Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A. C.

EFECTO DIETARIO DEL EXTRACTO DE *Ulva clathrata* SOBRE PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS, INMUNOLÓGICOS Y CRECIMIENTO DE TILAPIA (*Oreochromis niloticus*).

Por:

M.V.Z. Petra del Rocío Quezada Rodríguez

Tesis aprobada por la:
UNIDAD MAZATLÁN
EN ACUICULTURA Y MANEJO AMBIENTAL

Como requisito parcial para obtener el grado de:
MAESTRÍA EN CIENCIAS

Mazatlán, Sinaloa Agosto de 2012

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para revisar la tesis de Petra del Rocío Quezada Rodríguez, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias, con especialidad en Acuícultura.

Dra. Emma Josefina Fajer Ávila

Directora de Tesis

Dra. Crisantema Hernández González

Dr. Pablo Almazán Rueda

Dra. Oscar Basilio del Río Zaragoza

DECLARACIÓN INTITUCIONAL

La información generada en esta tesis es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del director del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD).

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director de tesis.

_____

Dr. Ramón Pacheco Aguilar
Director General

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo prestado durante el posgrado.

Al Centro de Investigación en Alimentación y desarrollo, A.C. (CIAD).

A mi directora de tesis Dra. Emma Fajer Ávila le agradezco de manera muy especial por creer en este proyecto y apoyarlo; por su paciencia, dedicación, consejos y por los conocimientos que me transmitió durante este tiempo.

Dr. Oscar Basilio del Rio por su apoyo, su dedicación, sus aportaciones y consejos.

Dr. Pablo Almazán Rueda por sus comentarios, apoyo y revisión del trabajo.

A Biol. Rosa María Medina Guerrero y M en C Catherine Soler por su ayuda, sugerencias durante la realización del experimento.

A M. en C. Irma Eugenia Martínez Rodríguez por sus aportes y apoyo en la elaboración del extracto.

M en C. Israel Alfaro por su apoyo tan valioso en análisis químico del extracto.

Al laboratorio de Nutrición y alimentación, química y productividad acuática e histopatología por la ayuda brindada en los análisis químicos e histológicos. En especial a Blanca Teresa González Rodríguez, MC. Virginia Patricia Dominguez Jiménez, MC. Miguel Sánchez y M.C. Selene María Abad Rosales.

M en C. Gabriela Aguilar Zárate por su apoyo en la elaboración del extracto.

A I.B.Q. Cathy Lizbeth Valdez Domínguez por su ayuda en la realización de este trabajo.

Susana Rodríguez Covarrubias por su ayuda en la fase experimental y su apoyo.

A Cathy, Zu, Ury, Fátima, Citlallic, Jary, Tere, Daniel, Efrén, Martin, África, Alán, por todos esos momentos que compartimos y por ser como mi familia durante este tiempo.

DEDICATORIA

A ti que desde donde te encuentras vigilas mis pasos, a mis hermanos Rogelio, Irma Leticia, Brandon Bernardino y a mis Padres Irma Rodríguez Pérez y Bernardino Quezada Quezada.

Sobre la arena

Dijo un hombre a otro: -Con la marea alta, hace mucho tiempo, escribí con mi cayado unas líneas en la arena. Y la gente aún se detiene para leerlas y cuida mucho de que no se borren.

Y el otro hombre dijo: -Yo también escribí unas líneas en la arena, pero lo hice durante la marea baja. Y las olas del inmenso mar las borraron y breve fue su vida. Pero dime; ¿qué fue lo que tú escribiste?

Y el primer hombre respondió: -Escribí: Soy lo que soy. ¿Y tú, qué escribiste?

Y el otro hombre dijo: -Escribí: Soy sólo una gota de este mar inmenso.

FIN.

(Gibrán Jalil Gibrán)

CONTENIDO

Página

LISTA DE TABLAS……... x

LISTA DE FIGURAS……..……... xii

RESUMEN…… xv

ABSTRACT…….. xvii

1. INTRODUCCIÓN……... 1

1.1. Producción de Tilapia…….. 1

2. ANTECEDENTES……..……..……. 4

2.1. Hematología y Sistema Inmune de Peces……..... 4

2.2. Inmunoestimulantes…… 7

2.3. *Saccharomyces cerevisiae* en Tilapia…….. 11

2.4. Extractos de Plantas como Inmunoestimulantes en Tilapia……. 13

2.5. *Ulva clathrata*……... 16

3. JUSTIFICACIÓN…… 19

4. HIPÓTESIS……. 20

5. OBJETIVOS……... 20

5.1. General

5.2. Particulares

6. MATERIALES Y MÉTODOS……... 21

6.1. Elaboración del Extracto de *Ulva clathrata*……... 21

6.2. Aclimatación de los Peces……..... 21

6.3. Tratamientos a Evaluar……... 21

6.4. Diseño Experimental…….. 22

6.4.1. Experimento de Inmunoestimulación…….. 22

6.5. Toma de Muestras……...… 24

6.5.1. Química del Extracto……...… 24

6.5.2. Experimento de Inmunoestimulación…….. 24

6.6. Variables a Medir……..... 25

6.6.1. Química del Extracto…….. 25
6.6.2. Hematología y Sistema Inmune……... 25
6.6.3. Crecimiento…….. 26
6.7. Análisis Estadístico…….. 27
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN…… 28
7.1. Elaboración del Extracto de *Ulva clathrata*……... 28
7.2. Química del Extracto……... 28
7.2.1. Análisis Elemental Cuantitativo……. 28
7.2.2. Espectroscopia de infrarrojo por Transformada de Fourier (FTIR)…. 30
7.2.3. Modelos Tridimensionales de los Disacáridos Obtenidos en el Extracto……. 33
7.2.4. Resonancia Magnética Nuclear del Extracto (RMN)……. 36
7.3. Experimento de Inmunoestimulación…… 40
7.3.1. Parámetros de Calidad de Agua…….. 40
7.3.2. Hematología y Sistema Inmune…… 40
Hematocrito…….. 40
Hemoglobina……. 42
Eritrocitos Totales…… 43
Leucocitos Totales……... 45
Actividad fagocítica……. 47
Proteína Total……... 50
Globulina……... 52
Albúmina…….. 53
7.3.3. Duración del Efecto Hematológico y/o Inmunológico…… 54
7.3.4. Crecimiento…….. 54
Crecimiento y Ganancia de Peso…… 54
Consumo de Alimento y Supervivencia……. 55
Conversión Alimenticia, Crecimiento Específico y Eficiencia Alimenticia……. 56
7.3.5. Notas del Periodo Experimental…… 59
8. CONCLUSIONES…… 62

9. RECOMENDACIONES……. 63
10. LITERATURA CITADA……..... 64
11. ANEXOS……..... 77
11.1. Anexo 1: Elaboración del Extracto de *U. clathrata*…….. 77
11.2. Anexo 2: Desinfección de Tanques Experimentales……. 79
11.3. Anexo 3: Recuento de Eritrocitos (RBC) y Leucocitos Totales (WBC). 80
11.4. Anexo 4: Prueba de Fagocitosis…… 82
11.4.1. Porcentaje de Fagocitosis……. 84

LISTA DE TABLAS

No	Título	Página
1	Células y moléculas efectoras del sistema innato y adaptativo de vertebrados (Bayne y Gerwick, 2001)…….....	6
2	Clasificación de inmunoestimulantes según su origen……...	7
3	Inmunoestimulantes administrados en tilapia, vía, dosis, tiempo de exposición y efecto en el sistema inmune……	9
4	Levadura *Saccharomyces cerevisiae* o extractos de ella como inmunoestimulantes dietarios en tilapia, inclusión, tiempo de exposición, incremento en la respuesta inmune y mejoras en indicadores del crecimiento……..	12
5	Extractos de plantas con actividad inmunoestimulante administrados a tilapia vía oral, porcentaje de inclusión en la dieta, tiempo de exposición e incremento de los indicadores de respuesta inmune……	14
6	Polisacáridos extraídos de macroalgas e incremento en la respuesta inmune……	16
7	Composición química de *U. clathrata* en co-cultivo con camarón blanco……..	17
8	Análisis elemental cuantitativo de harina de *U. clathrata*: valores calculados y valores observados……	28
9	Análisis elemental del extracto de *U. clathrata*: valores calculados y valores observados……...	29
10	Modelos tridimensionales de los disacáridos contenidos en el extracto…..	34
11	Resultados de Resonancia Magnética Nuclear del extracto de *U.clathrata*	37
12	Parámetros de calidad de agua durante el experimento……	40
13	Peso individual inicial, final y ganancia de peso individual de tilapia nilótica alimentada con diferentes niveles de extracto de *U. clathrata* y levadura (*S. cerevisiae*)……	55

14 Consumo total de alimento y supervivencia acumulada de tilapia nilótica alimentada con diferentes niveles de extracto de *U. clathrata* y levadura (*S. cerevisiae*)…….. 56

LISTA DE FIGURAS

No	Título	Página
1	Producción acuícola mundial: principales grupos de especies en 2008. Tomada de FAO, 2010……	1
2	Producción mundial de tilapia desde 1950 al 2009. Tomada de FAO 2009……	2
3	Disacáridos sulfatados de conforman el ulvan…….....	18
4	Esquema del sistema experimental de inmunoestimulación. Eu 0.1, Tratamiento Extracto Ulva 0.1%; Eu 0.5, tratamiento Extracto Ulva 0.5%; Eu 1, Tratamiento Extracto Ulva 1%; L, Tratamiento Levadura; C, control; R, reservorio; y Bomba…….	23
5	Cámara de Neubauer. Zonas rojas conteo de eritrocitos y zonas azules conteo de leucocitos……	25
6	FTIR de la Harina de *U. clathrata* (a) y Extracto de *U. clathrata* (b)…	31
7	Espectro de Resonancia Magnética Nuclear del Extracto de *U.clathrata*……...	38
8	Porcentaje de hematocrito de *O. niloticus* alimentado con diferentes niveles de extracto de *U. clathrata* y levadura (*S. cerevisiae*)……..	41
9	Concentración de hemoglobina de *O. niloticus* alimentada con diferentes niveles de extracto de *U. clathrata* y levadura (*S. cerevisiae*)……..	43
10	Eritrocitos totales de *O.niloticus* alimentada con diferentes niveles de extracto de *U. clathrata* y levadura (*S. cerevisiae*)……	44
11	Leucocitos totales de *O. niloticus* alimentada con diferentes niveles de extracto de *U. clathrata* y levadura (*S. cerevisiae*)……	45
12	Actividad fagocítica de *O. niloticus* alimentada con diferentes niveles de extracto de *U. clathrata* y levadura (*S. cerevisiae*)……..	48

LISTA DE FIGURAS (CONTINUACIÓN)

13 Concentración de proteína sérica de *O. niloticus* alimentada con diferentes niveles de extracto de *U. clathrata* y levadura (*S. cerevisiae*)…….. 51

14 Concentración de globulina sérica de *O. niloticus* alimentada con diferentes niveles de extracto de *U. clathrata* y levadura (*S. cerevisiae*)……. 52

15 Concentración de albúmina sérica de *O. niloticus* alimentada con diferentes niveles de extracto de *U. clathrata* y levadura (*S. cerevisiae*)…….. 53

16 Tasa de Conversión Alimenticia y de Crecimiento Específico de *O. niloticus* alimentada con diferentes niveles de extracto de *U. clathrata* y levadura (*S. cerevisiae*)…… 57

17 Tasa de Eficiencia Alimenticia de *O. niloticus* alimentada con diferentes niveles de extracto de *U. clathrata* y levadura (*S. cerevisiae*)…… 58

18 Hallazgos a la necropsia. a) Tumefacción y hemorragia del tracto intestinal de los peces con EU 0.1%, b) Tracto gastrointestinal de los peces control, c) Tracto gastrointestinal hemorrágico de los peces con EU 0.1%, d) Tracto gastrointestinal de los peces control.. 59

19 Corte histológico de intestino anterior (tinción HE). A intestino normal con definición clara de serosa (s), muscular transversal (mt), muscular longitudinal (ml), submucosa (sb) y epitelio (e).B acercamiento a epitelio de intestino normal. C intestino lesionado sin distinción de capas histológicas. D acercamiento a la mucosa de intestino lesionado. E acercamiento a muscular y serosa de intestino lesionado…… 60

20 Extracto sólido de U. clathrata……. 78

21 Orden propuesto para el recuento de células en las celdas de

hemocitómetro……. 81

22 Realización de un frotis sanguíneo……. 83
23 Identificación de secciones de un frotis sanguíneo……. 84
24 Imágenes de fagocitos con microesferas fagocitadas o adheridas (marcadas con M)……. 84

RESÚMEN

Las prácticas de producción intensiva de tilapia ofrecen condiciones que favorecen la aparición de una amplia variedad de patógenos por lo que, se requiere potencializar la respuesta inmune inespecífica para disminuir la incidencia de enfermedades. La utilización de inmunoestimulantes dietarios de extractos de algas tales como *Ulva clathrata* es una opción promisoria en la prevención de enfermedades. En este estudio se elaboró y caracterizó químicamente un extracto sólido de *U. clathrata* (EU), macroalga verde producida por acuacultura. Se realizó el análisis elemental cuantitativo para determinar el contenido de carbono, hidrógeno, nitrógeno y azufre, Espectroscopía de Infrarrojo por Transformada de Fourier (FTIR) y Resonancia Magnética Nuclear (RMN) para la caracterización química del EU. El contenido de grupos sulfatos en el EU fue mayor que el obtenido por otras técnicas. Los polisacáridos presentes son semejantes a los que componen el ulvan de otras especies de *Ulva*, lo que se confirmó con la señal característica de la ramnosa del 1H-RMN. Los efectos de la administración oral de EU sobre la hematología, inmunología y crecimiento de tilapia nilótica *(Oreochromis niloticus)* fueron evaluados en un experimento de 90 días (60 de tratamiento con extracto+ 30 de suspensión). Se incorporaron 3 niveles de inclusión EU (0.1, 0.5 y 1%) a una dieta comercial, se incluyó un control positivo (levadura 2%) y un control negativo (0%).Quinientos cuarenta peces (25 ± 3g) se agruparon aleatoriamente en cinco tratamientos con tres réplicas. El hematocrito (HTC), hemoglobina (HGB), eritrocitos (RBC) y leucocitos totales (WBC), actividad fagocítica (AF), proteína total (PROT), globulina (GB) y albúmina (AL) se midieron cada 15 días. La ganancia de peso, tasa de crecimiento específico, tasa de conversión alimenticia, tasa de eficiencia alimenticia y supervivencia se determinaron al final del experimento. La inclusión de 0.5 y 1% EU presentó el mayor incremento en WBC a los 30 días y el mejor IF desde el día 15, cuyos niveles más altos fueron alcanzados a los 45 días. Estos efectos se mantuvieron hasta 15 días posteriores a la suspensión dietaria del extracto. EU 0.1% incrementó la ganancia de peso diario a los 90 días. Los resultados elucidan el

potencial del extracto de *U. clathrata* para activar algunos indicadores de la respuesta inmune innata en tilapia, particularmente bajo las condiciones de inmunosupresión previstas (manipulación).

ABSTRACT

Intensification of aquaculture has led to the development of favorable conditions for a variety of fish pathogens. Therefore is important to enhance the innate immune response by the dietary administration of immunostimulants. The use of algae extract like immunostimulants such as *Ulva clathrata* is the most promissory strategies to prevent fish diseases. In the present study, a solid extract of *U. clathrata* (EU), a green seaweed produced by aquaculture was elaborated. The chemical composition of a solid extract was determined by quantitative elemental analysis (carbon, hydrogen nitrogen and sulfur content were determinated), infrared Fourier transform spectroscopy (FTIR) and nuclear magnetic resonance. The soluble polysaccharides found in the EU are sulphated polysaccharides, similar to ulvan obtained from other *Ulva* species and confirmed by the 1H- NMR spectrum, where the characteristic signal for the rhamnose was present. The effects of orally administrated EU on hematology, immunology and growth performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus)* were evaluated in a 90-days feeding trial (60 days of treatment+30 days of suspension). EU was incorporated into the diets at 0.1, 0.5 and 1%, a negative control (0%) and a positive control of *Saccharomyces cerevisiae* (LEV 2%) were included. Five hundred and forty fish (25 ± 3g) were randomly distributed into five treatment groups with each of three replicates. Hematocrit (HTC), hemoglobin (HGB), red blood cells (RBC), white blood cells (WBC), phagocytic activity (PA), serum total protein (PROT), globulin (GB) and albumin (AL) were measured every fifteen days. Weight gain (WG), specific growth rate (SGR), feed efficiency rate (FER), feed conversion ratio (FCR) and survival rate were determinated at the end of feeding trial. At the day 30 a significant increase of WBC and PI was observed in EU 0.5 and 1% and the best PI levels were observed in 15 to 45 day. These effects were maintained for 15 days after the suspension of dietary EU. The SGR was significantly increased in EU 0.1% group after 90 days of feeding trial. These results elucidate the potencial of *U. clathrata* extract to activate some innate immune responses in Nile tilapia,

and particularly under immunodepression related to intensive culturing operations (crowding, transport, handling, grading). .

1. INTRODUCCIÓN.

1.1. Producción de Tilapia.

Si bien existen países con tradición acuícola ancestral, en el contexto mundial la acuicultura es un sector productor de alimentos relativamente joven y de rápido crecimiento. La producción acuícola mundial se ha incrementado de menos de 1 millón de toneladas por año en 1950 a 52.5 millones de toneladas en 2008, esta industria ha crecido a un ritmo tres veces mayor que la producción de otros alimentos como la carne (FAO, 2010). Los peces de agua dulce son el grupo que produce más toneladas por la acuacultura a nivel mundial, lo que se muestra en la figura 1.

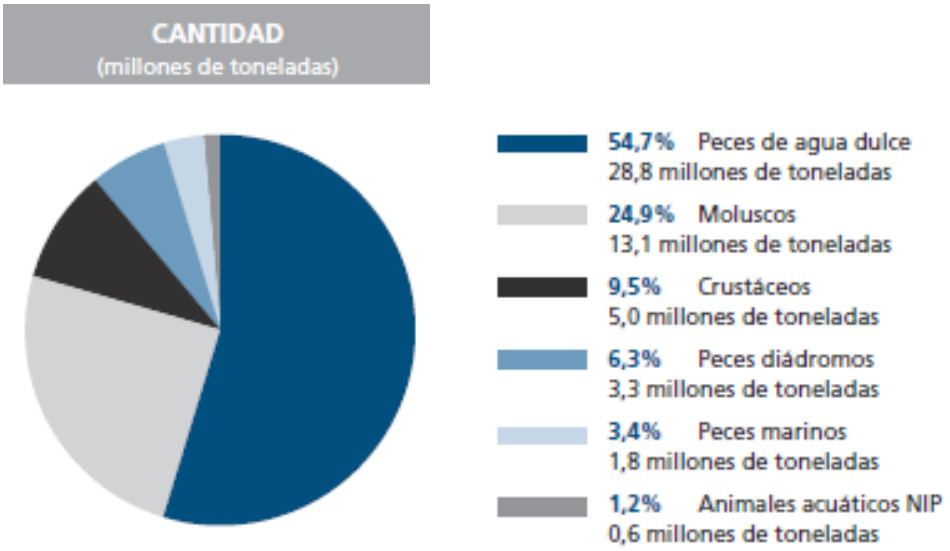


Figura 1. Producción acuícola mundial: principales grupos de especies en 2008. Tomada de FAO 2010.

La Tilapia (incluyendo todas las especies) constituye el segundo grupo más importante de peces cultivados, tras las especies de carpa. La producción mundial de tilapia se incrementó paulatinamente desde los años 50's a los 80's mientras que entre los 90's y principios del 2000, esta producción se mantuvo estable. Sin embargo, la producción mundial de tilapia ha ascendido de 1,5 millones de toneladas en 2003 a 2,5 millones de toneladas en 2010 (figura 2), con un valor de

venta superior a los 5 mil millones de USD. En ese año solo China produjo 1.3 millones de toneladas (FAO, 2012).

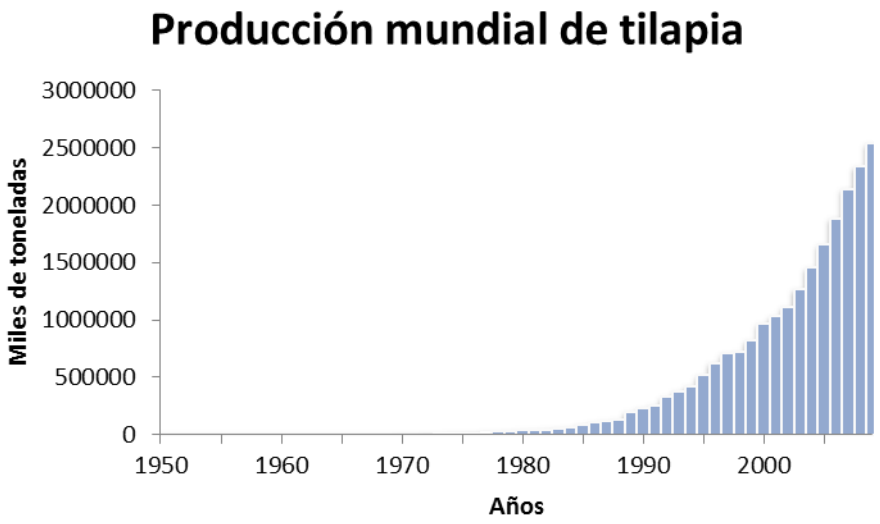


Figura 2. Producción mundial de tilapia desde 1950 al 2009. Tomada de FAO 2009.

En la actualidad el número de granjas de tilapia y sus volúmenes de producción en México se han incrementado hasta alcanzar la cifra de 76,986 toneladas en el 2010 (CONAPESCA, 2012). Sin embargo, la demanda de este recurso acuático requiere incrementar estos volúmenes de producción ya que en el mercado internacional, países como Estados Unidos, España, Francia y Alemania se han establecido como principales importadores de este recurso acuático (Globefish, FAO, 2012); por otro lado el mercado nacional, se ha mantenido estable. En lo que respecta a la producción nacional, los estados de Veracruz, Jalisco, Tamaulipas, Sinaloa y Nayarit ocupan del 1° al 5° lugar respectivamente como los principales estados productores de tilapia en México.

La tilapia ha sido considerada más tolerante que otros peces a condiciones ambientales desfavorables y otros factores estresantes. Estas cualidades de la especie íctica han facilitado su cultivo en densidades cada vez mayores y en sistemas de recirculación. Bajas densidades de tilapia cultivada en un ambiente óptimo, específicamente de temperatura, permanecen relativamente libre de enfermedades bacterianas o parasitarias. Sin embargo, las bajas temperaturas,

manejo inadecuado, pobre calidad del agua (oxígeno bajo, alto contenido de amonio, nitritos o CO_2, niveles de pH adversos) o altas densidades acompañadas de tasas de alimentación altas aumentan la susceptibilidad de estos peces a las infecciones. Se plantea que la disminución de la temperatura reduce la inmunidad y compromete la resistencia a las enfermedades, lo cual da lugar a una incidencia mayor de infecciones (Domínguez *et al*., 2005).

Los brotes de enfermedades en explotaciones acuícolas se pueden prevenir por medio de la utilización de compuestos que incrementan la resistencia natural de los peces a patógenos. A estos compuestos se les conoce como inmunoestimulantes.

A nivel mundial existe un gran interés por restringir el uso de medicamentos como antibióticos y otros químicos para tratar enfermedades en acuicultura, debido a que estas sustancias se acumulan en los tejidos el pez (lo cual representa un riesgo para la salud del consumidor), contaminan el medio ambiente afectando severamente a otros organismos y su costo es elevado (Cabello, 2006). Por eso, al mismo tiempo ha aumentado el afán de los investigadores para buscar compuestos naturales de menor costo, extraídos de plantas terrestres o acuáticas, que tengan algún efecto sobre la defensa del pez haciéndolo más resistente a enfermedades y con esto evitar el uso de antibióticos y sus desventajas.

2. ANTECEDENTES.

2.1. Hematología y Sistema Inmune de Peces

El análisis hematológico constituye una herramienta para evaluar la respuesta inmune innata, los componentes humorales que se examinan comúnmente son actividad de complemento, actividad de lisozima, proteínas totales, globulinas, proteínas de fase aguda, citocinas, mientras que los componentes celulares son los diferentes tipos de leucocitos (Kiron, 2012). Sin embargo, es necesario analizar otros componentes hematológicos pues son indicadores de salud de los organismos, tales como el porcentaje de hematocrito, los eritrocitos totales, la hemoglobina y la albúmina.

Los eritrocitos o glóbulos rojos llevan a cabo importantes funciones de trasporte de oxígeno y dióxido de carbono. La energía de los eritrocitos es destinada a mantener la forma celular, la estructura de la membrana, funciones enzimáticas, reducir hierro para la hemoglobina y otras funciones dirigidas a optimizar la oxigenación de los tejidos. Los glóbulos rojos están compuestos por 61% agua, 32% proteína (mayormente hemoglobina), 7% carbohidratos y 0.4% lípidos (Olver *et al*., 2010).

La evaluación de número y morfología de los glóbulos rojos es un paso crítico pues puede ser de gran ayuda para la identificación de distintas enfermedades metabólicas, indicar daño oxidativo o ayudar a identificar un proceso patológico (Olver *et al.*, 2010).

