

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS



Determinación de la retención y enrutamiento de aminoácidos dietarios en peces marinos, mediante análisis isotópico por componente específico

Presenta:

FERNANDO BARRETO CUIEL

Tesis para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado

de:

Doctor en Ecología Molecular y Biotecnología

Ensenada, Baja California, México, Enero 2018

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS

Determinación de la retención y enrutamiento de aminoácidos dietarios en peces marinos, mediante análisis isotópico por componente específico


Presenta:

FERNANDO BARRETO CURIEL


Tesis para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de:

Dr. en Ecología Molecular y Biotecnología

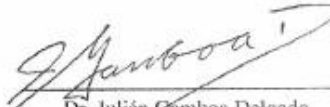
Aprobada por:


Dra. María Teresa Viana Castrillón
Directora de Tesis


Dra. Sharon Herzka Llona
Sinodal


Dr. Juan Pablo Lazo Corvera
Sinodal


Dr. Eduardo Durazo Beltrán
Sinodal


Dr. Julián Gamboa Delgado
Sinodal

Resumen de tesis para obtener el grado de Dr. En Ecología Molecular y Biotecnología que presenta **Fernando Barreto Curiel** como requisito parcial para su titulación en la Facultad de Ciencias Marinas. Ensenada Baja California, México. 2018.

“Determinación de la retención y enrutamiento de aminoácidos dietarios en peces marinos, mediante análisis isotópico por componente específico”

Resumen aprobado por:

Dra. María Teresa Viana Castrillón

La proteína es uno de los ingredientes más importantes en la formulación de peces carnívoros marinos, llegando a incorporarse al rededor del 50% en dietas balaceadas. Este mismo nutriente tiene la característica de ser el más costoso, respecto a las necesidades nutricionales de los peces. Por ello, se han realizados diferentes investigaciones en sustitución de proteína marina por proteínas vegetales, proteínas animales o subproductos terrestres. Sin embargo no se han obtenido resultados contundentes en la reducción de proteína o aumento en la eficiencia proteica. Esto se pudiera deber a que se formula a porcentaje de proteína y no a las necesidades aminoacídicas requeridas por los organismos. En otras palabras esto es llamado proteína ideal, donde todos los aminoácidos (AAs) se vuelven limitantes, tanto los esenciales (EAAs) como no esenciales (NEAAs). Por ello, el objetivo de este trabajo fue elucidar aquellos AAs que pudieran ser limitantes y aquellos que posiblemente pudieran estar siendo utilizados como fuente energética, mediante la técnica de isotopos estables por componente específico. En general se realizaron tres experimentos, uno en jurel (*Seriola lalandi*) en inanición y dos experimentos con variaciones en la disponibilidad y digestibilidad de la proteína en Totoaba (*Totoaba macdonaldi*). En los experimentos se estimó la pérdida o ganancia en peso, eficiencia alimenticia, supervivencia, proximales de pez completo, análisis isotópicos en masa y por componente isotópico (aminoácidos). En el Experimento I, los organismo fueron muestreados en hígado y músculo cada 0,2,4,6,9,12,15,20,25,30 y 35 días, mientras que en el Experimento 2 y 3, a los 0,15, 30,45 y 60 días. En inanición el jurel presento una pérdida de biomasa de 26.0 ± 9 g respecto a su peso inicial. El contenido de lípidos crudos en hígado y músculo se observó una reducción del 50% en ambos tejidos. Sin embargo, el análisis de ácidos grasos (AG) mostró, que los organismos en inanición conservaron los PUFAs y LC-PUFAs en alta proporción, utilizando preferentemente los MUFA'S como fuente energética, alcanzando una pérdida del 40% tanto en hígado como en músculo, respecto al inicial. De acuerdo al valor isotópico obtenido en masa para músculo en $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$ y por aminoácidos ($\delta^{15}\text{N}$), no se observaron diferencias significativas, por lo que la síntesis proteica no es elucidada durante un proceso de inanición. Mientras que en el hígado, los incrementos en el valor isotópico en masa de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$, indicaron que la tasa metabólica de proteínas y lípidos aumentan considerablemente, mostrando diferencias significativas para el día 20 y 4 (respectivamente). Los aminoácidos (AAs), tales como Ala, Asp, Glu, Pro, Ile, Leu y Val, mostraron diferencias significativas respecto a los organismos

iniciales. Sin embargo la Lys, Met, Phe y Gly, no mostraron diferencias en los 35 días de inanición. Por lo cual se puede sugerir que estos AAs no participan en el metabolismo energético del jurel. En el Experimento II, se formularon cuatro dietas isoenergéticas con diferente contenido proteico (400, 430, 460 and 490 g kg⁻¹ DM), variando los lípidos y carbohidratos en cada una de ellas. En Experimento III, se formularon cuatro dietas isoproteicas, isolipídicas y la misma contribución de carbohidratos, dejando indigestible una porción de proteína tratada con formaldehído, obteniendo un contenido digestible de 380, 420, 460 and 490 g kg⁻¹ DM. En ambos experimentos los organismos obtuvieron diferencias significativas en crecimiento y se observó que entre mayor proteína disponible o digestible en la dieta, mayor fue su crecimiento. Sin embargo no presentaron diferencias significativas en la tasa de eficiencia proteica (PER), para ambos experimentos y entre tratamientos, mostrando un PER promedio de 2.0± 0.1. En la composición proximal de los organismos finales del Experimento II, mostró diferencias significativas sólo en el contenido de proteína cruda, donde entre mayor proteína incluida en la dieta, mayor fue el contenido proteico en el organismo. Este comportamiento no se presentó en el Experimento III, ya que no se observaron diferencias significativas en el contenido de proteína cruda ente los cuatro tratamientos, pero si en lípidos y cenizas. En general los factores de enriquecimiento isotópico en masa ($\Delta\delta^{13}\text{C}$, $\Delta\delta^{15}\text{N}$), mostraron incrementos y diferencias significativas con forme aumenta la proteína disponible y digestible en los tratamientos, tanto en hígado como en músculo. Con los resultados obtenidos en los enriquecimientos isotópicos, se puede sugerir, que si bien, los organismos crecieron más conforme aumento la proteína, estos fueron menos eficientes en utilizarla y posiblemente destinada a gasto energético. Estas observaciones no se pudieron ver en el PER, por ello se puede afirmar que los análisis de isotopos en masa, son más informativos respecto al uso de los nutrientes disponibles en las dietas. Estas aseveraciones pueden ser corroboradas con los resultados obtenidos en los análisis de isótopos por componente específico, en donde, los factores de enriquecimiento isotópico por aminoácido incrementaron con forme aumenta la proteína en las dietas. En Experimento II, los AAs mayormente enriquecidos fueron mostrados en el tratamiento de 49% de proteína, donde la Glu en hígado y Ala músculo, mostraron un enriquecimiento isotópico de 9.37‰ and 9.0‰, respectivamente. Un comportamiento similar fue obtenido en el Experimento III, donde algunos AAs como Ala, Asp, Glu y Val fueron enriquecidos de 6 to 9 ‰. Sin embargo la Lys, Met y Phe también presentaron un enriquecimiento significativo. Con estos resultados se pudiera sugerir que estos EAAs son utilizados como fuente energética y se encuentran en mayor concentración de la requerida por los organismos en los cuatro tratamientos.

Dedicatoria

Dedico mi trabajo a Dios quien me brindó el tiempo necesario para terminar este trabajo, las fuerzas de seguir adelante y salud ante todo.

Esta tesis la dedico especialmente a mi familia: mis padres José Barreto Torres y Rosalba Curiel Villalbazo, quienes me dieron el regalo más preciado, la vida y por supuesto, la educación y valores de hogar. Mis hermanos José, Francisco y Zaira, quienes siempre estuvieron en el momento preciso para brindarme apoyo y fortaleza para seguir adelante con los objetivos de mi vida. Mil gracias por todo, los quiero mucho.

†A mis abuelos José Barreto, Rosario Torres, Juan Curiel y Beatriz Villalbazo. Si bien ya no se encuentran con nosotros, como dice el dicho, “lo que tiene la olla saca la cuchara” Dedicada a ustedes por darme uno padres ejemplares!!!!!!!!

A toda mi familia en general, Barreto Torres y Curiel Villalbazo. Gracias por sus buenas vibras y apoyo desde Tecomán, Colima, Guadalajara etc.

Agradecimientos

Gracias al CONACYT, por haberme apoyado a lo largo de mis estudios.

Gracias a la UABC, por aceptarme en un posgrado con un gran renombre y permitirme realizar mis estudios en sus instalaciones. Dentro de ésta, especialmente al Instituto de Investigaciones Oceanológicas, en donde se encuentra el Laboratorio de Nutrición y Fisiología Digestiva, que fue el laboratorio que me arropó el tiempo doctoral.

Gracias al CICESE, especialmente al Dr. Juan Pablo Lazo por donar los organismos con los que se trabajaron en esta tesis doctoral, ya que sin este apoyo no se hubieran culminado los objetivos planteados.

Gracias a la Dra. María Teresa Viana por todos sus comentarios, consejos, regaños y consejos que influyeron en mi superación personal, que experimenté en este periodo doctoral. Realmente muchas gracias por todo el apoyo proporcionado. Sin duda usted es una persona muy Tenaz y objetiva en todos los aspectos, por lo que me llevo lo mejor de todo. ¡Gracias!!!

Gracias a mis sinodales Dra. Sharon, Dr. Juan Pablo, Dr. Eduardo y Dr. Julián, por su gran apoyo y valiosos comentarios para terminar este proyecto.

Gracias al grupo de trabajo del laboratorio de Nutrición y Fisiología, Dr. José Antonio Mata Sotres, MC. Griselada Parés, Dr. Artur Rombenso y Lic. Aurora Tinajero.

