proporción de proteína soluble y el perfil polipéptidico de los ingredientes y dietas.



## **IV. OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

- Caracterizar el peso molecular de péptidos presentes en ingredientes y dietas diseñadas para juveniles de pez blanco.

### **Objetivos específicos**

1. Determinar la concentración de proteína soluble de las dietas y de los ingredientes utilizados como fuentes de proteína.
2. Determinar el peso Molecular de las proteínas solubles y de los polipéptidos menores a 30 KDa presentes en las dietas y en los ingredientes utilizados como fuentes de proteína.
3. Correlacionar los resultados obtenidos del perfil de pesos moleculares de las proteínas solubles presentes en las dietas, con los resultados de desempeño de juveniles alimentados con éstas (Pérez *et al.*, 2011).

## V. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Acuicultura, del Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales (IIAF), de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH).

Se caracterizó el perfil de las proteínas solubles de entre 1 y 30 KDa, presentes en cinco dietas experimentales y sus ingredientes, las cuales fueron evaluadas en un experimento de alimentación previamente realizado en juveniles de pez blanco de Pátzcuaro, por Pérez *et al.* (2011). Las dietas experimentales evaluadas contienen diferentes proporciones de harina de pescado (fuente de proteínas fibrosas) y fuentes de proteínas solubles, como se muestra en la tabla 1.

**Tabla 1.** Composición porcentual de Harina de pescado y fuentes de proteína soluble de las dietas experimentales.

|         | HARINA DE PESCADO (HP)<br>% | FUENTES DE PROTEINA<br>SOLUBLE (PS) % |
|---------|-----------------------------|---------------------------------------|
| Dieta 1 | 100                         | 0                                     |
| Dieta 2 | 75                          | 25                                    |
| Dieta 3 | 50                          | 50                                    |
| Dieta 4 | 25                          | 75                                    |
| Dieta 5 | 12.5                        | 87.5                                  |

La formulación de las dietas experimentales se muestra en la tabla 2.

**Tabla 2.** Composición de las dietas experimentales, elaboradas por Pérez *et al.* (2011). Los datos se expresan en g/Kg. HP75-PS25

| DIETA                              |        |           |           |            |                |
|------------------------------------|--------|-----------|-----------|------------|----------------|
| Ingredientes (g Kg <sup>-1</sup> ) | HP100  | HP75-PS25 | HP50-PS50 | HP25- PS75 | HP12.5- PS87.5 |
| Ingrediente 1*                     | 0.00   | 58.84     | 117.77    | 176.67     | 206.11         |
| Harina de pescado                  | 629.02 | 471.77    | 314.51    | 157.26     | 78.63          |
| Ingrediente 2*                     | 0.00   | 79.38     | 158.76    | 238.23     | 277.70         |
| Ingrediente 3*                     | 0.00   | 51.71     | 103.43    | 155.15     | 181.00         |
| Aceite de pescado                  | 0.00   | 0.00      | 0.00      | 3.54       | 10.97          |
| Aceite de soya                     | 0.00   | 0.00      | 13.68     | 25.00      | 25.00          |
| Almidón                            | 261.52 | 213.94    | 166.35    | 118.65     | 95.08          |
| BHT                                | 0.50   | 0.50      | 0.50      | 0.50       | 0.50           |
| Premezcla vit-min <sup>1</sup>     | 55.00  | 55.00     | 55.00     | 55.00      | 55.00          |
| Goma arábica                       | 17.50  | 17.50     | 17.50     | 17.50      | 17.50          |
| Alginato de Sodio                  | 2.50   | 2.50      | 2.50      | 2.50       | 2.50           |
| Lecitina de Soya                   | 50.00  | 50.50     | 50.50     | 50.50      | 50.50          |
| Energía (MJ Kg <sup>-1</sup> )     | 20.82  | 20.89     | 20.71     | 20.66      | 20.42          |

<sup>1</sup> Premezclas de vitaminas y minerales (DSM Nutritional Products).

\* Ingredientes estándar protegidos por propiedad intelectual, para la patente de las dietas.

Adicionalmente se analizaron tres ingredientes más (Ingredientes 4, 5 y 6), que se utilizan como fuentes de proteína soluble en la Planta de producción de pez Blanco del IIAF. Estos también son ingredientes estándar de secreto industrial.

### 5.1 Preparación de los homogenados.

Se prepararon homogenados de las dietas e ingredientes, pesando una cierta cantidad (en g) de cada una de dichas muestras y añadiéndole el volumen de agua desionizada requerido, para efectuar la disolución (Tabla 3). Las muestras se pesaron en una balanza analítica Mettler Toledo AB204-S y se colocaron en tubos plásticos de 7mL, los cuales contenían perlas de porcelana. Posteriormente se les adicionó el volumen de agua indicado, para ser homogenizadas en un homogenizador Precellys 24 bertin TECHNOLOGIES a 6000 rpm por 30 segundos. Posteriormente las muestras se centrifugaron a 3000 rpm durante 15 minutos, a 4°C, en una centrifuga Eppendorf 5804R, recuperando los sobrenadantes, es decir, los homogenados, que fueron en donde se realizó la cuantificación de proteína soluble y se caracterizó el perfil polipeptídico.

**Tabla 3.** Cantidad de muestra y volumen de agua utilizados para la preparación de homogenados.

| MUESTRA                       | CANTIDAD DE MUESTRA (g) | VOLUMEN DE AGUA (mL) |
|-------------------------------|-------------------------|----------------------|
| <b>Dieta 1 (D1)</b>           | 0.5                     | 4                    |
| <b>Dieta 2 (D2)</b>           | 0.5                     | 3.5                  |
| <b>Dieta 3 (D3)</b>           | 0.5                     | 3.5                  |
| <b>Dieta 4 (D4)</b>           | 0.5                     | 3.5                  |
| <b>Dieta 5 (D5)</b>           | 0.5                     | 3.5                  |
| <b>Ingrediente 1</b>          | 0.5                     | 3.5                  |
| <b>Harina de pescado (HP)</b> | 0.5                     | 4                    |
| <b>Ingrediente 2</b>          | 0.5                     | 3.5                  |
| <b>Ingrediente 3</b>          | 0.25                    | 4.5                  |
|                               |                         |                      |
| <b>Ingrediente 4</b>          | 0.25                    | 4.5                  |
| <b>Ingrediente 5</b>          | 0.5                     | 3.5                  |
| <b>Ingrediente 6</b>          | 0.5                     | 3.5                  |

## 5.2 Cuantificación de la concentración de Proteína soluble

La concentración de proteína soluble presente en ingredientes y dietas se determinó en los homogenados indicados en el apartado anterior, utilizando el método de Bradford (1976), en microplaca a 595nm. El fundamento de esta técnica se basa en la interacción del colorante hidrofóbico Azul Brillante de Coomassie G250 con la parte hidrófoba del interior de las proteínas, formando un complejo proteína-colorante, que desarrolla un color azul. A mayor cantidad de proteína, mayor color desarrollado y por lo tanto mayor absorbancia. Se realizó una curva patrón a partir de una solución estándar de albúmina sérica bovina Sigma A-7906 (1mg/mL). Se emplearon 10  $\mu$ L de cada uno de los homogenados y 200 $\mu$ L del reactivo de Bradford, y tras una incubación de 15 minutos, la densidad óptica (DO) fue determinada en un lector de microplacas “Eliread” (KONTROLab) (figura 5). La evaluación de la concentración de proteína de cada homogenado fue realizada por cuadruplicado.



