



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO EL HOMBRE Y SU AMBIENTE
LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

INFORME FINAL DE SERVICIO SOCIAL POR ACTIVIDADES RELACIONADAS
CON LA PROFESIÓN

**Apoyo a las actividades de investigación sobre la
expresión de genes de respuesta inmune y estrés
oxidativo en *Carassius auratus* cultivado en biofloc**

QUE PRESENTA LA ALUMNA

Karla Fernanda Mejia Aguilar

Matrícula

219203506

ASESORES

Dra. María del Carmen Monroy Dosta- UAM XOCHIMILCO

Núm. económico 28906

Dr. José Antonio Mata Sotres- UAM XOCHIMILCO

Núm. Económico 44314

Resumen

El objetivo de este proyecto fue evaluar la expresión de genes de estrés oxidativo: Catalasa (CAT), glutatión peroxidasas (GPX) y superóxido dismutasa (SOD) y de respuesta inmune: Interleucina (IL), proteína de choque térmico (HSP) y factor de necrosis tumoral (TNF), en el pez *Carassius auratus* cultivado en biofloc. Se obtuvieron 90 peces *C. auratus* que fueron distribuidos en nueve tinas de cultivo considerando tres tratamientos: Control (CTR), Biofloc con mezquite (MEZ) y Biofloc con avena (AVE) por triplicado. Los peces fueron alimentados con una dieta comercial para la especie, a razón del 7% de su biomasa durante un periodo de 30 días. Cada 15 días se obtuvieron los datos biométricos para evaluar la sobrevivencia y crecimiento, los parámetros fisicoquímicos del agua y los niveles de nitritos nitratos y amonio de las tinas de cultivo. Concluido el periodo experimental se obtuvieron muestras de hígado e intestino de donde fue extraído el ARN total utilizando el PureLink™ RNA Mini Kit (Invitrogen, USA), posteriormente se llevó a cabo la transcripción inversa de ADNc y la cuantificación relativa de los genes (qPCR) se calculó mediante el método $\Delta\Delta CT$.

Los resultados obtenidos en hígado mostraron diferencias significativas en la expresión de genes de respuesta inmune en los tratamientos, aunque la mayor expresión de IL y HSP se obtuvieron en mezquite, mientras que en el control se dio la mayor expresión de TNF. En intestino la mayor expresión de IL, TNF y HSP, se observó en avena. En el caso estrés oxidativo en hígado, también se observaron diferencias significativas entre los tratamientos. Sin embargo, la mayor expresión para SOD y GPX se presentó en mezquite y en el control fue para CAT. Con relación al intestino la mayor expresión de GPX se observó en avena y para mezquite SOD y CAT.

Palabras clave:

Expresión de genes, enzimas, proteínas, respuesta inmune, antioxidantes.

Índice

1. Introducción	4
2. Ubicación geográfica	5
3. Marco institucional.....	6
4. Objetivo de las actividades realizadas	7
5. Descripción específica de las actividades realizadas.	7
• 5.1 Instalación de las tinas de cultivo	7
• 5.3 Mantenimiento de la BFT	7
• 5.4 Obtención de muestras	8
• 5.5 Expresión.....	8
• 5.7 Análisis estadístico	9
6. Descripción del vínculo de las actividades con los objetivos de formación del plan de estudios	12
7. Referencias	13

1. Introducción

Actualmente en México, la producción acuícola ornamental se practica en 23 estados, donde los principales representantes son Nayarit, Jalisco, Veracruz, Yucatán y Morelos, siendo este último el estado con mayor producción de peces, en donde el 70% de la producción es exportada (SADER, 2022). No obstante, el sector acuícola del país aún enfrenta obstáculos en su desarrollo, donde se incluye el costo de insumos, bajas tasas de crecimiento, alta mortalidad, contaminación de los mares, ríos y esteros donde se desarrolla el cultivo a causa de la descarga de aguas derivado de los recambios y el hacinamiento de los peces que compromete su sistema inmune (CMDRS, 2019). Por lo que es necesario el desarrollo de sistemas eficientes, sostenibles y de menor impacto ambiental (Hernández-Mancipe, *et al.*, 2019).