Gracias a la Dra. Ceres Anabel Molina Cárdenas por todo su apoyo y perseverancia en el desarrollo y término de esta etapa de mi vida. Siempre estuviste y espero siga

siendo así. En los buenos y malos momentos que se generaron en este caminar. Gracias por los consejos y nalgadas, simplemente te “Bomboneo”. Gracias también a tu familia: Jaime, Rosa y Jimmy por el apoyo proporcionado.

Gracias a mis compañero de laboratorio Emmanuel, Daniel, Ariana, Servando, Fernando Maurith, Perez Julio, Tony Buddy, Paola, Jaime, Victoria, Aimee, Aurora, Omar y los de afuera del Laboratorio, como Isaura Bañuelos, Martha, Selene, Edith e Ivette, que me hicieron los días más amenos y divertidos, sin descartar todo el apoyo proporcionado.

Gracias a LINDEAACUA, FEEDACUA, LITGO SA DE CV, SISTEMAS INTEGRALES PARA LA ACUICULTURA y Proyectos internos (Presa las Auras, Tecate B.C.) que me apoyaron con incentivos económicos para terminar la estancia doctoral en la UABC.

Gracias a todas y cada una de las personas que me ayudaron a finalizar este proceso, ya sea con consejos, regañones, comentarios, des-estrés, risas, etc. José Augusto, Roger Frías, las huercas (Andrea y Vale), Ricardo, Pedro, Gaby Valle, Miguel, Karen, Gaby Arroyo y familia.... Gracias

Gracias a la familia TRIJEX por encaminarme al área del deporte multidisciplinario y lograr terminar un Ironman 70.3, que pensé que nunca lo lograría. Gracias Julio Castañeda.

ÍNDICE

Resumen	3
Dedicatoria.....	5
Agradecimientos.....	6
Índice de Figuras	10
Introducción General	11
Antecedentes.....	26
Justificación	32
Hipótesis	34
Objetivo General.....	35
Objetivos Específicos	35
Discusión General	37
Conclusiones Generales.....	47
Implicaciones.....	49
Bibliografía citada	50
Capítulo I. Metabolism of <i>Seriola lalandi</i> during Starvation as Revealed by Fatty Acid Analysis and Compound-Specific Analysis of Stable Isotopes within Amino Acids.....	62
Capitulo II. Use of isotopic enrichment to assess the relationship among dietary protein levels, growth and nitrogen retention in juvenile <i>Totoaba macdonaldi</i>	63

Capitulo III. Protein digestibility impact on the isotopic enrichment by amino acid, in
aquafeeds for *Totoaba macdonaldi*. 64

Índice de Figuras

Figura 1. Esquema simplificado de la producción de la taurina a partir del metabolismo de dos aminoácidos (metionina y cisteína) en ratones, Ueki <i>et al.</i> , 2012	13
Figura 2. Número de pasos en la biosíntesis de aminoácidos esenciales y no esenciales (Berg <i>et al.</i> , 2002).....	14
Figura 3. En donde, a través de una reacción bidireccional, se pueden sintetizar la glicina y serina. La glicina también puede ser producida directamente a través de la glicina sintetasa a partir de una molécula de CO ₂ (dióxido de carbono) y NH ₃ (amonia no ionizada). La cisteina puede ser sintetizada apartir de la serina, sustituyendo el grupo hidroxil con un átomo de sulfuro; el cual a su vez, se puede obtener a partir de la metionina creando así la cisteina.	16
Figura 4. Fraccionamiento cinético del carbono y nitrógeno asociado con el ciclo del ácido tricarboxilico (TCA) con relación a otros procesos metabólicos. Las líneas representan las rutas del fraccionamiento isotópico. Aminoácido total hidrolizable (THAA) en conjunto con la relación C:N como medición de la calidad proteica (Fantle <i>et al.</i> , 1999).....	24
Figura 5. Efecto del contenido proteico en el factor de discriminación trófico en la rana, <i>Bufo Japonicus</i> . Tomado de Chikaraishi <i>et al.</i> , 2015.....	30
Figura 6. Ruta de síntesis y oxidación de Leucina, extraída parcialmente de Bender (2012).....	38
Figura 7. Proceso metabólico de los AAs y sus rustas de degradación (Extraído de McMahon <i>et al.</i> , 2016).....	43

Introducción General

La calidad de la proteína está determinada por varios factores. Entre ellos, el perfil de aminoácidos (AAs) presente y su digestibilidad o disponibilidad para el organismo consumidor. Factores que se encuentran asociados directamente con la capacidad de absorción, asimilación y retención (Martínez-Montaña *et al.*, 2010). En este sentido, se han desarrollado experimentos en nutrición animal que estiman la capacidad de retener la proteína con respecto a la relación entre lo ingerido y lo que se retiene en forma de crecimiento (eficiencia proteica) (Hernandez *et al.*, 1996). En peces esta estimación es, por lo general, complicada ya que la estimación la ingestión en un ambiente acuático no siempre puede hacerse con exactitud. Medición que sirve para estudios enfocados a la utilización y retención de los AAs presentes en la dieta. Se sabe que es posible disminuir el porcentaje de proteína en el alimento a través de enriquecerlo con algunos de los AAs limitantes, dando así una respuesta similar a las dietas altas en proteína, sin afectar el crecimiento. Bajo este principio se creó el concepto de formulación a “proteína ideal”; cuya versión inicial se basó en encontrar el punto en donde los AAs esenciales llegaran a ser limitantes (Fuller *et al.*, 1989). Mientras que el concepto moderno integra también a los esenciales y no esenciales cuando llegan al punto de ser limitantes (Gómez-Requeni *et al.*, 2004; Yamamoto *et al.*, 2005; Gaylord & Barrows 2009; Milgen & Dourmad, 2015).

La proteína está compuesta por 20 aminoácidos; las definiciones convencionales sobre AAs esenciales y no esenciales radican en la capacidad de ser sintetizados o no por el

propio organismo, y se diferencian de aquellos que se denominan limitantes como aquellos que en caso de no estar presentes en una cantidad definida limitan el crecimiento. Los AAs esenciales y limitantes, suelen ser los mismos para todas las especies animales aunque difieren en los niveles requeridos. Éstos sólo pueden ser sintetizados por organismos autótrofos o quimioautótrofos, tales como, plantas y bacterias. Los AAs pueden descomponerse en metabolitos, en donde ambos juegan un papel importante como reguladores de rutas metabólicas clave para el crecimiento, utilización de nutrientes, inmunidad, metamorfosis larval, reproducción, mantenimiento, resistencia a agentes de estrés en el ambiente, y organismos patógenos (Li *et al.*, 2008; Wu, 2009). En peces, por ejemplo, Li *et al.* (2008) establecieron que existen AAs que sin estar considerados como esenciales, tales como la glutamina, glicina, prolina e hidroxiprolina, intervienen directamente en promover el crecimiento, desarrollo, y salud de los animales acuáticos. Incluso, la taurina que es un metabolito derivado de la cisteína y metionina (Fig. 1), es considerado limitante y esencial para algunas especies (Takagi *et al.*, 2008; Nguyen *et al.*, 2013; Bañuelos-Vargas *et al.*, 2014). Dada la importancia de los AAs en los procesos metabólicos en los organismos acuáticos, es imperante estimar la retención, y más aún, a aquellos que están siendo utilizados como energía, para formular de manera precisa a los requerimientos de los peces resultando en una mayor eficiencia proteica.

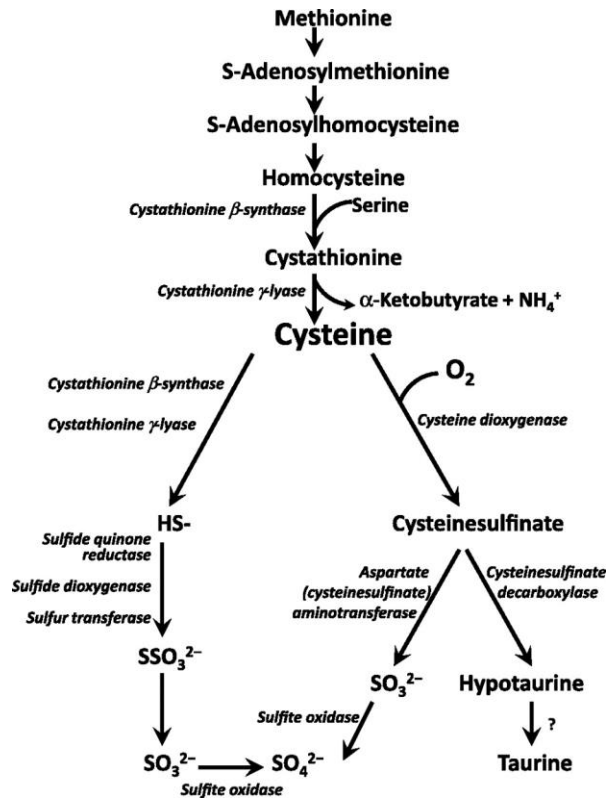


Figura 1. Esquema simplificado de la producción de la taurina a partir del metabolismo de dos aminoácidos (metionina y cisteína) en ratones. (Ueki *et al.*, 2012)

En general, los AAs son sintetizados a partir de rutas específicas, las cuales pueden ser complejas. Los AAs no esenciales (AANE) se sintetizan a través de un número de reacciones simples. Por ejemplo, la alanina y el aspartato son sintetizados en un sólo paso desde el piruvato y oxaloacetato, respectivamente. Mientras que AAs esenciales (AAE) como la arginina presenta 10 pasos para su formación *de novo*. En general, los AAes requieren un mínimo de cinco a 16 pasos (Figura 2; Stryer *et al.*, 1995).