Figura 5. Lector de microplacas “Eliread” (KONTROLab)

### 5.2.1 Curva de patrón.

Para poder cuantificar la concentración de proteína soluble de las muestras, se realizó una curva patrón, utilizando un estándar de albúmina bovina sérica, a una concentración de 1mg/mL, a partir de la cual se realizaron varias diluciones, por cuadruplicado. Tras seguir el procedimiento arriba descrito, la absorbancia de cada punto fue leída, como se indicó. En la figura 6 se muestra el resultado de la curva patrón, graficando Absorbancia Vs Concentración.

| Concentración<br>mg/ml. | Abs.     |
|-------------------------|----------|
| 0                       |          |
| 0.05                    | -0.01275 |
| 0.1                     | 0.05675  |
| 0.2                     | 0.173    |
| 0.3                     | 0.2755   |
| 0.4                     | 0.3575   |
| 0.5                     | 0.43775  |
| 0.6                     | 0.57425  |

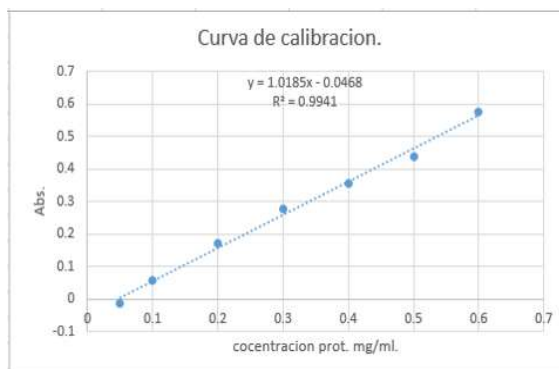


Figura 6. Curva patrón de concentración de proteína, utilizando albúmina sérica bovina.

### 5.2.2 Cálculo de la Concentración de proteína

Con ayuda de la curva patrón se calcula la cantidad de proteína soluble presente en las dietas e ingredientes, en mg/mL, despejando la fórmula:

$$y = mx - b.$$

**Donde:**

**y**= absorbancia.

**m, b**= Constantes que se obtienen de las ecuaciones de regresión de la curva patrón; donde **b** es el intercepto y **m** es la pendiente.

**x**= Concentración de proteína soluble, en mg/mL.

Multiplicando por el factor de dilución de cada muestra, se obtuvo la concentración real de cada homogenado.

Del estudio de Pérez (2011) se conocía la cantidad de proteína total (en g/kg) presente en las dietas, por lo que se realizaron las conversiones necesarias hasta obtener las mismas unidades y así poder obtener el porcentaje de proteína soluble presente en las muestras, respecto del 100% de la proteína total que contenían.

### 5.3 Concentración de homogenados

Tanto la baja concentración de proteína en los homogenados como bandas muy tenues en geles evidenciaron que era necesario concentrar la proteína soluble de las muestras. La concentración de proteínas se llevó a cabo con el

uso de filtros AmiCon Ultra-3KDa (Merck Millipore), que permiten recuperar proteínas mayores a 3 KDa. Se adicionaron 2mL de muestra en el dispositivo y se ensambló el tubo recolector del filtrado; este se centrifugó a 7500 g por 60 min, a temperatura ambiente (TA 2), siguiendo las instrucciones del proveedor, en una centrífuga Sorval ST 16R (Thermo Scientific; del Instituto de Ciencias Químico Biológicas, de la UMSNH, Cortesía del Dr. Homero Reyes). Transcurrido este tiempo, se retiró el tubo de recolección del dispositivo y se colocó el tubo recolector de concentrado, invirtiendo el dispositivo, centrifugando a 1000 g durante 2 min. Una vez obtenidos los concentrados, se les determinó la concentración de proteínas.

Con estos datos se calculó la cantidad de proteína a cargar en los pocillos de los geles de acrilamida. Se realizaron diversos corrimientos electroforéticos, con diferentes cantidades de proteína, hasta lograr obtener la mejor resolución de las bandas de proteína.

#### **5.4 Electroforesis en gel de Tricina SDS-PAGE**

Ésta se llevó a cabo según el método de Schägger (2006), cuyos reactivos y soluciones requeridos se muestran en el Apéndice 1.

#### **5.5 Determinación de pesos moleculares**

Para determinar el peso molecular de los polipéptidos y proteínas se utilizó el programa Gel Analyzer (2010), el cual requiere de una imagen con una resolución óptima. Para ello se colocaron los geles en un transiluminador SPECTROLINE UV/ White/Light Transilluminator y se fotografiaron. Dichas imágenes se exportaron al programa y tras delimitar las áreas de cada banda, tanto de las proteínas de las muestras como de los marcadores, se obtuvieron los siguientes resultados: los pesos moleculares de cada banda, el factor de correlación (Rf), y el volumen de la banda (Volumen de Materia Prima, VMP);

Es importante mencionar que esta técnica permite resolver bandas de proteínas y polipéptidos de pesos moleculares entre 1 – 100 KDa por lo que las proteínas de mayor tamaño fueron evaluadas, en un trabajo paralelo (Ruiz-Campa, inédito), mediante la técnica SDS-PAGE.

Para obtener una aproximación de la proporción de cada proteína/polipéptido en las muestras, se calculó la proporción (X) de cada banda, de la siguiente forma:

$$X = (\text{VMP de cada banda} \times 100) / \Sigma \text{VMP} *$$

\* Sumatoria del VMP de todas las bandas de cada muestra, tanto las evaluadas con este método como por el de Ruiz-Campa (inédito).

## VI. RESULTADOS

### 6.1 Concentración de proteína soluble de dietas e ingredientes.

En la tabla 4, se muestran los resultados de concentración de proteína soluble de las dietas. Tal como era esperado, el porcentaje de proteína soluble en las dietas con respecto a la proteína total, fue incrementándose conforme se incremento la inclusión de fuentes de proteína soluble, de acuerdo a la composición de las dietas.

**Tabla 4.** Concentración de proteína soluble y porcentaje de proteína soluble en las dietas, con respecto al 100% de proteína total de estas.

| Muestra | Composición     | Proteína soluble (mg/mL de homogenado) | Proteína soluble (g/Kg de dieta) | Proteína total (g/Kg de dieta) | % de Proteína soluble, de la proteína total de las dietas. |
|---------|-----------------|----------------------------------------|----------------------------------|--------------------------------|------------------------------------------------------------|
| Dieta 1 | 100% HP         | 1,13                                   | 9,06                             | 432,20                         | 2,10                                                       |
| Dieta 2 | 75% HP-25%PS    | 4,33                                   | 30,28                            | 447,80                         | 6,76                                                       |
| Dieta 3 | 50%HP-50%PS     | 17,64                                  | 123,45                           | 450,90                         | 27,38                                                      |
| Dieta 4 | 25%HP-75%PS     | 27,89                                  | 195,23                           | 443,80                         | 43,99                                                      |
| Dieta 5 | 12.5%HP-87.5%PS | 34,04                                  | 238,27                           | 420,90                         | 56,61                                                      |

HP, harina de pescado; PS fuente de proteína soluble.

En la tabla 5 se muestran los resultados de concentración de proteína soluble de los ingredientes que conforman las dietas (ingrediente 1, 2, 3 y harina de pescado) y los ingredientes analizados de manera individual (ingrediente 4,5 y 6). Se puede observar que el ingrediente con menor porcentaje de proteína soluble es la harina de pescado, puesto que ésta es rica en proteína fibrosa. En orden decreciente, el mayor porcentaje de proteína soluble fue encontrado en los ingredientes 1, 2 y 3; confirmando que son buenas fuentes de proteína soluble para la elaboración de dietas. Los ingredientes 4, 5 y 6 no fueron utilizados en las dietas experimentales elaboradas por Pérez *et al.* (2011), por lo que no se pudo realizar el cálculo de porcentaje de proteína soluble con respecto de la proteína total de alguna dieta. Estos ingredientes se analizaron debido a que actualmente se utilizan en la elaboración de dietas para peces blancos.