En los últimos años, la tecnología de biofloculos (BFT, por sus siglas en inglés) se ha utilizado como una alternativa sostenible en el cultivo de peces, ya que se trata de un sistema de cultivo de bajo costo, que no requiere recambios de agua y contribuye a la inmunidad de los organismos acuáticos (Ochoa-Hernández, *et al.*, 2023). En la implementación del sistema, se ha comprobado que adicionar fuentes de carbono mejora la eliminación del amoníaco, al promover el crecimiento de bacterias heterótrofas que se encargan de transformar dicho elemento, a formas menos tóxicas sin la necesidad de recambios de agua. Al respecto, diversas investigaciones han utilizado melaza, azúcares, fuentes de fibra, cereales y glicerol para elevar la relación carbono nitrógeno necesaria para la funcionalidad de estos sistemas (Hargreaves, 2006).

De acuerdo con (Mugwanya, *et al.*, 2021) la BFT es un sistema inmunoestimulante debido a que las bacterias presentes en el sistema promueven la activación del sistema inmune con un incremento de macrófagos, neutrófilos y eosinófilo que proveen protección contra microorganismos patógenos. La bioseguridad que ofrece el sistema también se debe al mínimo recambio de agua que limita el ingreso de virus, bacterias y hongos al sistema (Ahmad, *et al.*, 2017).

Por otro lado, es importante considerar que los peces cultivados se encuentran en estrés constante por las variaciones ambientales y el manejo continuo, lo que puede

afectar su estado de bienestar. En el caso específico del estrés oxidativo, se trata de un desequilibrio entre la formación de radicales libres que afectan las membranas celulares e incrementa la superoxidación lipídica y la capacidad antioxidante del organismo (Córdova, *et al.*, 2018).

Si bien en los últimos años se ha documentado de manera significativa sobre los beneficios de uso de la BFT en el cultivo de los peces, donde se ha determinado una mejora en el crecimiento, la supervivencia y el control de enfermedades, existen pocos estudios que comprueben estos beneficios, a través de la expresión de genes de respuesta inmune y estrés oxidativo, lo que permitiría tener un panorama más amplio de los procesos fisiológicos que los peces están llevando a cabo. Por lo que el objetivo de este estudio es determinar la expresión de genes de estrés oxidativo a partir de la expresión de las enzimas catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPX) y superóxido dismutasa (SOD) (García-Triana, *et al.*, 1995) y la expresión de genes de respuesta inmune mediante la interleucina (IL), factor de necrosis tumoral (TNF) y proteínas de choque térmico (HSP) que pueden servir como indicadores para comparar el bienestar de los organismos cultivados en un sistema convencional y en un sistema biofloc.

2. Ubicación geográfica

Las actividades del servicio social se realizaron en el laboratorio de Análisis Químico de Alimento Vivo, que se encuentra ubicado en el edificio W perteneciente a la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco, localizada en Calzada del Hueso 1100, Coapa, Col. Villa Quietud, Delegación Coyoacán, C.P. 04960, México, CDMX (Figura 1).