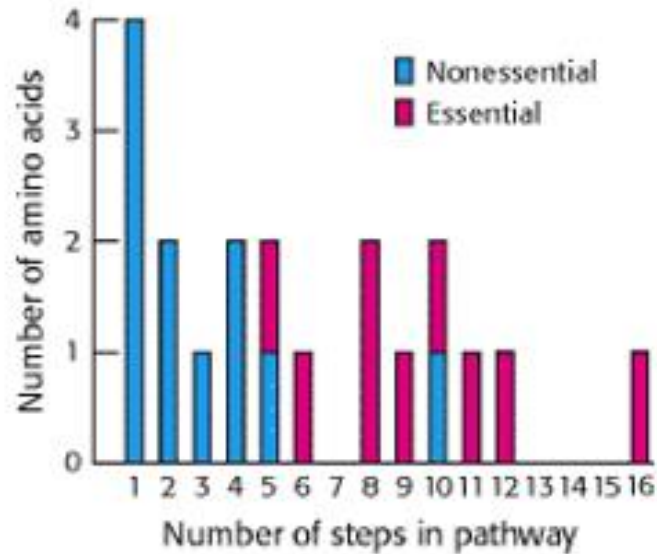


Figura 2. Número de pasos en la biosíntesis de aminoácidos esenciales y no esenciales (Berg *et al.*, 2002).

Las rutas relacionadas para la producción de estos compuestos son el ciclo del ácido cítrico y la glucólisis (Fig. 3). Dentro del ciclo del ácido cítrico se sintetizan cinco AAes (lisina, arginina, metionina, treonina e isoleucina) y cinco AANes (ácido aspártico, ácido glutámico, glutamina, prolina, y asparagina). En dicha ruta existen dos moléculas como intermediarias, la α -ketoglutarato y oxaloacetato, que éstas a su vez, proporcionan los 10 AAs por medio de enzimas específicas (transaminasas). Este proceso de transformación se conoce como transaminación, en donde el grupo amino es transferido de un AA donante a un α -cetoácido. Un ejemplo simple de este tipo de reacción es la formación del glutamato, el cual se forma a partir de un α -cetoglutarato + amonio no ionizado para producir glutamato por la acción de la enzima glutamato deshidrogenasa (Salamons, 1988).

El resto de los AAs son derivados del rompimiento de glucosa (glucólisis) donde el esqueleto de carbono de esta molécula forma parte del AA. Una de las primeras reacciones en cascada dentro de la glucólisis es la generación del piruvato, que a su vez, por medio de la transaminación, se producen la alanina, valina y leucina (Stryer, 1995). Considerando que para los últimos dos mencionados, se llevan a cabo una serie de rutas enzimáticas de transformación para llegar a ellos.

Otro producto de la glucólisis es el 3-fosfoglicerato, el cual puede ser utilizado para sintetizar la serina mediante una transaminación, a través de la enzima serina hidroximetil transferasa. En donde, a través de una reacción bidireccional, se pueden sintetizar la glicina y serina. La glicina también puede ser producida directamente a través de la glicina sintetasa a partir de una molécula de CO₂ (dióxido de carbono) y NH₃ (amonía no ionizada). La cisteína puede ser sintetizada a partir de la serina, sustituyendo el grupo hidroxil con un átomo de sulfuro; el cual a su vez, se puede obtener a partir de la metionina creando así la cisteína (Lehninger. 1975; Devlin. 2006).

Los AAs aromáticos, fenilalanina, tirosina y triptófano son sintetizados a partir del fosfofenolpiruvato a través de una transaminación (Stryer, 1995). Sin embargo, la tirosina también se puede sintetizar a partir de la fenilalanina por hidroxilación directa. Esto ocurre sólo en organismos que no pueden sintetizar *de novo*, desde el fosfofenolpiruvato (Devlin, 2006).

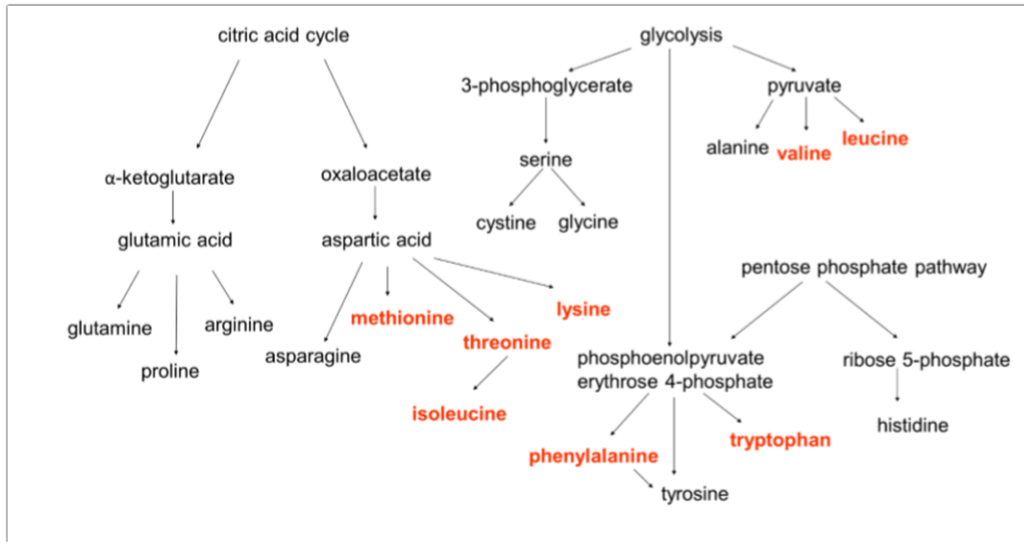


Figura 3. Resumen de las rutas anabólicas de síntesis de aminoácidos. Los aminoácidos de color naranja, son aquellos aminoácidos que son considerados esenciales para organismos secundarios en adelante (Ellis, 2012). La arginina es esencial en organismos acuáticos en todas sus etapas, mientras que en el humano sólo en etapas de crecimiento.

Si bien son conocidas las rutas metabólicas de la mayoría de los AAs, el estudio sobre los requerimientos totales en el organismo, es complejo y existen variaciones amplias en el estudio para sus requerimientos. Esto se debe a que los requerimientos de los AAs en peces se estudian tradicionalmente, de acuerdo a la proporción en la que se encuentran en el organismo, y no respecto a la proporción en la cual los AAs que son utilizados en crecimiento y mantenimiento de los organismos (Cowey, 1994). Entre otros factores que pueden afectar la estimación de los requerimientos están: la calidad de agua, flujo de cultivo y densidad de experimentación; ya que esto genera un cambio en el desempeño fisiológico de los organismos (Kim *et al.*, 1992). Además de factores internos como una formulación alimenticia errónea, la cantidad de proteína proporcionada, la digestibilidad del alimento (Martínez-Montaña *et al.*, 2010), o bien, en su energía neta. La digestibilidad de la proteína radica directamente en la disponibilidad de los AAs, es decir, aquellos que al ser

ingeridos se encuentren disponibles para ser absorbidos a través de los enterocitos. Existen diferentes técnicas que involucran el uso de marcadores para medir la digestibilidad. La más común es la estimación de la digestibilidad aparente, que involucra el uso de marcadores no digeribles, los cuales sirven como parámetro de estimación en el nivel de concentración de los mismos entre la dieta y las heces, y que por diferencia nos indica lo que fue absorbido. Como requisito fundamental, un marcador no debe absorberse ni retenerse dentro del tracto intestinal. Estos marcadores pueden ser internos (que provengan en la materia orgánica del alimento), o bien externos y que tengan que ser agregados en una proporción conocida. Se llama aparente ya que no considera la pérdida de los productos exógenos, por lo cual la digestibilidad es subestimada. A diferencia, en la digestibilidad verdadera, se consideran los productos orgánicos perdidos a través de las heces que no provienen del alimento. Esta última requiere calcular la pérdida endógena alimentando al organismo con una dieta libre del nutriente que se desea medir, además de medir el total del alimento ingerido y el total de las heces producidas. Por ello es más complicada su estimación y se reporta comúnmente la digestibilidad aparente.

Existen también técnicas especializadas que permiten determinar la composición elemental de los alimentos ingeridos en diferentes segmentos del tracto digestivo para estimar su aprovechamiento. Estas técnicas requieren el monitoreo mediante la canulación de fístulas al hacia las regiones internas de los organismos utilizando tubos que las conecten con el exterior (Conover, 1966; Bordner *et al.*, 1983; Quinn, 1986; Goodman-Lowe *et al.*, 1999; Drazen *et al.*, 2007;), lo cual sería complejo en los organismos acuáticos. Por otro lado, también es posible medir la proporción de productos asimilados (productos retenidos) con relación a los ingeridos, mediante el uso de nutrientes marcados radiactivamente. Por ejemplo, Conceição *et al.* (2003) realizaron un estudio con larvas de peces (*Solea*

senegalesis y *Diplodus sargus*) utilizando el isótopo de carbono radiactivo (^{14}C), demostrando que las larvas tienen una alta capacidad de discriminar entre AAs, así como también marcar la eficiencia de retención entre AAE y AANE. Estos autores obtuvieron que las larvas tienen una mayor retención de los AAE en un ambiente de inanición, cercana al 60%, y que los AANE son preferentemente usados como fuente energética.