**Tabla 5.** Concentración de proteína soluble y porcentaje de proteína soluble con respecto al 100% de proteína total en los ingredientes.

| <b>Muestra.</b>   | <b>Proteína soluble (mg/mL de homogenado)</b> | <b>Proteína soluble (g/Kg de ingrediente)</b> | <b>Proteína Total (g/Kg de ingrediente)</b> | <b>Proteína soluble (% de la prot. total)</b> |
|-------------------|-----------------------------------------------|-----------------------------------------------|---------------------------------------------|-----------------------------------------------|
| Ingrediente 1     | 58.11                                         | 406.77                                        | 845.10                                      | <b>48.13</b>                                  |
| Harina de pescado | 0.74                                          | 5.89                                          | 675.50                                      | <b>0.87</b>                                   |
| Ingrediente 2     | 4.40                                          | 30.82                                         | 113.20                                      | <b>27.23</b>                                  |
| Ingrediente 3     | 21.46                                         | 386.1                                         | 904.70                                      | <b>42.67</b>                                  |
|                   |                                               |                                               |                                             |                                               |
| Ingrediente 4     | 34.16                                         | 614.89                                        | ND                                          | ND                                            |
| Ingrediente 5     | 22.69                                         | 158.84                                        | ND                                          | ND                                            |
| Ingrediente 6     | 53.54                                         | 374.78                                        | ND                                          | ND                                            |

ND: No determinado por qué no fueron utilizados en las dietas experimentales usadas en el estudio de Pérez *et al.* (2011).

## 6.2 Concentración de proteína soluble de los homogenados de las dietas.

En la tabla 6 se muestra la concentración de proteína soluble de los homogenados concentrados. Tras el procedimiento descrito en métodos se logró incrementar la concentración de proteína soluble, con respecto a los homogenados originales. No obstante, el factor de concentración logrado fue menor al estipulado por el proveedor, quienes consideraron factores de concentración de 45. Sin embargo, la concentración de proteína soluble obtenida, tanto en los ingredientes como en las dietas, fue la suficiente para poder observar las proteínas y polipéptidos en los geles de poliácridamida.

**Tabla 6.** Concentración de proteína soluble en los homogenados concentrados de las dietas e ingredientes.

| <b>Muestra</b> | <b>Proteína Soluble (mg/mL)</b> | <b>Factor de concentración</b> |
|----------------|---------------------------------|--------------------------------|
| Dieta 1        | 3,27                            | 2.89                           |
| Dieta 2        | 14,27                           | 3.29                           |
| Dieta 3        | 25,38                           | 1.43                           |
| Dieta 4        | 36,77                           | 1.31                           |
| Dieta 5        | 46                              | 1.35                           |
|                |                                 |                                |
| Ingrediente 1  | 164,24                          | 2.82                           |



|                   |        |      |
|-------------------|--------|------|
| Harina de pescado | 5,10   | 6.89 |
| Ingrediente 2     | 12,52  | 2.84 |
| Ingrediente 3     | 40,04  | 1.86 |
|                   |        |      |
| Ingrediente 4     | 82,40  | 2.41 |
| Ingrediente 5     | 45,27  | 1.99 |
| Ingrediente 6     | 109,65 | 2.04 |

### 6.3 Geles de poliacrilamida.

Como se había mencionado el uso de los geles de poliacrilamida, con la técnica Tricina SDS-PAGE, permite caracterizar el perfil y el peso molecular de proteínas, polipéptidos y péptidos contenidos en una gran diversidad de muestras, teniendo una mejor resolución para polipéptidos de bajo peso molecular.

Para realizar el análisis de las dietas experimentales, así como de los ingredientes, fue necesario optimizar varias condiciones, para la óptima separación de las proteínas. Entre los que se requirió, fue optimizar la cantidad de proteína a cargar en los geles, de tal forma que se obtuviera una buena resolución y visualización de las bandas de dietas e ingredientes. Se consideró que ésta fuera la misma para las distintas dietas, para poder observar el efecto del cambio de la composición de las dietas sobre el perfil polipeptídico. La cantidad de proteína soluble óptima para las distintas muestras se observa en la tabla 7. Con base en ésta se calculó el volumen de muestra a cargar en los pocillos.

**Tabla 7.** Cantidad de proteína cargada en los pocillos de los geles.

| Muestra.           | Cantidad de proteína (µg) |
|--------------------|---------------------------|
| Dieta 1            | 10                        |
| Dieta 2            | 20                        |
| Dieta 3            | 20                        |
| Dieta 4            | 20                        |
| Dieta 5            | 20                        |
|                    |                           |
| Ingrediente 1      | 20                        |
| Harina de pescado. | 5                         |
| Ingrediente 2      | 20                        |
| Ingrediente3       | 40                        |
| Ingrediente 4      | 20                        |
| Ingrediente 5      | 20                        |
| Ingrediente 6      | 20                        |

En la figura 7 se muestran los geles que contienen tanto las dietas como los ingredientes. Las dietas fueron cargadas junto a los ingredientes con el objetivo de poder apreciar que polipéptidos o proteínas aportaba cada uno de los ingredientes a las dietas, pero fue difícil la identificación ya que la mayoría de las bandas de las dietas fueron aportadas por más de un ingrediente. La dieta 1 se corrió junto a la harina de pescado (HP) ya que solo contiene este ingrediente como fuente de proteína.

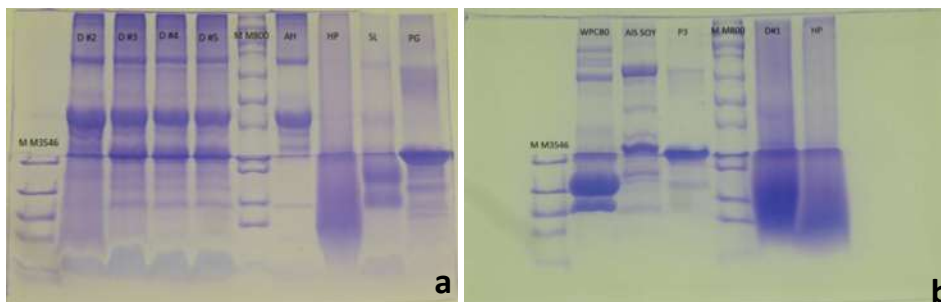


Figura 7. Geles de Poliacrilamida, al 10 y 16% teñidos con azul de Coomasie a) Dietas e ingredientes: carril 1 marcador de peso molecular M3546 (1060-26600Da), carriles del 2 al 5: dieta 2(D2), dieta 3 (D3), dieta 4 (D4), dieta 5 (D5), carril 6: marcador de peso molecular LC5800 (3.5–360KDa), carril 7: Ingrediente 1, carril 8: harina de pescado, carril 9: Ingrediente 2, carril 10: Ingrediente 3. b) Ingredientes adicionales. Carril 1: marcador de peso molecular M3546, carril 2: Ingrediente 4, carril 3: Ingrediente 5, carril 4: Ingrediente 6, carril 5: marcador de peso molecular LC5800, carril 6: dieta 1 (D1), carril 7: harina de pescado.

Se pudieron observar y evaluar el peso molecular de las distintas proteínas y polipéptidos que componen las dietas e ingredientes resultados que se indican en las tablas 8 y 9. Como se mencionó anteriormente, en este proyecto únicamente nos enfocamos a los polipéptidos menores a 30,000 Da de peso molecular.