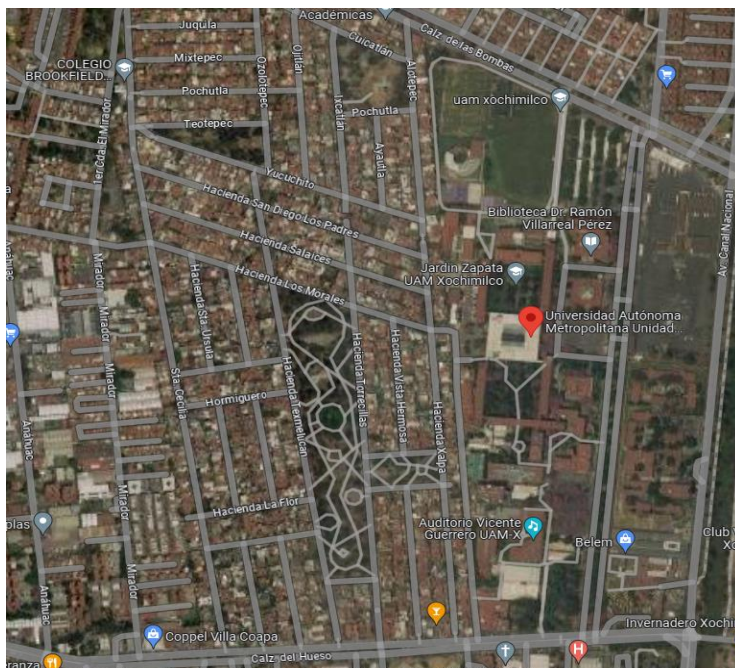


Figura 1. Ubicación de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco

3. Marco institucional

La Licenciatura en Biología de la UAM-Xochimilco se diseñó en 1974 por un grupo de profesores del Departamento El Hombre y su Ambiente, con un interesante y novedoso enfoque que respondía a la práctica emergente de la profesión: El manejo de los recursos naturales renovables. Las múltiples generaciones de biólogos egresados de este programa han demostrado el impacto social de este perfil profesional. El Plan de Estudios fue aprobado por el Colegio Académico en su sesión del 28 de julio de 1978, y actualizado en la sesión 217 del 19 de junio del 2000.

El objetivo general del Plan es “Formar profesionales creativos y críticos capaces de realizar actividades científicas para desarrollar y evaluar, con una perspectiva multidisciplinaria, estrategias de manejo de los recursos naturales bióticos con base en metodologías propias de las ciencias biológicas”.

4. Objetivo de las actividades realizadas

Evaluar la expresión de genes de respuesta inmune y estrés oxidativo en *Carassius auratus* cultivado en biofloc utilizando mezquite y avena como fuente de carbono.

5. Descripción específica de las actividades realizadas.



Figura 2. Instalación de tinas

- 5.1 Instalación de las tinas de cultivo

Se instalaron 9 tinas con 80 L de capacidad, con aireación constante, calentadores y una tapa para cubrir las durante las noches (Figura 2).

- 5.2 Obtención y cultivo de *Carassius auratus*

Se compraron 90 ejemplares de peces de la especie *Carassius auratus* en el mercado de Morelos, que

fueron trasladados al Laboratorio de Análisis Químico de Alimento Vivo (DEHA) en la UAM Xochimilco donde se aclimataron a una temperatura de 22°C por siete días. Posteriormente se distribuyeron de manera aleatoria 10 peces en cada una de las tinas previamente preparadas, considerando tres tratamientos por triplicado: Control (CTR), Biofloc con mezquite (MEZ) y biofloc con avena (AVE). Los peces fueron alimentados durante 30 días con alimento comercial para la especie a una proporción del 7% de su biomasa, dividida en dos raciones.

- 5.3 Mantenimiento de la BFT

El proceso de maduración del biofloc se llevó a cabo con una relación C:N (20:1) donde se adicionaron las harinas de avena y mezquite respectivamente dos veces al día. La cantidad de harina fue calculada a partir de la fórmula recomendada por Emerenciano, *et al.* (2012), ajustando cada 15 días conforme el crecimiento de los organismos.

- 5.4 Obtención de muestras

Para la toma de muestras de hígado e intestino se sacrificaron tres peces al azar por cada unidad experimental. La eutanasia de los organismos se realizó tomando en cuenta el manual para eutanasia en animales de AVMA (2020). Cabe especificar que para el intestino se tomó la parte proximal más cercana al poro anal. Las muestras fueron preservadas en ARNLater en tubos eppendorf para los análisis moleculares, por lo cual se realizó un pull de los tejidos correspondientes (Figura 3).