Otra técnica que en los últimos 10 años se ha aplicado en el campo de la nutrición, son los isótopos estables. Los isótopos son representados por los tipos de átomos de un mismo elemento pero con diferente masa atómica atribuible a un diferente número de neutrones en el núcleo. A diferencia de los radioactivos, éstos son estables, y pueden mantenerse por mayor tiempo. Los isótopos radioactivos tienen la facilidad de ser analizados fácilmente con contadores de centelleo, mientras que los estables sólo se miden a través de la cuantificación proporcional de la masa que los compone. Para esto, se requiere de una metodología complicada con el uso de equipo con alta precisión como el espectrómetro de masas para relación isotópica (IRMS por sus siglas en inglés) para cada elemento. A diferencia de los isótopos estables, en los isótopos radioactivos se utiliza el espectrómetro de centello, el cual detecta la luz que es emitida por los átomos de un mismo elemento proveniente de isótopo radioactivo. Si bien este equipo es menos complicado y accesible, el uso de isótopos radioactivos por su naturaleza, pueden representar un riesgo para la salud, por lo que se requiere de laboratorios especializados y cierta normatividad en la certificación.

El uso de isótopos estables en estudios de asimilación o retención, es una técnica nutricional alternativa sin riesgo, no invasiva y en la que la razón (Ej. $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) de cambio de los isótopos contribuyentes en cierto tejido puede utilizarse para determinar la contribución de distintas fuentes nutricionales, e incluso permite definir las contribuciones

de lípidos, proteínas y sus respectivas unidades monoméricas . Esto se lleva a cabo cuando se suministran dietas control conteniendo un solo tipo de nutriente de interés y mezclas de ingredientes en distintas dietas, para eventualmente comparar los cambios isotópicos obtenidos en el tejido de los organismos a través del tiempo, utilizando modelos matemáticos (Gamboa-Delgado & Le Vay, 2009). La trazabilidad de los ingredientes en los alimentos formulados, como por ejemplo la harina de soya, maíz, trigo, y subproducto de ave, puede ser rastreada en comparación a la harina de pescado debido a que la razón isotópica (valor isotópico) de cada uno de ellos, es distinta. La huella isotópica que contiene cada uno de los ingredientes se debe a su procedencia, ya sea por factores ambientales de donde son extraídos y su localización en el planeta o por sus hábitos alimenticios. Con esta técnica se puede trazar directamente la incorporación de los flujos de carbono y nitrógeno que están presente en un alimento formulado o en presas vivas (Jomori *et al.*, 2008; Gao *et al.*, 2006, 2011). Brindando así, una historia nutricional de la asimilación o retención de sus nutrientes (Phillips & Gregg, 2003; Yokoyama *et al.*, 2002). El uso de este método se basa en el supuesto de que los valores de isótopos en los tejidos de los organismos consumidores reflejan los valores isotópicos de sus dietas, a lo que se le llama “equilibrio con su dieta” dejando su huella isotópica en un tiempo determinado (recambio isotópico). La cual en la naturaleza puede cambiar en el tiempo debido a variaciones en la dieta, estado nutricional, requerimientos nutricios, disponibilidad e incluso calidad de la dieta (Fry, 2006). El recambio isotópico está influenciado entre y dentro de una misma especie debido a variaciones en las tasas de crecimiento, tasa de recambio proteico, requerimientos energéticos y el metabolismo de proteína, así como por variables ambientales. Es importante considerar que la mayoría de los estudios que utilizan la tasa de recambio isotópico se han enfocado en peces pequeños, los cuales tienen una tasa de crecimiento

específica alta, obteniendo un equilibrio isotópico rápido con su dieta, (enriquecimiento por crecimiento o dilución) con un mínimo efecto del metabolismo (Bosley *et al.*, 2002; Witting *et al.*, 2004; Herzka, 2005).

Por la naturaleza de la materia orgánica, los isótopos estables que se pueden detectar son el ^{13}C , ^{15}N , ^{34}S , ^{18}O e ^2H . Sin embargo, por su abundancia, han sido los del ^{13}C y ^{15}N los más utilizados, aunque estudios recientes se han ayudado del ^{18}O e ^2H para estudios más precisos. Estos estudios han sido ampliamente aplicados en ecología, para comprender los movimientos migratorios de las especies, rastreo de fuentes alimenticias, estimación de niveles tróficos, entre otros (Barnes & Jennings, 2007; Guelinckx *et al.*, 2008; Chikaraishi *et al.*, 2007, 2009, 2015; Germain *et al.*, 2013).

Como se mencionó arriba, los isótopos más estudiados debido a su abundancia relativa en la materia orgánica, son los isótopos del nitrógeno (cuyos valores se expresan en notación delta, $\delta^{15}\text{N}$) y el carbono ($\delta^{13}\text{C}$) (Barnes & Jennings, 2007). La estimación de ambos apoya diversas herramientas para seguir los flujos de nutrientes desde las fuentes tróficas hasta los organismos consumidores (Michener & Schelle, 1994). Las unidades utilizadas para expresar la razón isotópica en los isótopos estables, son partes por mil (‰), esta notación se obtiene de la razón del isótopo pesado/ligero, respecto un estándar de laboratorio (como ejemplo, Nitrógeno atmosférico para $\delta^{15}\text{N}$ y PeeDee Belemnite (PDB) $\delta^{13}\text{C}$) expresadas en delta (δ), por ejemplo, $\delta^{15}\text{N}$.

Aparte de estudiar los valores isotópicos promedio o componentes en masa de una muestra (bulk en inglés), en años recientes se ha desarrollado el análisis isotópico de componentes específicos, una vez que la materia orgánica ha sido separada cromatográficamente antes de su ingreso al IRMS, por componente, ya sean aminoácidos

en el caso de la proteína o ácidos grasos en el caso de la grasa. Esta técnica incrementa la especificidad de estudios dietarios y brinda un mayor entendimiento en el uso y enrutamiento de los aminoácidos (Fantle *et al.*, 1999; Chikaraishi *et al.*, 2009; McMahon *et al.*, 2010; Germanin *et al.*, 2013; Miura and Goto, 2012; Chikaraishi *et al.*, 2015; McMahon *et al.*, 2015).

Para estimar el nivel de retención de los alimentos, se han desarrollado modelos matemáticos que permiten estimar el aporte relativo de las diferentes fuentes (nutrientes) de un organismo dado (consumidor), dando a conocer la proporción asimilada de cada fuente en el tejido de estudio (Philips y Koch, 2002). También existen modelos que nos permiten distinguir entre el recambio isotópico por crecimiento (k) y la tasa de recambio metabólica (m) (Hesslein, 1993), misma que es utilizada para calcular mediante el modelo de Tieszen *et al.* (1983) el tiempo de equilibrio isotópico entre un organismo y su dieta (T_{50-95}). De igual manera, la tasa metabólica es utilizada para determinar la proporción de energía que se va al metabolismo y al crecimiento. El modelo Tiempo-Base de Hesslein *et al.* (1993) es uno de ellos, el cual ha sido ampliamente utilizado para cuantificar la tasa metabólica de diferentes tejidos. Este modelo ha sido utilizado para determinar que el hígado es el tejido con mayor tasa metabólica con relación al músculo, corazón y branquias en diferentes organismos (Guelinckx *et al.*, 2007; Xia *et al.*, 2013; Xia *et al.*, 2015; Mohan *et al.*, 2016). Al cuantificar la tasa metabólica (m), se puede también estimar el tiempo de recambio isotópico respecto a la dieta dada (modelo de Tieszen *et al.*, 1983). Así como también la proporción del enriquecimiento isotópico derivado del metabolismo (P_m) y del crecimiento (P_g) (Xia *et al.*, 2013; Xia *et al.*, 2015).

La proteína es el único grupo de moléculas orgánicas que contiene nitrógeno en las dietas balanceadas, por lo que todas las inferencias sobre los isótopos del $\delta^{15}\text{N}$ nos llevan a estimar lo relativo ha dicho nutriente. Mientras que el del $\delta^{13}\text{C}$ nos muestra el nivel de movilización entre lípidos y carbohidratos (McMahon *et al.*, 2010). Sin embargo, ya que la proteína está conformada por AA, hoy en día es posible estimar las relaciones isotópicas del $\delta^{15}\text{N}$ para cada AA. Esto se logra mediante una adecuación de la técnica del IRMS, en donde los AA son separados mediante cromatografía de gases antes de ser incorporados al espectrómetro de masas por relaciones isotópicas (por componentes específicos, CSIA, por sus siglas en inglés).

El rastreo y enriquecimiento de los AA por componente específico nos permite determinar su nivel de utilización por medio del enriquecimiento de cada uno de ellos. Esto como reflejo de su participación en los procesos metabólicos, y corresponden a una serie de funciones importantes, que no pueden ser cuantificadas con un simple análisis de AA. Una de las diferentes funciones de los AAs es la osmoregulación, proceso que utiliza ciertos AAs en el interior de las células para compensar la concentración iónica del medio externo (Zhang *et al.*, 2006; Takeuchi, 2007). También, los AAs son clave en ciertas rutas metabólicas para el mantenimiento de las funciones primordiales como la regulación del crecimiento, inmunidad, metamorfosis larval, reproducción, así como para la resistencia a ambientes sujetos a estrés y a organismos patogénicos (Li *et al.*, 2008).