**Tabla 8.** Pesos moleculares de polipéptidos y proteínas en las dietas.

| Dieta 1 | Dieta 2 | Dieta 3 | Dieta 4 | Dieta 5 |
|---------|---------|---------|---------|---------|
| PM Da   | PM Da   | PM Da   | PM Da   | PM Da   |
| 29.303  | 35.334  | 36.696  | 37.328  | 37.715  |
| 15.337  | 30.157  | 27.299  | 27.575  | 28.040  |
|         | 28.040  | 25.677  | 25.854  | 26.122  |
|         | 26.571  | 21.546  | 22.112  | 22.275  |
|         | 21.466  | 18.389  | 18.835  | 19.136  |
|         | 14.346  | 14.346  | 14.544  | 14.809  |

**Tabla 9.** Pesos moleculares de polipéptidos y proteínas en los ingredientes: Ingrediente 1 (I1), Harina de pescado (HP), Ingrediente 2 (I2), Ingrediente 3 (I3), Ingrediente 4 (I4), Ingrediente 5 (I5), Ingrediente 6 (I6).

| I1     | HP     | I2     | I3     | I4     | I5     | I6     |
|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| PM Da  | PM Da  | PM Da  | PM Da  | PM Da  | PM Da  | PM Da  |
| 37.328 | 29.364 | 43.621 | 28.792 | 29.474 | 35.717 | 29.646 |
| 31.442 | 11.100 | 29.268 | 25.943 | 19.127 | 30.441 | 28.791 |
| 28.414 |        | 22.275 | 22.356 | 14.655 | 29.132 | 27.772 |
| 14.676 |        | 16.239 | 19.211 |        | 27.434 | 26.594 |
|        |        |        | 14.743 |        | 25.510 | 25.760 |
|        |        |        | 12.681 |        | 23.616 | 20.870 |
|        |        |        | 10.054 |        | 21.832 | 19.916 |
|        |        |        | 7.807  |        | 14.127 | 15.261 |

#### 6.4 Perfil péptidico de dietas e ingredientes

En las tablas 10 y 11 se muestra el perfil péptidico completo (1 – 350 KDa) de cada una de las dietas e ingredientes. Este se determinó con los pesos moleculares obtenidos en este proyecto (1,000 – 30,000 Da) y los obtenidos en otro proyecto realizado paralelamente, en el que se evaluaron las proteínas y polipéptidos de pesos moleculares mayores a 30,000 Da, a través de la técnica SDS-PAGE (Campa L., Ríos G., Toledo M. 2015). En la tabla 10 se resalta la fracción péptidica por debajo de 30,000 Da de las dietas 2 y 3 las cuales dieron mejores resultados en cuanto a supervivencia y crecimiento (Pérez *et al.* 2011)

**Tabla 10.** Composición porcentual del perfil péptidico de las proteínas solubles de las dietas, en un intervalo de peso molecular de 1 – 350 KDa.

| Peso Molecular (KDa) | Dieta 1 HP 100 | Dieta 2 HP75-PS25 | Dieta 3 HP50-PS50 | Dieta 4 HP25-PS75 | Dieta 5 HP12.5-PS87.5 |
|----------------------|----------------|-------------------|-------------------|-------------------|-----------------------|
| 350 - 300            |                |                   | 6.00              | 6.90              | 11.50                 |
| 300 - 200            |                | 10                | 3.50              | 4.60              |                       |
| 200 - 100            |                | 3.40              | 3.60              | 3.10              | 3.00                  |
| 100 - 50             |                | 11.60             | 11.40             | 12.80             | 11.40                 |
| 50 - 30              |                | 48                | 41.30             | 42.70             | 40.50                 |
| 30 - 20              | 34.40          | <b>18.80</b>      | <b>20.90</b>      | 19.20             | 21.40                 |
| 20 - 10              | 65.60          | <b>8.10</b>       | <b>13.20</b>      | 10.70             | 12.10                 |
| 10 - 1               |                |                   |                   |                   |                       |

En la dieta 1 hay poca proteína soluble, observándose dos bandas únicamente en el intervalo de 10 - 30 KDa. Las dietas 2, 3, 4 y 5 se componen por polipéptidos (a partir de 5,650 a 11,300 Da) que se encuentran en el intervalo de 10 – 20 KDa y proteínas (por encima de 11,300Da) que se distribuyen en todo el intervalo que se pudo analizar. Algunas proteínas y polipéptidos se van incrementando y otro disminuyendo conforme la distinta composición de las dietas.

**Tabla 11.** Composición porcentual del perfil péptidico de ingredientes, en un intervalo de peso molecular de 1 – 350 KDa. Ingrediente 1 (I1), Harina de pescado (HP), Ingrediente 2 (I2), Ingrediente 3 (I3), Ingrediente 4 (I4), Ingrediente 5 (I5), Ingrediente 6 (I6).

| Peso Molecular (KDa) | I1 %  | HP %  | I2 %  | I3 %  | I4 %  | I5 %  | I6 %  |
|----------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 350 - 300            | 14.50 |       |       |       |       |       |       |
| 300 - 200            |       |       |       |       | 1.10  | 6.90  |       |
| 200 - 100            | 10.20 |       |       |       | 9.30  |       | 1.30  |
| 100 – 50             | 16.60 |       | 8.30  | 3.60  | 14.50 | 16.50 | 5.30  |
| 50 - 30              | 46.60 |       | 15.70 | 21.10 | 9.00  | 36.00 | 48.40 |
| 30 - 20              | 6.20  | 12.40 | 46.80 | 33.70 | 7.80  | 32.00 | 31.20 |
| 20 - 10              | 6.10  | 87.60 | 29.20 | 34.50 | 58.40 | 8.70  | 13.70 |
| 10 - 1               |       |       |       | 7.00  |       |       |       |

## VII. DISCUSIÓN

*Chirostoma estor* es una especie que presenta características y hábitos alimenticios de un pez carnívoro filtrador, con intestino corto y posee un sistema de filtración orobranquial (Ross *et al.*, 2006). Como se mencionó anteriormente es un pez agastrico que tampoco posee ciegos pilóricos, por lo que su digestión se lleva a cabo de forma diferente a la de los peces con estómago. Toledo-Cuevas *et al.* 2011 realizaron un estudio donde describen la capacidad digestiva del pez blanco, reportando una mayor importancia de la digestión citosólica sobre la luminal durante la etapa larvaria y en juveniles de 90dpe. Recientemente en el 2014 Hernández-González reportó que dicha actividad se mantiene durante todo el estadio juvenil y adulto. Tanto su hábito alimenticio como las características de su sistema digestivo sugieren que este organismo está adaptado al consumo de proteínas de fácil digestión, como lo es la proteína soluble. Es por esto que dietas conteniendo distintas proporciones de fuentes de proteína soluble fueron evaluadas por Pérez *et al.* 2011, estudiando su impacto sobre el crecimiento de juveniles de pez blanco.

De acuerdo al estudio realizado por Pérez *et al.* (2011), las dietas conformadas por 75%HP-25%PS y 50%HP-50%PS, identificadas como dieta 2 y 3 respectivamente, mostraron un mejor desempeño de los juveniles de pez blanco respecto a su crecimiento y supervivencia. Este resultado se puede comparar con lo obtenido por Carvalho *et al.* (2003) quienes encontraron un mejor crecimiento y supervivencia en las etapas larvarias tempranas de la carpa común *Cyprinus carpio*, cuando se utilizó la proteína soluble en un nivel de inclusión del 25 al 50% de la dieta.

Las dietas experimentales 2 y 3 contienen 6.76, y 27.38% de proteína soluble del porcentaje total de la proteína dietaria. Esto sugiere que dicho intervalo de proteína soluble tiene un impacto positivo en la supervivencia y crecimiento de los juveniles de pez blanco.