Figura 3. Toma de muestras de intestino e hígado.

- 5.5 Expresión

El ARN total se extrajo de cada tejido utilizando el PureLink™ RNA Mini Kit (Invitrogen, USA) de acuerdo con el manual del fabricante. La cantidad y calidad del ARN se midió mediante electroforesis en gel, así como espectrofotometría (Eppendorf BioPhotometer, Alemania).

Posteriormente 500 ng de ARN, se transcribieron inversamente en una reacción de 20 μ L utilizando el kit de transcripción inversa de ADNc de alta capacidad (Applied Biosystems; USA) en un termociclador MyCycler™ (Bio-Rad, USA). El programa de transcripción inversa consistió en 10 min a 25 °C, 120 min a 37 °C, 5 min a 85 °C y, finalmente, se mantuvo a 4 °C. Las reacciones de qPCR se realizaron con un ng de

ADNc, cebadores en sentido y antisentido (200 nM cada uno y SYBR® Select Master Mix (Applied Biosystems, USA).

La cuantificación relativa de los genes (qPCR) se calculó mediante el método $\Delta\Delta CT$ (Livak y Schmittgen, 2001), utilizando un umbral automatizado y una línea de base móvil para determinar los valores de CT. Las condiciones de la PCR fueron: un paso inicial de desnaturalización y activación de la polimerasa durante 10 min a 95 °C; 40 ciclos de desnaturalización durante 15 s a 95 °C, y extensión durante 45 s a 60 °C; finalmente, una curva de fusión de 60 °C a 95 °C durante 20 min para comprobar si existen artefactos de dímeros en los cebadores (Rotor-Gene 6000, USA). Las condiciones de optimización de qPCR se realizaron en función de la temperatura de recorrido del cebador (60 °C), la concentración del cebador (200 nM) y la concentración del molde (cinco series de dilución 1:10 por triplicado de 10 ng a 1 pg de ARN). Se utilizó β -actina (actb) como gen de referencia interno.

- 5.7 Análisis estadístico

Con el fin de identificar las posibles diferencias significativas entre los tratamientos, se realizó estadística descriptiva, en el caso de cumplir con las premisas de Normalidad, se realizaron pruebas de ANOVA. En caso de encontrarse diferencias significativas ($P < 0.05$), se realizó una prueba de Tukey, con ayuda del programa STATISTICA y se graficaron los resultados en el programa SigmaPlot.

- 5.8 Resultados de las actividades desarrolladas durante el servicio social.

En el hígado se observaron diferencias significativas en las enzimas superóxido dismutasa (SOD) con una $p = 0.32$, glutatión peroxidasa (GPX) con una $p = 0.009$ para el tratamiento con mezquite, mientras que en el control fue para catalasa (CAT) con una $p = 0.004$. En el caso de las proteínas interleucina y de choque térmico se observaron diferencias significativas con un valor de $p = 0.001$ y $p = 0.0003$ respectivamente para el tratamiento con mezquite. Por último, para el factor de

necrosis tumoral (TNF) no se obtuvieron diferencias significativas entre tratamientos con una $p=0.239$ (Figura 4).