Dentro de la clasificación de AA por componente isotópico específico, se les conoce en general como “AA fuente” a los esenciales (AAE), pues son obtenidos a través del alimento, a diferencia de los “tróficos” que pueden cambiar y corresponden en su mayoría a los AANE. Esta terminología, si bien es burda, es utilizada para describir las cadenas

tróficas en los estudios de ecología (Popp *et al.*, 2007). Por ejemplo, algunos AAs fuente, como la lisina, fenilalanina, tirosina o metionina, se cree que sufren poca o ninguna transaminación en los consumidores. De tal forma que pueden proveer una aproximación directa para los valores de $\delta^{15}\text{N}$ en la base de las cadenas alimenticias. En contraste, los AA tróficos constituyen la parte medular del reciclamiento del nitrógeno dentro y fuera del reservorio de AA, como por ejemplo, la alanina, ácido glutámico, y ácido aspártico, por lo que están fuertemente enriquecidos en $\delta^{15}\text{N}$ respecto a la dieta. El hecho de que los AAE y AANE muestran un enriquecimiento en isótopo pesado del nitrógeno (^{15}N) relativo a los AA de la dieta, forma la base para el uso de análisis de isótopos por componente específico. Mismo que es utilizado para estimar el nivel trófico en las cadenas alimenticias o bien el factor de enriquecimiento isotópico en el crecimiento de los estudios en nutrición animal (McClellan & Montoya 2002; Chikaraishi *et al.*, 2009; McMahon *et al.*, 2010). Para estimar el nivel trófico de un organismo, es necesario conocer el valor isotópico del ácido glutámico y la fenilalanina en un organismo (Chikaraishi *et al.*, 2009). Estos dos aminoácidos son comúnmente utilizados como indicadores ya que el ácido glutámico es un aminoácido donde la transaminación ejerce un valor alto en el fraccionamiento trófico, mientras que la fenilalanina, por lo regular, no participa en reacciones de transaminación, (Campbell *et al.*, 2005). La mayor parte de la fenilalanina disponible en la dieta, se incorpora y es utilizada y transformada a tirosina por lo que no hay un enriquecimiento isotópico, ya que es casi nula su síntesis a partir de la glucosa (Fig. 2). Otro de los factores que contribuye al fraccionamiento mínimo de este aminoácido, es que es utilizado como neurotransmisor y no en rutas metabólicas (Devlin, 2006).

En estudios de nutrición, la interpretación de los análisis de isótopos estables por AA tiene el potencial de proveer información más detallada acerca de la dieta (Popp *et al.*, 2007). Los AAE o fuente, están catalogados como trazadores isotópicos confiables, ya que no varían en gran proporción con la señal de la dieta ingerida. Esto se debe a que presentan un fraccionamiento menor (Fig. 4) para ser directamente retenidos como crecimiento. Mientras que los AANE o tróficos se encuentran mayormente enriquecidos ya que son utilizados como fuente de energía (ciclo de Krebs), además de ser precursores de otros aminoácidos. Estos dos procesos se llevan a cabo a través de la desaminación y transaminación de aminoácidos (Fantle *et al.*, 1999; McMahon *et al.*, 2010; Chikarasishi *et al.*, 2009; Lorrain *et al.*, 2009).

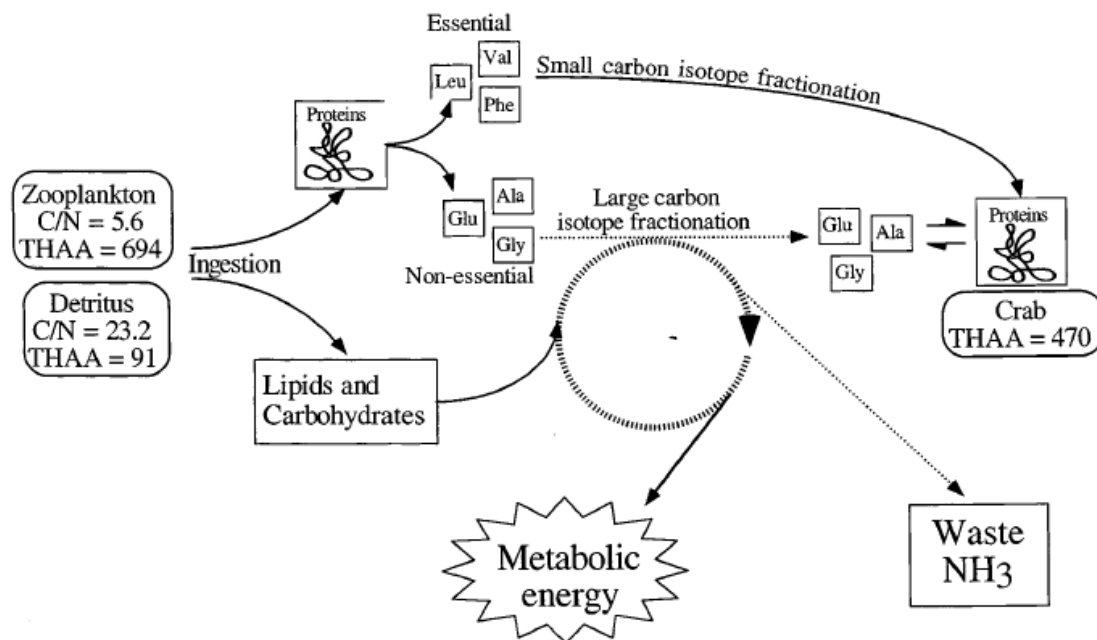


Figura 4. Fraccionamiento cinético del carbono y nitrógeno asociado con el ciclo del ácido tricarboxílico (TCA) con relación a otros procesos metabólicos. Las líneas representan las rutas del fraccionamiento isotópico. Aminoácido total hidrolizable

(THAA) en conjunto con la relación C:N como medición de la calidad proteica (Fantle *et al.*, 1999).

Antecedentes

La utilización de la técnica de isótopos estables aplicados en organismos acuáticos cultivados se reporta por primera vez en 1983 gracias a Schroeder (1983a,b). Sus estudios permitieron determinar flujos de nutrientes mediante el análisis de las proporciones entre los isótopos estables del C y del N en la dieta con relación a lo estimado en los distintos tejidos corporales. Este aporte es ampliamente aceptado dentro de la comunidad científica y ha facilitado la estimación de la retención de nutrientes de manera eficiente y precisa (Schlechtriem *et al.*, 2004; Foken, 2008).

En México, uno de los organismos modelo utilizado para el estudio de la retención de nutrientes mediante el uso de isótopos estables es el camarón blanco. Gamboa-Delgado & Le Vay (2009) probaron dos dietas isoenergéticas e isoprotéicas, las cuales contenían 46 y 23% de proteína. Cada una de estas dietas tenía una sustitución de 0, 50, 90 y 100% de harina de soya por harina de pescado, para poder evaluar la contribución de cada una de las harinas en el músculo del organismo. Mediante un modelo de mezcla concluyeron que la harina de pescado era favorablemente retenida en un 69%, en dietas que contenían una mezcla de harina de pescado con soya (50:50).

Posteriormente Gamboa-Delgado *et al.* (2013), realizaron un experimento donde utilizaron la harina de pescado, harina de soya y gluten de maíz en diversas proporciones, observando que el nitrógeno proveniente de la harina de maíz era mayoritariamente incorporado. Atribuyendo esta mejor respuesta a la alta concentración de fenilalanina encontrada en el gluten de maíz.

Se tiene evidencia de que las tasas de recambio metabólico/isotópico son diferentes entre tejidos (Heady & Moore, 2013; Xia *et al.*, 2015). De tal manera que en un estudio

con la carpa herbívora (*Ctenpharyngodon idellus*) se encontró que el recambio metabólico obedeció a una secuencia (de menor a mayor) entre branquia<músculo<hígado, lo que corresponde a diferencias en la actividad metabólica entre los tejidos. La contribución a largo plazo de las tasas de recambio isotópico del nitrógeno derivado del metabolismo en dicha especie fue mayor para el hígado (70 al 77% de la contribución metabólica) y derivado de crecimiento fue mayor para las branquias (86 al 90% de contribución de incremento de tejido neto). Un factor que podría explicar la diferencia en retención del ^{15}N entre tejidos es la variación de los perfiles de aminoácidos para cada tejido. Por otro lado, el valor de ^{15}N de los diferentes aminoácidos varía generalmente de forma significativa, lo que resulta en diferencias en el fraccionamiento isotópico entre tejidos (Xia *et al.*, 2013). Una respuesta similar en el recambio isotópico del nitrógeno en diferentes tejidos ha sido observada en juveniles de un góbido de arena (*Pomatoschistus minutus*) en donde se encontró que el recambio isotópico obedece a una secuencia de músculo<corazón<hígado, órganos en los cuales se obtuvo una vida media de 27.8, 26.6 y 2.8 días respectivamente (Guelinckx *et al.*, 2008).

Hasta la fecha, la técnica de isótopos estable por AAs ha sido utilizada para determinar la estructura de la red alimenticia, migraciones y nivel trófico al cual pertenece cada especie. Lo que ha contribuido a un mayor entendimiento de los ecosistemas complejos y suministrando mayor información acerca de la fisiología y bioquímica de los organismos (Germain *et al.*, 2013).

Chikaraishi *et al.* (2009) estudiaron la señal isotópica del ^{15}N de cada aminoácido en 17 organismos foto-autótrofos y su relación trófica durante cuatro experimentos controlando su alimentación, utilizando algas verdes (autótrofos), zooplancton y peces. Dichos autores encontraron resultados consistentes a los ya reportados en otros estudios,

concluyendo que el método por AAs puede ser aplicado a cualquier tipo de organismos. También demostraron que el fraccionamiento de la fenilalanina es el más bajo, lo cual se observa en todas las especies, con valores de hasta 0.4‰ mientras que mayores enriquecimientos se dan en la glutamina, glicina y alanina (8‰).