Mediante los geles de Tricina SDS-PAGE se calculó el perfil de distribución de pesos moleculares de las proteínas presentes en las dietas, encontrando diversos pesos moleculares que van desde los 1 a 350 KDa. Sin embargo en este proyecto únicamente nos enfocamos a las proteínas con peso molecular menor a 30 KDa.

En el caso de las dietas 2 y 3, la fracción de proteínas solubles por debajo de 30 KDa es de 26.9% para la dieta 2 y 34.1% para la dieta 3 (porcentajes resaltados en tabla 10), lo que revela que aproximadamente una tercera parte de estas dietas contiene polipéptidos y proteínas que van de los 36,500 hasta los 14346 Da (Tabla 8). Aksnes *et al* (2006) encontraron que polipéptidos y péptidos de peso molecular bajo se absorben con mayor facilidad por los enterocitos en comparación con macromoléculas que poseen un alto peso

molecular. Los autores describen que el crecimiento de la trucha Arco iris se redujo considerablemente al eliminar polipéptidos y proteínas de bajo peso molecular, Yamamoto *et al.* (2002) encontraron que las proteínas solubles en dietas para larvas de ayu (*Plecoglossus altivelis*) promovieron el crecimiento y mejoraron la tasa de supervivencia, las dietas empleadas contenían proteínas y péptidos de bajo peso molecular. Zheng *et al.* 2013 reportaron que péptidos y aminoácidos de bajo peso molecular menores a 1000 Da, presentes en la dieta estimulan el crecimiento de la platija japonesa (*Paralichthys olivaceus*).

Durante el proceso de digestión las proteínas son fragmentadas hasta tri-dipéptidos y aminoácidos libres, los cuales son absorbidos fácilmente en el intestino por distintos mecanismos de transporte (Zambonino-Infante *et al.*). Un equilibrio entre péptidos y aminoácidos parece ser importante para optimizar la utilización de proteínas en la dieta. Carvalho *et al.* (2003) determinaron el perfil de peso molecular de la proteína soluble en rotíferos y artemia, sugiriendo que las dietas artificiales para larvas deben tener la solubilidad de las proteínas y el perfil de peso molecular similar al del alimento vivo. Es probable que las dietas 2 y 3 formuladas por Pérez *et al.* (2011) cumplan con este equilibrio en cuanto a la solubilidad de las proteínas y perfil de peso molecular semejante al del alimento vivo, de tal forma que logren aprovechar mejor la proteína lo que se refleja en un mejor resultado en crecimiento y supervivencia del pez blanco.

Un exceso de tri- y dipéptidos podrían producir un efecto negativo debido a la saturación de los mecanismos de transporte (Govoni *et al.*, 1986; Bernier *et al.*, 1988). Zambonino-Infante *et al.* (1997) observaron que un nivel de inclusión de 0 a 15% de di- y tripéptidos en las dietas mejoraban un mejor crecimiento y supervivencia en la Lubina Europea. Sin embargo, un efecto contrario fue observado al aumentar estos niveles de inclusión a un 30%. Por otro lado, López-Alvarado y Kanazawa (1995), observaron que el rendimiento de las larvas de besugo rojo se reducía, cuando el nivel de aminoácidos libres en las dietas era mayor del 10%.

El tiempo de tránsito intestinal, también es un aspecto importante para el aprovechamiento del alimento ingerido por las larvas, debido a que tiende a ser muy corto lo que puede afectar la eficiencia en la absorción de proteínas (Govoni *et al.*, 1986; Werner y Blaxter, 1980). Esto podría explicar porque mayores contenidos de proteína soluble en las dietas de pez blanco están afectando negativamente en el desempeño del pez blanco, ya que por su intestino corto a lo largo de toda su vida presenta un tránsito intestinal muy rápido, con lo que se podría sugerir que las larvas requieran alimentarse frecuentemente (Ríos-Duran, 2000).

Otra causa a la que se pudiera atribuir el efecto negativo de las dietas para pez blanco, con mayores niveles de inclusión de proteína soluble, puede ser la alta concentración de aminoácidos libres que podrían estarse generando al ser digeridas en el intestino. Dicha alta concentración pudiera estar afectando el crecimiento debido a que provocan la estimulación en la secreción de la tripsina, la cual se encarga de inhibir la secreción de colecistoquinina (CCK), es una hormona gastrointestinal que estimula la función digestiva, como se ha encontrado en la lubina *Dicentrarchus labrax* (Cahu *et al.*, 1995).

En la concentración de los homogenados se obtuvieron factores de concentración menores a los estipulados por el proveedor. Esto pudo deberse a que no se lograron obtener verdaderos homogenados de las dietas porque éstas no se disolvieron completamente en el agua, debido a que contienen ingredientes insolubles (como la harina de pescado). Así que pudieron formarse complejos con las proteínas solubles, que impidieran su purificación y concentración. Otra posible causa podría ser la no optimización del método para este tipo de muestras.

En cuanto a los ingredientes utilizados en la formulación de las dietas de Pérez *et al* (2011), se pudo apreciar que el porcentaje de proteína soluble es alto con respecto a la cantidad de proteína total, en el caso de los ingredientes 1 y 3 el 48.13 y 42.67% respectivamente, en el ingrediente 2 el porcentaje de proteína es 27.23% confirmando que son buena fuente de proteína soluble para la elaboración de dietas para pez blanco, en el caso de la harina de pescado el porcentaje de proteína soluble fue bajo de 0.87%, ya que es un ingrediente rico en proteína fibrosa y poco soluble en agua.

## VIII. CONCLUSIÓN

La dieta 2 (HP 75%-PS25%) y la dieta 3 (HP50%-PS50%), que dieron mejores resultados en cuanto a supervivencia y crecimiento (Pérez *et al.* 2011), contienen un nivel de proteína soluble de 6.76 y 27.38% (% de la proteína total) respectivamente, lo que sugiere que niveles de proteína soluble dentro de este intervalo favorecen el crecimiento y supervivencia del pez blanco de Patzcuaro (*Chirostoma estor*).

En estas dietas la fracción de proteína soluble por debajo de 30 KDa es de 26.9% para la dieta 2 y 34.1% para la dieta 3, lo que revela que aproximadamente una tercera parte de estas dietas contiene polipéptidos y proteínas que van de los 14346 Da hasta 36500Da.



## IX. BIBLIOGRAFÍA

Aksnes, A., Hope, B., Jönsson, E., Björnsson, B. & Albrektsen, S. 2006. Size-fractionated fish hydrolysate as feed ingredient for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed high plant protein diets. I: growth, growth regulation and feed utilization. *Aquaculture*, 261, 305–317.

Avalos A. 2010. Evaluación del crecimiento de juveniles de pez blanco (*menidia estor*) alimentados con dietas a base de proteína hidrolizada de bagre armado (*ptery goplichthys disjunctivus*). Tesis de maestria UMSNH.

Barbour, C. D. 1973. The systematics and evolution of the genus *Chirostoma* Swainson (Pisces:Atherinidae). *Tulane Studies in Zoology and Botany*, 18(3):97-141.

Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254.

Bernier, J.J., Adrian, J., Vidon, N. 1988. Les Aliments dans le Tube Digestif Doin E ´ diteurs, Paris.

Cahu, C.L., Zambonino Infante, J.L. 1995. Maturation of the pancreatic and intestinal digestive functions in sea bass (*Dicentrarchus labrax*): effect of weaning with different protein sources. *Fish Physiol. Biochem.* 14, 431– 437.

Cahu, C.L., Zambonino-Infante, J.L. Quazuguel, P., Le Gall, M.M. 1999. Protein hydrolysate vs. fish meal in compound diets for 10-day old sea bass *Dicentrarchus labrax* larvae. *Aquaculture* 171, 109–119.