La hemoglobina es una molécula compuesta de una proteína de origen ribosomal denominada globina y otra proteína que contiene porfirina y hierro. Esta molécula ocupa un rol central en la función de los eritrocitos en la unión, trasporte y entrega de oxígeno en los tejidos. La hemoglobina se sintetiza dentro de los eritrocitos en desarrollo. También forma parte importante en el metabolismo del hierro y cuando existe deficiencia de hierro el contenido de hemoglobina desciende (Olver *et al.*, 2010).

El plasma contiene numerosas proteínas que mantienen la homeostasis dentro del cuerpo y responden a cambios medioambientales. Entre los componentes plasmáticos están las proteínas de coagulación (proteínas hemostáticas), albúminas e inmunoglobulinas (Brooks, 2010).

El suero sanguíneo se obtiene después de la coagulación de la sangre y las proteínas totales son de dos tipos: albúminas y globulinas.

La albúmina es la proteína de transporte de sustancias hidrofóbicas en el plasma sanguíneo. Mientras que las globulinas son un grupo muy amplio de proteínas que contiene a las inmunoglobulinas (Brooks, 2010).

Los leucocitos o glóbulos blancos son las células involucradas en el sistema inmune, pueden encontrarse en sangre circulante o en tejidos, en ocasiones forman complejos en los tejidos (centros melanomacrófagos). Los glóbulos blancos se clasifican de acuerdo a su morfología y se distinguen varios tipos: los linfocitos, granulocitos y monocitos o macrófagos (Ellis, 1977).

El sistema inmune protege al organismo contra enfermedades por medio de la identificación y eliminación de patógenos y la supresión de tumores. Otro importante rol del sistema inmune es el de participar en el mantenimiento de la homeostasis durante el desarrollo y crecimiento de los organismos y después de un proceso inflamatorio o daño tisular. Clásicamente el sistema inmune se divide en dos el específico o adaptativo y el inespecífico o innato (Whyte, 2007; Magnadottir, 2010).

En comparación con el sistema inmune adaptativo en el cual sus células son los linfocitos y sus moléculas efectoras son las inmunoglobulinas, las células y moléculas efectoras del sistema inmune innato es mucho más diverso y su tiempo de reacción es más rápido pero de corta duración (Bayne y Gerwick, 2001), lo cual se muestra en la tabla 1.

Tabla 1. Células y moléculas efectoras del sistema innato y adaptativo de vertebrados (Bayne y Gerwick, 2001).

	Adaptativo	Innato
Células	Células T y B	Células citotóxicas (NK), Monocitos/macrófagos, granulocitos (predominantemente neutrófilos
Tejidos	Linfoide	Hígado, bazo, pronefros
Reguladores	Citocínas	Citocínas
Componentes humorales	Inmunoglobulinas	Sistema de complemento, proteínas de coagulación, antiproteasas, proteínas de unión a metales, lectinas, lisozímas, péptidos antimicrobianos, opsoninas
Cinética	Lento	Rápido

Los mecanismos que componen la respuesta inmune inespecífica proveen protección al hospedero evitando la adhesión, invasión o multiplicación de patógenos, mediante diferentes tipos de barreras: las físicas (piel, branquias, intestino) humorales (el complemento, transferrinas, antiproteasas, hemolisinas, lisozimas, interferón, proteína C reactiva) y celulares (leucocitos, incluyendo macrófagos y neutrófilos) además del proceso de inflamación (Secombes, 1996).

Las células fagocíticas (macrófagos tisulares, monocitos circulantes y neutrófilos) desempeñan un importantísimo papel en la defensa del organismo, ya que son capaces de adherirse y destruir partículas extrañas por medio de la fagocitosis.

Los neutrófilos son la primera línea de defensa contra microrganismos invasores, trauma tisular o cualquier agente causante de inflamación. La capacidad de los neutrófilos para fagocitar y eliminar bacterias depende de la presencia de numerosos receptores de membrana, la subsecuente activación de la célula y de los gránulos citoplasmáticos (Nabity y Ramaiah, 2010).

Diversos estudios indican que la respuesta inmune en peces depende de la temperatura al ser organismos poiquilotermos, es decir que es efectiva sólo cuando la temperatura del agua está dentro de los límites vitales para cada especie (Domínguez *et al.*, 2005). Sin embargo el sistema inmune innato ha demostrado su capacidad de respuesta después de la administración de inmunoestimulantes aun cuando la temperatura ambiental no es la óptima para la

especie (Bagni *et al.*, 2005). Es por eso que algunos autores coinciden en que su sistema de defensa más efectivo contra antígenos es el innato o inespecífico, sin embargo, el sistema inmune inespecífico carece de memoria (Bayne, 2001).

Es por esto que la tendencia actual en la acuicultura es promover la homeostasis y resistencia a enfermedades mediante la administración profiláctica de inmunoestimulantes, particularmente bajo condiciones de inmunodepresión (condiciones medioambientales desfavorables para la especie, manipulación, trasporte, o época reproductiva). La acción de los inmunoestimulantes se basa en la modulación de uno o varios componentes del sistema inmune inespecífico al momento de expresar la respuesta inmune. Y su uso no debería tener algún efecto negativo sobre otros parámetros hematológicos.

2.2. Inmunoestimulantes.

Un inmunoestimulante puede definirse como un "compuesto natural que modula el sistema inmune aumentando la resistencia del hospedero contra las enfermedades que en la mayoría de los casos, son causados por patógenos" (Bricknell y Dalmo, 2005).

El término inmunoestimulante incluye una amplia variedad de sustancias que activan el sistema inmune a través proteínas receptoras de reconocimiento y por consecuencia aumentan la resistencia a enfermedades (Magnadottir, 2010). Los inmunoestimulantes pueden dividirse en varios grupos dependiendo de su origen en la tabla 2 se muestran algunos ejemplos.

Tabla 2. Clasificación de inmunoestimulantes según su origen.

Origen	Fuente	Ejemplo
Natural	Bacteriano	Peptidoglicanos, lipopolisacaridos. (Balcazar, et al. 2007)
	Extractos vegetales/ algas	Alginato, Kelp, spirulina, laminarían.
	Suplementos	Nucleótidos, Carotenoides, vitamina A, E, D.
Sintético	Levamisol, Ergosan ®, Aquabio 1®	

Existen distintas ventajas del uso de inmunoestimulantes sobre otros quimioterapéuticos en peces (Bricknell & Dalmo 2005). A continuación se mencionan las principales:

- Son baratos y fáciles de administrar a los peces.
- Representan menor riesgo en salud pública, ya que su aplicación profiláctica puede disminuir el uso de antibióticos en los peces.
- Se pueden administrar durante épocas en que la aparición de enfermedades es conocida o predecible, por ejemplo época de reproducción, manipulación, transporte.
- Promueve supervivencia y resistencia de los organismos al estrés o a las enfermedades.
- No se ha reportado la formación de resistencia de patógenos a los inmunoestimulantes.
- No representan riesgo para el medio ambiente.
- Los inmunoestimulantes son utilizados también como adyuvantes en formulaciones de vacunas con muy buena respuesta de anticuerpos.

A la fecha se conocen una gran variedad de inmunoestimulantes utilizados en diferentes especies de tilapia, en la tabla 3 se muestran algunos ejemplos.

Tabla 3. Inmunoestimulantes administrados en tilapia, vía, dosis, tiempo de exposición y efecto en el sistema inmune.

Especie	Imunoestimulante	Vía-Dosis – tiempo de exposición	Incremento en la respuesta inmune	Referencia
Orechromis sp.	Aquabio 1	Oral inmersión de larvas-0.01g L- 7 días	Lectinas, actividad de lisozima y antiproteasas	Martínez *et al*.,2006
Híbridos *Oreochromis*	Vitaminas antioxidantes (A,C y E) y minerales (Se, Zn,Cu, Mn y Fe)	Macrófagos in vitro- vitaminas 100µg mL y minerales 40-80µg mL-dosis única	Viabilidad celular y actividad de lisozima.	Hung *et al*.,2007a
Híbridos *Oreochromis*	Vitaminas antioxidantes (A,C y E) y minerales (Se, Zn,Cu, Mn y Fe)	Oral-0.1, 0.3 y 0.5% para vitaminas y 0.015% para minerales-120 días	Proliferación de macrófagos dependiente de la dosis, actividad de lisozima, fagocitosis, superóxido intracelular	Hung *et al*.,2007b
Oreochromis niloticus	Extracto de *Echinacea pupurea*	Oral-0.25 ppt-168 días	Leucocitos totales y actividad de lisozimay resistencia a *Pseudomonas fluorences*	Aly *et al*., 2008
O. niloticus	Boro y Extractos en polvo de plantas chinas (*Astragalus membranaceus* y *Lonicera japónica)*	Oral-0.05-0.1%-30 días	Estallido respiratorio, actividad fagocítica, lisozima plasmática, proteína total e inmunoglobulina.	Ardó *et al*., 2008
O. niloticus	Vitamina A	Oral- 1000UI Kg-70 días	Leucocitos totales y actividad del complemento resistencia a *Aeromona. hydrophila*.	Guo *et al.,* 2010
O. niloticus	Inulina y vitamina C	Oral-0.5 y 0.05%- 30 días	Adherencia de neutrófilos, estallido respiratorio y actividad de lisozima y resistencia a *Aeromona. hydrophila*	Ibrahem *et al*.,2010
Oreochromis mossambicus	Extracto acuoso caliente de hojas de un árbol (*Toona sinensis)*	Inyección-4-8µg g-dosis única	Estallido respiratorio, actividad fagocítica y de la lisozima, resistencia a *A. hydrophila*	Wu *et al*.,2010

Existen diferentes vías de administración de los inmunoestimulantes por inmersión, por inyección y oral en el alimento. Cada una de las vías tiene sus ventajas sobre las demás. Por ejemplo, la oral resulta la más práctica cuando se administra inmunoestimulantes en el alimento a peces juveniles o adultos, dado el tamaño de los peces y el manejo que implicaría administrar el inmunoestimulante por inyección (Galindo-Villegas y Hosokawa, 2004).

La absorción y velocidad del efecto de los inmunoestimulantes también depende de la vía de administración, en ese sentido, la vía por inyección presenta ventajas sobre la vía por inmersión u oral. Sin embargo se debe tener en cuenta que todas las vías de administración son útiles, pues depende del tipo de inmunoestimulante que se quiera administrar y el propósito (Galindo-Villegas y Hosokawa, 2004).

Los inmunoestimulantes administrados vía oral en el alimento son también conocidos como inmunoestimulantes dietarios, se incluyen en un porcentaje de la ración alimenticia de los peces y se administran por periodos relativamente largos (15 , 30 o más días), debido a que su absorción es variable y consecuentemente su efecto (Galindo-Villegas y Hosokawa, 2004).

En lo que respecta a la duración del efecto de inmunoestimulantes se conocen algunos reportes que coinciden en que algunos indicadores de inmunoestimulación vuelven a niveles del control hasta 30 días después de la suspensión del inmunoestimulante dietario (Bagni *et al*., 2005). Esto se debe a que la respuesta inmune innata es inmediata pero no prolongada ya que el efecto se pierde una vez que el compuesto inmunoestimulante se elimina del cuerpo del pez (Bayne y Gerwick, 2001).

Otros efectos deseables en la administración de inmunoestimulantes dietarios es que como promotores de la salud del organismo, proveen mejor crecimiento, supervivencia y ganancia de peso, es decir que su uso en peces se refleje en mejores indicadores de productividad: mejor consumo de alimento, mejor ganancia de peso, eficiencia alimenticia, tasa de conversión alimenticia, tasa de crecimiento específico.

El consumo del alimento aparente es un indicador de la aceptabilidad del inmunoestimulante dietario.

La ganancia de peso se calcula como sigue:

GP= Peso final-Peso inicial

Fórmula (1)

La eficiencia alimenticia aparente o tasa de eficiencia alimenticia (TEA), por otro lado determina la cantidad del alimento asimilada por un animal con relación a la consumida, es decir, el alimento que se transformó en peso corporal. Y cuya fórmula es la siguiente:

TEA (%)= (GP / alimento total consumido) x 100

Donde GP es la ganancia de peso

Fórmula (2)

Otro indicador que se utiliza para ver la cantidad de alimento requerido para crear una unidad de biomasa es el factor de conversión o Tasa de Conversión Alimenticia (TCA).

TCA= alimento administrado (peso seco)/ peso ganado (peso húmedo)

Formula (3)

Mientras que la tasa de crecimiento específico indica la ganancia de peso en relación a los días trascurridos de alimentación con el inmunoestimulante dietario.

TCE (%/día)= [(ln Peso final- ln Peso inicial)/número de días] x100

Donde ln es logaritmo natural

Fórmula (4)

2.3. *Saccharomyces cerevisiae* en Tilapia

La levadura del pan, *Saccharomyces cerevisiae* es un micro organismo unicelular, cuya composición es ampliamente conocida fenotípica y genotípicamente (Hatwell, 1974; Ho *et al.*, 2002)

La célula completa de la levadura y extractos de ella han sido utilizados con éxito como inmunoestimulantes (Siwicki *et al.*, 1994; Anderson *et al.*, 1995; Ortuño *et al.*, 2002; Abdel-Tawwab *et al.*, 2008; Andrews, 2009) y como promotores de crecimiento en diferentes especies de peces incluyendo a la tilapia (Oliva-Teles y Goncaves, 2001; Ortuño *et al.*, 2002; Lara-Flores *et al.*, 2003; Li, 2003, 2004, 2005; Reque, 2010; Tukmechi, 2011). En la tabla 4 se muestran reportes de levadura o extractos de ella usados en la dieta de tilapia, así como su nivel de inclusión, el incremento en la respuesta inmune y mejoras en los indicadores de crecimiento.

Tabla 4 Levadura *Saccharomyces cerevisiae* o extractos de ella como inmunoestimulantes dietarios en tilapia, inclusión, tiempo de exposición, incremento en la respuesta inmune y mejoras en indicadores del crecimiento. N.D. No determinado en el estudio.

Especie	Parte de *S.cerevisiae*	Inclusión-tiempo de exposición	Incremento en respuesta inmune	Mejoras en indicadores del crecimiento	Referencia
O.niloticus	Célula completa	10 y 20%-112 días	Proteína total, globulina, resistencia a *A.hydropila*	Mejor ganancia de peso, TCA y TCE	Hassan, 2007
O.niloticus	Célula completa	0.25 a 5%-84 días	Proteína total y globulina, actividad bactericida y resistencia a *A.hydropila* además incremento de eritrocitos, hemoglobina, hematocrito.	Mejor ganancia de peso, TCE, supervivencia, Consumo de alimento, TCA, tasa de eficiencia de proteína, utilización de proteína y utilización de energía.	Abdel-Tawwab *et al.,* 2008
O. niloticus	β-glucano y célula completa	0.1% y 1%-21 días	Transformación linfocitaria, actividad fagocítica, Leucocitos totales, actividad bactericida del suero óxido nítrico y resistencia a *A.hydropila*.	N.D.	El-Boshy *et al.*, 2010
O.niloticus	Célula completa y pared celular	2% y 0.3%-70 días	Aumento de leucocitos totales, Mejor respuesta inflamatoria, migración de leucocitos	N.D.	Reque *et al.*, 2010
O.niloticus	β-1,3/1,6 glucano	0.5 y 0.1%-14 días	Aumento de leucocitos totales, linfocitos y monocitos, aumento de actividad fagocítica	N.D.	Sahan y Duman, ,2010

De acuerdo a los antecedentes revisados sobre el uso de levadura en dietas de tilapia, se puede concluir que la inclusión de la célula completa en porcentaje superior al 1% es beneficiosa, ya que se observan efectos positivos tanto en indicadores de inmunoestimulación como de crecimiento para la especie.

2.4. Extractos de Plantas como Inmunoestimulantes en Tilapia

La búsqueda de métodos para la prevención de enfermedades ha encontrado en la herbolaria una estrategia prometedora para evitar que los peces se enfermen.

Se han elaborado algunos extractos de plantas que incrementan los mecanismos de defensa inespecífico (número de leucocitos, lisozima sérica, actividad fagocítica, proteína sérica, globulinas, respuesta inflamatoria) y la resistencia natural de la tilapia frente a algunos patógenos. Estos extractos se han administrado vía intraperitoneal a nivel experimental y vía oral a escala piloto (Gioacchini *et al*., 2008). En la tabla 5 se muestran los resultados del efecto dietario de extractos de plantas en tilapia sobre los principales indicadores de respuesta inmune para diferentes periodos de inclusión.

Adicionalmente a las plantas terrestres, las algas despiertan gran interés por ser una fuente natural de compuestos con actividad biológica que pueden utilizarse como ingredientes funcionales en dietas.

Las algas son organismos fotosintéticos con estructuras reproductivas simples. Este grupo está compuesto por un total de 25 a 30,000 especies, con una gran variedad de formas y tamaños, microalgas (algas unicelulares) y macroalgas (multicelulares). Algunas de ellas viven en condiciones ambientales cambiantes e incluso extremas por lo que son organismos que deben adaptarse para sobrevivir, debido a ello producen metabolitos que no se encuentran en otras plantas y que son bioactivos (Plaza *et al.*, 2008).

Tabla 5. Extractos de plantas con actividad inmunoestimulante administrados a tilapia vía oral, porcentaje de inclusión en la dieta, tiempo de exposición e incremento de los indicadores de respuesta inmune.

Especie	Extracto	Inclusión en dieta – tiempo de exposición	Incremento en respuesta inmune	Referencia
O.niloticus	Producto elaborado con *Astragalus radix y Scutellari radix*	0.1, 0.5, 1% - 30 días	Fagocitosis, lisozima y actividad de estallido respiratorio.	Yin *et al.*, 2006
O.niloticus	Producto acuoso elaborado con *Astragalus membranaceuss y Lonicera japonica*	0.1% - 30 días	Fagocitosis, lisozima, anticuerpos y resistencia a *Aeromona hydrophila.*	Yuan *et a*l., 2007
O. mossambicus	Extracto de lechuga (*Eclipta alba*)	0.1 a 1% - 21 días	Actividad de lisozima, producción de oxígeno reactivo y mieloperoxidasa, resistencia a *A. hydrophila*.	Christybapita *et al.,* 2007
O. niloticus	Extracto de *Laminaria japónica* (Laminarían)	0.1% - 21 días	Transformación linfocitaria, actividad fagocítica, recuento de linfocitos, actividad bactericida del suero, oxido nítrico y resistencia a *A. hydrophila*	El-Boshy *et al.*, 2010
O. mossambicus	Extracto de semilla en cloroformo de *Nyctanthes arbortristis*	0.01,0.1,1% - 21 días	Lisozima, complemento, meloperoxidasa y especies de oxígeno y nitrógeno reactivo. Resistencia a *A. hydrophila.*	Kirubakaran *et al.*, 2010
O. niloticus	Extracto de *L. japonica* y *Ganoderma lucidum*	0.5, 1% - 21 días	Fagocitosis, actividad de lisozima y resistencia *a A. Hydrophila.*	Mohamed y Abasali 2010a, 2010b
O. niloticus	Extracto acuoso de *Andrographis paniculata*	0.5,1, 1.5% - 30 días	Lisozima, fagocitosis y actividad del estallido respiratorio. Resistencia a *S. agalactie*	Rattanachaikunsopon y Phumkhachorn, 2009.
O. mossambicus	Extracto de *Cynodon dactylon y Zingiber officinale*	1% - 45 días	Fagocitosis y lisozima	Harikrishnan *et al.*, 2011
O. niloticus	Extracto de *Cratoxylum formosum*	0.5 a 1.5% - 45 días	Fagocitosis, estallido respiratorio y lisozima	Harikrishnan *et al.*, 2011

Las principales actividades biológicas que se han descrito para algunas algas incluyen las anticoagulantes (Ciancia *et al.*, 2010), anti-hiperlipidémicas (Pengzhan

et al., 2003), antivirales, antitumorales (Hiroishy *et al.*, 2001) y antioxidantes (Sathivel *et al.*, 2008).

Se han aislado otros componentes de las macroalgas que tienen actividad inmunoestimulante. El β-glucano obtenido de *Laminaria hyperborean* incrementa la actividad de macrófagos *in vitro* de salmón; los alginatos, presentes en algas pardas, inyectados vía intraperitoneal a trucha incrementan la actividad fagocítica, estallido respiratorio y expresión de citocinas en leucocitos periféricos (Peddie *et al*., 2002). Los polisacáridos de las macroalgas pueden también incrementar la resistencia de los peces a enfermedades, ya que carpas inyectadas vía intraperitoneal con carragenina obtenido de *Chondrus ocellatus* (alga roja) mostraron mayor resistencia a las bacterias *Edwarsiella tarda* y *Aeromonas hydrophilla.*

Se ha estudiado la composición de la pared celular de algunas algas y en distintos trabajos se identificaron algunas sustancias incluidos los extractos de polisacáridos como los responsables de la bioactividad de las algas, específicamente de su capacidad para estimular el sistema inmune (Costa, 2010). En la tabla 6 se muestran resultados de algunos estudios.

Castro y colaboradores en 2004 publicaron un trabajo sobre estimulación de macrófagos de rodaballo utilizando un extracto hidrosoluble de diferentes especies de algas verdes del género *Ulva* y *Enteromorpha*, dos años más tarde, los mismos autores reportaron las propiedades de los polisacáridos responsables de modular la función de los macrófagos del rodaballo en otro estudio *in vitro* (Castro *et al.*, 2006). Como éste, varios trabajos han mostrado evidencia de que los polisacáridos responsables de modular la respuesta inmune son el ulvan, el ácido urónico, la xilosa, la ramnosa y otros polisacáridos ácidos sulfatados (Leiro *et al.*, 2007)

Tabla 6. Polisacáridos extraídos de macroalgas e incremento en la respuesta inmune.

Polisacárido	Incremento en la respuesta inmune	Referencia
Alginato de sodio	Aumenta la migración linfocitaria y la actividad fagocítica además de resistencia en rodaballos infectados con *Vibrio anguillarum*	Skjermo *et al.*, 1995
Laminaran y β-glucano *Laminaria hyperborea*	Inmunomoduladores en macrófagos de salmón (*Salmo salar*)	Dalmo y Seljelid, 1995
Carragenina Algas rojas	Incremento de actividad fagocitaria y resistencia contra bacterias después de haber sido inyectada vía intraperitoneal en la carpa (*Cyprinus carpio*)	Fujiki *et al.*, 1997
Ácido algínico (Ergosan ®) Extraído de *Laminaria digitata y Ascophyllum nodosum*	Aumenta la producción de neutrófilos, fagocitosis expresión de interleucinas y estallido respiratorio en trucha arcoíris	Peddie *et al*., 2002
	Actividad del complemento, lisozima sérica en lubina (*Dicentarchus labrax*)	Bagni, *et al*., 2005
	Aumenta la expresión de citocinas (IL-1β, IL-8 y TNFα2) en Trucha arcoiris (*Onchorhynchus mykiss*).	Gioacchini, *et al*., 2008.
	Recuento de linfocitos en esturión beluga (*Huso huso*).	Jalali *et al.,* 2009.
	Aumento en conteo de linfocitos en trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*).	Heidarieh, y Reza 2012.
	Aumento de leucocitos, lisozima, proteasa, actividad antibacterial del mucus cutáneo, además mejor tasa de crecimiento específico y tasa de conversión alimenticia después de 45 días en trucha arcoíris.	Sheikzadeh *et al*., 2012

2.5. *Ulva clathrata*.

Ulva clathrata (antes conocida como *Enteromorpha clathrata*, ver Hayden *et al.*, 2003) o Ao-nori, es una macroalga verde de la familia Ulvaceae de distribución mundial.

Actualmente, esta macroalga verde es producida en Sinaloa, México por la empresa Aonori Aquafarms Incorporated con tecnología patentada en co-cultivo con camarón blanco (Moll, 2004 y Moll *et al.*, 2006).

Existen varios estudios que describen las características químicas de otras especies de *Ulva* provenientes de poblaciones naturales, zonas costeras y lagunas en todo ellos la composición es diferente de acuerdo a la distribución geográfica, la época del año y la calidad del agua (temperatura, salinidad, disponibilidad de nutrientes) (Yaich *et al.*, 2011). Sin embargo, Peña-Rodríguez y colaboradores en 2011 reportaron las características químicas de esta especie producida en co-cultivo con camarón; se muestran en la tabla 7.

Tabla 7. Composición química de *U. clathrata* en co-cultivo con camarón blanco.

Nutriente	Contenido
Proteína cruda	20-26%
Sacáridos: Rhamnosa Ácidos urónicos Xilosa Glucosa	 36-40% 27-29% 10-13% 10-16%
Fibra dietaria	41%
Ácidos grasos saturados	51%
Ácidos grasos polinsaturados	13%
Carotenoides	169mg/kg de peso seco
Minerales: Ca Fe Cu Zn As	 19 g/kg 4.2 g/kg 14 mg/Kg 17mg/kg 9 mg /kg

Por otro lado, Hernandez-Garibay y colaboradores en 2011 aislaron y caracterizaron los polisacáridos de *U. clathrata* producida en co-cultivo con camarón blanco; los autores encontraron que los polisacáridos solubles presentes en esta especie son polisacáridos sulfatados, y son los mismos disacáridos que forman parte del ulvan. Estos disacáridos son representados por modelos tridimensionales en la figura 3.