MacMahon *et al.* (2010) realizaron un estudio para conocer el fraccionamiento de carbono de los AAs en músculo del pez momia (*Fundulus heteroclitus*) utilizando cuatro dietas con diferente origen y contenido proteico (Vegi-pro 8%, Bio-vita 53%, Calamar 69% y almeja 71%). Los resultados en el enriquecimiento isotópico del $\delta^{13}\text{C}$ entre el consumidor y la dieta reflejan un gran fraccionamiento trófico para muchos de los AANE y poco o nulo fraccionamiento para AAEs. De igual forma los valores $\delta^{13}\text{C}$ no fueron diferentes entre la dieta y el consumidor. Con base en sus resultados de $\Delta^{13}\text{C}$ de los AANE, los autores afirman que se presentó tanto síntesis *de novo* y un enrutamiento directo de los isótopos de la proteína de la dieta. Sin embargo, en este tipo de estudios, la variación en los patrones de fraccionamiento isotópico pueden deberse a que se estudian dietas con diferente composición proteica que seguramente variará en la disponibilidad de AA para su absorción (digestibilidad), que involucran también la gran diversidad del reservorio de carbono de sus fuentes.

En la actualidad se ha visto que en el proceso de transaminación del ácido glutámico y ácido aspártico genera un fraccionamiento de hasta 8‰ durante los cambios en los niveles tróficos de la red alimentaria. De tal modo que el 86% de este 8‰ es causado por el metabolismo durante el proceso de desaminación y transaminación en animales heterotróficos. Motivo por lo que hoy en día se ha estimado hipotéticamente que el fraccionamiento del nitrógeno ocurre en asociación con el metabolismo del ácido

glutámico. Sin embargo, pocos estudios se han realizado para investigar este fraccionamiento isotópico en este proceso (Miura & Goto, 2012).

Chikaraishi *et al.* (2015), cuantificaron el factor de discriminación trófica ($\Delta^{15}\text{N}$) en la rana, *Bufo japonicus*, las cuales fueron alimentados con tres distintas dietas. Dos dietas experimentales formuladas con base a gusanos vivos y arroz blanco cocido; una de ellas con proteína alta y carbohidratos bajos y la segunda al contrario; proteína baja y carbohidratos altos, utilizando una tercera dieta comercial como referencia. Dichos autores observaron que dos de los AAE o fuente, metionina y fenilalanina, no resultaron en un enriquecimiento isotópico en el tejido del organismo con ninguna de las tres dietas experimentales, alcanzando un valor de 0.3 a 0.5 ‰. Sin embargo, el $\Delta^{15}\text{N}$ fue mayor en los AA tróficos, tales como la alanina, valina, leucina y ácido glutámico, variación que se pudo relacionar a la dieta proporcionada. No obstante, el ácido glutámico presentó el mismo factor de enriquecimiento de 8‰ con las dietas altas en proteína, pero con la dieta de arroz presentó un $\Delta^{15}\text{N}$ de 0.6‰. Lo anterior sugiere que el factor de discriminación trófica del nitrógeno está estrechamente relacionado con el contenido proteico del alimento, y por supuesto, del crecimiento. Es decir, entre menor proteína, menor el factor de discriminación trófica dado por un menor uso de la proteína como energía metabólica (Fig. 5).

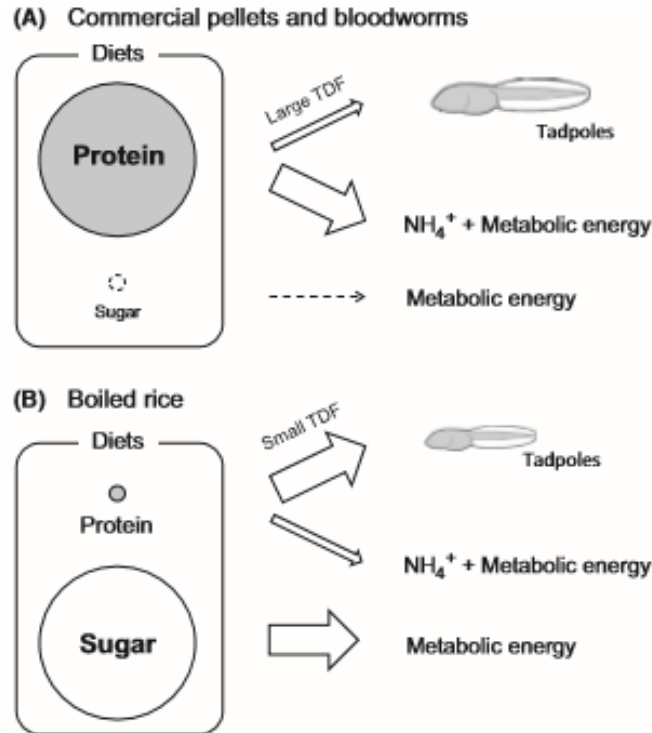


Figura 5. Efecto del contenido proteico en el factor de discriminación trófico en la rana, *Bufo Japonicus*. Tomado de Chikaraishi *et al.*, 2015.

Bajo este mismo esquema, en nuestro laboratorio se han realizado distintos experimentos con enfoques nutricionales (Badillo-Zapata *et al.*, 2014, 2016). En donde mediante modelos de mezcla de dos fuentes y un isótopo se observó, la retención diferencial entre las fuentes proteicas utilizando a la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) y totoaba (*Totoaba macdonaldi*). En ambos experimentos se obtuvieron respuestas del efecto de la sustitución de la harina de pescado (HP) por harina de sub-producto de ave (HSA), obtenido los mejores índices biológicos en una combinación de fuentes proteicas de 33-66 (HP-HSA). En cuanto al factor de enriquecimiento isotópico ($\Delta^{15}\text{N}$) se mostró un comportamiento distinto entre ambas especies, dado que para trucha, alcanzó un enriquecimiento de $\Delta^{15}\text{N}=1\%$ y la totoaba de $\Delta^{15}\text{N}=3.6\%$. Si consideramos que el factor

de enriquecimiento isotópico en nitrógeno es la suma de los procesos metabólicos de los organismos (anabolismo y catabolismo), se puede establecer que la trucha aprovechó de manera más eficiente la dieta en comparación a la totoaba, en donde la retención de la proteína en trucha fue mayor y con menor gasto metabólico. Así mismo, se observó que la harina de subproducto de ave es mayormente retenida en comparación a la harina de pescado en la trucha, mientras que en totoaba, a pesar de que una mezcla de 2:1 con mayor harina de subproducto de ave resultó en mayor crecimiento, la harina de pescado se retuvo ligeramente más que la de ave. Si bien los estudios anteriores han llevado a un conocimiento entre la retención de diferentes fuentes proteicas en peces, el contar con una técnica por componente y medir la relación isotópica de cada AA individual, nos permitirá ir más allá y conocer el nivel de incorporación en tejido y el enrutamiento de los AAs en el metabolismo intermediario utilizando la misma relación de fuentes proteicas.

Justificación

Actualmente se utiliza harina de pescado como la fuente principal de proteína en las dietas para peces carnívoros. La razón obvia es por contener un perfil aminoacídico similar al requerido por los mismos peces, además de promover una alta digestibilidad. Sin embargo, aún contando con los AA contenidos en el pez completo, y en este caso de la harina de pescado, no refleja el requerimiento de los mismos para el metabolismo intermediario. Por esta razón, es de gran importancia conocer los requerimientos de todos los AA, tanto esenciales como no esenciales para poder formular a proteína ideal en el nuevo concepto que agrupa a todos ellos.

Por otro lado, el uso de harina de pescado no es sostenible, ya que altas cantidades de sardina de excelente calidad es utilizada para su reducción en harina y ser utilizada para dietas de peces, en vez de ser un producto de consumo directo por el humano. La formulación ideal, tiene como objeto el utilizar mezclas de harinas y AAs cristalinos como suplemento. De esta manera se podrá llegar a eliminar el uso de la harina de pescado, además de incrementar la eficiencia proteica y reducir la producción de amonio para el ambiente.

Para conocer los requerimientos exactos existen varios métodos, en donde en la mayoría de los casos el óptimo de proteína se evalúa de acuerdo al desempeño (dosis respuesta). Si bien se obtiene un resultado práctico, éste no refleja la fisiología detrás de este requerimiento.

El uso de mediciones de isótopos estables, tanto en masa (bulk) como por componente específico, si bien es complejo en cuanto a su determinación e interpretación, nos permitirá generar conocimiento básico sobre como son utilizados los AAs dentro del metabolismo intermediario. De llegar a este conocimiento, será más fácil encontrar fuentes factibles para su sustitución total, así como hacer un mejor uso de las fuentes proteicas y hacer la acuicultura sostenible con el medio ambiente.

Es así que este trabajo pretende el estudio de la retención de AAs mediante la estimación del enriquecimiento isotópico en hígado y músculo, evaluado a través de distintos diseños experimentales. Esto nos permitirá elucidar, no sólo acortar la brecha en el conocimiento práctico de formulación, sino para entender el metabolismo energético de los peces.

Hipótesis

El factor de enriquecimiento isotópico en masa y por componente específico nos permitirá estimar con mayor precisión el nivel en que la proteína, y los aminoácidos, están siendo utilizados en procesos metabólicos, tanto en hígado como en músculo; y así poder formular dietas a proteína ideal.

Objetivo General

Evaluar la retención y enrutamiento de aminoácidos dietarios en peces marinos, mediante análisis isotópico por componente específico.

Objetivos Específicos

1. Estimar el efecto de la inanición del jurel por medio de técnicas isotópicas, sobre la movilización de los AAs para hacer frente a la sobrevivencia.
2. Cuantificar los índices biológicos de los diferentes experimentos desarrollados, tales como crecimiento específico, eficiencia proteica, peso ganado, eficiencia alimenticia y supervivencia bajo distintos diseños experimentales, tales como niveles de proteína con diferente proteína:energía o utilizando proteína no digestible como relleno (isolipídicas e igual contenido de carbohidratos).
3. Estimar el factor de enriquecimiento isotópico en hígado y músculo del carbono y nitrógeno en masa (bulk) y para algunos aminoácidos, tales como isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, valina ,alanina, aspartato, glutamato, glicina y bajo los diferentes diseños experimentales.
4. Estimar las tasas metabólicas de los organismos en hígado y músculo bajo los diferentes diseños experimentales, así como también, las tasas de recambio proteico

y la contribución de la energía al crecimiento y al metabolismo utilizando el factor de enriquecimiento isotópico.