Cahu, C.L., Zambonino-Infante, J.L. 2001. Substitution of live food by formulated diets in marine fish larvae. *Aquaculture* 200, 161– 180.

Cahu, C., Rønnestad, I., Grangier, V., Zambonino Infante, J.L. 2004 Expression and activities of pancreatic enzymes in developing sea bass larvae (*Dicentrarchus labrax*) in relation to intact and hydrolyzed dietary protein; involvement of cholecystokinin. *Aquaculture* 238, 295–308.

Carvalho, A.P., Escaffre, A.M., Olivia Teles, A., Bergot, P. 1997. First feeding of common carp larvae on diets with high levels of protein hydrolysates. *Aquac. Int.* 5, 361–367.

Carvalho A.P., Sa´ R., Oliva-Telesa A., Bergotb P. 2003. Solubility and peptide profile affect the utilization of dietary protein by common carp (*Cyprinus carpio*) during early larval stages.

Dyer, B.S., Chernoff, B. 1996. Phylogenetic-relationships among atheriniform fishes (*Teleostei: Atherinomorpha*). *Zool. Journal Society.* 69.

Ganapathy, V., Brandsch, M., Leibach, F.H. 1994. Intestinal transport of amino acids and peptides. In: Johnson, L.R. (Ed.), *Physiology of the Gastrointestinal Tract*. Raven Press, New York, pp. 1773– 1794.

García de León, F. J. 1984. “Ecología pesquera, alimentación y ciclo gonádico de *Chirostoma estor* Jordan y *Micropterus salmoides* Lacépède en el lago de Pátzcuaro, Michoacán”, México, Tesis de Biología, UANL, 172.

García-Pérez Hilda M., 2000. Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia. 31-35.

Garfin DE. 1990. One dimensional gel electrophoresis. *Methods in enzymology*. Vol 182. Academic press.

Govoni, J. J; Boehlert, G. W. and Y. Watanabe. 1986. The physiology of digestion in fish larvae. *Env. Biol. Fish.*, 16(1-3): 59-77.

Hernández-González M.A. 2011. Influencia de la disponibilidad de alimento sobre la actividad de las principales enzimas digestivas en larvas del Pez Blanco de Pátzcuaro (*Chirostoma estor*). Tesis de Licenciatura. Facultad de Biología Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. 39.

Hernández-González MA. 2014. Determinación del modelo de maduración digestiva del pez blanco de Pátzcuaro, *Chirostoma estor*, bajo un régimen de alimento vivo. Tesis de Maestría, UMSNH.

Historia y avances del cultivo de pescado blanco. Instituto Nacional de la Pesca SAGARPA. 16.

Horka M., Ruzicka F. Kubesova A. Nemcova E. Slais K. 2011. Separation of phenotypically indistinguishable *Candida* species, *C. Orthopsilosis*, *C. metapsilosis* and *C. parapsilosis*, by capillary electromigration techniques.

Lehninger, A. 1981. Bioquímica. Las bases moleculares de la estructura y función celular. Ediciones Omega, S. A. Barcelona. 1117.

López-Alvarado, J., Kanazawa, A. 1995. Optimum levels of crystalline amino acids in diets for red sea bream (*Pagrus major*). ICES Mar. Sci. Symp. 201, 100– 105.

López-García, J., C. A. Martínez-Palacios and M. G. Ríos-Durán. 2010. Effect of dietary protein and lipid levels on growth, survival and feed utilization of Mexican Silverside (*Menidia estor*) juveniles. 14th International Symposium of Fish Nutrition and Feeding (ISFNF 2010), Quingdao, China.

Lomonte B; Gutiérrez J.M; Furtado M.f. 1990. Isolation of basic myotoxins from *Bothrops moojeni* and *Bothrops atrox* snake venoms.

Martínez-Palacios, C. A; Chavez-Sanchez, M. C; PAPP, G. S; Abdo De La Parra, I. y L. G. Ross. 2002. Progresos en el cultivo del pescado blanco del Lago de Pátzcuaro *Chirostoma estor estor*. Ciencia Nicolaíta 32: 73-90.

Martínez-Palacios, C., E. Barriga, J. Taylor, G. Durán and L. Ross. 2002c. Effect of temperature on growth and survival of *Chirostoma estor estor*, Jordan 1879, monitored using a simple video technique for remote measurement of length and mass of larval and juvenile fishes. Aquaculture. 209: 369-377.

Martínez Palacios C.A., G. Ross L. 2005. Patzcuaro hoy rescate del pez blanco. Presentación. Ciencia y desarrollo.

Martínez-Palacios, C.A., Rios-Duran, M. G., Fonseca-Madrigal, J., Toledo-Cuevas, E.M., Sotelo-Lopez., A., G., Ross, L. 2008. Developments in the nutrition of *Menidia estor* Jordan1880. Aquaculture Research, 2008, 39, 738-747.

Moyle, P. B. and J. J. Cech Jr. 2000. Fishes. An Introduction to Ichthyology. Fourth Edition. Prentice Hall, Inc. USA. 612.

Ospina- Salazar G. 2013. Evaluación de dos hidrolizados comerciales en dietas artificiales para juveniles de pescado blanco. Tesis.

Palomino C. D. 2012. Working at La Meta. <http://es.slideshare.net/davian02/sds-page>. Published on 26 de diciembre de 2012.

Pérez H.L. 2011. Efectos del uso de proteína soluble en la dieta, sobre el crecimiento y supervivencia de juveniles de pez blanco de Pátzcuaro (*chirostoma estor*).

Pimentel Acosta. 2009. Uso de bagre armado (*pterygoplichthys disjunctivus*) en ensilado ácido como fuente de proteína alterna en dietas para el cultivo de pez blanco de Pátzcuaro (*menidia estor*).tesis.

Ríos-Durán, M. G. 2000. Actividad proteolítica en larvas de pez blanco *Chirostoma estor* copandaro (Pices: *Atherinidae*): Implicaciones para su cultivo. Tesis de maestría. U.M.S.N.H. 53.

Ross L. G., Martínez-Palacios C.A., Aguilar-Valdez, Ma. Del C. Beveridge, M. C. M. y Chávez-Sánchez, Ma. C. 2006. Determination of feeding mode in fish: the importance of using structural and functional feeding studies in conjunction with gut analysis in a selective zooplanktivore *Chirostoma estor estor*. Jordan 1880. Journal of Fish Biology, 68: 1782-1794.

Rust, M.B. 1995. Quantitative aspects of nutrient assimilation in six species of fish larvae. Dr. thesis. School of Fisheries: University of Washington, Seattle, 137.

Rønnestad, I., Thorsen, A., Finn, R.N. 1999. Fish larval nutrition: a review of recent advances in the roles of amino acids. Aquaculture 177, 201– 216.

Schägger H. 2006. Tricine–SDS–PAGE. Molekulare Bioenergetik, Zentrum der Biologischen Chemie, Universitätsklinikum Frankfurt, Theodor-Stern-Kai 7, Haus 26, D-60590 Frankfurt, Germany.

Wittig I., and Schägger H. 2008. Features and applications of blue-native and clear-native electrophoresis. *Proteomics*, 8:3974-3990.

Shapiro AL, Viñuela E, Maizel JV Jr. (1967). Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels.. *Biochem Biophys Res Commun*. 28 (5): 815-820. PMID 4861258

Steffens, W. 1987. Principios fundamentales de la alimentación en los peces. Editorial Acribia S.A. Jaime Esaín Escobar (Trad.). España. 257.

Stroband, H. W. J. y F. H. Van Der Veen. 1981. Localization of protein absorption during transport of food in the intestine of the grasscarp, *Ctenopharyngodon idella* (Val.), 218: 149-156.