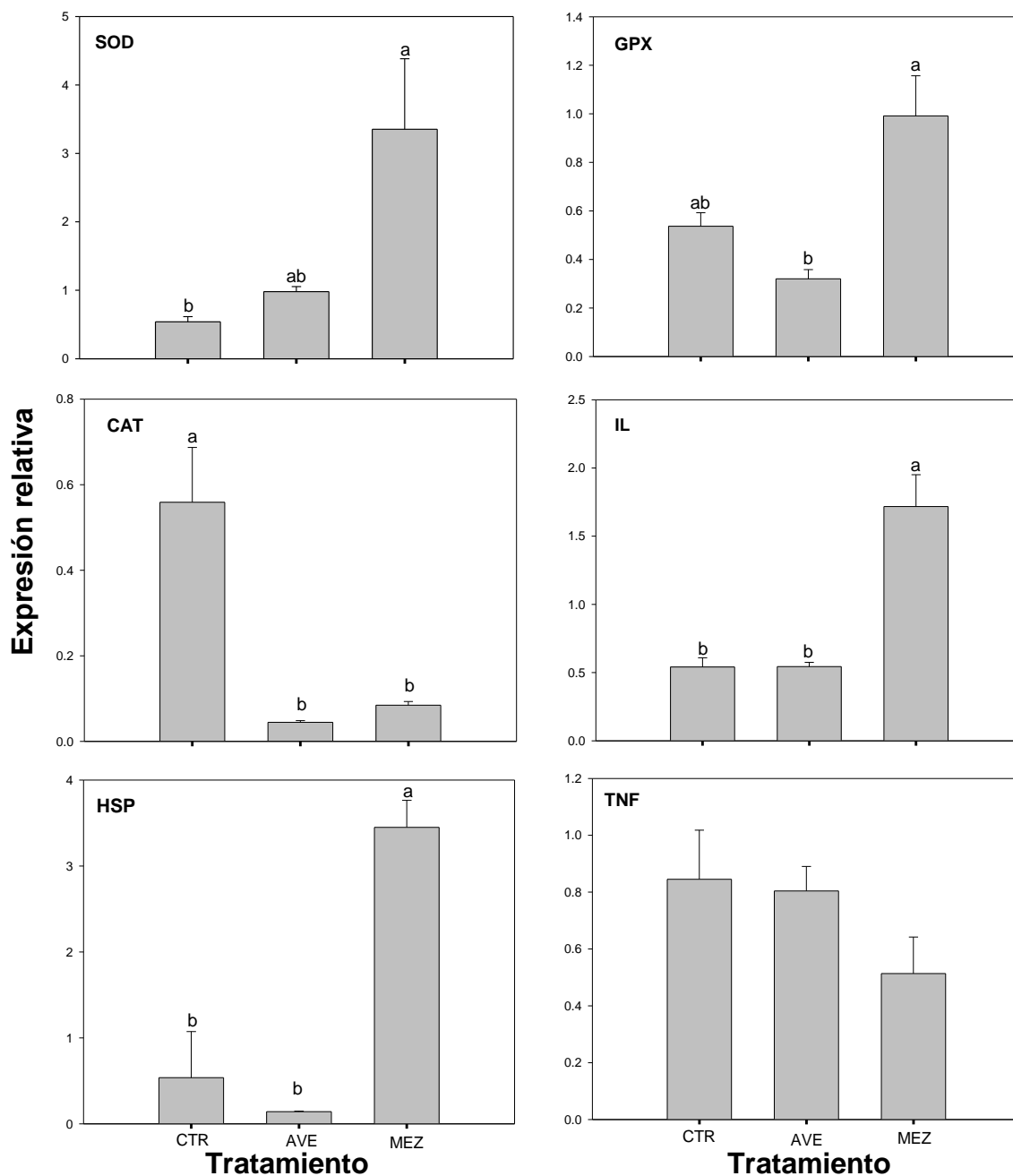


Figura 4: Resultados de los análisis moleculares para las muestras de hígado

En el caso de los resultados para intestino, CAT fue el único que no presentó diferencias significativas con una p de 0.116, el resto presentaron diferencias

significativas, SOD $p=0.003$, GPX $p=0.004$, IL $p=0.0004$, HSP con una p de 0.002 y por último TNF que resultó en una p de 0.02 (Figura 5)