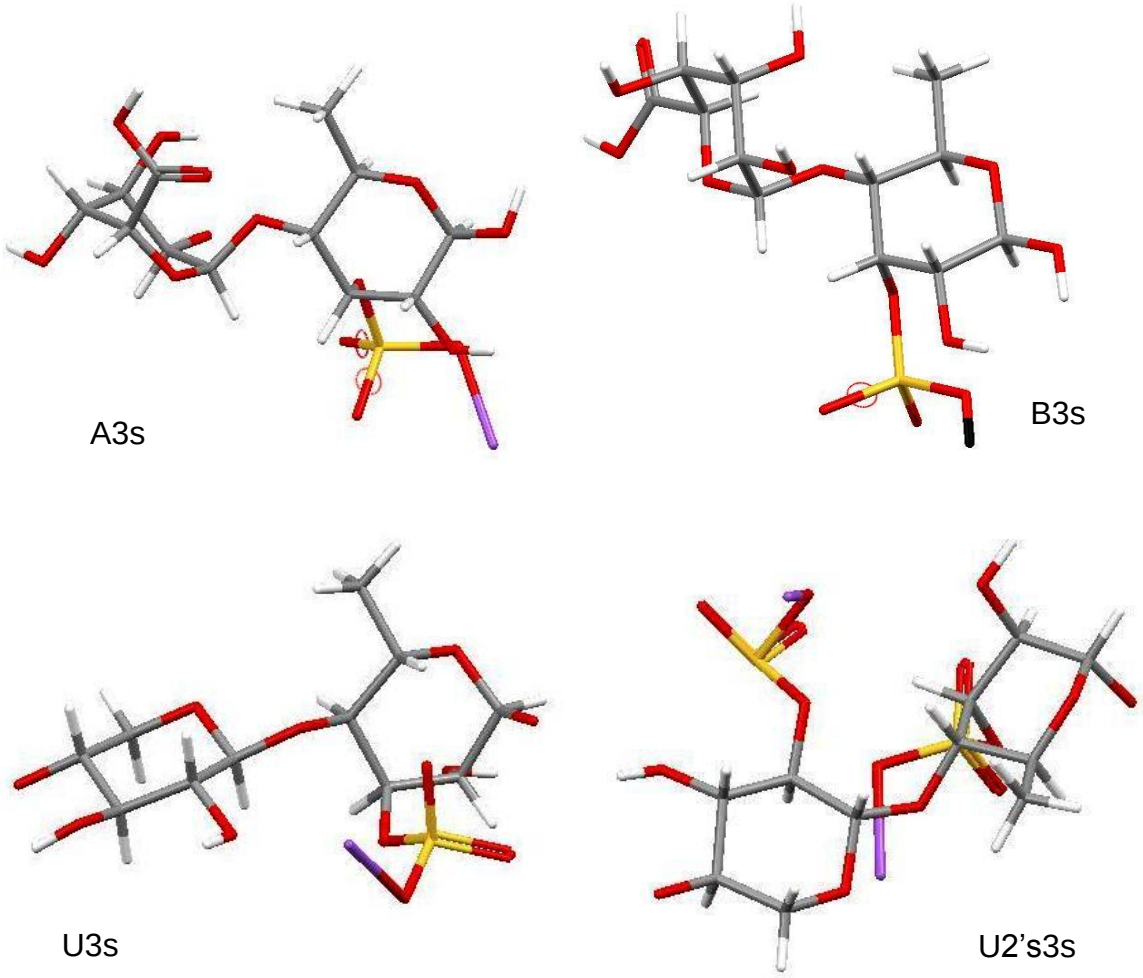


Figura 3. Disacáridos sulfatados que conforman el ulvan:
C **H** **O** **S** **Na**

El ulvan es el nombre con el que se conoce al conjunto de polisacáridos obtenidos de macro algas verdes del genero *Ulva* (Ray, 1995). Esta constituido principalmente por secuencias de disacáridos, rhamnosa sulfatada y ácido glucurónico, ácido idurónico o xilosa (Quemener *et al*., 1997). Los disacáridos que más se repiten en la composición del ulvan son ácidos aldobiurónicos designados como tipo A y tipo B: ácido ulvanobiurónico 3-sulfato (A3s) y ácido ulvanobiurónico 3-sulfato (B3s) respectivamente; y las ulvanobiosas de tipo U3s y U2’s3s (Lahaye, 2001).

3. JUSTIFICACIÓN

El empleo de antibióticos u otros quimioterapéuticos, para el tratamiento de enfermedades, presenta desventajas ya que, además de su elevado costo, implican ciertos riesgos pues crean resistencia en patógenos, riesgos para el consumidor y contaminan en medio ambiente. Además, para el caso de los que son inyectados o administrados oralmente, requieren de un tiempo de retiro lo que restringe la comercialización del producto para consumo humano (Jacobs y Chenia, 2007).

Las prácticas de producción intensiva de tilapia ofrecen condiciones que favorecen la aparición de una amplia variedad de patógenos es por esto, que se requiere potencializar la respuesta inmune inespecífica así como promover la homeostasis en los organismos juveniles de manera profiláctica para disminuir la incidencia de enfermedades.

Actualmente se considera que el manejo integral de organismos, instalaciones y prácticas de producción permiten la prevención de enfermedades, siendo esto más rentable que el uso de medicamentos para su control (Hakalahti-Sirén *et al.*, 2008). Por lo cual, la utilización de inmunoestimulantes dietarios es una opción promisoria en la prevención de enfermedades.

A pesar de que existe información sobre la actividad inmunoestimulante de extracto de ulva, los reportes son de estudios *in vitro* y en los estudios *in vivo* se administra por inyección intraperitoneal. Existe un producto comercial (Ergosan®) a base de algas que se administra en el alimento sin embargo es elaborado con algas pardas. No se conocen reportes de administración de extracto de *Ulva clathrata* en el alimento, no obstante es una macroalga producida por acuacultura en México, se destina principalmente a la elaboración de sushi o como ingrediente en dietas. Su uso como ingrediente en dietas no representa riesgo alguno para la salud (Peña-Rodríguez *et al*, 2011) y se ha demostrado que contiene sustancias

bioactivas (Hernández-Garibay *et al*, 2011) que pueden tener un efecto modulador en la respuesta del sistema inmune de los organismos.

4. HIPÓTESIS.

La adición de extracto de *Ulva clathrata* en la dieta de tilapia modificará los parámetros hematológicos, aumentará la respuesta inmunológica y el crecimiento.

5. OBJETIVOS.

5.1. General

Evaluar el efecto inmunoestimulante del extracto de *Ulva clathrata* adicionado en la dieta de tilapia (*Oreochromis niloticus*).

5.2. Particulares

Elaborar y analizar la composición química del extracto de *Ulva clathrata.*

Adicionar el extracto de ulva a la dieta comercial para tilapia

Analizar la respuesta hematológica de *O. niloticus* alimentada con diferentes niveles de inclusión del extracto de ulva en la dieta.

Evaluar los diferentes niveles de inclusión del extracto sobre la respuesta del sistema inmune.

Evaluar el tiempo de duración del efecto hematológico y/o inmunológico del extracto.

Evaluar la eficiencia del extracto de ulva en el crecimiento de la tilapia.

6. MATERIALES Y MÉTODOS.

6.1. Elaboración del Extracto de *Ulva clathrata*.

Ocho kilogramos de ulva deshidratada procedente de la empresa Aonori Aquafarms Inc. (antes: Sinaloa Seafields International), fueron pulverizados con un molino eléctrico (Rosk amp champion Mod.2975) hasta obtener un tamaño de partícula de 250µm en la planta de alimentos del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. (CIAD) Unidad Mazatlán en Acuicultura y Manejo Ambiental (Mazatlán, Sinaloa, México). El extracto se elaboró de acuerdo a la metodología de Hernández-Garibay *et al* (2011) que consiste en realizar una extracción ácida y precipitar los polisacáridos con alcohol, con una modificación sobre la forma de obtener el extracto en peso seco. La metodología completa se describe en el anexo 1.

6.2. Aclimatación de los Peces.

Se compraron 540 juveniles de *Oreochromis. niloticus* de 25±3g de peso (promedio ±desviación estándar) de la empresa Maricultura del Pacífico, provenientes del mismo lote de reproductores de la línea comercial Tecnopez. Los peces se trasladaron al Área de Bioensayos del Laboratorio de Parasitología del CIAD. Se mantuvieron en tanques de 400L con aeración constante, por un periodo de 10 días el cual se denomina periodo de aclimatación, durante el cual se les administró alimento comercial para tilapia (Purina®, 35% proteína cruda y 9% lípidos) dos veces al día a saciedad aparente. Se midieron los parámetros de oxígeno, temperatura y pH diariamente.

6.3. Tratamientos a Evaluar.

Se evaluaron como inmunoestimulantes: la levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) y el extracto de ulva (*Ulva clathrata*). La levadura (Levaduras y avios Azteca S.A. de C.V.) se utilizó como control positivo al 2% de inclusión en la dieta acorde a lo reportado por Reque *et al*. (2010) como el optimo efecto inmunoestimulante en *O.*

niloticus. La levadura se compró en el supermercado y se adicionó a la dieta como se describe en párrafos subsecuentes.

Se evaluaron cinco tratamientos compuestos por la dieta basal (Purina® de 35% de proteína cruda y 9% de lípidos) a los que se les adicionó el extracto de ulva en tres diferentes concentraciones (EU): EU 0.1%, EU 0.5%, EU 1%. El porcentaje de levadura (LEV) óptimo (2%) como el control positivo y el control negativo sin inmunoestimulante (C). La dieta basal se pulverizó utilizando un molino eléctrico de martillos (Roskamp, Waterloo, I.A.), se mezcló con una batidora (Holbat,), se adicionó la levadura o extracto de ulva y se formaron pellets de tamaño uniforme (1.5 mm) con ayuda de un molino de carne (Torrey M22R2). Los pellets se secaron en desecador de aire forzado a 40ºC por 12 horas, se empacaron en bolsas de plástico y se mantuvieron a 3°C hasta su uso.

6.4. Diseño Experimental.

6.4.1. Experimento de Inmunoestimulación.

Se lavaron y desinfectaron las instalaciones y equipos de la sala de bioensayo como se describe en el anexo 2.

Se distribuyeron 540 peces, 36 peces por tanque, en 5 tratamientos por triplicado, lo cuales se distribuyeron aleatoriamente. El sistema de tanques utilizado fue de circulación cerrada con recambios del 20% de volumen total de cada tanque cada tercer día. Consistió en 15 tanques de 400 L y un reservorio de agua, como lo muestra la figura 1. El agua se obtuvo de la red municipal y se decloró por medio de aireación dentro de un reservorio por 24 horas posteriormente fue bombeada a los tanques. La aireación en el sistema se mantuvo permanente y se realizó un recambio del 20% del volumen total de agua en todos los tanques cada 48 horas.

El oxígeno disuelto y temperatura fueron medidos diariamente mientras que el pH se midió cada semana. Y el amonio se determinó a las 72 horas sin remplazo de agua para asegurar que bajo este manejo del sistema, los niveles se mantuvieran por debajo de los limites máximos para la especie.

Durante el experimento se alimentó a los peces dos veces al día (9:00 y 15:00 horas) a saciedad aparente por un periodo de 60 días con las dietas experimentales luego se suspendió la administración de los inmunoestimulante y se continuó administrando la dieta C (0%) por otros 30 días.

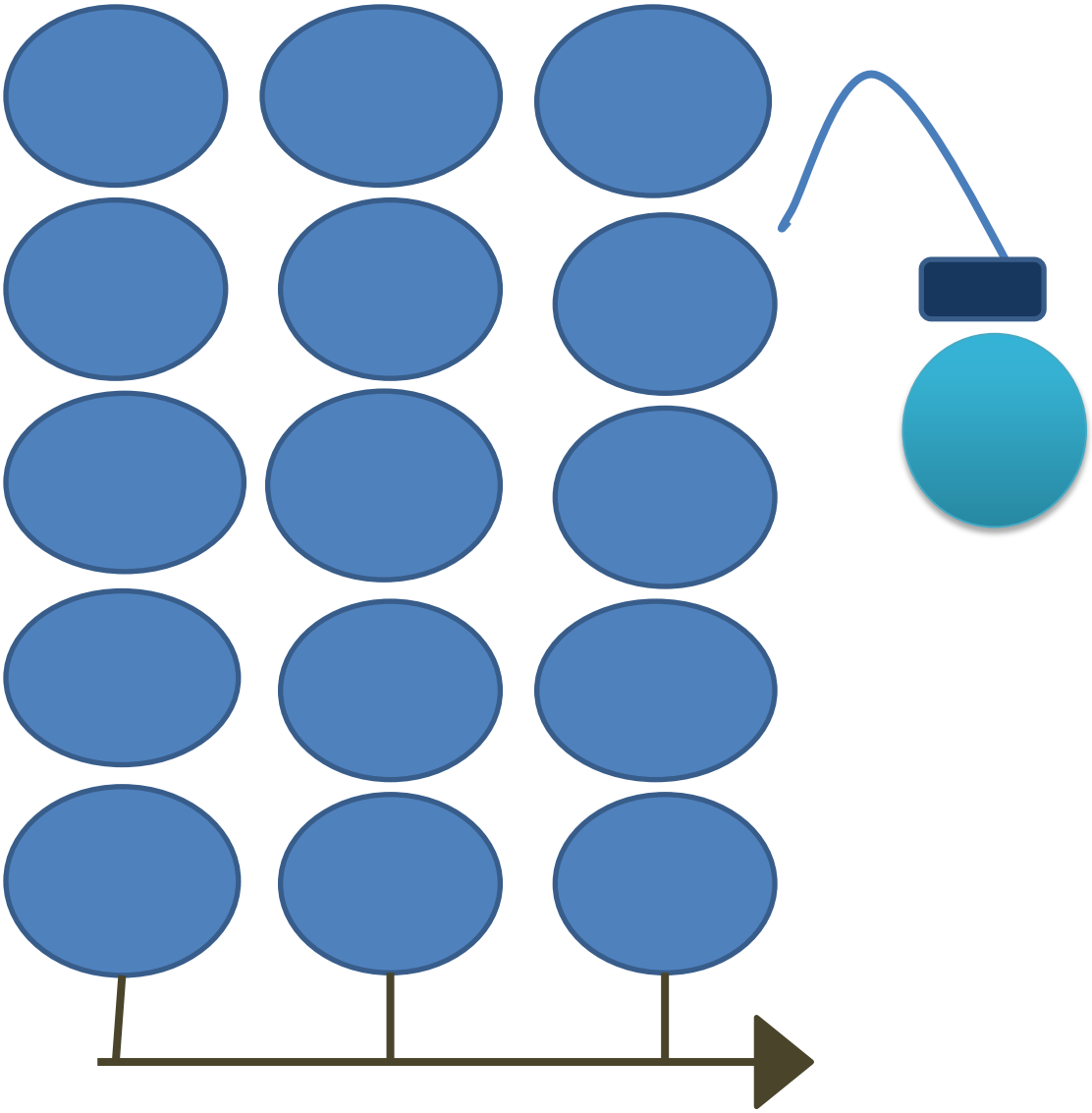


Figura 4. Esquema del sistema experimental de inmunoestimulación. Eu 0.1, Tratamiento Extracto Ulva 0.1%; Eu 0.5, tratamiento Extracto ulva 0.5%; Eu 1, Tratamiento extracto ulva 1%; L, tratamiento levadura; C, control; R, reservorio; y Bomba.

6.5. Toma de Muestras.

6.5.1. Química del Extracto.

Una vez elaborado el extracto se enviaron muestras a la Unidad de servicios Académicos a la Investigación (USAI) de la Facultad de Química en la Universidad Nacional Autónoma de México, en donde se le realizaron: Análisis elemental cuantitativo de la harina de ulva y el extracto para efectos de comparación, se determinó el contenido de Carbono, Hidrógeno, Nitrógenos y Azufre; Espectroscopia de infrarrojo por Transformada de Fourier (FTIR) de la harina de ulva y al extracto; y Resonancia Magnética Nuclear del extracto (RMN). Adicionalmente se calcularon los modelos tridimensionales de los polisacáridos contenidos en el extracto.

6.5.2. Experimento de Inmunoestimulación.

Se eligieron al azar seis peces por tratamiento cada 15 días durante el periodo de experimentación. Dichos organismos no se alimentaron durante 24 horas previas al muestreo. Se manipularon con cuidado, evitando estresar a los organismos y se anestesiaron con 2-fenoxyetanol (Sigma, St.louis, MO, EUA) a dosis de 0.5mL/L.

Una vez anestesiados los peces, se obtuvieron muestras sanguíneas por medio de punción de la vena caudal para lo que se utilizaron jeringas de 1mL sin anticoagulante (Teruno México, DF, México) Posteriormente los peces se pesaron y midieron, individualmente. La sangre extraida se depositó en dos tubos; uno con EDTA como anticoagulante (Microvette EDTA tripotassium salt, Germany) que fue utilizado para el recuento de leucocitos totales (WBC), el recuento de eritrocitos totales (RBC), la determinación de la hemoglobina (HGB) y actividad fagocítica (AF). Mientras que en el otro tubo, sin anticoagulante, se depositó la sangre destinada para la determinación de hematocrito (HCT), el cual se realizó inmediatamente después de tomada la muestra de sangre. El resto de la sangre se dejó coagular, posteriormente se centrifugó y se obtuvo el suero, el cual se almacenó a -20ºC para posteriormente analizar la concentración de las proteínas totales (PROT), las albúminas (AL) y las globulinas (GB).

6.6. Variables a Medir.

6.6.1. Química del Extracto.

EL análisis elemental cuantitativo se realizó en un equipo Fisons Instruments Modelo EA1108 (CHNS-O), se utilizó estándar de cistina. Los espectros del Infrarrojo se obtuvieron en un espectrofotómetro Perkin Elmer FTIR modelo 1605, en el intervalo de 4000 a 400 cm^{-1}, utilizando pastillas de bromuro de potasio. Los modelos tridimensionales calculados de las moléculas contenidas en el extracto, se generaron por medio del programa Hyperchem 8.0, el cual calculó y optimizó la geometría de las fórmulas. Posteriormente se utilizó el programa Mercury 2.4 para modelar las fórmulas a partir de sus fórmulas empíricas.

Por otro lado, los espectros de RMN de ^{1}H, se realizaron en un espectrómetro Bruker 300. El disolvente utilizado fue D_2O.

6.6.2. Hematología y Sistema Inmune.

Para el recuento de eritrocitos y leucocitos totales se utilizó el diluyente propuesto por Natt-Herrick (1952) y cuya técnica de preparación se describe a detalle en el Anexo 3.

Los recuentos celulares se realizaron en una cámara de Neubauer como se muestra en la figura 3, la técnica completa se describe a detalle en el anexo 3.

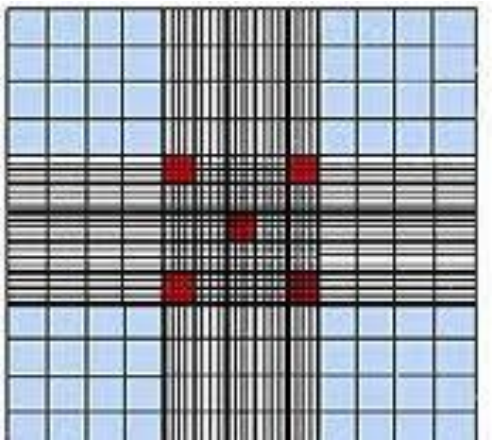


Figura 5. Cámara de Neubauer. Zonas rojas recuento de eritrocitos y zonas azules recuento de leucocitos.

Los recuentos totales se obtienen con las siguientes formulas:

$$\textit{Eritrocitos Totales} = \frac{\textit{Número de eritrocitos / 2}}{0.02} \times 200$$

Fórmula (5)

$$\textit{Leucocitos Totales} = \frac{\textit{Número de Leucocitos}}{8} \times 200$$

Fórmula (6)

Los resultados se reportan como células por milímetro cúbico (células mm^3)

El hematocrito se realizó con tubos capilares heparinizados los cuales se colocaron por 10 minutos en una centrifuga de micro-hematocrito (SOL-BAT P600, México, DF, México) por último el paquete celular se medió con un lector de hematocrito (SOL-BAT) y se reportó como porcentaje.

La hemoglobina de los glóbulos rojos se analizó por el método colorimétrico de la cianometahemoglobina (con reactivo Mex Lab.) de acuerdo a las indicaciones del fabricante y para medir la concentración se utilizó un espectofotómetro (UV-1800, Shimadzu) auna longitud de onda de 540nm, el resultado se reportó en $g.dL^{-1}$.

La proteína total sérica y albúmina se determinaron por colorimetría basada en Biuret y se utilizó el Kit de prueba de la marca Mex Lab, se siguieron las indicaciones del fabricante. Para medir la concentración se utilizó un espectofotómetro (UV-1800, Shimadzu) a una longitud de onda de 545 y 620 nm, respectivamente, La globulina se obtuvo por sustracción de la albúmina de la proteína total sérica, los resultados se reportaron en $g.dL^{-1}$.

La actividad fagocítica fue determinada por medio de la técnica de fagocitosis usando microesferas de latex y los resultados fueron expresados en porcentaje. La técnica completa se describe en el anexo 4.

6.6.3. Crecimiento.

Los peces de cada tratamiento fueron pesados y medidos cada dos semanas para determinar la ganancia de peso (o tasa de eficiencia alimenticia, TEA), tasa de crecimiento específico (TCE) y tasa de conversión alimenticia (TCA); al final del experimento se determinó la ganancia de peso (GP) y consumo de alimento. Para lo cual se aplicaron las siguientes formulas:

TEA (%)= (Peso final-Peso inicial/alimento total consumido) x 100

TCE (%/día)= [(ln Peso final- ln Peso inicial)/número de días] x100

TCA= alimento administrado (peso seco)/ peso ganado (peso húmedo)

GP= Peso final-Peso inicial

6.7. Análisis Estadístico.

Una vez determinados los promedios de las variables a medir, se realizó un análisis estadístico inferencial con el fin de hacer una comparación entre ellos y las inclusiones de inmunoestimulante, para determinar si existen diferencias significativas entre los promedios y si estas diferencias existieron, se determinó cuáles fueron, por medio de análisis de varianza de dos vías (ANOVA) para determinar las diferencias entre los tratamientos y los días del experimento.

Se probó la normalidad y homocedasticidad de varianzas; cuando la homocedasticidad de las varianzas no pudo demostrarse y dada la naturaleza de los datos; se realizó un análisis de varianza mediante un ANOVA no paramétrico de Kruskal–Wallis. El contraste de hipótesis de Kruskal–Wallis (Kruskal y Wallis, 1952) es la alternativa no paramétrica del método ANOVA, es decir; sirve para contrastar la hipótesis de que muestras cuantitativas han sido obtenidas de la misma población aunque su distribución no sea normal (Montgomery, 2001). En el caso de rechazar H_0 de que k muestras han sido obtenidas de la misma población, se aplicó una prueba de comparación múltiple para determinar específicamente las diferencias significativas entre cada uno de los promedios. Se aplicó la prueba de Duncan o prueba de rango múltiple de Duncan (1955).

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

7.1. Elaboración del extracto de *Ulva clathrata*

El rendimiento del extracto de *U. chlatrata* liofilizado fue del 12%, el cual se encuentra dentro del intervalo reportado por Hernández-Garibay *et al*. (2011) para el extracto de la misma especie de alga (7.5-14.8%) secado al calor. La liofilización es una técnica de secado en frío que sirve para deshidratar sin causar daño a los materiales biológicos y resulta en productos de mayor calidad, ya que al no emplear calor se evitan pérdidas nutricionales y organolépticas del producto.

7.2 Química del Extracto

7.2.1 Análisis Elemental Cuantitativo

El análisis elemental cuantitativo es esencial para caracterizar los compuestos orgánicos.

Los porcentajes calculados de peso de cada elemento en la molécula representan valores teóricos que se derivan de la composición química de la harina de *U. clathrata*, mientras que los porcentajes observados se obtuvieron mediante el análisis elemental de la muestra.

Los resultados del análisis elemental cuantitativo de la harina de *U. clathrata* se muestran en la tabla 8.

Tabla 8 Análisis elemental cuantitativo de harina de *U. clathrata*: valores calculados y valores observados

Elemento	Porcentaje de peso en la molécula (calculado)	Porcentaje de peso en la molécula (observado)
C	26.01	25.999
H	5.026	4.86
N	2.99	2.695
S	4.568	4.567

El porcentaje de peso del Carbono e Hidrógeno refleja el contenido de polisacáridos estructurales tales como la celulosa y polisacáridos solubles en harina de ulva. Esto concuerda con los valores altos de celulosa y polisacáridos reportados por Peña-Hernández *et al.* (2011); los cuales determinaron mediante el análisis proximal de harina de *U.clathrata,* que la fibra dietaria total está entre 37.6-43.6% de peso seco, los polisacáridos insolubles 16.6-20.8% y los polisacáridos solubles (azucares totales) 17.35-31.11%. Mientras que el contenido de proteína de la harina es de 20% de peso seco, esto explica la proporción de la intervención del nitrógeno en la muestra analizada.

El ulvan representa un rendimiento del 7-29% del peso seco de harina de ulva y considerando que este grupo de polisacáridos contiene azufre en proporción del 16-23% (Lahaye & Robic, 2007), entonces el contenido de azufre en peso seco de alga puede ser de 1-7% (Peña-Rodríguez *et al*., 2011), lo cual indica la presencia de este elemento en la harina determinado por el análisis elemental (Tabla 8).

Los resultados de la composición química, se muestran en la tabla 9.

Tabla 9 Análisis elemental del extracto de *U. clathrata*: valores calculados y valores observados.