Toledo-Cuevas M., Moyano L.F.J., Tovar-Ramírez D., Álvarez-González C.A., Strüssman C., Martínez-Chávez C., Martínez-Palacios C.A. 2011. Development of digestive biochemistry in the initial stages of three cultured Atherinopsids. *Aquaculture Research*. 42:766-786.

Toledo-Cuevas E.M., Tenorio-Patiño C., Herrera-Vargas M.A., Álvarez-González CA., Tovar-Ramírez D., Moyano-López, F.J., Ríos-Durán MG., Bolasina S., Martínez-Palacios CA. 2007. Actividad enzimática digestiva del pez blanco de Pátzcuaro, *Menidia estor*, durante su desarrollo ontogénico larvario. *Memorias del 3er Congreso Estatal de Ciencia y Tecnología*. 377-381.

Toledo, D. M. P. 1988. Foraging by Largemouth bass (*Micropterus salmoides*) on Atherinids (*Chirostoma spp*) in lake Pátzcuaro, Michoacán, México”, Thesis Master of Science, University of Michiga,. Ann Arbor, Michigan, U.S.A, 53.

Tovar franco J.A. 2003. Programa de postgrado cursos básicos. Pontifica universidad javeriana. Facultad de ciencias.

Weber K, Osborn M. 1969. «The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis.». J Biol Chem. 244 (16): 4406-4412

Werner, R.G., Blaxter, J.H.S. 1980. Growth and survival of larval herring (*Clupea harengus*) in relation to prey density. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 37, 1063–1069.

Zambonino-Infante, J.L., Cahu, C.L., Peres, A. 1997. Partial substitution of di- and tripeptides for native proteins in sea bass diet improves *Dicentrarchus labrax* development. J. Nutr. 127, 608– 614.

Zheng K., Xu T., Qian C., Liang M, & Wang X. 2013. Effect of low molecular weight fish protein hydrolysate on growth performance and IGF-I expression in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) fed high plant protein diets. 372-380.

## X. APENDICE

### 10.1 Preparación de los geles de poliacrilamida y condiciones de corrimiento.

#### 10.1.1. Reactivos y soluciones utilizados en la Electroforesis

**Tabla 12.** Reactivos y soluciones utilizados en la Electroforesis en gel de Tricina SDS-PAGE, según el método de Schägger (2006).

| <b>Solución.</b>               | <b>Reactivo.</b>                                                                                                                                                                                    | <b>Observaciones.</b>                                                             |
|--------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| <b>AB-6<br/>(49.5%T – 6%C)</b> | Acrilamida (Bio-rad 161-0103)<br>Bisacrilamida (Bio-rad 161-0201)                                                                                                                                   | Tóxico.<br>Sensible a la luz. Almacenar a 4 °C<br>Sin filtrar.<br>Duración 1 mes. |
| <b>Buffer gel</b>              | Tris base (Sigma T1503) 3M<br>SDS(Bio-rad 161-0301) 0.3%, <b>pH 8.45</b>                                                                                                                            | Se prepara a 3X. Diluir 1X, con agua destilada para su utilización en el gel.     |
|                                | Glicerol (Sigma G-5516)                                                                                                                                                                             | Sensible a la luz.                                                                |
|                                | APS* (Sigma A-3678) al 10%                                                                                                                                                                          | Se prepara en fresco.                                                             |
|                                | TEMED (Sigma T-7024)                                                                                                                                                                                | Sensible a la luz. Almacenar a 4 °C.                                              |
| <b>Buffer de carga</b>         | SDS (Bio-rad 161-0301) 12%.<br>Glicerol (Sigma G-5516) 30%.<br>Tris-HCl (Sigma T3253-500G) 0.15 M.<br>Azul de Coomasie G (Bio-rad 161-0400) 0.05%.<br>Mercaptoetanol (Sigma M-3148) 6%, <b>pH 7</b> | El mercaptoetanol se adiciona en la alícuota a utilizar para cargar el gel.       |
| <b>Buffer cátodo.</b>          | Tris base (Sigma T1503) 0.1M<br>Tricina (Sigma T0377) 0.1M<br>SDS (Bio-rad 161-0301) 0.1%<br><b>No ajustar pH</b>                                                                                   | Se debe conservar a 4 °C.                                                         |
| <b>Buffer ánodo</b>            | Tris base (Sigma T1503) 0.1M, pH                                                                                                                                                                    | Se debe conservar a 4 °C.                                                         |

|                                |                                                                                             |                                                                         |
|--------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|
|                                | 8.9                                                                                         |                                                                         |
| <b>Solución fijadora.</b>      | Acetato de amonio<br>0.1M<br>Metanol (Sigma M3641-1L) 50%<br>Ac. Acético (Fermont 3045) 10% | Se prepara la solución 4 horas antes de utilizarla y mantenerla a 4 °C. |
| <b>Solución para teñir</b>     | Ac. Acético (Fermont 3045) al 10%<br>Coomasie G (Bio-rad 161-0400) 0.025%                   | Se debe guardar en la oscuridad, en un frasco de vidrio ámbar.          |
| <b>Solución para desteñir.</b> | Ac. Acético (Fermont 3045) al 10%                                                           | Se debe conservar en un frasco ámbar, en gaveta oscura, a TA.           |

Para preparar solución AB-6(49.5%T, 6%C)

| Reactivo      | Cantidad. |
|---------------|-----------|
| Acrilamida    | 23.5g     |
| Bisacrilamida | 1.5g      |
| Agua          | 50mL.     |

T: concentración total de los monómeros (acrilamida y el agente de reticulación Bisacrilamida).

C: concentración del agente reticulante (respecto a la concentración total).

### 10.1.2 Preparación de los geles de poliacrilamida

Se utilizó un sistema discontinuo compuesto por un gel compactador al 4% y dos geles separadores resolutivos, al 10 y 16% (figura 8).



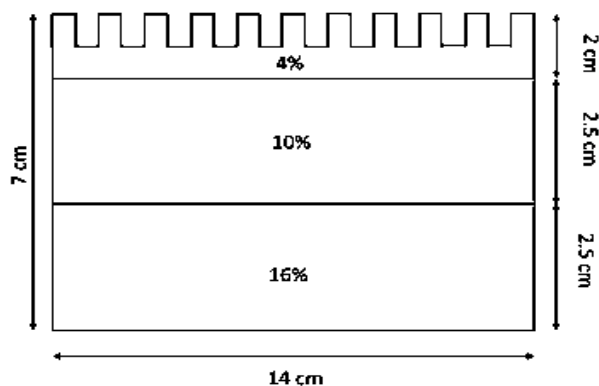


Figura 8. Distribución de las concentraciones de poliacrilamida en el gel (Schägger, 2006).

Se empleó un equipo Mini-PROTEAN Tetra cell, para preparar mini geles de 0.75mm de grosor, de acuerdo a las instrucciones del proveedor. Los vidrios se colocaron correctamente sobre la estructura de polimerización, para evitar fugas de la acrilamida (figura 9). Los vidrios se marcaron con las medidas que se muestran en la figura 8.



Figura 9. Soporte de la estructura para la polimerización de geles de poliacrilamida.

Se prepararon las soluciones de acrilamida para cada una de las concentraciones de los geles: 4, 10 y 16%, como se muestra en la tabla 13.