Discusión General

Los Experimentos realizados en este trabajo demuestran que el análisis de isótopos estables por componente específico (AAs) nos revela el estado metabólico (catabolismo y anabolismo) de los organismos en estudio.

En el Experimento I, utilizando al Jurel como especie de estudio, se evaluó el efecto de la inanición para determinar aquellos AAs que fueran mayormente utilizados como fuente energética en un estado catabólico. En este estudio se observó que en el músculo de los organismos no incrementó el enriquecimiento isotópico en $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$, tanto en "masa", como en componente específico al cabo de 35 días. Esto seguramente se debe al resultado de la disminución del anabolismo o síntesis de músculo *de novo*, ya que el organismo incrementa el catabolismo de las fuentes energéticas. Se estimó una pérdida de 26% de biomasa húmeda, valor que representó en términos absolutos cerca de 40g de biomasa. Mientras que tanto en el hígado y músculo se redujo la grasa en un 50%. Haciendo un ejercicio de cálculo posterior (back calculation en inglés) para estimar las pérdidas energéticas totales, se obtiene que el hígado redujo 1 g de su peso en húmedo, con relación al peso inicial, obteniendo así una pérdida de 0.271g de grasa, con relación a su contenido inicial; y 0.729 g de proteína y carbohidratos. En términos energéticos, significa que el hígado perdió un total de 5.355Kcal/35 días en inanición. Haciendo el mismo ejercicio para el músculo, se estima una pérdida de grasa de 3.5 g y 35.5 g de proteína y carbohidratos, dando lugar a un costo energético por reducción de masa húmeda de 173.46 kcal/35 d en inanición. El costo de total de energía en 35 días de inanición fue de 178.85 kcal. Con este cálculo se puede decir que el músculo es el reservorio principal de energía

disponible, y que el jurel utilizó en mayor cantidad la energía proveniente de proteína que de los lípidos y carbohidratos. Si bien esto es sólo una estimación burda, ya que no fueron consideradas las vísceras, y los cálculos pueden estar un tanto sesgados, si nos da una visión un poco general. Con relación a la grasa perdida por el jurel (3.77 g de grasa), se observa que los ácidos grasos mayormente utilizados durante la inanición, fueron los monosaturados con un 40% de pérdida, respecto al inicial (Cuadro 3, Exp. 1), seguido de los ácidos grasos saturados, con una pérdida del 3.6%. Mientras que los PUFAs fueron retenidos en mayor proporción. Si bien se ha descrito ampliamente que los ácidos grasos saturados y monosaturados son mayormente utilizados como fuente energética (De Silva *et al.*, 1997; Tocher, 2003; Luo et al., 2009), se observa que el jurel utiliza principalmente los monosaturados.

En el factor de enriquecimiento isotópico en hígado mostró un incremento significativo tanto en carbono como en nitrógeno. Mostrando así un mayor metabolismo en el hígado, comparado con el músculo. Bajo esta premisa podemos ratificar que el hígado es el principal tejido que recicla los nutrientes para poder sobrevivir ante la inanición. Se sabe que la gluconeogénesis ocurre principalmente en el hígado, transformando las fuentes nitrogenadas (AAs) o carbonadas (piruvato) en glucosa como forma energética, como el ciclo de la Ala (Felig, 1973; Cooper, 2011). Lo cual se refleja en el incremento del factor de enriquecimiento en el hígado.

En este trabajo también se observó que el jurel incrementó su enriquecimiento isotópico ($\Delta\delta^{15}\text{N}$) por AAs para Ala, Asp, Glu, Pro, Ile, Leu y Val. La mayoría de estos AAs están descritos como glucogénicos; por participar en la síntesis de glucosa. Con este enriquecimiento, podemos decir que el jurel tiene la capacidad de reciclar o sintetizar

parcialmente estos tres AA ramificados (Ile, Leu y Val), al observar su enriquecimiento en el isótopo pesado del nitrógeno. Lo anterior podría deberse a su oxidación y transaminación. Por ejemplo, la oxidación de la Leu, da como resultado el ácido 2-oxo-isocaproico y un Glu, mientras que la *Leu transaminasa* utiliza un ácido oxo-isocaproico mismo que es transformado a Leu en un solo paso con ayuda de un Glu (Bender, 2012) (Fig.1). La Leu que es un AA cetogénico (Copito *et al.*, 1984), si bien se sabe que no es sintetizado *de novo*, es utilizado para abastecer de energía a los tejidos periféricos como cerebro, corazón y riñón (Robinson & Wiliamson, 1980). En nuestro trabajo se demuestra que la Leu está activamente involucrada en los procesos para obtención de energía.

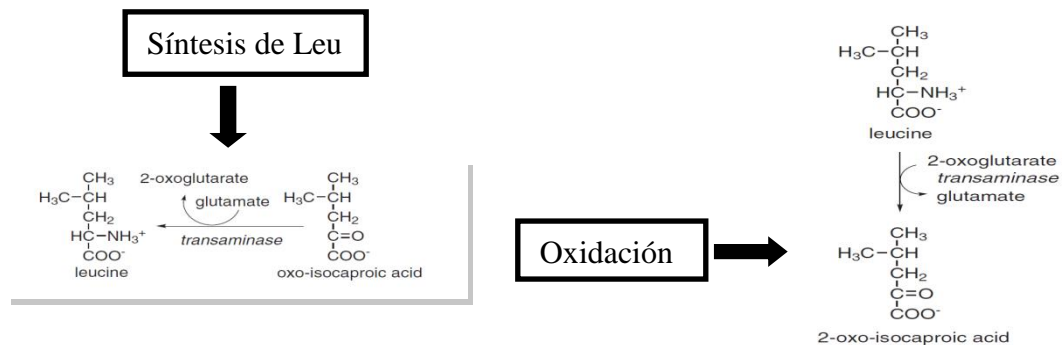


Figura 6. Ruta de síntesis y oxidación de Leucina, extraída parcialmente de Bender (2012)

Bajo un estado en alimentación, se diseñaron otros dos Experimentos (2 y 3) para tratar de evaluar el efecto de la proteína en el factor de enriquecimiento isotópico en “masa” y por AA. En el Experimento 2, la proteína se incrementó en cuatro niveles (400, 430, 460 y 490 g/kg de dieta). Debido a que existen las bases fisiológicas para establecer que los organismos consumen alimento hasta saciar sus requerimientos energéticos (Cho & Kaushik, 1985; Drewnowski & Bellisle, 2003), se varió el contenido de lípidos y carbohidratos para mantener un mismo nivel de energía. Sin embargo, en el supuesto de que esto no ocurriera, el Experimento 3, se basó en un diseño experimental en donde los lípidos y carbohidratos se mantuvieron constantes al incrementar la proteína. En este último, se utilizó proteína indigestible como relleno para complementar el 100% de la formulación. La digestibilidad proteica se base en la disponibilidad de sus enlaces peptídicos a ser degradados por las enzimas digestivas (Erickson & Kim, 1990). Sin embargo, se sabe que una proteína sometida a calor en presencia de formaldehído puede ocasionar un daño irreversible formando entrecruzamientos, los cuales difícilmente podrán ser degradados por enzimas (Antoniewicz *et al.*, 1992). Es así que en este Experimento se fueron mezclando las fuentes proteicas digestibles y tratadas, manteniendo una cantidad creciente un tanto similar al Experimento anterior (380, 420, 460 y 490 g/kg dieta), pero de proteína digestible y contrarrestando con la proteína tratada.

En ambos Experimentos se observó que a mayor cantidad de proteína disponible en la dieta, mayor fue su crecimiento, sin observar diferencias significativas en la tasa de eficiencia proteica (PER). La eficiencia proteica es una estimación indirecta de la misma, ya que se considera la ingestión directa de proteína con relación al incremento corporal, sin considerar las proporciones de nutrientes que resultaron en ganancia. Es decir, al

considerar el peso total, no se sabe si hubo un mayor incremento en grasa o músculo. Por otro lado, se basa en la estimación de la ingestión, la cual no siempre es exacta (Mackenzie & Peters, 1990).

Al estimar el factor de enriquecimiento isotópico en “masa” ($\Delta\delta^{13}\text{C}$ y $\Delta\delta^{15}\text{N}$) para hígado y músculo en ambos Experimentos, se encontró un mayor enriquecimiento del nitrógeno conforme aumentó la proteína. Por ejemplo, en el Experimento 3, los valores del $\Delta\delta^{15}\text{N}$ oscilaron entre 2.8 up a 3.4‰. Este factor se determina hasta que el tejido estudiado llegue al equilibrio con su dieta y es estimado mediante la diferencia entre ambos (Minagawa & Wada, 1984). Los resultados obtenidos reflejan los procesos metabólicos que ocurren en el tejido estudiado, mostrando así la utilización de los diferentes sustratos en la dieta (proteína, lípidos y carbohidratos). Al existir un mayor enriquecimiento del isótopo del N se demuestra que la proteína está siendo metabolizada como fuente energética. El $\Delta\delta^{13}\text{C}$ en músculo presentó un incremento significativamente distinto conforme aumentó la proteína, en ambos Experimentos. Esto pudiera deberse a la menor acumulación de fuentes energéticas en el músculo (glucógeno y grasa), ya que estas fuentes muestran un valor isotópico más ligero. Sin embargo, no se mostraron diferencias significativas en la relación C:N. Para hígado en el Experimento 3, el isótopo pesado fue empobrecido (redujo) conforme aumento la proteína. Comparando con la relación C:N, observamos que al aumentar la proteína en la dieta aumenta significativamente la relación C:N (5.02 hasta 30.84), dando un reflejo en la acumulación de lípidos o glucógeno en hígado. Vale la pena recordar, que a diferencia del PER que considera el pez completo, el enriquecimiento isotópico sólo refleja la actividad metabólica de un tejido en particular que fue muestreado, que en este caso es músculo o hígado. De esta manera, en ambos Experimentos no se

observaron diferencias en la acumulación de grasa en el organismo completo en los Experimentos realizados.