Elemento	Porcentaje de peso en la molécula (calculados)	Porcentaje de peso en la molécula (observado)
C	19.35	19.473
H	3.88	3.783
N	0.98	0.895
S	5.62	8.691

Los porcentajes calculados de peso en la molécula representan el peso de cada elemento en la sustancia, estos valores se obtuvieron de la estructura de los principales disacáridos encontrados en el ulvan, este grupo de disacáridos contienen ácidos urónicos (ácido glucurónico y ácido idurinico) los cuales se forman con sulfato ulvanobiouronico tipo A (A3s) y tipo B (B3s), ambos han sido descritos por Lahaye (2001) El ulvan ha sido aislado de otras especies de *Ulva* (*U.*

rígida, U. lactuca, U. pertusa, U. rotundata) (Ray y Lahaye 1995; Pengzhan *et al*., 2003; Castro et al., 2006; Sathivel *et al*.,2008; Robic *et al*., 2009). Los porcentajes de peso observados de cada elemento en la molécula fueron obtenidos del análisis elemental de la muestra de extracto de *U. clathrata*.

Se observa de manera general, que el contenido de carbono es mucho menor en la muestra de extracto (tabla 9) en comparación con la harina de *U. clathrata* (tabla 8), esto se debe al proceso de extracción, por medio del cual se eliminó la celulosa, otros carbohidratos estructurales y fibra dietaria insoluble de la harina.

El contenido de Carbono, Hidrógeno y Nitrógeno de la muestra de extracto coincide con el contenido calculado del ulvan, lo cual indica que se obtuvieron las especies de polisacáridos reportados por Lahaye (2001) con un alto grado de pureza. Mientras que el porcentaje observado de intervención del azufre en la muestra de extracto de *U. clathrata* es superior al calculado, lo que sugiere que la liofilización aplicada en la técnica de elaboración de extracto pudo haber evitado la perdida de grupos sulfato en el extracto obtenido.

7.2.2 Espectroscopia de infrarrojo por Transformada de Fourier (FTIR)

Una técnica utilizada para la caracterización química de sustancias es la Espectroscopia de Infrarrojo por Transformada de Fourier (FTIR).

La FTIR se basa en las vibraciones moleculares que se llevan a cabo cuando se incide una frecuencia del espectro electromagnético en la zona del infarrojo a una muestra. De esta manera, se pueden medir las vibraciones u oscilaciones de átomos unidos mediante un enlace químico. Estas vibraciones determinan interacciones entre los átomos (donación y recepción de protones o electrones), estas interacciones inter o intramoleculares son extremadamente importantes en el comportamiento y propiedades de las macromoléculas biológicas, pues sus conformaciones y actividad bioquímica son determinadas por dichas interacciones (Nakamoto, 1986).

En la figura 5 se muestra el resultado de la FTIR de harina de *U. clathrata* y del extracto; donde el espectro de la harina **(a)** presenta una banda robusta con una frecuencia de vibración 3,238 cm^{-1} que corresponde a los grupos carboxilos, los enlaces carbono-carbono del anillo del polisacárido, así como a los enlaces nitrógeno-hidrógeno de la aminas presentes en los animoácidos de las proteínas (Silvertein, 1991). Adicionalmente se encuentra una banda en 1,634 cm^{-1} específico para los grupos carboxilo presentes, además se observa una banda ancha característica de los grupos sulfato en 1,084 cm^{-1}. Siendo estas bandas las más importantes y representativas para la identificación de los polisacáridos en la muestra.

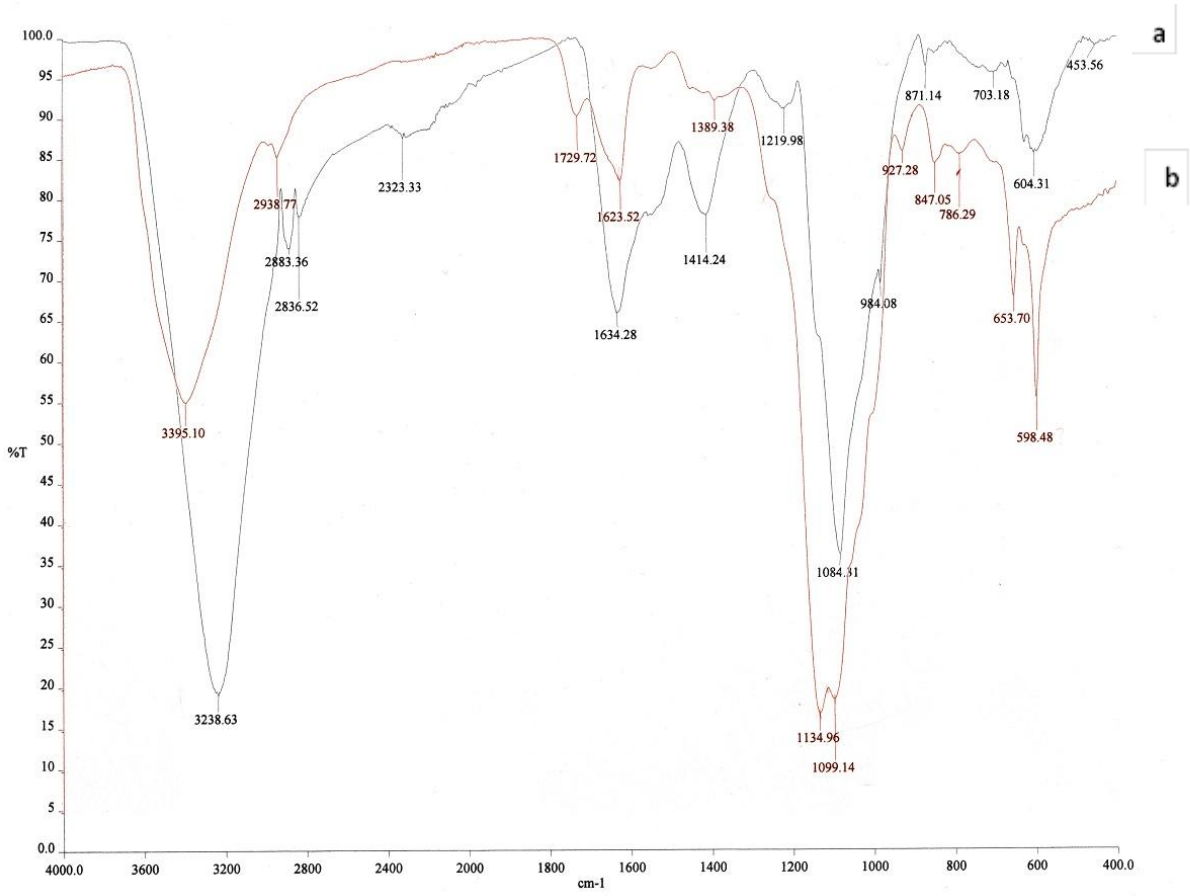


Figura 6. FTIR de la Harina de *U. clathrata* (a) y Extracto de *U. clathrata* (b)

El espectro del extracto de *U. clathrata* **(b)**, muestra ciertas similitudes con los que se han descrito para otras especies de *Ulva* (Castro *et al.*, 2006; Robic *et al.*, 2009a) en los que también se presentan bandas en 1,650 y 1,400 $^{cm-1}$, asignadas a grupos carboxilos (Silvertein, 1991), una banda intensa en 1,260 $^{cm-1}$ indicando la presencia de sulfato y dos pequeñas bandas en 850 y 790^{cm-1} que se han observadas típicamente en ulvan.

Se muestra en 1134 y 1099 cm^{-1} una banda desdoblada del grupo sulfato, el cual se aprecia mejor debido a su pureza ya que se eliminan compuestos que interfieren en las interacciones y las vibraciones de este grupo. Adicionalmente se observa que la banda de los carboxilos se desdobla y desplaza a una frecuencia de vibración de 1729 y 1623 cm^{-1}, debido a la eliminación de celulosa y polisacáridos estructurales que contenían otro tipo de carboxilos los cuales también participaban en las vibraciones que se observaban en el espectro FTIR de la harina. Lo anterior corresponde a lo encontrado por Hernández-Garibay *et al*. (2011); quien observó bandas de grupo carboxilo en 1646cm^{-1}.

Castro *et al*. (2006) asignó una banda en 850cm^{-1} a los sulfatos contenidos en el ulvan, mediante un experimento de desulfatación y resulfatación del polisacárido aislado de *Ulva rigida.* Lo que concuerda con la banda observada en 847cm^{-1} del FTIR realizado al extracto de *U.clathrata* en este estudio **(b)**. Por otro lado, Robic *et al*. (2009a); reportaron la existencia de una banda fuerte en 1055 $^{cm-1}$ presente en el ulvan de *U. rotundata* y que está asociada a la vibración del enlace C-O de la ramnosa y ácido glucurónico, sin embargo en la muestra de extracto analizada, esta banda se encuentra traslapada por la vibración del enlace del grupo sulfato, que es más fuerte (Silverstein, 1991).

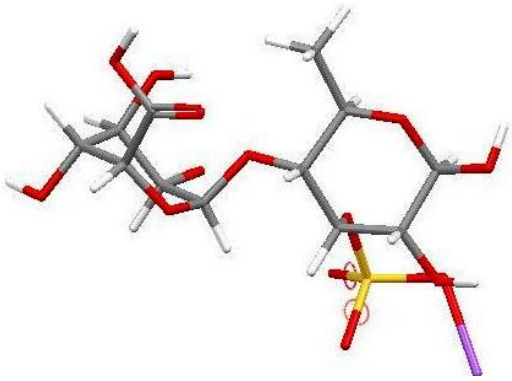
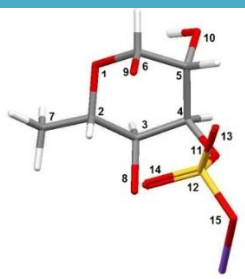
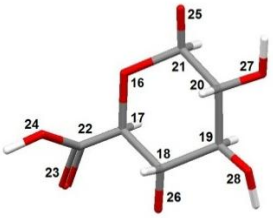
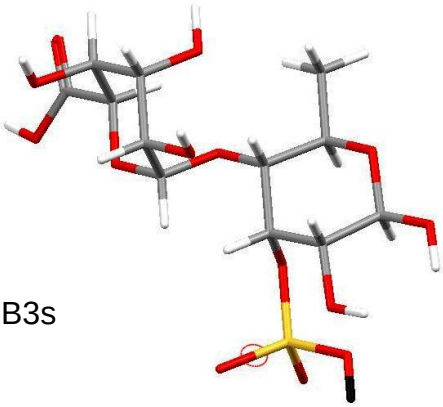
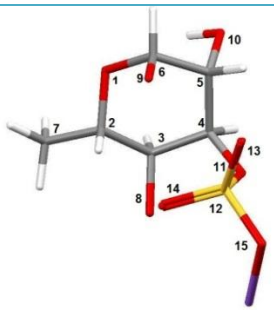
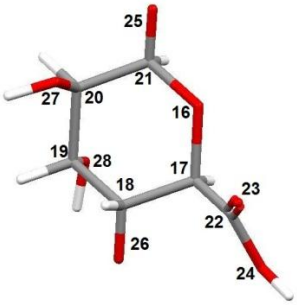
En 598cm^{-1} se observa una banda de intensidad media que pertenece a una vibración δ del enlace de S-O-Na (Nakamoto, 1986), este grupo funcional está presente en la formula química de los principales disacáridos que forman el ulvan, los ácidos ulvanobiurónicos y ulvanobiosas (Lahaye, 2001).

Basado en los hallazgos en el FTIR del extracto de *U.clathrata* se puede concluir que se logró aislar de la harina, polisacáridos similares al ulvan reportado en otras especies de ulva.

7.2.3 Modelos Tridimensionales de los Disacáridos Obtenidos en el Extracto.

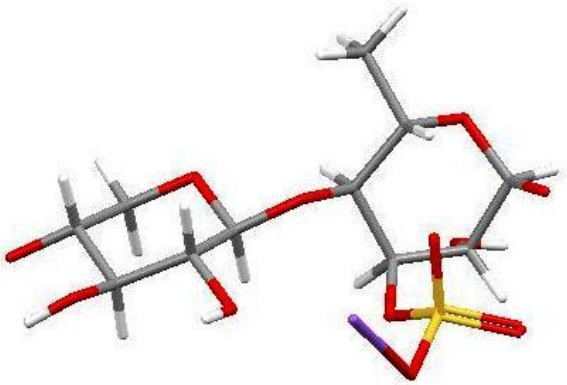
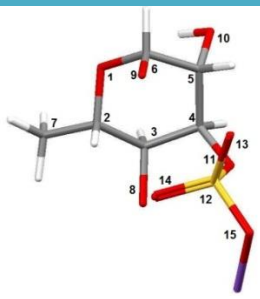
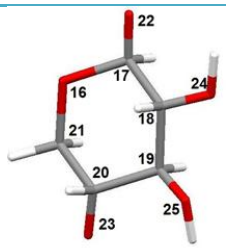
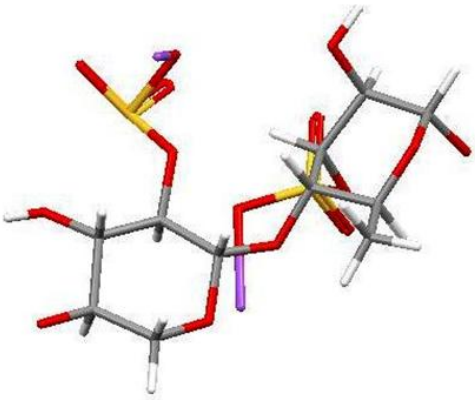
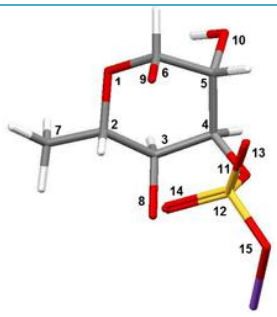
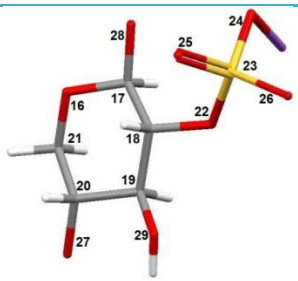
A continuación se muestran los modelos tridimensionales generados de los disacáridos presentes en el extracto, estos modelos representan las fórmulas empíricas descritas por Lahaye (2001).

Tabla 10 Modelos tridimensionales de los disacáridos contenidos en el extracto.

Disacárido	Número de átomos por monosacárido
A3s 	 (**1**)
	 (2)
B3s 	 (1)
	 (2)

Carbono , **Hidrógeno** **Oxígeno** **Azufre** **y Sodio**

Tabla 10 Modelos tridimensionales de los disacáridos contenidos en el extracto. (CONTINUACIÓN)

Disacárido	Número de átomos por monosacárido
 U3s	 (1)
	 (2)
 U2’s3s	 (1)
	 (2)

Carbono , **Hidrógeno** **Oxígeno** **Azufre** **Sodio**

Estos modelos muestran que la estructura del monosacárido 1 de todos los polisacáridos es la misma. No así para las estructuras del polisacárido 2 en los que las principales diferencias observadas son:

- La posición del O (16) en el anillo que se encuentra en posición orto al oxígeno puente del disacárido y que muestra que los anillos (2) del A3s y B3s son isómeros ópticos.
- La presencia de un grupo ácido en el C (22) en el anillo de A3s y B3s, ausente en el anillo 2 de los U3s y U2's3s.
- La presencia del grupo sulfato en C18 del U2's3s, ausente en el U3s, lo cual puede explicar la presencia de la banda intensa en 1,260 cm^{-1} y la banda en 847 cm^{-1} del FTIR de extracto.
- La unión del anillo (1) y (2) de los monosacáridos por el O (8) puede explicar la señal de 1055 cm^{-1} del grupo carboxilo.

Las diferencias que se observan en la estructura de cada uno de los disacáridos, son importantes porque al tener diferente naturaleza magnética es posible identificarlas mediante técnicas como la resonancia magnética nuclear (RMN). Los modelos de las estructuras presentes en el extracto obtenido son de gran apoyo para la asignación y entendimiento de las señales de RMN.

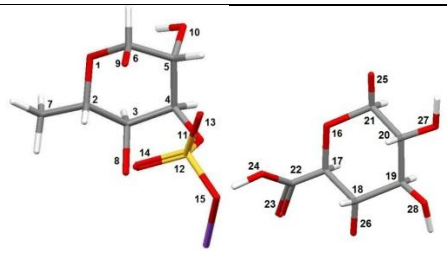
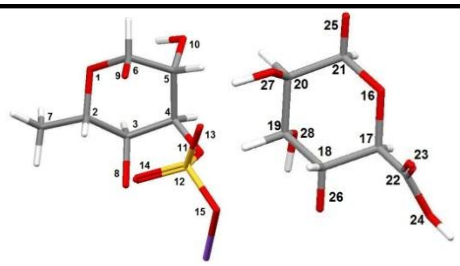
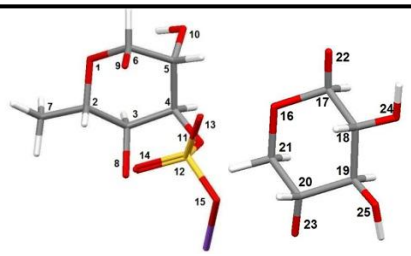
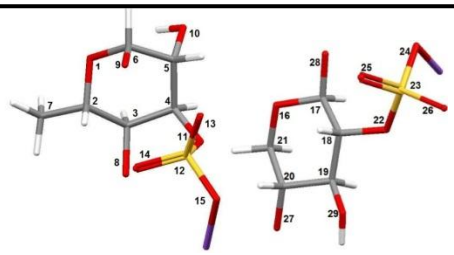
7.2.4 Resonancia Magnética Nuclear del Extracto (RMN)

Adicionalmente a los análisis explicados previamente, se realizó la espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear (RMN). La RMN permite determinar las estructuras de los compuestos orgánicos, pero desde los núcleos atómicos de los elementos que conforman estas moléculas.

Lo que se muestra en el espectro de RMN son los desplazamientos químicos de los núcleos atómicos. En la medida que ellos están relacionados o interactúan mediante algún tipo de enlace, los desplazamientos químicos serán diferentes.

En la tabla 11 se presentan los desplazamientos químicos de cada uno de los protones de los cuatro disacáridos encontrados en el extracto. En la columna central se presenta la región con la multiplicidad correspondiente a la que se encuentran cada uno de los protones dependiendo de su naturaleza magnética, mientras que en la columna derecha se muestran los desplazamientos químicos que aparecen en el espectro de RMN (Figura 6).

Tabla 11 Resultados de Resonancia Magnética Nuclear del extracto de *U. clathrata.*

	^{1}H	ppm (teórico)	ppm (encontrado)
 A3s	2	$3.3\text{-}4^{Q}$	$3.2\text{-}4.2^{M}$
	3	$3.3\text{-}4^{T}$	$3.2\text{-}4.2^{M}$
	4	$4\text{-}6^{T}$	5.20
	5	$3.3\text{-}4^{C}$	$3.2\text{-}4.2^{M}$
	6,21	$3.3\text{-}4^{D}$	$3.2\text{-}4.2^{M}$
	7	$0.7\text{-}1.3^{D}$	1.1
	17	$4\text{-}6^{D}$	$3.2\text{-}4.2^{M}$
	18	$3.3\text{-}4^{T}$	$3.2\text{-}4.2^{M}$
	19,20	$3.3\text{-}4^{C}$	$3.2\text{-}4.2^{M}$
	10,27,28	$1\text{-}6^{D}$	--------
 B3s	17	$4\text{-}6^{D}$	4.2
	18	$3.3\text{-}4^{T}$	$3.2\text{-}4.2^{M}$
	19,20	$3.3\text{-}4^{T}$	$3.2\text{-}4.2^{M}$
	21	$3.3\text{-}4^{D}$	$3.2\text{-}4.2^{M}$
	27,28	$1\text{-}6^{D}$	--------
	24	$10\text{-}12^{S}$	--------
 U3s	17	$3.3\text{-}4^{D}$	$3.2\text{-}4.2^{M}$
	18,19	$3.3\text{-}4^{T}$	$3.2\text{-}4.2^{M}$
	20	$3.3\text{-}4^{C}$	$3.2\text{-}4.2^{M}$
	21	$3.3\text{-}4^{D}$	$3.2\text{-}4.2^{M}$
	24,25	$1\text{-}6^{D}$	--------
 U2’s3s	17	$3.3\text{-}4^{D}$	$3.2\text{-}4.2^{M}$
	18	$4\text{-}6^{T}$	5.20
	19	$3.3\text{-}4^{T}$	$3.2\text{-}4.2^{M}$
	20	$3.3\text{-}4^{C}$	$3.2\text{-}4.2^{M}$
	21	$3.3\text{-}4^{D}$	$3.2\text{-}4.2^{M}$
	29	$1\text{-}6^{D}$	----------

S= singulete, D= doblete, T= triplete, C= cuadruplete, Q= quintuplete, M= multiplete.

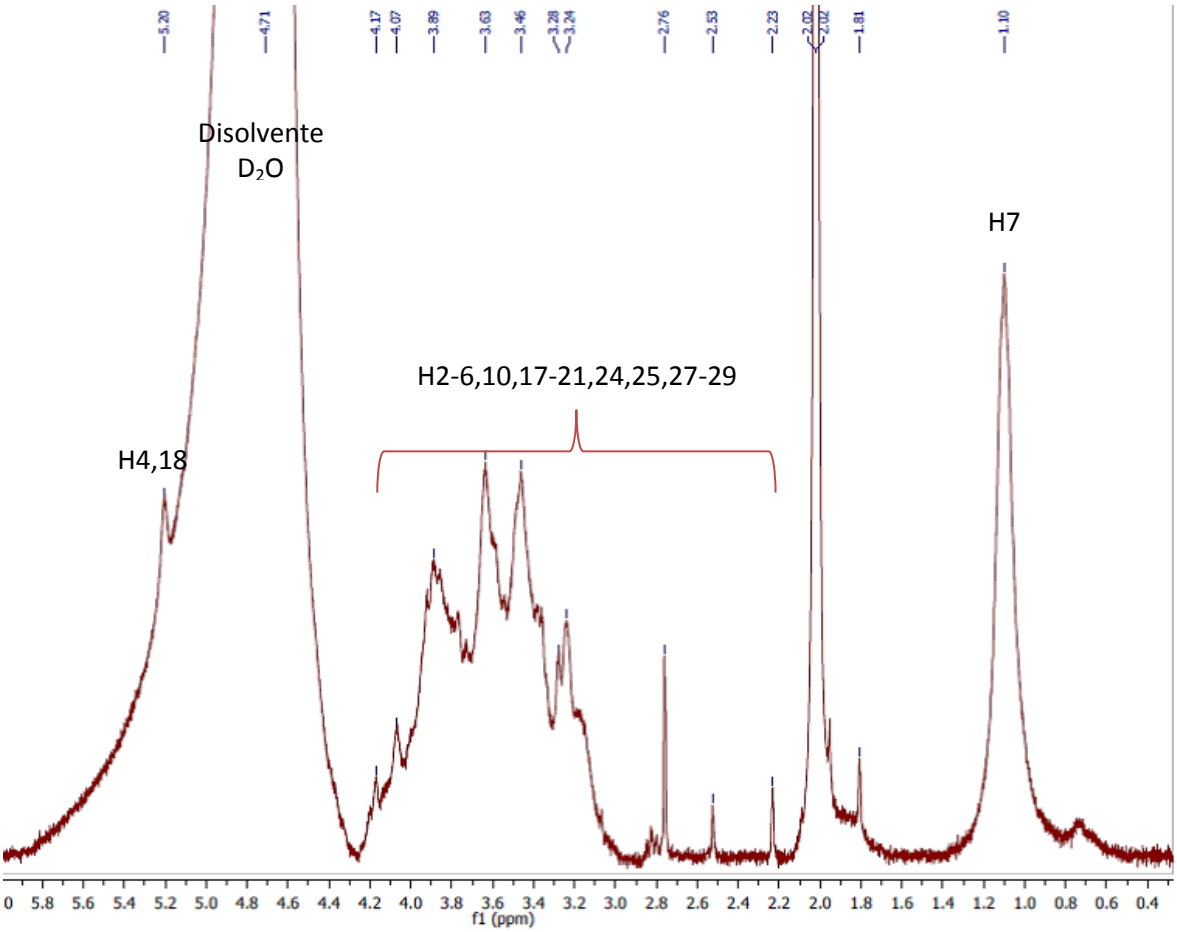


Figura 7. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear del Extracto de *U. clathrata*

En la tabla se observa que casi todos los protones aparecen en la misma región y que experimentalmente solo se observa un multiplete en el espectro (figura 6). Esto se debe a que los protones que aparecen en esa región tienen fuertes acoplamientos entre ellos, además que la rigidez y la naturaleza de los sustituyentes propicia a que la relajación spin-red sea más lenta por lo que las señales se vuelven más anchas.

Los protones de los grupos alcohol en los disacáridos no se observan debido a que se intercambian por los deuterios del agua deuterada utilizada como diluyente en la técnica. El protón ácido no se observa debido a la poca solubilidad que presenta el extracto en agua deuterada que imposibilitó su detección en el equipo (5 mg en 0.6 mL de D_2O). El metilo del fragmento α-L-ramosil se observa en 1.10

ppm (H7), que es muy cercano al reportado por Robic *et al*. (2009) (1.26 ppm). Dichos autores también reportan el protón unido al sustituyente sulfato de la α–ramnosa en un desplazamiento químico de 5.36 ppm, mientras que en el espectro obtenido se encuentra en 5.20. Las diferencias se pueden deber a las diferencias del equipo, sin embargo aparecen en las regiones correspondientes a la naturaleza magnética del protón estudiado. Como se había mencionado con anterioridad, el fragmento ramnosa se encuentra sin cambios en los cuatro diferentes disacáridos, por lo que las señales del protón metilo y el protón unido al carbono que tiene como sustituyente al sulfato, se encuentran con relativa mayor intensidad, ya que la intensidad también está en relación con la concentración.