**Tabla 13.** Preparación de los geles concentrador y separadores.

|                        | Gel de acrilamida al 4% | Gel de acrilamida al 10% | Gel de acrilamida al 16% |
|------------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|
| <b>Buffer gel (mL)</b> | 1.5                     | 5                        | 5                        |
| <b>Agua (mL)</b>       | 4                       | 5.5                      | 3.5                      |
| <b>Glicerol (mL)</b>   |                         | 1.5                      | 1.5                      |
| <b>AB-6 (mL)</b>       | 0.5                     | 3                        | 5                        |
| <b>APS al 10% (mL)</b> | 45                      | 75                       | 50                       |
| <b>TEMED (mL)</b>      | 4.5                     | 7.5                      | 5                        |

Primeramente se preparó el gel al 16%. Para esto, en un matraz de 50 ml se adicionaron solo los cuatro primeros reactivos, en el orden indicado en la tabla 13, mezclándolos suavemente para evitar la formación de burbujas. Posteriormente y justo antes de vaciar la solución dentro de los vidrios, se adicionaron los volúmenes indicados de APS al 10% y TEMED. Éste último es una amina terciaria empleada como catalizador de la reacción, que causa la formación de radicales libres del APS. Estos reactivos catalizan la polimerización de la acrilamida utilizando un sistema REDOX, actuando el APS como agente oxidante y el TEMED como agente reductor (García, 2000). La solución fue vaciada, con la ayuda de una pipeta de vidrio y una propipeta, en la parte superior de los vidrios, rebasando un poco (5mm) la marca de dicho gel. Esto porque al efectuarse la polimerización, el volumen de la poliacrilamida se reduce, liberando agua. Por último, se adiciona aproximadamente 1mL de agua destilada, para alinear el gel. Para asegurarnos que el gel ya polimerizó, antes de adicionar la siguiente concentración de solución de acrilamida, se revisa que el sobrante de la solución en el matraz ya esté polimerizado; el oxígeno inhibe la polimerización, por lo que primero polimerizará la acrilamida que está en los vidrios. También se puede observar entre los vidrios, notándose la separación entre el gel y el agua que se adicionó. Una vez polimerizado este gel, el agua destilada se desecha, volteando el gel. Se prepara entonces la solución de acrilamida al 10%, siguiendo el procedimiento descrito. Finalmente, al adicionar la solución al 4%, se coloca con cuidado el peine, evitando la formación de burbujas (figura 9).

### 10.1.3. Carga de las muestras en el gel.

Una vez que polimerizó el gel al 4%, se retira el peine con mucho cuidado. Se retiran los vidrios espaciadores con el gel, de la estructura de polimerización, para colocarlo ahora en el conjunto de electrodos. Cuidar que quede bien colocado para evitar fugas y mezcla de los diferentes buffers. Se vertió el buffer del cátodo entre los vidrios, hasta quedar totalmente llena la cámara interna, como se observa en la figura 10.

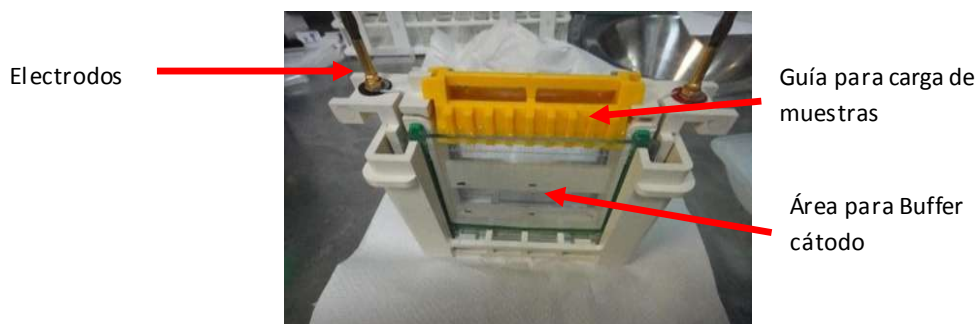


Figura 10. Ensamble de los vidrios, con el gel de acrilamida, en los electrodos

Con base en la sensibilidad reportada para esta técnica, se cargó la cantidad mínima de proteína soluble (calculando el volumen para cada muestra) que pudiera ser visualizada en los geles. Dicho volumen de muestra se mezcló con el buffer de carga (SDS, Glicerol, Tris-HCl, Coomassie G y mercaptoetanol), en una relación 1:1, incubando a 37°C durante 15 min. Esto para facilitar la desnaturalización de las proteínas y la formación del complejo SDS-proteína.

Para inyectar las muestras se utilizó una jeringa Hamilton, por su alta precisión y exactitud ( $\pm 1\%$  del volumen nominal), realizando el cargado lentamente para evitar la formación de burbujas y la contaminación de otros pocillos. Para determinar el peso de los polipéptidos se cargaron 10  $\mu$ L de cada uno de los dos marcadores comerciales utilizados: Ultra Low Range Molecular Weight Marker (1,060- 26,600; Sigma-Aldrich, Cat. M3546) compuesto por seis proteínas de peso molecular conocido (tabla 14) y, Novex Sharp Pre-stained Protein Standard (3.5 – 360 KDa; Thermo Fischer Scientific, Cat. LC5800) sin especificación de las proteínas que componen el marcador, debido a la patente industrial.

**Tabla 14.** Polipéptidos y proteínas presentes en marcador comercial M3546

| Polipéptidos / Proteínas.                      | Peso molecular (Da) |
|------------------------------------------------|---------------------|
| Triosafosfato isomerasa, de músculo de conejo. | 26,600              |
| Mioglobina de corazón de caballo               | 17,000              |
| $\alpha$ -lactoalbúmina de leche bovina        | 14,200              |
| Aprotinina de pulmón bovino                    | 6,500               |
| Cadena B (oxidada) de la insulina bovina       | 3,496               |
| Bradicinina                                    | 1,060               |

#### 10.1.4. Corrimiento electroforético

Una vez que se inyectaron las muestras y el marcador, se introdujeron los electrodos (que contenían los geles) en el mini tanque. Entonces se adicionó el buffer del ánodo, hasta cubrir el alambre de platino. Se colocó la tapa del mini tanque para iniciar el corrimiento, con ayuda de una fuente de poder Thermo SCIENTIFIC EC 3000 XL (figura 11).



Figura 11. Mini tanque de corrimiento y fuente de poder.

El corrimiento se llevó a cabo a diferentes voltajes, según la concentración del gel, como se muestra en la tabla 15.

**Tabla 15.** Voltajes y tiempos empleados en el corrimiento de los geles.

| Concentración del gel                                                                            | Voltaje | Tiempo       |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|--------------|
| Desde el inicio del corrimiento hasta que la muestra migra completamente a través del gel de 4%. | 30V     | 35 - 40 min. |

|                                                                                     |      |                 |
|-------------------------------------------------------------------------------------|------|-----------------|
| Desde el final del gel 4% hasta el final del gel de 10%                             | 90V  | 45 – 50 min.    |
| Desde el final del gel 10% hasta el final del gel de 16% (azul a 0.5 cm del final). | 150V | 1h – 1h 10 min. |

## 10.2. Fijación, teñido y revelado de geles

Una vez terminado el corrimiento electroforético se retiraron los geles de los vidrios espaciadores, cuidadosamente. Se cortó el gel compactador (el de concentración al 4%). Los geles resolutivos (10 y 16%) se enjuagaron con agua desionizada y posteriormente se colocaron en un recipiente, en donde permanecieron con la solución fijadora, durante 30 min, con agitación suave, con el objetivo de retener las proteínas en el gel. Tras este tiempo se retiró la solución fijadora y se adicionó la solución para teñir, en donde fueron incubados durante una hora, con agitación suave. Esta solución contiene azul G de Coomassie, que es un colorante que tiñe en forma no específica a todas las proteínas, de un fuerte color azul; no obstante, también se tiñen los geles. Por esto es que al concluir la tinción, se adicionó la solución para desteñir, durante una hora, cambiando la solución en repetidas ocasiones. Con esto se obtienen geles en donde se encuentran proteínas y polipéptidos separados por su peso molecular.