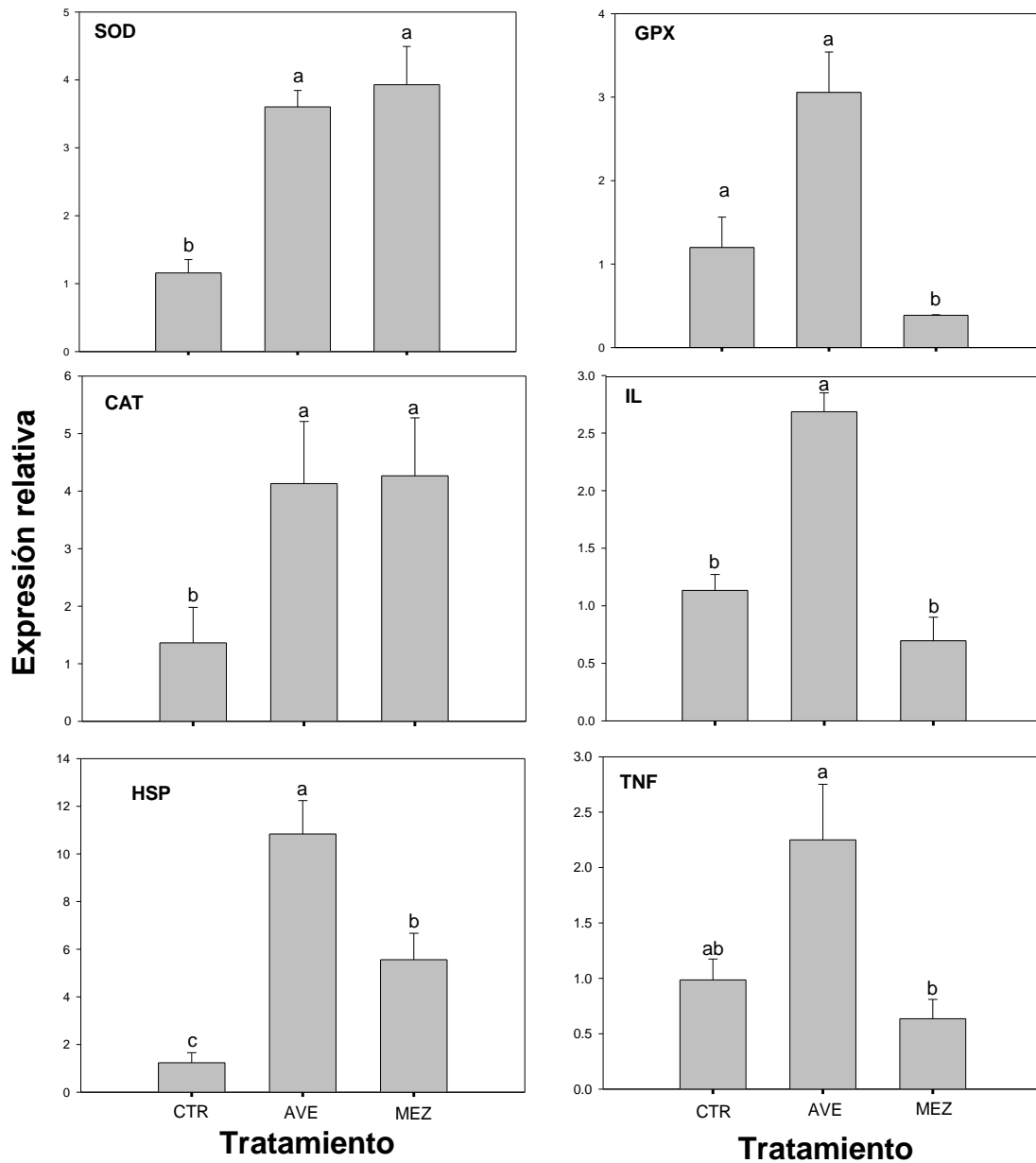


Figura 5. Resultados de las pruebas moleculares para las muestras de intestino

6. Descripción del vínculo de las actividades con los objetivos de formación del plan de estudios

Las actividades realizadas sobre la expresión de genes de respuesta inmune y estrés oxidativo me permitieron poner en práctica los conocimientos del módulo de procesos celulares fundamentales donde se evalúa la importancia de la respuesta inmunitaria en la preservación de la salud de los individuos, además, puse en práctica los conocimientos del módulo de producción secundaria, al cultivar a *Carassius auratus*.