7.3. Experimento de Inmunoestimulación.

7.3.1 Parámetros de Calidad de Agua.

Los promedios y desviación estándar de los parámetros de calidad de agua se muestran en la tabla 12, donde se observa que a lo largo del periodo experimental se mantuvieron dentro del intervalo de valores óptimos para la especie. Los valores de temperatura que van desde los 22 a 30°C son optimas para lograr un buen crecimiento y bajas mortalidades. El valor del oxígeno disuelto debe ser mayor a 3 $mg.L^{-1}$, el pH de 6.5 a 8, mientras que el amonio es tóxico, y depende del pH y la temperatura del agua, los niveles de tolerancia para la tilapia se encuentran en el intervalo de 0.6 a 2.0 ppm (Soderberg, 2006).

Tabla 12 Parámetros de calidad de agua durante el experimento.

Parámetro	($\dot{x}$ ±d.e.)
Temperatura (°C)	25.5±3.02
Oxígeno disuelto ($mg.L^{-1}$)	6.89±.56
pH	7.19±0.22

Con el fin de conocer las condiciones de amonio presentes en el sistema experimental después de 48 horas sin recambio de agua y alimentando los peces 2 veces al día; se determinaron los niveles de amonio los cuales se mantuvieron por debajo de 0.202 $mg.L^{-1}$ bajo estas condiciones.

7.3.2. Hematología y Sistema Inmune.

Hematocrito (HTC).

En la figura 8 se muestran los resultados del porcentaje del HTC durante todo el periodo experimental, la flecha negra indica la suspensión de administración del inmunoestimulante dietario.

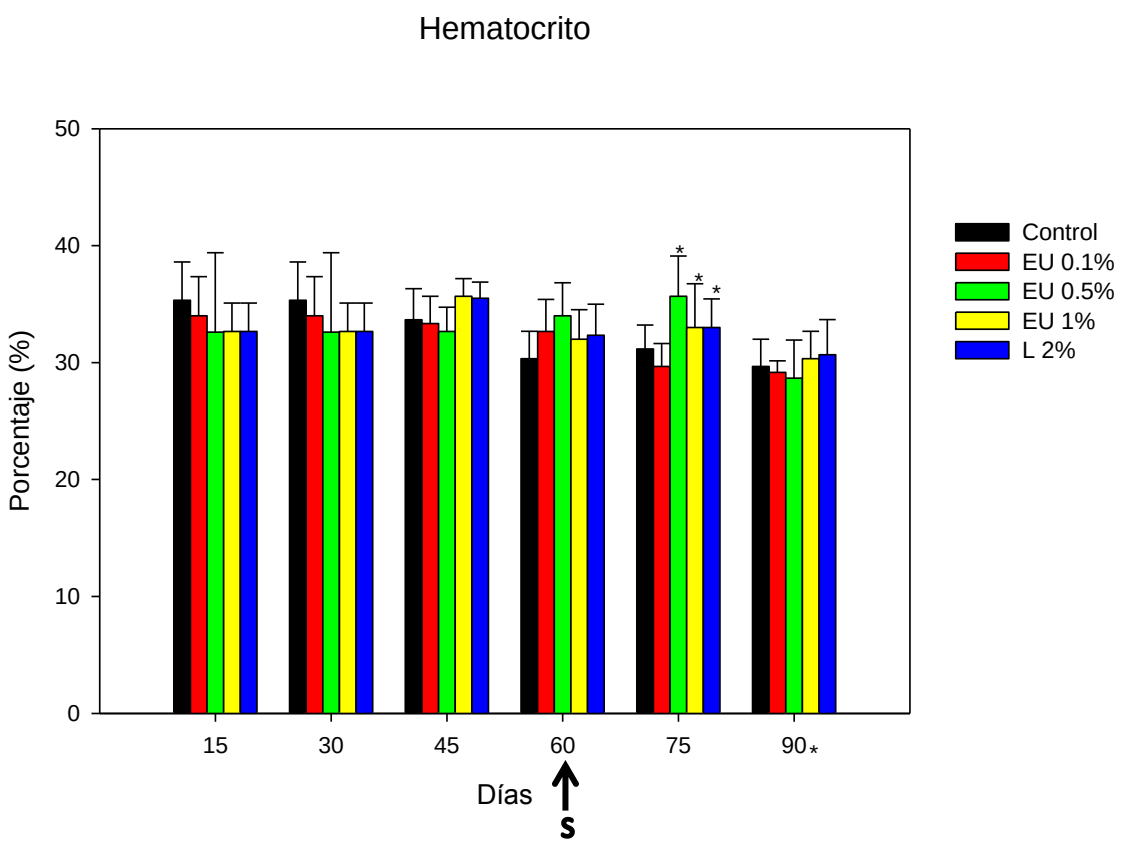


Figura 8. Porcentaje de hematocrito de *O. niloticus* alimentada con diferentes niveles de extracto de *U. clathrata* y levadura (*S. cerevisiae*). La S indica la suspensión de administración de inmunoestimulante dietario.

En el porcentaje de HTC no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos. Sin embargo, los porcentajes de HTC de todos los tratamientos en el día 30 fueron significativamente mayores al resto de los días del experimento pues el promedio fue de 38% comparado con 32-34% del resto de los días ($P<0.05$).

Los porcentajes de HTC durante el periodo 0-45 días del experimento coinciden con los reportados por Sado *et al.* (2008) para tilapia nilótica del mismo peso, edad, temperatura del agua y alimentada con dieta para tilapia. En general, para todos los tratamientos, el porcentaje de HTC se mantuvo por arriba de 30 en casi todo el experimento excepto el día 90. Los valores arriba de 30 y hasta 40% se encuentran dentro del intervalo normal reportado para la especie por diferentes autores (Bittencourt, 2003; Hahn-von-hessberg, y Grajales-Quintero, 2011) y estos

valores han sido considerados indicadores de buena salud de los organismos (Aly *et al*., 2008).

Algunos estudios sugieren, que la disminución en el porcentaje de HTC puede estar relacionada al estrés debido a la falta o cambio de alimento (Yue y Zhou 2008; Affonso *et al*., 2002). Lo cual puede explicar lo encontrado en los día 60 y 90 en el presente trabajo, ya que a partir de la suspensión de la administración de inmunoestimulante en la dieta, los valores de todos los tratamientos disminuyeron y al día 90 todos los tratamientos menos el control estuvieron por debajo del 30% de HTC y fueron significativamente diferentes ($P<0.05$). Lo que podría interpretarse como una etapa de adaptación al alimento sin inmunoestimulante.

Hemoglobina (HGB).

La concentración de la hemoglobina en la sangre se mantuvo por arriba de $7 g.dL^{-1}$ lo cual es indicador de buena salud de los organismos y coincide con los valores reportados por Tran-Duy (2008); Sahan y Duman (2008); Bittencourt *et al*. (2003) y Hahn-von-hessberg y Grajales-Quintero (2011) para la misma especie de pez y condiciones similares de cultivo.

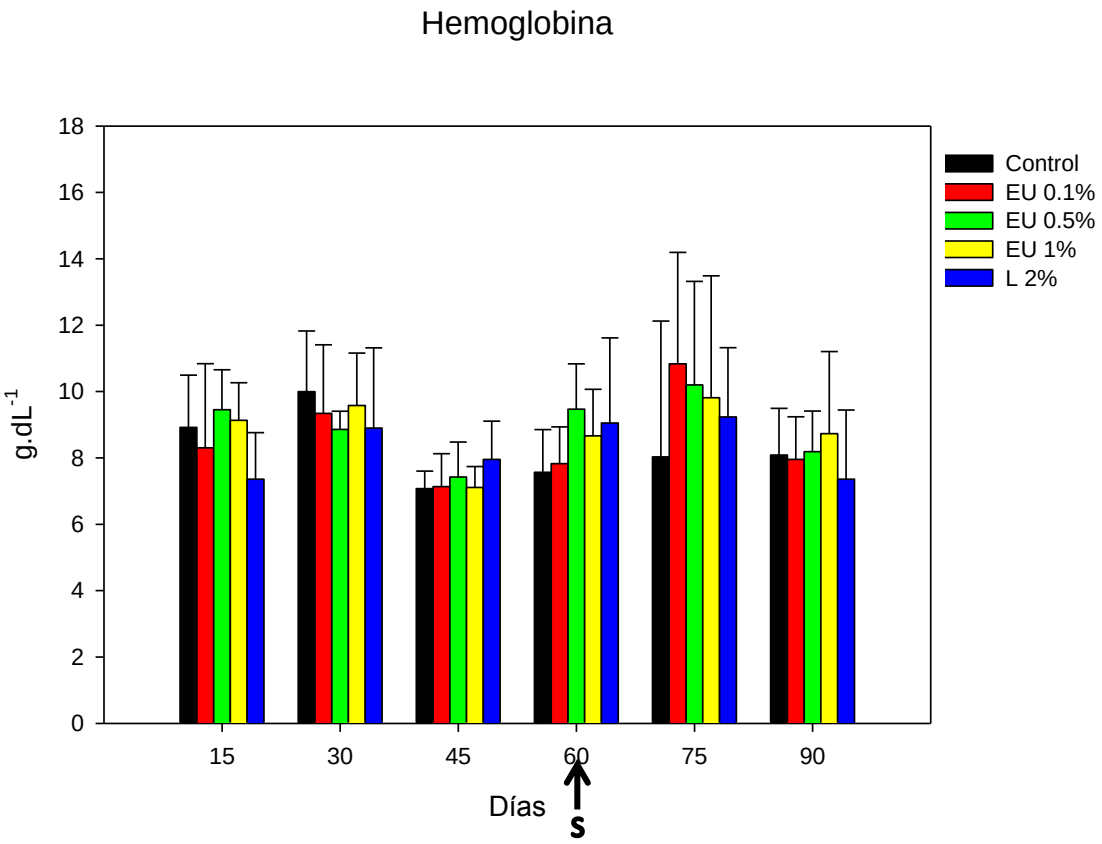


Figura 9. Concentración de la hemoglobina de *O. niloticus* alimentada con diferentes niveles de extracto de *U. clathrata* y levadura (*S. cerevisiae*). La S indica la suspensión de administración de inmunoestimulante dietario.

La concentración de HGB no mostró diferencias significativas entre los diferentes tratamientos, ni durante los días de experimento ($P<0.05$). Lo que indica que la inclusión de extracto de *U.clathrata* en el alimento de tilapia no causa efectos adversos en la salud (figura 9), esto coincide con lo reportado por Jalali *et al*. (2009) tras la inclusión dietaria de Ergosan del 0.2, 0.4 y 0.6% en el esturión beluga.

Eritrocitos Totales (RBC).

En la figura 10 se muestran los valores de RBC los cuales, en todos los tratamientos y días se mantuvieron dentro de los valores de 1.4 y 1.9 $x10^6$ células mm^3, estos valores han sido reportados con anterioridad para la misma especie y

bajo las misma condiciones de calidad de agua por Rado *et al*. (2008); Tran-Duy, (2008) y Hahn-Von-Hessberg y Grajales-Quintero (2011).

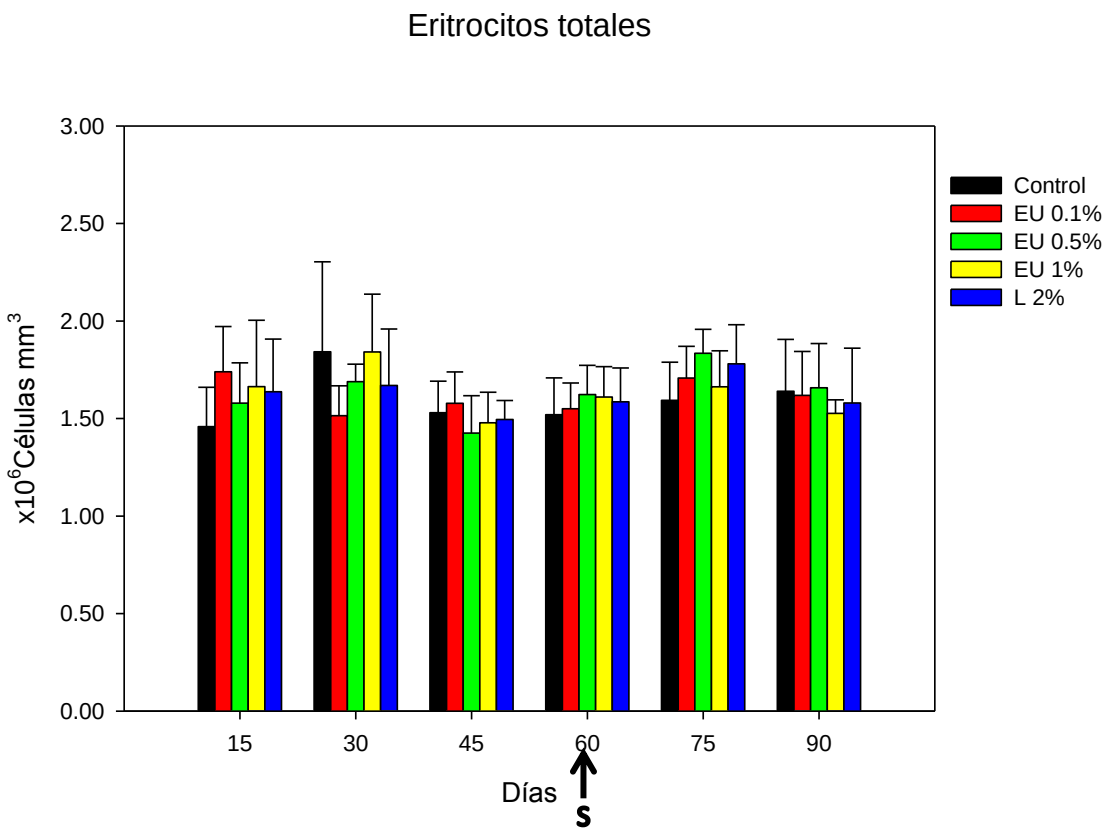


Figura 10. Eritrocitos totales de *O. niloticus* alimentada con diferentes niveles de extracto de *U.clathrata* y levadura (*S. cerevisiae*). La S indica la suspensión de administración de inmunoestimulante dietario.

Existen estudios que indican que algunos inmunoestimulantes en dosis altas pueden disminuir el número de eritrocitos, sin embargo se ha sugerido que se trata de un efecto de sobredosis (Jeney *et al*., 1997; Verhlac *et al*., 1998 y Abd El-Rhman *et al*., 2009). Por otro lado, también se ha reportado que los inmunoestimulantes dietarios pueden aumentar los RBC, casi siempre esto se interpreta como indicador de salud de los peces (Sahan y Duman 2008). Sin embargo, en el presente estudio no se observaron diferencias significativas en los valores de RBC entre los tratamientos ($P<0.05$).

Se observó que el recuento de RBC en todos los tratamientos fue significativamente mayor en el día 30 con respecto a los días 60, 75 y 90 ($P<0.05$). La tendencia de los valores de RBC del control se mantuvo relativamente estable después del día 60, contrario a la tendencia a disminuir en el día 90 en los tratamientos EU 0.1, 0.5, 1% y L2%. Estos recuentos bajos de RBC fueron observados previamente por Affonso *et al*. (2002) y por Yue y Zhou (2008), quienes sugirieron que ésta es una respuesta fisiológica de estrés producida por el cambio de alimento, privación o toxicidad del mismo.

Leucocitos Totales (WBC).

En la figura 11 se muestra el recuento de los WBC de los cinco tratamientos durante el periodo experimental.

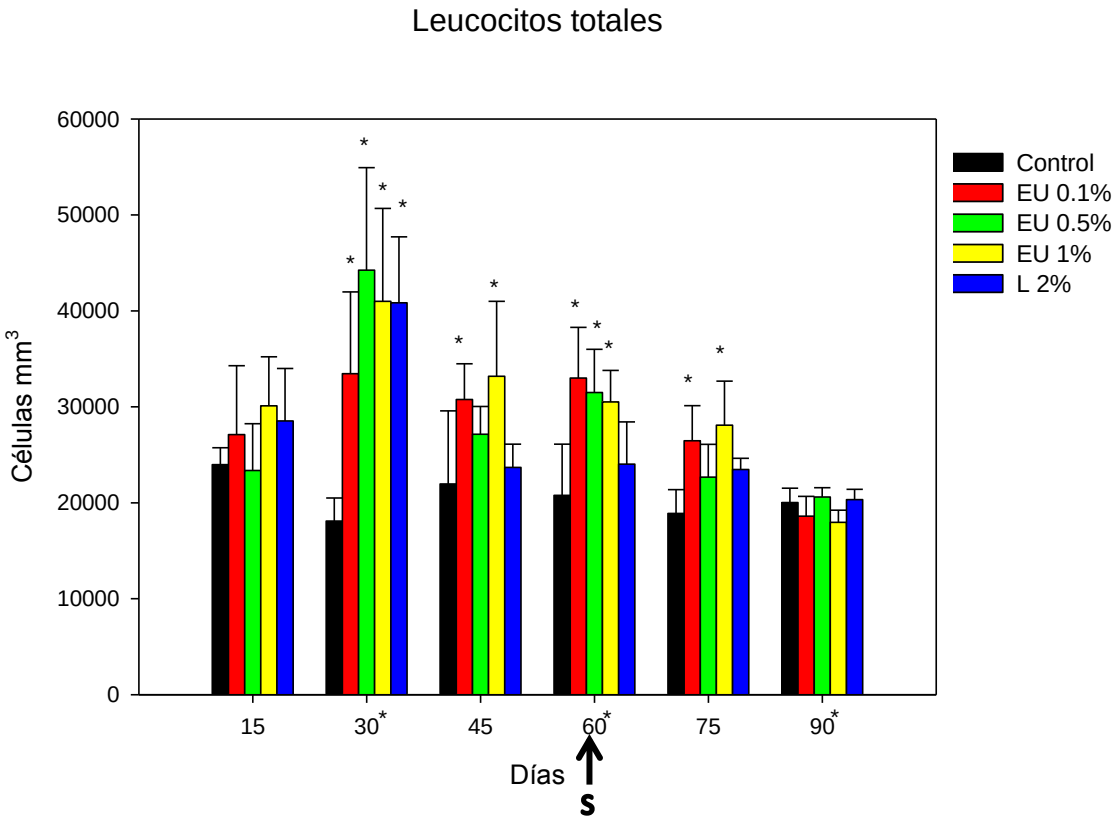


Figura 11. Leucocitos totales de *O. niloticus* alimentada con diferentes niveles de extracto de *U. clathrata* y levadura (*S. cerevisiae*). La S indica la suspensión de administración de inmunoestimulante dietario.

(*) Denotan diferencias significativas entre los días y tratamientos.

El número de WBC en los tratamientos EU 0.1%, EU 0.5%, EU 1% y L 2% fue significativamente mayor al control en el día 30. Al día 45 los tratamientos con extracto de ulva (EU 0.1%, 0.5 y 1%) el número de leucocitos fue más alto comparado al L 2% y al control. Esta diferencia se mantuvo durante los días 60 y 75, mientras que al día 90 no se registraron diferencias significativas entre los tratamientos ($P<0.05$).

El recuento de WBC del tratamiento control no tuvo diferencias significativas durante el periodo experimental ($P<0.05$) y se mantuvo entre 17,000 y 22,000 células.mm³ lo cual concuerda con lo que se ha reportado para *O.niloticus* sanos mantenidos en condiciones de cultivo similares a las del presente estudio (Ghiraldelli *et al*., 2006; Guo *et al*., 2010; Hahn-von-hessberg y Grajales-Quintero 2011).

El recuento de WBC es considerado un indicador del estado de salud de los organismos debido a su importancia en el sistema inmune innato y adaptativo (Roberts 1978). Los leucocitos están involucrados en la regulación inmunológica del organismo, incrementan en número como respuesta de defensa del cuerpo durante periodos de estrés (Santhakumar, Balaji y Ramudu 1999; Das, Ayyap- pan y Jena 2006; Del Rio-Zaragoza *et al*., 2008). Diversos estudios han demostrado que algunos inmunoestimulantes promueven la leucopoyesis y que los tratamientos con mejor respuesta inmune tienen mayor recuento de WBC (Choudhary, *et al*. 2005; Jha, *et al*. 2007; Andrews *et al* 2009).

El recuento de WBC en el tratamiento L 2% en el día 30, fué significativamente mayor con respecto al control ($P<0.05$), lo cual fue observado en la misma especie a partir del día 21 de alimentación con 1% de *S.cerevisiae* por El-Boshy *et al*. (2010). Esto puede atribuirse a que la levadura contiene en su pared celular compuestos como los polímeros de glucosa (también conocidos como glucanos), manoproteínas (polímeros de manosa unidos a péptidos) y quitina. Según Cabib *et al*. (1982), la célula de la levadura contiene 7.7% de glucano crudo y 1% de quitina. Y estos compuestos han demostrado su capacidad para aumentar el recuento de leucocitos en tilapia nilótica (El-Boshy *et al*.,2010 ; Sahan y Duman

2010) y otras especies de peces (Li y Gatlin 2004 y 2003), sin embargo los efectos fisiológicos que ocasiona en los organismos la levadura *S. cerevisiae* o algún componente de su célula, no se observan por periodos largos aunque se mantenga su administración dietaria (Velhac *et al*., 1996; 1998; Bagni *et al*., 2005; Misra *et al*.,2006). Esto concuerda con lo observado en este estudio, pues al día 45 ya no se observaron diferencias significativas entre los recuentos de WBC del tratamiento L 2% y del control ($P<0.05$).

El recuento de WBC mostró diferencias significativas entre los tratamiento de EU y entre los días de experimento pues al día 30 el recuento de WBC de los tratamientos EU 0.5 y 1% fueron significativamente mayores al tratamiento EU 0.1%. A diferencia del día 45 cuando los tratamientos EU 1% y 0.1% fueron significativamente mayores al EU 0.5%; aunque para el día 60 no hubo diferencias significativas entre los 3 diferentes tratamientos ($P<0.05$).

Al día 75, solo EU 0.1% y EU 1% fueron significativamente mayores al resto de los tratamientos y finalmente al día 90 no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos incluyendo al L 2% y al control ($P<0.05$).

El incremento de WBC en los tratamientos del EU se atribuye a los compuestos sulfatados presentes en el extracto, los cuales son reconocidos por un receptor de membrana de los leucocitos (Castro *et al.*, 2006). Cuando los polisacáridos se unen al receptor de membrana, la célula se vuelve más activa y al mismo tiempo secreta citoquinas que estimulan la formación de nuevos leucocitos (Fujiki *et al*., 2000; Peddie *et al*., 2002; Castro *et al*, 2006).

Actividad Fagocítica (AF).

La fagocitosis es indicador de la respuesta inmune (Nabity y Ramaiah 2010); en la figura 12 se muestran los resultados de la fagocitosis de los cinco tratamientos registrado a lo largo del periodo experimental.

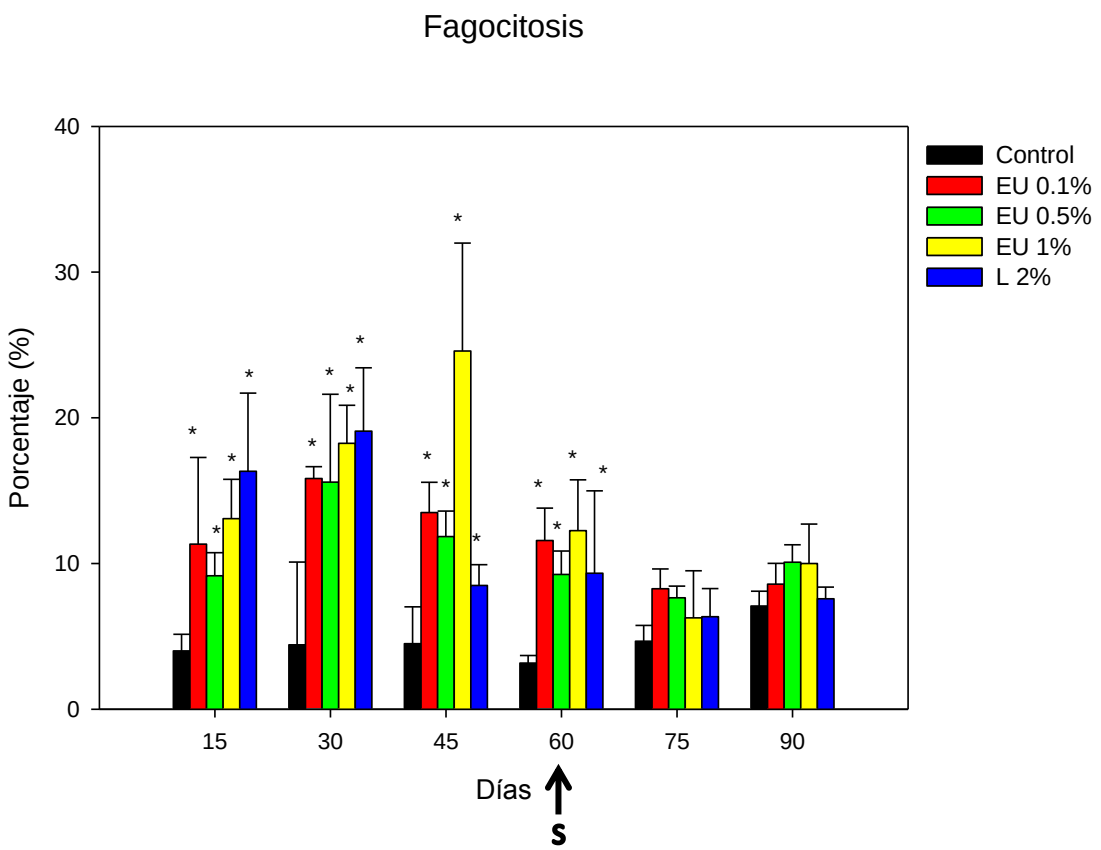


Figura 12. Actividad fagocítica de *O. niloticus* alimentada con diferentes niveles de extracto de *U. clathrata* y levadura (*S. cerevisiae*). La S indica la suspensión de administración de inmunoestimulante dietario.

(*) Denotan diferencias significativas entre los tratamientos.

La fagocitosis observada en el tratamiento control se mantuvo entre el 4 y 8% y no se observaron diferencias significativas entre los días del periodo experimental ($P<0.05$). Estos porcentajes fueron observados con anterioridad (observación propia en estudios preliminares) en organismos *Oreochromis sp.* sanos y mantenidos en condiciones de cultivo similares a las del presente estudio. El-Boshy *et al* (2010) reportó una fagocitosis entre 16 y 18% para *O. niloticus* sanos y 8% para organismos inmunodeprimidos, sin embargo las condiciones de cultivo reportadas son diferentes a las que se mantuvieron en el presente estudio.

En el presente trabajo la fagocitosis que presentó el tratamiento L 2% fue significativamente diferente al control desde el día 15 hasta el día 75 y finalmente

al día 90 no se observaron diferencias significativas entre L 2% y control. Este aumento en la actividad fagocitaria, se corrobora al ya observado por otros autores cuando se administró levadura o algún componente de esta célula en la dieta (Sakai *et al*., 2001; Sahan y Duman, 2010).

Por otro lado, la fagocitosis de los tratamientos que contienen extracto de *U. clathrata* mostraron diferencias significativas con respecto al control desde el día 30 hasta el día 60 ($P<0.05$); aunque cada uno tuvo diferentes porcentajes. Sin embargo, al día 90 del experimento ningún tratamiento EU mostró diferencias significativas con respecto al control ó a L 2%.

En lo que respecta la fagocitosis de EU 1% fue significativamente diferente al control desde el día 15, tuvo su nivel más alto el día 45 y disminuyó el día 60, esta disminución se acentuó con la suspensión de EU, al día 75 no se observaron diferencias significativas entre EU 1% y el control ($P<0.05$).

La fagocitosis de EU 0.5% y de EU 0.1% fueron significativamente diferentes al control desde el día 15, tuvieron su nivel más alto el día 30 y al día 60 aunque bajaron el porcentaje de fagocitosis, fueron significativamente mayores al control. Quince días después de la suspensión de la administración de EU en la dieta (día 75), no se observaron diferencias significativas entre EU 0.5%, EU 0.1% y el control ($P<0.05$).

El aumento en la actividad fagocítica mostrado en este estudio fue reportado previamente por Castro *et al.* (2004) quien mediante un estudio *in vitro* observó que los extractos acuosos de *Ulva rigida* y *Enteromorpha sp.* podían estimular a los monocitos y granulocitos de rodaballo.

Estudios *in vitro* demostraron que la capacidad de estimulación de los fagocitos depende de la presencia de grupos sulfato en la estructura química del extracto de *Ulva rigida* (Castro *et al*., 2006) El ulvan puede modular la actividad de macrófagos de murino (roedores de laboratorio) y la presencia de los grupos sulfato en la molécula parece ser necesaria para lograr tal efecto (Leiro *et al.,* 2007). En el presente estudio los resultados en la fagocitosis parecen

corresponderse con los polisacáridos sulfatados detectados en el extracto de *U. clathrata* elaborado.

Ergosan ® es un producto comercial que contiene 1% de ácido algínico extraído de *Laminaria digitata y Ascophyllum nodosum* (algas pardas); se ha demostrado su capacidad de aumentar la actividad fagocítica tras su inyección intraperitoneal en trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) (Peddie *et al.,* 2002). Adicionalmente, tras la inyección intraperitoneal de alginato de sodio y carragenina (extraídos de algas rojas) en el mero manchado (*Epinephelus coicoides*) se observó aumento del índice fagocitario (Cheng *et al*., 2007). De igual modo, la administración dietaria de 0.1 y 0.2% de alginato de sodio mostró incrementar la fagicitosis en *Epinephelus fuscoguttatus* (Chiu *et al*., 2008). Sin embargo, la relación de este efecto con la composición del alginato, la carragenina o al ácido algínico no es muy clara ya que no poseen grupos sulfatados en su estructura química.

Proteína Total (PROT).

La concentración de la proteína total sérica de los diferentes tratamientos a lo largo de los 90 días de experimento se muestra en la figura 13.

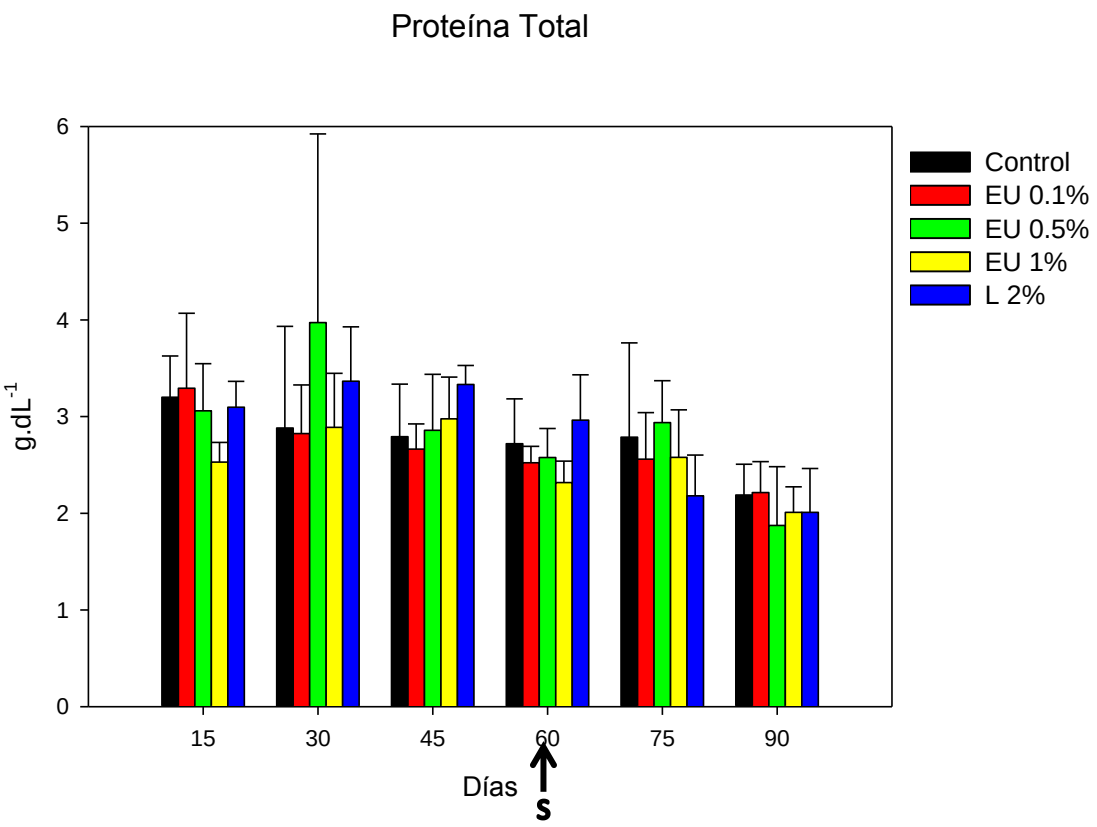


Figura 13. Concentración de la proteína sérica de *O. niloticus* alimentada con diferentes niveles de extracto de *U.clathrata* y levadura (*S. cerevisiae*). La S indica la suspensión de administración de inmunoestimulante dietario.

La concentración de la proteína total sérica de todos los tratamientos se mantuvo entre 1.8 y 4 $g.dL^{-1}$ estos resultados concuerdan con los publicados previamente y se encuentran dentro de los intervalos de organismos de la misma especie mantenidos en condiciones de cultivo similares a las del presente trabajo (Hasan 2007)

El incremento en los niveles de proteína total sérica, albúmina y globulina ha sido asociado con una respuesta inmune fuerte (Wiegertjes *et al*., 1996; Dina *et al*., 2007; Jha *et al*., 2007). Sin embargo, el contenido de proteína total sérica, globulina (figura 14) y albúmina (figura 15) del presente estudio no mostraron diferencias significativas entre los tratamientos ni entre los días experimentales ($P<0.05$) estos resultados fueron observados por Bagni *et al*. (2005) quienes administraron Macrogard (que contiene 0.1% de β-glucano derivado de la pared

celular de *S. cerevisiae*) y Ergosan por ciclos de 60 días (15 días de administración y 45 de suspensión). Los resultados revelaron que las proteínas totales séricas no variaron significativamente entre los tratamientos ni a lo largo del periodo.

Globulina (GB).

El contenido de globulina sérica de los diferentes tratamientos a lo largo de los 90 días de experimento se muestra en la figura 14.

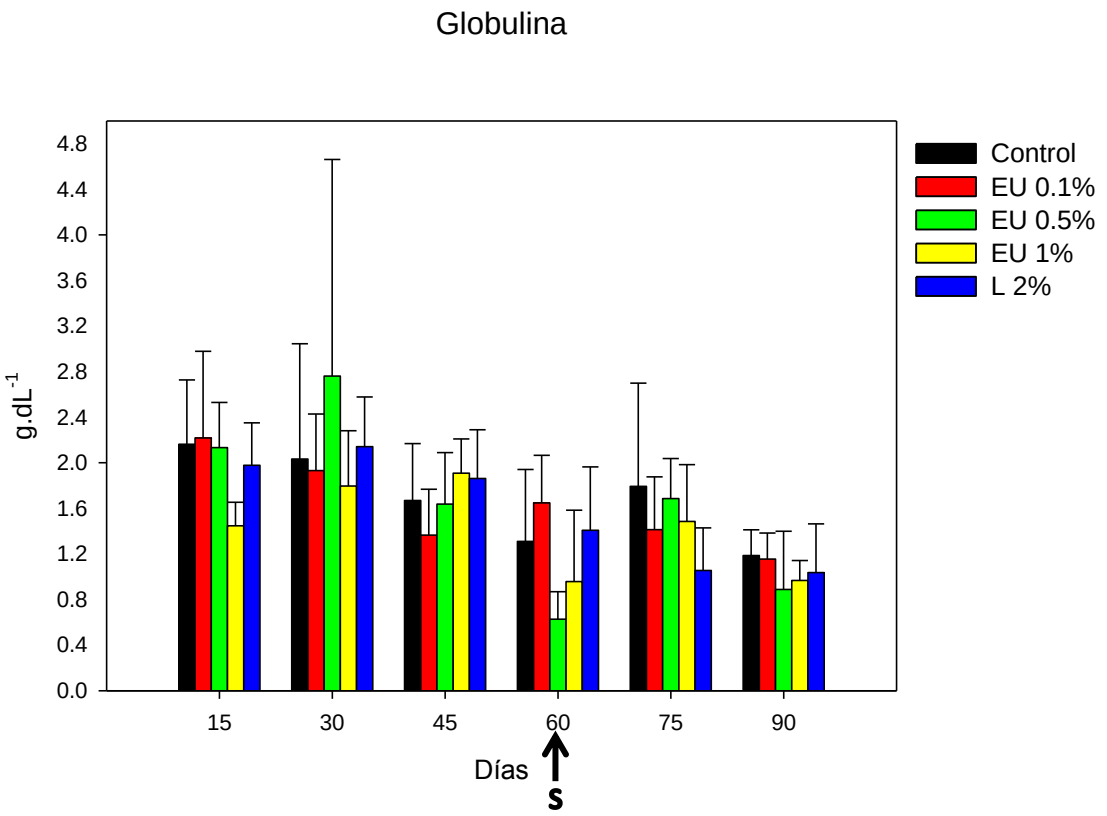


Figura 14. Concentración de globulina sérica de *O. niloticus* alimentada con diferentes niveles de extracto de *U. clathrata* y levadura (*S. cerevisiae*). La S indica la suspensión de administración de inmunoestimulante dietario.

La concentración de Gb de todos los tratamientos se mantuvo entre 0.5 y 2.7 $g.dL^{-1}$ y se encuentran dentro de los intervalos para tilapias de la misma especie en condiciones de cultivo similares a las del presente estudio (Hasan, 2007).

Las γ-globulinas son una fracción de las globulinas y representan la fuente de casi todas la proteínas inmunológicamente activas de la sangre, la presencia de mayor contenido de GB indica mayor resistencia a patógenos siempre que se combinen con conteos altos de WBC y de la fagocitosis (Andrews *et al*., 2009). Sin embargo, los resultados de concentración sérica de Gb no mostraron diferencias significativas entre los tratamientos ni entre los días del periodo experimental (P<0.05) esto podría deberse a que no se realizó una infección experimental a los peces.

Albúmina (AL).

En la figura 15 se muestra el contenido de albúmina sérica de los diferentes tratamientos a lo largo del periodo experimental (P<0.05). La concentración de AL no mostró diferencias significativas entre los tratamientos ni entre los días del experimento.

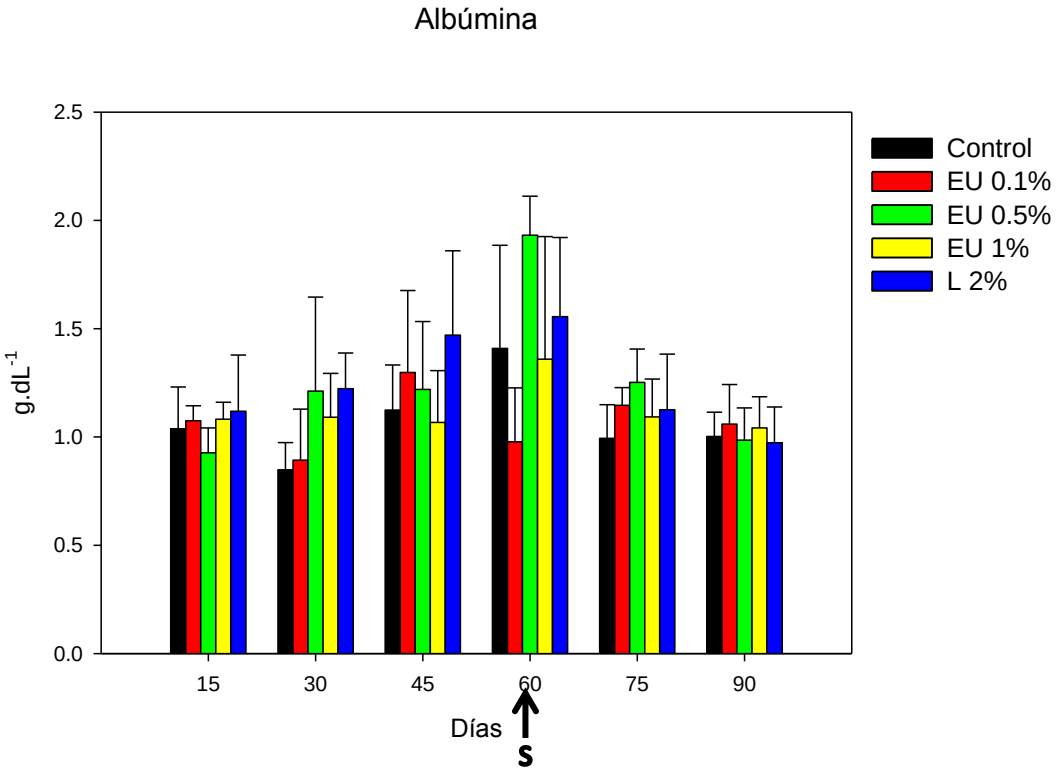


Figura 15 Concentración de albúmina sérica de *O. niloticus* alimentada con diferentes niveles de extracto de *U. clathrata* y levadura (*S. cerevisiae*). La S indica la suspensión de administración de inmunoestimulante dietario.

7.3.3. Duración del Efecto Hematológico y/o Inmunológico.

Los tratamientos con extracto de *U. clathrata* registraron los conteos más altos de WBC al día 30. En la figura 11, se observa una tendencia a disminuir de los WBC a partir del día 45, la cual se acentúa con la suspensión de la administración del extracto. Sin embargo al día 75 todavía es posible observar el efecto del EU y de la L en los valores altos de los WBC ya que aun son significativamente diferentes al control. Por otro lado, el nivel más alto de la fagocitosis de los tratamientos EU fue diferente y según el porcentaje de inclusión en la dieta (figura 12).

La inclusión de 0.5 y 1% del extracto de *U. clathrata* en la dieta de juveniles de *O. niloticus* mostró el mayor incremento en el número de leucocitos totales a los 30 días y la mejor actividad fagocítica se observó desde el día 15 sus niveles más altos fueron alcanzados a los 45 días. Estos efectos se mantuvieron hasta 15 días posteriores a la suspensión dietaria del extracto.

Castro *et al*. (2004) detectaron mediante un estudio *in vitro* que la exposición prolongada al extracto de ulva no satura ni desgasta a los fagocitos de rodaballo, es decir que estas células siguen estimuladas después de una exposición de 6 horas al extracto hidrosoluble de diferentes especies de macroalgas verdes. Sin embargo los resultados de WBC y fagocitosis, presentados en las figuras 11 y 12 respectivamente, muestran que a pesar de la administración continua de EU durante 60 días, la respuesta fisiológica no se mantiene en los niveles más altos durante todo el periodo. Este efecto puede deberse a que el sistema inmune del pez se desensibiliza al inmunoestimulante y se pierde la respuesta inmune paulatinamente (Bricknell y Dalmo, 2005).

7.3.4. Crecimiento.

Crecimiento y Ganancia de Peso.

La tabla 13 muestra algunos indicadores de crecimiento (peso final y ganancia de peso) de tilapia nilótica al final del experimento

Aunque existen estudios previos que indican que la inclusión de levadura (o algún componente de su célula) o ácido algínico en la dieta, aumentó significativamente la ganancia de peso de diferentes especies de peces como el esturión belga (*Huso huso*) (Jalali *et al*., 2009; Heidarieh *et al.*, 2011) la lubina rayada (*Morone chrysops×M. saxatilis)* (Li y Gatlin 2003, 2004 y 2005) y la tilapia (*O. niloticus*) (Hasan, 2007; Abdel-Tawwab *et al.*, 2008). En la tabla 13 se puede observar que el peso final individual y la ganancia de peso registradas en el presente estudio no tuvieron diferencias significativas entre los tratamientos (P<0.05). Sin embargo, la administración dietaria de ácido algínico a tilapia nilótica (Merrifield *et al.,* 2011) y de ácido algínico o β-glucano de levadura a robalo (Bagni *et al.*, 2005) revelaron resultados semejantes a los observados en tilapia nilótica en esta investigación.

Tabla 13. Peso individual inicial, final y ganancia de peso individual de tilapia nilótica alimentada con diferentes niveles de extracto de *U. clathrata* y levadura (*S. cerevisiae*).

Tratamiento	Peso individual inicial (g) (ẋ ±d.e.)	Peso individual final (g) (ẋ ±d.e.)	Ganancia de peso individual (g) (ẋ ±d.e.)
C	24.34±3.45[a]	75.82±15.80[b]	52.39±6.81[c]
EU 0.1 %	25.71±1.88[a]	84.20±3.62[b]	58.49±4.72[c]
EU 0.5 %	24.33±0.45[a]	81.03±1.54[b]	56.70±8.45[c]
EU 1 %	24.50±0.22[a]	83.89±6.93[b]	59.39±6.88[c]
L 2%	24.58±0.39[a]	86.92±2.83[b]	62.34±2.43[c]

Consumo de Alimento y Supervivencia.

En la tabla 14 se muestran los resultados de consumo de alimento total y supervivencia de tilapia nilótica en relación al tratamiento experimental. Los resultados de consumo de alimento no presentaron diferencias significativas entre los tratamientos, lo que es de suma importancia cuando se adicionan ingredientes nuevos a las dietas pues indica que el alimento fue igualmente aceptado por los organismos con o sin aditivo (extracto de ulva o levadura).

La supervivencia fue alta en todos los tratamientos. Sin embargo, la supervivencia para L 2% resultó de 88.89% significativamente diferente al resto de los tratamientos incluyendo al control (P<0.5). Abdel-Tawwab *et al*. (2008) reportaron que la supervivencia parece disminuir con la inclusión de levadura por un periodo de 12 semanas, sin embargo en su estudio no mostró diferencias significativas entre el periodo de administración y la supervivencia. Este resultado puede atribuirse al periodo prolongado de exposición a *S. cerevisiae*. La exposición de peces a inmunoestimulantes dietarios en dosis altas o por periodos largo de tiempo pueden ser inmunosupresores en incluso colapsar al organismo hasta causar la muerte (Gannam & Schrock, 1999).

Tabla 14. Consumo total de alimento y supervivencia acumulada de tilapia nilótica alimentada con diferentes niveles de extracto de *U. clathrata* y levadura (*S. cerevisiae*).

Tratamiento	Consumo individual de alimento (g) ($\dot{x}$ ±d.e.)	Supervivencia acumulada (%)
C	44.98±2.52[a]	98.15 [a]
EU 0.1%	48.13±0.79 [a]	96.08 [a]
EU 0.5%	47.00±6.50 [a]	96.3 [a]
EU 1%	46.37±1.3 [a]	93.52 [a]
L 2%	45.42±0.99[a]	88.89 [b]

Conversión Alimenticia, Crecimiento Específico y Eficiencia Alimenticia.

La tasa de crecimiento específico (TCE), tasa de conversión alimenticia (TCA) y la tasa de eficiencia alimenticia (TEA) son indicadores de crecimiento que se utilizan comúnmente en tilapia y otras especies (Bagni *et al*., 2005; Abdeltawwab *et al*., 2008; Abd El-Rhman *et al*., 2009; Andrews *et al*., 2009).

Indicadores de crecimiento

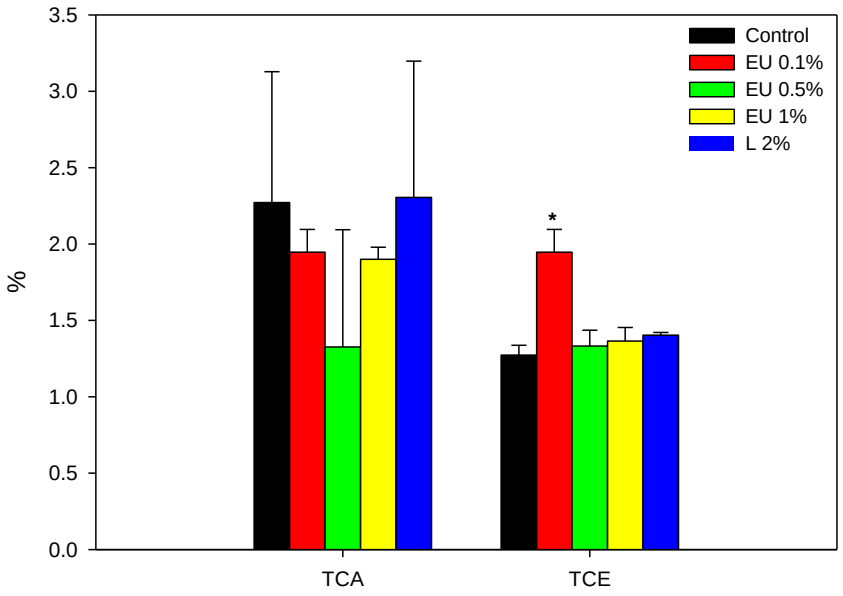


Figura 16. Tasa de Conversión Alimenticia y de Crecimiento Específico de *O. niloticus* alimentada con diferentes niveles de extracto y levadura (*S. cerevisiae*).

(*) Muestran diferencias significativas.

Los resultados de la TCA y la TCE se muestran en la figura 16, mientras que los de la TEA se muestran en la figura 17. La TCA no mostró diferencias significativas entre los tratamientos, mientras que la TCE del tratamiento EU 0.1% fue significativamente diferente al resto de los tratamientos incluyendo al control ($P<0.05$).

El aumento en la TCE indica aumento de ganancia de peso por día; este resultado había sido reportado para *O. niloticus* (Hasan, 2007) y otras especies (Jalali *et al*., 2009; Heidarieh *et al*., 2012) tras la administración de Ergosan. Sin embargo, Merrifield *et al*. (2011) no observó diferencias significativas en la TCE de tilapia nilótica tras 60 días de administración dietaria de 0.5% de ácido algínico (Ergosan ®), este resultado puede ser explicado por el tamaño de la muestra pues se basó en las mediciones de 3 peces.

En contraste con los resultados del presente estudio, Abdel-Tawwab *et al*. (2009) y Hasan (2007) reportaron que la inclusión de *S. cerevisiae* incrementó el crecimiento de tilapia nilótica y modificó todos los indicadores (TCA, TCE y TEA) con respecto al control.