7. Referencias

- Ahmad, I., Babitha Rani, A. M., Verma, A. K., & Maqsood, M. (2017). Biofloc technology: an emerging avenue in aquatic animal healthcare and nutrition. *Aquaculture International: Journal of the European Aquaculture Society*, 25(3), 1215-1226. <https://doi.org/10.1007/s10499-016-0108-8>
- Aladro, L. M. (2009). *Manual de prácticas de laboratorio de protozoos*. Prensas de Ciencias.
- AVMA (Animal Veterinary Medical Assosiation). (2020). *Manual para la eutanasia en animales*. <https://olaw.nih.gov/policies-laws/avma-guidelines-2020.htm>
- Córdova, A. Guerra, J. Iglesias, A. y Rodríguez, B. (2018). *Estrés oxidativo y antioxidantes en animales (1.ª ed.)*. Universidad Autónoma Metropolitana. <https://casadelibrosabiertos.uam.mx/gpd-estres-oxidativo-y-antioxidantes-en-animales.html>
- Consejo Mexicano para el Desarrollo Rural Sustentable (CMDRS). (2018). *Propuestas de políticas públicas para el desarrollo rural sustentable* Centro de Investigación y Desarrollo Costero. (pp. 7-11).
- Emerenciano, M., Ballester, E. L. C., Cavalli, R. O., & Wasielesky, W. (2012). Biofloc technology application as a food source in a limited water exchange nursery system for pink shrimp *Farfantepenaeus brasiliensis* (Latreille, 1817): BFT as a food source for *F. brasiliensis*. *Aquaculture Research*, 43(3), 447-457. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2011.02848.x>
- García-Triana, B., García Morales, O. H., H. S., Rodes Fernández, L., & García Piñeiro, C. (1995). Enzimas que participan como barreras fisiológicas para eliminar los radicales libres: I. Superóxido dismutasas. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 14(1). <https://www.imbiomed.com.mx/articulo.php?id=25675>
- Hargreaves, J. A. (2006). Photosynthetic suspended-growth systems in aquaculture. *Aquaculture Engineering*, 34(3), 344-363. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2005.08.009>
- Hernández Mancipe, L. E., Londoño Velez, J. I., Hernández García, K. A., & Torres Hernández, L. C. (2019). Los sistemas biofloc: una estrategia eficiente en la

producción acuícola. CES medicina veterinaria y zootecnia, 14(1), 70-99.
<https://doi.org/10.21615/cesmvz.14.1.6>

Mugwanya, M., Dawood, M. A. O., Kimera, F., & Sewilam, H. (2021). Biofloc systems for sustainable production of economically important aquatic species: A review. Sustainability, 13(13), 7255. <https://doi.org/10.3390/su13137255>

Ochoa-Hernández, M. E., Villanueva-Gutiérrez, E., Martínez-Córdova, L. R., & Calderón Alvarado, K. del C. (2023). Tecnología de Bioflóculos: Un camino hacia la acuicultura sustentable. Epistemus, 17(34).
<https://doi.org/10.36790/epistemus.v17i34.282>

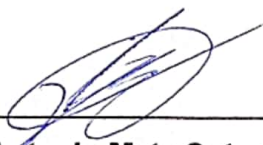
SADER. (2022). Acuicultura en México. Producción Acuícola. Recuperado 20 Agosto 2024 de, <https://www.gob.mx/agricultura/articulos/acuicultura-en-mexico#:~:text=La%20producci%C3%B3n%20acu%C3%ADcola%20en%20M%C3%A9xico,los%20cuales%20el%2070%25%20de>

Visto bueno de los asesores

ASESORES



Asesor interno. Dra. María del Carmen Monroy Dosta- UAM XOCHIMILCO
Núm. económico 28906



Asesor externo. Dr. José Antonio Mata Sotres- UAM XOCHIMILCO
Núm. Económico 44314

Alumna



Karla Fernanda Mejia Aguilar
Matrícula 219203506