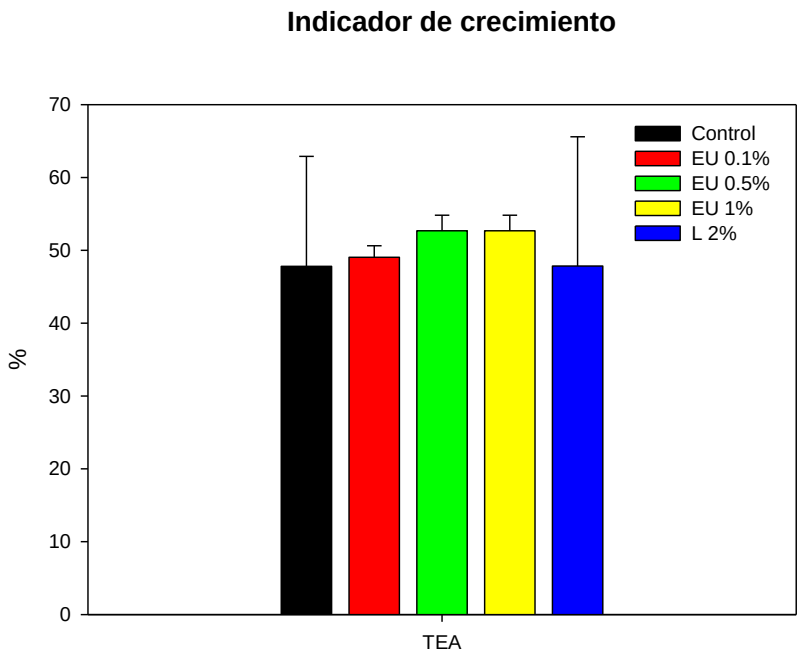


Figura 17. Tasa de Eficiencia Alimenticia de *O. niloticus* alimentada con diferentes niveles de extracto de *U. clathrata* y levadura (*S. cerevisiae*).

La TEA, de manera similar que la TCA, no mostró diferencias significativas entre los tratamientos experimentales ($P<0.05$), lo cual concuerda con lo reportado por Merrifield *et al*. (2011). Contrario a esto, Leonhardt *et al*. (2011) observaron mejor TCA y TEA en tilapia nilótica alimentada con Ergosan 0.5%; sin embargo las condiciones de desarrollo del estudio no son comparables pues fue realizado en jaulas flotantes.

Se incrementó la ganancia en peso diaria de los juveniles de tilapia a los 90 días de adicionarle *U.clathrata* al 0.1% de la ración alimenticia diaria. Sin embargo, los resultados en los indicadores de crecimiento reportados en estudios previos

sugiere que la variación de estos indicadores en tilapia depende del tiempo de duración del experimento entre otros factores (Hasan, 2007).

Notas del Periodo Experimental.

La tabla 14 muestra el porcentaje de supervivencia acumulada durante los 90 días del periodo experimental. Aunque el numero de peces muertos no fue alto (10 peces) se encontró diferencia significativa entre el porcentaje de supervivencia acumulada para L2% con relación a todos los tratamientos incluido el control. Los peces moribundos detectados fueron retirados de los tanques para su necropsia.

También se encontraron cuatro y siete peces moribundos en los tratamientos EU 1% y EU 0.1%, cuya necropsia se presenta a continuación. Cabe resaltar que en las necropsias de los peces de los demás tratamientos resultaron SCPA (Sin Cambio Patológico Aparente).

Hallazgos a la necropsia.

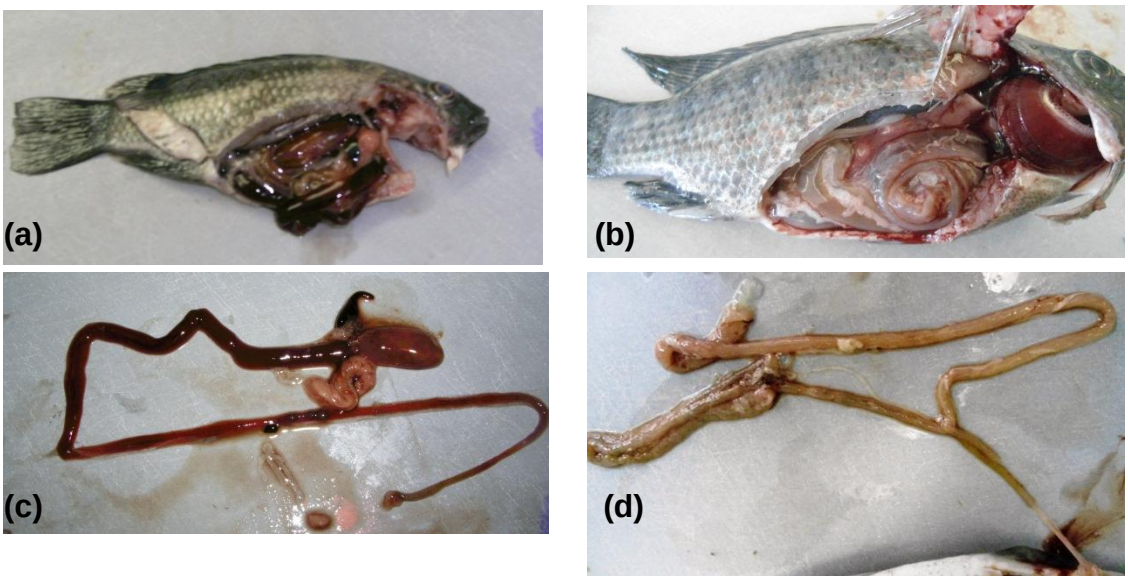


Figura 18. Hallazgos a la necropsia. a) Tumefacción y hemorragia del tracto intestinal de los peces con EU 0.1%, b) Tracto gastrointestinal de los peces control, c) Tracto gastrointestinal hemorrágico de los peces con EU 0.1%, d) Tracto gastrointestinal de los peces control.

En la figura 18(a) se observa la evidente tumefacción en tracto gastrointestinal al incidir en la cavidad corporal. Al disectar el estómago e intestino se observó enteritis hemorrágica anterior que no afectaba al estomago (figura 18 c). El cual

tenía contenido estomacal (pellets de alimento), lo cual indica que a pesar de la lesión tan grave (figura 18(c)) los animales seguían consumiendo alimento.

Durante la necropsia se tomaron muestras del tejido para su estudio histopatológico, cuyos resultados se presentan en la figura 19.

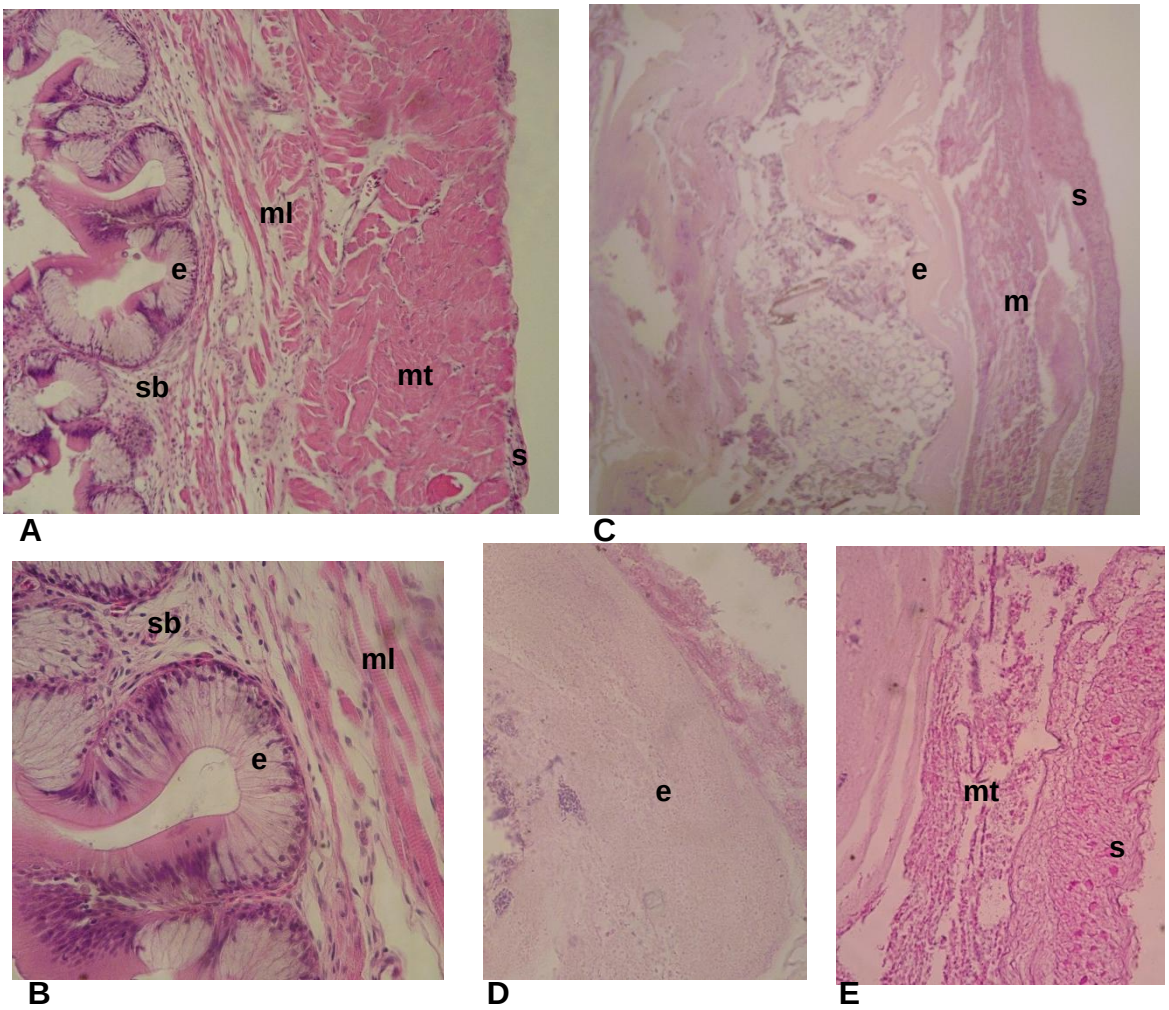


Figura 19. Corte histológico de intestino anterior (tinción HE). A intestino normal con definición clara de serosa (S), muscular transversal (MT), muscular longitudinal (ML), submucosa (SB) y epitelio (E) (*400X*).B acercamiento a epitelio de intestino normal. C intestino lesionado (600X). D acercamiento a la mucosa de intestino lesionado. E acercamiento a muscular y serosa de intestino lesionado (600X).

La figura 19 C muestra la poca distinción de capas histológicas, se observan los capilares sanguíneos llenos y ausencia de células definidas. La figura 19D muestra licuefacción de las células epiteliales, pérdida total de arquitectura histológica, no se observan el epitelio cilíndrico simple. Finalmente la figura 19E muestra la restos de miocitos sin embargo la pérdida de células también es evidente. De acuerdo a los hallazgos en el estudio histopatológico existe limitada distinción de capas histológicas y pérdida total de arquitectura tisular, destrucción de células y el diagnóstico es compatible a necrosis.

Los resultados obtenidos muestran una reacción individual al tratamiento EU 0.1% y EU 1% considerando los porcentajes tan bajos de mortalidad de 3.6 y 6.8% respetivamente. Otros autores han reportado que dentro de la misma especie se registran diferencias en el metabolismo de sustancias que explican variaciones en las reacciones individuales a medicamentos, en este caso podría deberse a los inmunoestimulantes (OMS, 1966)

6. CONCLUSIONES

La técnica de elaboración del extracto de *U. clathrata* tuvo buen rendimiento en gramos producidos con relación a los gramos de harina.

Se extrajeron polisacáridos semejantes al ulvan cuya purificación y concentración fue mejor a la reportada por otros autores.

Los porcentajes de inclusión evaluados modularon la producción de leucocitos y su función, reflejado en el aumento del número de leucocitos totales y la actividad fagocítica, efecto que se mantuvo hasta 15 días después de la suspensión dietaria del extracto.

No se observaron efectos adversos en el crecimiento, palatabilidad y la supervivencia con la inclusión del extracto de *U. clathrata* a 0.1, 0.5 y 1%en la dieta de tilapia.

Los resultados elucidan el potencial del extracto de *U.clathrata* para activar algunos indicadores de la respuesta inmune innata en tilapia y particularmente bajo condiciones de inmunosupresión previstas en las granjas acuícolas como son el transporte, desdobles, biometrías, cambio de temperatura, manejo de reproductores.

7. RECOMENDACIONES

En estudios de Inmunoestimulación, el enfrentamiento de los peces inmunoestimulados a patógenos es comprobatorio. Por lo que se recomienda desafiar a tilapias inmunoestimuladas con el extracto de *Ulva clathrata* a un patógeno específico o a factores de estrés para corroborar la resistencia conferida.

Se recomienda evaluar el efecto dietario del extracto de *U. clathrata* a escala piloto en diferentes sistemas de cultivo de tilapia durante un ciclo productivo con el propósito de estudiar el crecimiento, supervivencia y resistencia al estrés de los peces.

10. LITERATURA CITADA.

1. Abd El-Rhman A.M., Khattab Y. a E., & Shalaby A. M. E. (2009). *Micrococcus luteus* and *Pseudomonas* species as probiotics for promoting the growth performance and health of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. Fish & Shellfish Immunology 27(2):175-80.
2. Abdel-Tawwab M., Abdelrahman A., & Ismael N. (2008). Evaluation of commercial live bakers' yeast, *Saccharomyces cerevisiae* as a growth and immunity promoter for Fry Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) challenged in situ with *Aeromonas hydrophila*. Aquaculture 280(1-4): 185-189.
3. Affonso E.G., Polez V.L.P.,Corrêa C.F., Mazon A.F., Araújo M.R.R., Moraes G. & Rantin F.T. (2002). Blood parameters and metabolites in the teleost fish *Colossoma macropomum* exposed to sulfide or hypoxia, Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol. 133: 375–382
4. Aly S. M., Abdel-Galil Ahmed Y., Abdel-Aziz Ghareeb A., & Mohamed M. F. (2008). Studies on *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus acidophilus*, as potential probiotics, on the immune response and resistance of Tilapia nilotica (*Oreochromis niloticus*) to challenge infections. Fish & Shellfish Immunology 25(1-2): 128-36.
5. Aly S. M., Mohamed F. M. & John G. (2008). *Echinacea* as immunostimulatory agent in nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) via earthen pond experiment. 8th International Symposium on Tilapia Aquaculture. pp. 1033-1042.
6. Anderson D.P., Siwicki A.K. & Rumsey, G.L. (1995) Injection or immersion delivery of selected immunostimulants to trout demonstrate enhancement of nonspecific defense mechanisms and protective immunity. In: Shariff M., Arthur J.R., Subasinghe R.P. (Eds.), Diseases in Asian Aquaculture: II. Fish Health Section. Asian Fisheries Society, Manila, pp. 413–426.
7. Ardo L., Yin G., Xu P., Varadi L., Szigeti G., Jeney Z. & Jeney G. (2008). Chinese herbs (*Astragalus membranaceus* and *Lonicera japonica*) and boron enhance the non-specific immune response of Nile tilapia (*Oreochromis*

niloticus) and resistance against *Aeromonas hydrophila*. Aquaculture 275(1-4): 26-33.

8. Andrews S. R., Sahu N. P., Pal A. K., & Kumar S. (2009). Haematological modulation and growth of *Labeo rohita* fingerlings: effect of dietary mannan oligosaccharide, yeast extract, protein hydrolysate and *chlorella*. Aquaculture Research 41(1): 61-69.
9. Bagni, M., Romano, N., Finoia, M. G., Abelli, L., Scapigliati, G., Tiscar, P. G.& Sarti, M.. (2005). Short- and long-term effects of a dietary yeast beta-glucan (Macrogard) and alginic acid (Ergosan) preparation on immune response in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). Fish & Shellfish Immunology, 18(4), 311-25.
10. Bayne C.J. & Gerwick L. (2001) The acute phase response and innate immunity of fish. Developmental and Comparative Immunology 25: 725-743.
11. Bittencourt N.L. y Molinari L.M. (2003). Haematological and biochemical values for Nile tilapia *Oerochromis niloticus* cultured in semi-intensive system. Biological Sciences 25 (2): 385-389.
12. Bricknell I., & Dalmo R. a. (2005). The use of immunostimulants in fish larval aquaculture. Fish & Shellfish Immunology 19(5): 457-72.
13. Brooks M.B. (2010).Transfusion of Plasma Products. En: Weiss D.J. y Wardrop K.J.(eds). Veterinary Hematology. Sixth edition. Wiley-Blackwell. Iowa. 744-750p.
14. Cabello F. C. (2006). Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. Environmental Microbiology 8(7): 1137-44.
15. Cabib E., Roberts R., Bowers B. (1982). Synthesis of the yeast cell wall and its regulation. Annu. Rev. Biochem. 51, 763–793.
16. Castro R., Piazzon M. C., Zarra I., Leiro J., Noya M., & Lamas J. (2006). Stimulation of turbot phagocytes by *Ulva rigida* C. Agardh polysaccharides. Aquaculture 254(1-4): 9-20.

17. Cheng A.-C., Tu C.-W., Chen Y.-Y., Nan F.-H., & Chen J.-C. (2007). The immunostimulatory effects of sodium alginate and iota-carrageenan on orange-spotted grouper *Epinephelus coicoides* and its resistance against *Vibrio alginolyticus*. Fish & Shellfish Immunology 22(3): 197-205.
18. Chiu S., Tsai R., Hsu J., Chun L., & Cheng W. (2008). Dietary sodium alginate administration to enhance the non-specific immune responses, and disease resistance of the juvenile grouper *Epinephelus fuscoguttatus*. Aquaculture 277(1-2): 66-72.
19. Choudhary D., PalA.K., Sahu N.P., Kumar S., Das S.S. & Mu- kherjee S.C. (2005) Dietary yeast RNA supplementation reduces mortality by *Aeromonas hydrophila* in rohu (*Labeo rohita* L.) juveniles. Fish and Shellfish Immunology 19: 281-291
20. Christybapita D., Divyagnaneswari M. & Michael R. D. (2007). Oral administration of *Eclipta alba* leaf aqueous extract enhances the non-specific immune responses and disease resistance of *Oreochromis mossambicus*. Fish & Shellfish Immunology 23(4): 840-852
21. Ciancia M., Quintana I. & Cerezo A. S. (2010). Overview of anticoagulant activity of sulfated polysaccharides from seaweeds in relation to their structures, focusing on those of green seaweeds. Current Medicinal Chemistry 17: 2503-29.
22. Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca (CONAPESCA).(2010). Anuario Estadístico de Acuacultura y Pesca. pp28
23. Costa L.S. (2010).Biological activities of sulfated polysaccharides from tropical seaweeds. Biomedicine & Pharmacotherapy 64: 21-8.
24. Dalmo R.A.& Seljelid R. (1995). The immunomodulatory effect of LPS, laminaran and sulfated laminaran [β(1,3)-D-glucan] on Atlantic salmon, *Salmo salar* L., macrophages *in vitro*. Journal of Fish Diseases 18: 175–185.

25. Domínguez M., Takemura A. & Tsuchiya M. (2005). Effects of changes in environmental factors on the non-specific immune response of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L. Aquaculture Research *36*(4): 391-397.

26. Ellis, A.E. (1977). The leucocytes of fish: A review. Journal Fish Biology (11):.453-491.

27. El-Boshy M. E., El-Ashram A. M., Abdelhamid F. M., & Gadalla H. a. (2010). Immunomodulatory effect of dietary *Saccharomyces cerevisiae*, beta-glucan and laminaran in mercuric chloride treated Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and experimentally infected with *Aeromonas hydrophila*. Fish & Shellfish Immunology 28(5-6): 802-808.

28. FAO (2010). El estado mundial de pesca y acuacutura (SOFIA) Roma: Departamento de pesca 25-27 pp.

29. FAO (2009). Fishery Statistic. Roma.

30. FAO (2012). Globefish.

31. Fujiki K., Shin D.H., Nakao M., Yano T. (2000). Molecular cloning and expression analysis of carp (*Cyprinus carpio*) interleukin-1β, high affinity immunoglobulin E Fc receptor gamma subunit and serum amyloid A. Fish & Shellfish Immunology 10: 229–242.

32. Galindo-Villegas J. & Hosokawa H. (2004). Immunostimulants: towards temporary prevention of diseases in marine fish. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Nieto-López, M.G., Villareal, D., Scholz, U. y González, M.. Avances en nutrición acuícola VII. Memorias del VII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 16-19p.

33. Gannam A.L. & Schrock R.M. (1999). Immunostimulants in Fish Diets. Journal of Applied Aquaculture 9(4):53-89.

34. Ghiraldelli L., Laterça-Martins M., Yamashita M., & Tomas Jeronimo, G. (2006). Hematologia de *Oreochromis niloticus* (*Cichlidae*) e *Cyprinus carpio* (*Cyprinidae*) mantidos em diferentes condições de manejo e alimentação no

Estado de Santa Catarina , Brasil. Acta Scientiarum.Biological Sciences 28(4): 319-325.

35. Gioacchini G., Smith P., & Carnevali O. (2008). Effects of Ergosan on the expression of cytokine genes in the liver of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to enteric red mouth vaccine. Veterinary Immunology and Immunopathology, 123(3-4): 215-22.
36. Guo R., Lim C., Xia H., Aksor M. Y., & Li M. (2010). Effect of various dietary vitamin A levels on growth performance and immune response of tilapia (*Oreochromis niloticus*). Frontiers of Agriculture in China 4(4): 507-512.
37. Hakalahti-Sirén T., Mikheev V. N. & Valtonen E. T. (2008). Control of freshwater fish louse *Argulus coregoni*: a step towards an integrated management strategy. Diseases of Aquatic Organisms. 82: 67-77.
38. Hahn-von-hessberg C. M. & Grajales-quintero A. (2011). Parámetros hematológicos de Tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus* , Linnaeus 1757) con peso entre 250 g y 350 g , en el Centro Experimental Piscícola de la Universidad de Caldas Hematological parameters of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus* , Linnae. Medicina Veterinaria 5(1): 47-61.
39. Harikrishnan R., Balasundaram C. & Heo M.S. (2011).Impact of plant products on innate and adaptive immune system of cultured finfish and shellfish. Aquaculture 317: 1-15.
40. Hartwell L.H. (1974) *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. Bacteriological Reviews 38 (2): 164-198.
41. Hasan, Y. (2007). Physiological effects of some additives on growth , blood constituents and immunity in nile tilapia *(Oreochromis niloticus). PDH thesis*. Assiut University.
42. Hayden HS, Blomster J, Maggs CA, Silva PA, Stanhope MJ, & Waaland JR (2003) Linnaeus Was Right All Along: *Ulva* and *Enteromorpha* are not distinct genera. European Journal of Phycology 38:277–294.
43. Heidarieh M., Soltani M., Tamimi A. H., & Toluei M. H. (2011). Comparative Effect of Raw Fiber (Vitacel) and Alginic acid (Ergosan) on Growth

Performance , Immunocompetent Cell Population and Plasma Lysozyme Content of Giant Sturgeon (*Huso huso*). Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 450, 445-450.

44. Hernández-Garibay E., Zertuche-González J. A. & Pacheco-Ruíz I. (2011).Isolation and chemical characterization of algal polysaccharides from the green seaweed *Ulva clathrata* (Roth) C. Agardh. Journal of Applied Phycology 23: 537-542.
45. Hiroishy S., Sugie K., Yoshida T., Morimoto J., Taniguchi Y., Imai S. & Kurebayashi, J., (2001). Antitumor effects of *Marginisporum crassissimum* (Rhodophyceae), a marine red alga. Cancer Lett. 167: 145–150.

46. Ho Y., Gruhler A., Heilbut A., Bader G.D., Moore L., Adams S.L., Millar A., Taylor P., Bennett K., Boutilier K., Yang L., Wolting C., Donaldson I., Schandorff S., Shewnarane J., Vo M., Taggart J., Goudreault M., Muskart B., Alfarano C., Dewar D., Lin Z., Michalickova K., Willems A.R., Sassi H., Nielsen P.A., Rasmussen K.J., Andersen J.R., Johansen L.E., Hansen L.H., Jespersen H., Podtelejnikov A., Nielsen E., Crawford J., Poulsen V., Sorensen B.D., Matthiesen J., Hendrickson R.C., Gleeson F., Pawson T., Moran M.F., Dorocher D., Mann M., Hogue C.W.V., Figeys D. & Tyers M. (2002). Systematic identification of protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae* by mass spectrometry. Nature 415 (10): enero. 180-183

47. Hung S.-W., Tu C.-Y., & Wang W.-S. (2007) (a). In vitro effects of singular or combined anti-oxidative vitamins and/or minerals on tilapia (*Oreochromis* hybrids) peripheral blood monocyte-derived, anterior kidney-derived, and spleen-derived macrophages. Fish & Shellfish Immunology, *23*(1): 1-15.

48. Hung S.-W., Tu C.-Y.& Wang W.-S. (2007)(b). In vivo effects of adding singular or combined anti-oxidative vitamins and/or minerals to diets on the immune system of tilapia (*Oreochromis* hybrids) peripheral blood monocyte-derived, anterior kidney-derived, and spleen-derived macrophages. Veterinary immunology and immunopathology, *115*(1-2): 87-99.

49. Ibrahem M. D., Fathi M., Mesalhy S., & Abd El-Aty A.M. (2010). Effect of dietary supplementation of inulin and vitamin C on the growth, hematology, innate immunity, and resistance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Fish & Shellfish Immunology *29*(2): 241-246.
50. Jacobs L., & Chenia H. Y. (2007). Characterization of integrons and tetracycline resistance determinants in *Aeromonas spp*. isolated from South African aquaculture systems. International Journal of Food Microbiology *114*(3): 295-306.
51. Jalali M. A., Ahmadifar,E., Sudagar,M., & Takami,G. A. (2009). Growth efficiency, body composition, survival and haematological changes in great sturgeon (*Huso huso* Linnaeus, 1758) juveniles fed diets supplemented with different levels of Ergosan. Aquaculture Research, 40(7): 804-809.
52. Jeney G., Galeotti M., Volpatti D., Jeney Z.& Anderson D.P. (1997): Prevention of stress in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed diets containing different doses of glucan. Aquaculture 154: 1-15.
53. Jha A.K., Pal A.K., Sahu N.P., Kumar S. & Mukherjee S.C. (2007). Haemato-immunological responses to dietary yeast RNA, n-3 fatty acid and b carotene in *Catla catla* ju veniles. Fish and Shellfish Immunology 23:917-927.
54. Kiron V. (2012). Fish immune system and its nutritional modulation for preventive health care. *Animal Feed Science and Technology*, (In press).
55. Kirubakaran C.J.W., Alexander C.P. & Dinakaran-Michael R. (2010). Enhancement of non- specific immune responses and disease resistance on oral administration of *Nyctanthes arbortristis* seed extract in *Oreochromis mossambicus* (Peters). Aquaculture Research. 41: 1630–1639.
56. Lahaye M (2001) Chemistry and physico-chemistry of phycocolloids. Cah Biol Mar 42:137–157.
57. Lara-Flores M., Olvera-Novoa M. A., Guzmán-Méndez B.E., & López- Madrid W. (2003). Use of the bacteria *Streptococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus*, and the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as growth promoters in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Aquaculture 216: 193–201.

58. Li P., Gatlin III D.M., (2003). Evaluation of brewer's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*)asa feed supplement for hybrid striped bass (*Morone chrysops×M. saxatilis*). Aquaculture 219: 681–692.
59. Li P., Gatlin III D.M., (2004). Dietary brewer's yeast and the prebiotic GroBiotick™ AE influence growth performance, immune responses and resistance of hybrid striped bass (*Morone chrysops×M. saxatilis*)to *Streptococcus iniae* infection. Aquaculture 231: 445–456.
60. Li, P., and Gatlin D.M. 2005. Evaluation of the prebiotic GroBiotic®-A and brewer's yeast as dietary supplements for sub-adult hybrid striped bass (*Morone chrysops X M. saxatilis*) challenged in situ with Mycobacterium marinum. Aquaculture 248: 197– 205.
61. Leiro J.M., Castro R., Arranz J. A. & Lamas J. (2007).Immunomodulating activities of acidic sulphated polysaccharides obtained from the seaweed *Ulva rigida* C. Agardh. International immunopharmacology 7: 879-88.
62. Magnadottir B. (2010). Immunological control of fish diseases. Marine biotechnology *12*(4): 361-79.
63. Martínez R., Carpi, Y., Gómez Y., Raíces M., Morales A., Herrera F., González O., Morales R. & Estrada M.P. (2006). Acuabio 1 stimulates anaerobic metabolism and the immune system in goldfish and tilapia larvae. Biotecnología Aplicada, *23*(24): 294-299.
64. Merrifield D. L., Harper G. M., Mustafa S., Carnevali O., Picchietti S., & Davies S. J. (2011). Effect of dietary alginic acid on juvenile tilapia (*Oreochromis niloticus*) intestinal microbial balance, intestinal histology and growth performance. Cell and Tissue Research 344(1): 135-46.
65. Misra C.K., Das B.K., Mukherjee S.C., Pattnaik P. (2006).Effect of long term administration of dietary β-glucan on immunity, growth and survival of *Labeo rohita* fingerlings. Aquaculture 255 (1-4): 82-94.

66. Moll B. (Sinaloa Seafields International) 2004. Aquatic surface barriers and methods for culturing seaweed. International Patent (PCT) No.WO 2004/093525 A2. 2004-11-04.

67. Moll B., Chavez Vega,G., Lopez Beltran, J. (Sinaloa Seafields International) 2006.Managed co-cultures of organisms having prophylactic and health-promoting effects. International patent (PCT) No.WO 2006/002093 A1. 2006-01-05

68. Montgomery D.C. 2001.Desing and Analysis of Experiments. Jonh Wiley & Sons. Quinta edición. New York. 680 pp.

69. Nabity M.B. & Ramaiah S.K. 2010. Neutrophil Structure and Biochemistry en: Weiss D.J. y Wardrop K.J.(eds). Veterinary Hematology. Sexta edición. Wiley-Blackwell. Iowa .263-269p.

70. Nakamoto, K; (1986) “Sulfato, Carbonato and other Acido Complexeses” en Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Organic Coordination Compounds; 4° edición, John Wiley & Sons, EUA; pags. 249-252.

71. Olver C.S., Andrews G.A., Smith J.E. & Kaneko J.J.(2010). Erytrocyte Structure and Function en Weiss D.J. y Wardrop K.J.(eds). Veterinary Hematology. Sexta edición. Wiley-Blackwell. Iowa. 123-130p.

72. Oliva-Teles A., & Gonçalves P. (2001). Partial replacement of fishmeal by brewer’s yeast (*Saccaromyces cerevisae*) in diets for sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. Aquaculture, 202(3-4): 269-278.

73. Organización Mundial de la Salud. (1966). Principios aplicables al estudio preclínico de la inocuidad de los medicamentos. Informe Técnico 341.

74. Ortuño J., Cuesta A., Rodríguez A., Esteban M.A. & Meseguer J. (2002). Oral administration of yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, enhances the cellular innate immune response of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). Vet. Immunol. Immunopathol. 85: 41–50.

75. Peddie S., Zou J. & Secombes J. (2002). Immunostimulation in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) following intraperitoneal administration of Ergosan. Vet. Immunol. Immunopathol. 86: 101–113
76. Pengzhan Y., Ning L., Xiguang L., Gefei Z., Quanbin Z., & Pengcheng L. (2003). Antihyperlipidemic effects of different molecular weight sulfated polysaccharides from *Ulva pertusa* (Chlorophyta). Pharmacological Research *48*(6): 543–549.
77. Peña-Rodríguez A., Mawhinney T.P., Ricque-Marie D. & Cruz-Suárez L.E.(2011). Chemical composition of cultivated seaweed *Ulva clathrata* (Roth) C. Agardh. Food Chemistry 129: 491-498.
78. Plaza M., Cifuentes A., & Ibanez, E. (2008). In the search of new functional food ingredients from algae. Trends in Food Science & Technology, 19(1): 31-39.
79. Quemener B., Lahaye M., & Bobin-Dubigeon C. (1997). Sugar determination in ulvans by a chemical-enzymatic method coupled to high performance anion exchange chromatography. Journal of Applied Phycology 9: 179–188.
80. Rattanachaikunsopon P. & Phumkhachorn P. (2009). Prophylactic effect of *Andrographis paniculata* extracts against *Streptococcus agalactiae* infection in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Journal of Bioscience and. Bioengineering. 107: 779–582.
81. Ray B. (1995). Cell-wall polysaccharides from the marine green alga *Ulva rigida* (Ulvales, Chlorophyta). Chemical structure of ulvan. Carbohydrate Research, 274: 313-318.
82. Reque, V. R., De Moraes, J. R. E., De Andrade Belo, M. A., & De Moraes, F. R. (2010). Inflammation induced by inactivated *Aeromonas hydrophila* in Nile tilapia fed diets supplemented with *Saccharomyces cerevisiae*. Aquaculture, *300*(1-4): 37–42.
83. Robic A, Sassi J., & Lahaye M. (2008). Impact of stabilization treatments of the green seaweed *Ulva rotundata* (Chlorophyta) on the extraction yield, the

physico-chemical and rheological properties of ulvan. Carbohydrate Polymers 74(3): 344-352.

84. Robic A., Rondeau-Mouro C., Sassi J.-F., Lerat Y., & Lahaye M. (2009). Structure and interactions of ulvan in the cell wall of the marine green algae *Ulva rotundata* (Ulvales, Chlorophyceae). Carbohydrate Polymers 77(2): 206-216.
85. Sahan A., & Duman S. (2010). Influence of β-1 3 / 1 , 6 glucan applications on some non-specific cellular immune response and haematologic parameters of healthy Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L ., 1758). Turkey Journal of Animal Science 34(1): 75-81.
86. Sakai, M., Taniguchi, K., Mamoto, K., Ogawa, H., Tabata, M., 2001. Immunostimulant effects of nucleotide isolated from yeast RNA on carp, *Cyprinus carpio* L. Journal of. Fish Disease 24: 433–438.
87. Sathivel A., Raghavendran H. R. B., Srinivasan P., & Devaki T. (2008). Anti-peroxidative and anti-hyperlipidemic nature of *Ulva lactuca* crude polysaccharide on D-galactosamine induced hepatitis in rats. Food and Chemical Toxicology : An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association 46(10): 3262–7.
88. Secombes C.J. (1996). The nonspecific immune system: cellular defenses. En: Iwama G., Nakanishi T. (Eds.), The Fish Immune System. Organism, Pathogen and Environment. Academic Press, San Diego, CA, pp. 63–101.
89. Secombes CJ,Wang T, Hong S, Peddie S, Crampe M. & Laing KJ, (2001). Cytokines and innate immunity of fish. Developmental and Comparative Immunology 25:713-723.
90. Sheikhzadeh N., Pashaki A. K., Nofouzi K., Heidarieh M., & Tayefi-nasrabadi H. (2012). Effects of dietary Ergosan on cutaneous mucosal immune response in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). Fish and Shellfish Immunology. (in Press)
91. Silverstein R.M, Bassler G.C. & Morril T.C., “Spectrometric Identification of Organic Compounds”, John Wiley Inc., New York, Fifth Edition (1991).

92. Soderberg R.W. (2006). Culture in flowing water. In: Lim, C.E., Webster, C.D. (Eds.), Tilapia: Biology, Culture and Nutrition. Food Products Press, London, pp. 289–312.

93. Siwicki A.K., Anderson D.P. & Rumsey G.L. (1994). Dietary intake of immunostimulants by rainbow trout affects non-specific immunity and protection against furunculosis. Veterinary Immunology and Immunopathology 41: 125–139.

94. Skjermo J., Defoort T., Dehasque M., Espevik T., Olsen Y., Skja ˚k-Bræk G., Sorgeloos P.& Vadstein O. (1995). Immunostimulation of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.) using an alginate with high mannuronic acid content administered via the live food organism Artemia. Fish and Shellfish Immunology 5: 531–534.

95. Tran-duy A., Schrama J., Vandam A., & Verreth, J. (2008). Effects of oxygen concentration and body weight on maximum feed intake, growth and hematological parameters of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. Aquaculture 275(1-4): 152-162.

96. Tukmechi A., Rahmati-Andani H.R., Manaffar R. & Sheikhzadeh N. (2011).Dietary administration of Beta-mercapto-ethanol treated *Saccharomyces cerevisiae* enhanced the growth, innate response and disease resistance of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Fish Shellfish Immunology 30: 923-928.

97. Verlhac V., Gabaudan J.A., Obach A., Schuep W. & Hole R. (1996). Influence of dietary glucan and vitamin C on non-specific and specific immune responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture 143: 123-133.

98. Verlhac V., Obach A., Gabaudan J., Schüep W. & Hole R. (1998). Immunomodulation by dietary vitamin C and glucan in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Fish & Shellfish Immunology 8: 409-424.

99. Whyte S.K. (2007).The innate immune response of finfish--a review of current knowledge. Fish & shellfish immunology 23: 1127-51.

100. Wu C.-C., Liu C.-H., Chang Y.-P., & Hsieh S.-L. (2010). Effects of hot-water extract of *Toona sinensis* on immune response and resistance to *Aeromonas hydrophila* in *Oreochromis mossambicus*. Fish & Shellfish Immunology *29*(2): 258-63.

101. Yaich H., Garna H., Besbes S., Paquot M., Blecker C. & Attia H. (2011). Chemical composition and functional properties of *Ulva lactuca* seaweed collected in Tunisia. Food Chemistry, 128(4): 895-901.

102. Yin G., Jeney G., Racz T., Xu P., Jun X.& Jeney Z. (2006). Effect of two Chinese herbs (*Astragalus radix* and *Scutellaria radix*) on non-specific immune response of tilapia, *Oreochromis niloticus*. Aquaculture 253: 39-47.

103. Yuan C., Li D., Chen W., Sun F., Wu G., Gong Y., Tang J., Shen M.& Han X. (2007). Administration of a herbal immunoregulation mixture enhances some immune parameters in carp (*Cyprinus carpio*). Fish Physiology and Biochemistry. 33: 93–101.

104. Yue Y., & Zhou Q. (2008). Effect of replacing soybean meal with cottonseed meal on growth, feed utilization, and hematological indexes for juvenile hybrid tilapia, *Oreochromis niloticus*×*O. aureus*. Aquaculture 284 (1-4): 185-189.

105. Zaragoza, O.D.R., Rodríguez, M.H. & Bückle Ramirez L.F. (2008). Thermal stress effect on tilapia *Oreochromis mossambicus* (Pisces: Cichlidae) blood parameters. Marine and Freshwater Behaviour and Physiology *41*(2): 79–89.

11. ANEXOS

11.1. Anexo 1: Elaboración del Extracto de *U. clathrata*

Materiales	Reactivos	Equipo
Harina de ulva Filtros Waltman No.2 (8µm) Tierra de diatomeas	Sol. HCl 0.2N Etanol 96%	Centrífuga (Megafuge 16 thermo scientific heraeus) Plancha (Jenway 1000) Bomba de vacío Liofilizadora

Principio.

Extracción de polisacáridos hidrosolubles sulfatados de la pared celular de *Ulva clathrata* utilizando un medio ácido. De acuerdo con Hernández-Garibay *et al* (2011), este medio presenta mayor rendimiento de polisacáridos por gramo de harina, sin embargo la metodología aquí presentada tiene modificaciones en la manera de obtención del extracto en peso seco realizada por liofilización.

Procedimiento.

Extraer mezclando harina de ulva (tamaño de partícula 20µm max.) en solución de HCl 0.2 N por 2 horas a 60ºC (en proporción 1:10p/v). Como se muestra en la figura 22.

Centrifugar la mezcla 2000rpm 20 min, obtener el sobrenadante y separar el tejido de la planta.

Re-extraer el tejido de la planta en solución de HCL 0.2N por 60 min.

Centrifugar 2000rpm 20, obtener el sobrenadante.

Mezclar los dos extractos.

Filtrar al vacío con filtro Waltman No.2 (8µm) y tierra de diatomeas.

Precipitar adicionando 3 volúmenes de etanol al 96%,

Centrifugar para recuperar el precipitado.

Enjuagar el sólido 2 veces con 15ml de Etanol al 70% por 30 min cada una, extraer el etanol después de cada vez.

Enjuagar 2 veces con etanol 96%, extraer el etanol después de cada vez.

Congelar por al menos 48hrs y liofilizar hasta obtener peso constante. Se obtuvo un extracto como lo muestra la figura 20.

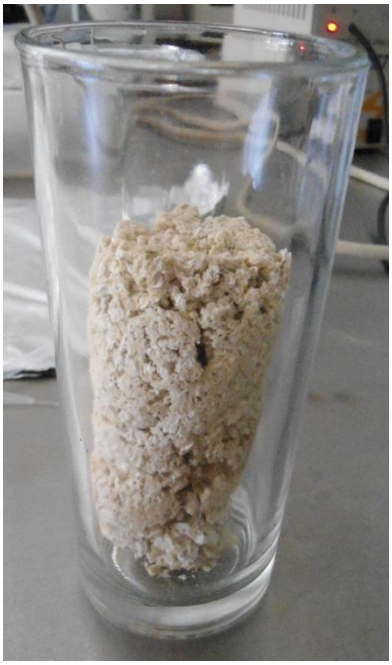


Figura 20. Extracto sólido de U. clathrata.

11.2. Anexo 2: Desinfección de Tanques Experimentales.

Materiales	Reactivos	Equipo
Jerga Vaso con graduación Agua.	Virkons ® Bayer	

Principio.

Asegurar que los tanques estarán libres de patógenos, mediante la desinfección, una vez que se lavaron cuidadosamente los tanques y otros materiales de la sala de bioensayos.

Procedimiento.

Mezclar en el vaso con graduación 1.3 g. de Virkons ® en 300 ml de agua limpia para aplicar en tanque de 400Lts.

Aplicar la mezcla con la jerga en las paredes y el fondo del tanque hasta empapar.

Dejar actuar el desinfectante por 20 minutos.

Enjuagar.

11.3 Anexo 3: Recuento de Eritrocitos (RBC) y Leucocitos Totales (WBC).

Materiales	Reactivos	Equipo
Muestra de sangre fresca con anticoagulante. Micropipeta Puntas para pipeta de capacidad mayor de 20µL. (estériles). Frascos con tapa de capacidad mayor a 5 mL. (estériles). Pipeta de vidrio de capacidad mayor de 5mL. (estéril).	Solución Natt-Herrick. Para preparar solución de Natt-Herrick: NaCl 3.88 g $NaSO_4$ 2.50 g Na_2HPO_4 1.74 g KH_2PO_4 0.25 g Formalina 37% 7.50 ml Methil Violeta 0.10 g Papel filtro Whatman No.2 Agua destilada	Cámara de Neu-bahuer o hemocitómetro (Marienfeld-Superior). Microscopio (Olympus CX31)

Principio.

Se utiliza este método directo de conteo celular que permite la distinción de eritrocitos y de leucocitos, dada la tinción de diferentes tonos de azul que brinda el violeta de metilo.

Procedimiento.

Colocar 4 mL de la solución de Natt-Herrick en un frasco con tapa.

Tomar de la sangre con la micropipeta y punta 20 µL. Mezclar en el frasco con la Solución Natt-Herrick enjuagar la punta con la solución hasta remover la sangre.

Agitar lentamente el frasco 5 veces.

Dejar reposar 5 minutos

Tomar la muestra con la micropipeta y desechar las primeras gotas de la solución para posteriormente cargar la cámara de Neu-bahuer.

Esperar 3 minutos y contar en el microscopio al objetivo de 40X.

Contar primero las zonas de eritrocitos luego las zonas de leucocitos siguiendo el orden de izquierda a derecha y visceversa como lo muestra la imagen…

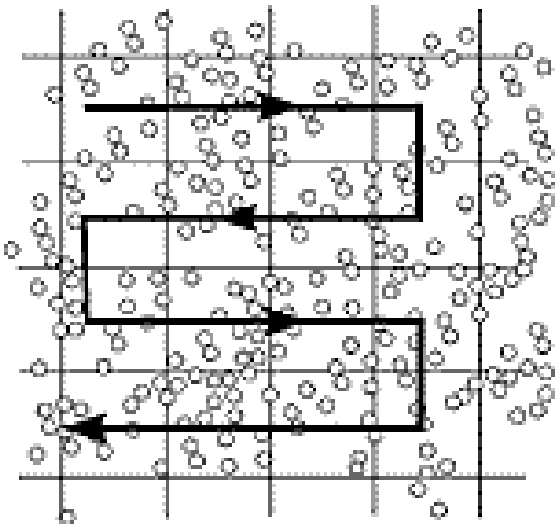


Figura 21. Orden propuesto para el recuento de células en las celdas de hemocitómetro.

Procedimiento para la preparación de 1L de la Solución Natt-Herrick's (1952)

Mezclar las sales en el orden indicado previamente dentro de un matraz.

Colocar la formalina

Colocar 500 mL de agua destilada, agitar hasta mezclar completamente las sales.

Colocar el metil violeta, mezclar.

Aforar a 1L.

Dejar reposar la solución 12 horas.

Filtrar la solución con papel Whatman No.2.

Conservar la solución a 4°C dentro de un frasco ámbar.

11.4. Anexo 4: Prueba de Fagocitosis

Materiales	Reactivos	Equipo
Muestra de sangre fresca con anticoagulante. Portaobjetos Cubreobjetos Aceite de inmersión Resina (Cytoseal 60 viscosidad baja)	Solución salina balanceada con fosfato, pH 7.0-7.4 (PBS) Microesferas de latex (cuentas fluorescentes de amina-poliestireno 2.0 µm) Metanol Colorante Giemsa (Giemsa modificado de Sigma-Aldrich) Tiosulfato de sodio 0.1 N Agua destilada	Incubadora (Felisa) Microscopio compuesto (Olympus BX51 TRF Olympus Co. Tokio, Japon)

Principio.

Determinación de la actividad fagocíticamediante la evaluación microscópica del porcentaje de células que han fagocitado partículas de látex, después de la incubación y la tinción de células sanguíneas.

Procedimiento.

Agitar vigorosamente las microesferas y mezclar 0.3 ml en 10ml de PBS en un frasco de vidrio (evitar recipientes de plástico ya que las microesferas pueden adherirse a las superficies del frasco).

Mezclar 100 µL de sangre fresca heparinizada con 50 µL de la suspensión de microesferas.
Incubar durante 2 horas a 37ºC, agitar ocasionalmente

Depositar una gota de sangre sobre un portaobjetos,
Hacer un frotis sobre el portaobjetos:

Poner el lado de otro portaobjetos en contacto con la gota formando un ángulo de 45°, deslizar para formar una película.

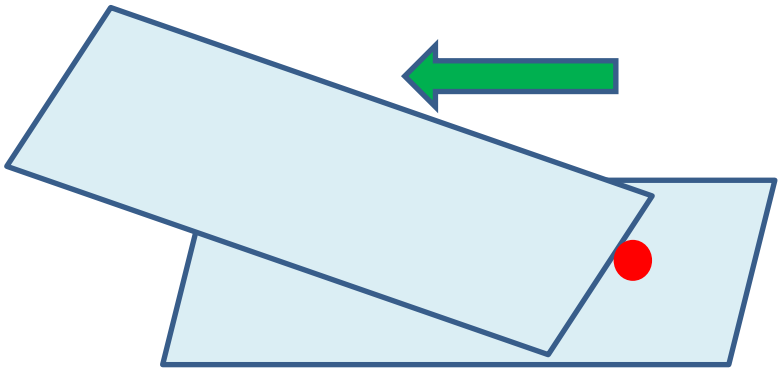


Figura 22.Realización de un frotis sanguíneo.

Dejar secar al aire.

Adicionar unas gotas de metanol para fijar.

Dejar secar al aire.

Cubrir la totalidad de la película con colorante Giemsa y dejar actuar por 5 minutos.

Agregar 10 gotas de tiosulfato de sodio y dejar actuar por 5 minutos.

Lavar con unas gotas de agua destilada.

Dejar secar al aire.

Colocar 5 gotas de resina y colocar cubreobjetos

11.4.1. Porcentaje de la fagocitosis.

Observar en el microscopio compuesto con el objetivo de 40X y 60X para identificar la zona ideal del frotis, evitar contar en zonas con cúmulos de células (células amontonadas) o residuos de colorante, elegir la zona del cuerpo del frotis y observar con el objetivo de100X con aceite de inmersión.

Recorrer el frotis como se muestra en la ilustración, 100 campos de cada frotis o hasta contar 100 leucocitos (neutrófilos o monocitos).

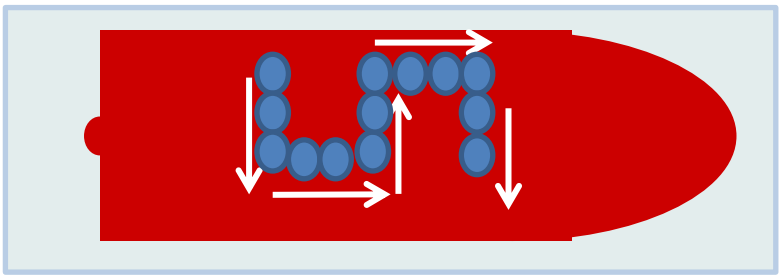


Figura 23. Identificación de secciones de un frotis sanguíneo

El porcentaje de fagocitosis se define como el número de polimorfonucleares que fagocitaron o que presentan fagosóma(s) con las microesferas de latex y adherencia de las mismas (figura 23), sobre el número total de polimorfonucleares.

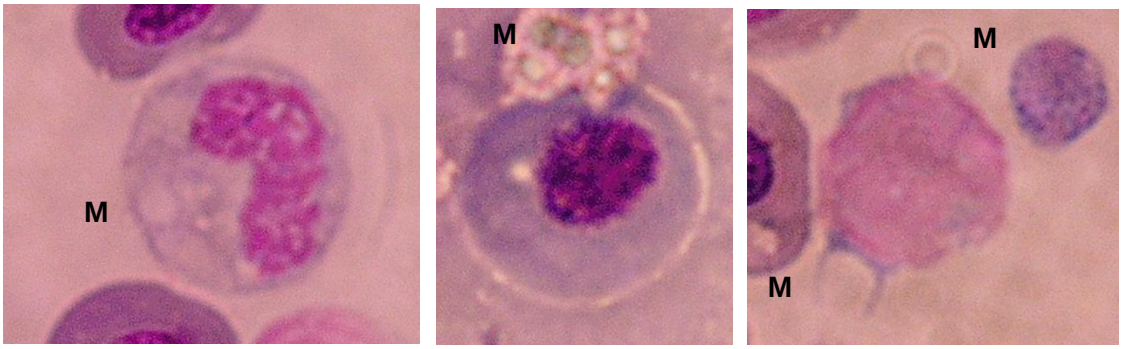


Figura 24. Imágenes de fagocitos con microesferas fagocitadas o adheridas (marcadas con M)