Las tasas metabólicas, “m”, aquí presentadas fueron calculadas mediante el modelo de Hesslein *et al.* (1993). Estas se obtiene a través de una regresión no lineal de los valores isotópicos en “masa” y la tasa específica de crecimiento, obteniendo así, el cambio isotópico por el metabolismo por día. Así mismo, al obtener la tasa metabólica para cada tejido, se pudo estimar el tiempo de recambio proteico por medio del modelo descrito por Tieszen *et al.* (1983). En el Experimento 2 se calculó para músculo y en el Experimento 3, para hígado. La razón de no haberse podido estimar en ambos tejidos en los dos Experimentos se basa en una limitante del modelo. Ya que el tejido debe llegar al equilibrio a través de un cambio exponencial que concluye en una pendiente sin tener grandes fluctuaciones, principio que no se cumplió en todos los casos. Esto ocurre, ya sea porque haya muchas fluctuaciones entre las mediciones (como en el tejido de hígado en el Experimento 2); porque el valor isotópico entre el organismo inicial y su dieta de estudio sea muy similar, como si el organismo ya hubiera llegado al equilibrio (como se observó en el músculo del Experimento 3); o bien, porque se contaban con pocas repeticiones dando lugar a altas variaciones entre muestras replicadas.

Aún así, los valores que pudieron ser calculados en estos dos Experimentos (2 y 3) se lograron al 50 y 95% de recambio proteico para el tejido del músculo e hígado, para los Experimentos 2 y 3, respectivamente. En igualdad de circunstancias, si así lo fuera, comparando el músculo del Experimento 2 vs el hígado del Experimento 3, los resultados obtenidos muestran que el hígado es el tejido metabólico más activo, respecto al músculo, lo cual ya ha sido ampliamente documentado por diversos autores (Boecklen *et al.*, 2011;

Xia *et al.*, 2013; 2015; Mohan *et al.*, 2016). Sin embargo el objetivo de estos dos Experimentos fue el obtener el efecto de recambio entre distintos niveles de inclusión proteica en la totoaba. Objetivo que no se cumplió claramente en el Experimento 2, ya que no se presentaron diferencias significativas en el T_{50} y T_{95} , aunque si se logra observar una predisposición al incremento metabólico en el músculo. De tal manera que entre más proteína era incluida en la dieta, menores tiempos de recambio proteico se obtuvieron. Vale mencionar nuevamente que en el Experimento 2, las dietas con mayor proteína contenían mayor cantidad de lípidos (de 7.7 a 10.6%) y carbohidratos (de 43.6 a 29.3) para mantener las dietas isoenergéticas. Por tanto, esta respuesta no tan marcada pudo haber estado afectada por el consumo en las dietas, o el desbalance entre la proteína, lípidos y carbohidratos. Sin embargo en el Experimento 3, en donde se utilizó proteína tratada con formaldehído (no digestible) como relleno para formular al 100%, las respuestas si presentaron diferencias significativas en el recambio proteico entre los tratamientos. En donde se puede afirmar que entre mayor sea la tasa metabólica (“*m*”), el recambio será en menor tiempo. Comparando esto con el Experimento 2, podemos estimar que en peces, o en este caso particular la totoaba, la ingestión pudiera estar más asociada al llenado estomacal que a cubrir sus requerimientos energéticos (Date *et al.*, 2002). Esto pudiera deberse a que la saciedad en peces no está tan relacionada como en otras especies a la presencia de glucosa en sangre para generar este efecto insulínico para inicio del anabolismo (Drewnowski & Bellisle, 2003). Sino que posiblemente sea el nervio vago quien dispare la señalización de llenado (Date *et al.*, 2002).

El factor de enriquecimiento por AA, que es la parte central de este trabajo doctoral, independientemente de lo expuesto anteriormente, aquí si se cuenta con los datos de

enriquecimiento isotópico en músculo e hígado para ambos Experimentos. En general se observó que los AAs mayormente enriquecidos en el isótopo pesado del nitrógeno (^{15}N) fueron algunos AAE y AANE, tales como Ile, Leu, Val, Ala, Asp y Glu. Estos son los mismos AAs que también se mostraron enriquecidos en la movilización en jurel bajo un esquema de inanición durante un periodo de 35 días (Experimento 1). En el jurel, se concluyó que estos fueron los AAs que se utilizaron para la obtención de energía, al ser reciclados a través del metabolismo intermediario. En los Experimentos 2 y 3, se puede inferir que al igual que en el jurel, la totoaba utilizó la proteína como fuente energética, ya que conforme más proteína digestible entraba en la dieta, los factores de enriquecimiento isotópico para estos AAs antes mencionados, fueron aumentando significativamente. Esto fue observado en el Experimento 3, donde sólo la proteína varió mientras que los lípidos y carbohidratos se mantuvieron constantes.

Los AAs tales como la Met, Lys, Phe, Gly y Pro en el jurel en inanición, no presentaron diferencias significativas en el factor de enriquecimiento isotópico tanto en músculo como en hígado, por lo cual podemos ratificar que estos AAs tienen una mínima participación en el metabolismo energético, aún en condiciones extremas de inanición durante 35 días. Un empobrecimiento en el factor de enriquecimiento isotópico, ya ha sido demostrado en diferentes trabajos (Fantle *et al.*, 1999; McClelland & Montoya, 2002; Schmidt *et al.*, 2004; Gaye-Siesseggeret *et al.*, 2007; Popp *et al.* 2007 ;McMahon *et al.*, 2010; McMahon *et al.*, 2015), en donde se ha sugerido que dichos valores tan bajos pudieran deberse a su utilización, mediante un proceso de desaminación irreversible, o por la funcionalidad de algunos AAs. Entre estos último, podemos mencionar a la Phe y Gly, AAs que son utilizados en la síntesis de las catecolaminas (endorfinas) (O'Connell, 2017). Sin embargo,

en ambos Experimentos realizados en totoaba, observamos un enriquecimiento isotópico (tanto en $\Delta\delta^{15}\text{N}$ y $\Delta\delta^{13}\text{C}$) en la mayoría de estos AAs. Por tanto, podríamos afirmar que los AAs estaban disponibles en exceso, por lo que fueron utilizados u oxidados para contribuir en el grupo del nitrógeno que comparten todos los AAs (Fig 2), ya sea transaminados o sintetizados (*de novo*).

A) Amino acid nitrogen pools and transfers

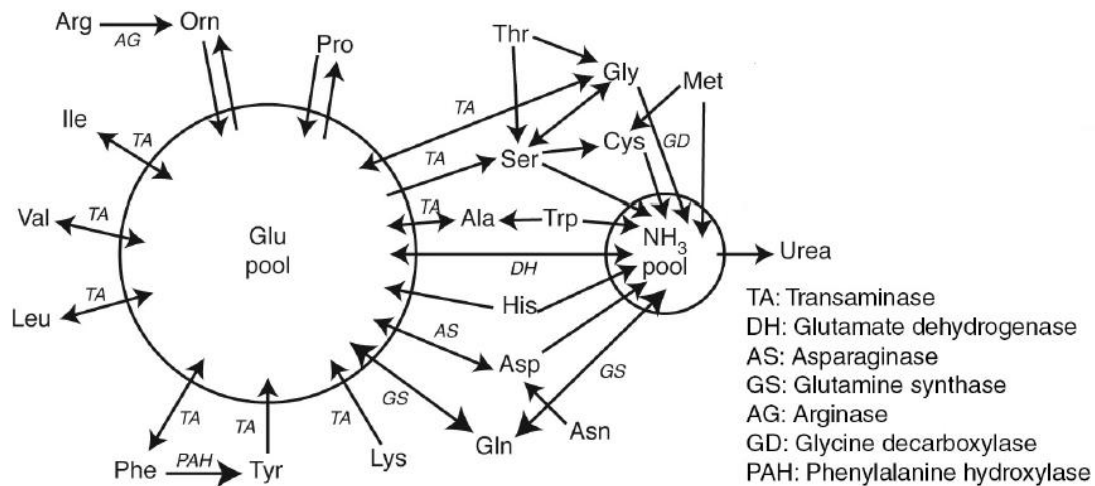


Figura 7. Proceso metabólico de los AAs y sus rutas de degradación (Extraído de McMahon et al., 2016)

En el caso particular de la Asp, en ambos Experimentos con totoaba se presentó un $\Delta\delta^{13}\text{C}$ de -4.71 hasta -9.56‰. Razón por la que podemos sugerir que la totoaba utiliza este AA en sus diferentes procesos fisiológicos y energéticos, ya que cuenta con la característica de ser un AA sintetizado *de novo* (McMahon *et al.*, 2010; 2015). Dichos autores establecen que los AAs no esenciales pueden ser sintetizados *de novo* en donde el esqueleto de carbono al

provenir de carbohidratos o lípidos, los cuales tienen valores isotópicos más ligeros, resultando en valores del C más ligeros dentro de aquellos AAs que son sintetizados.

Conclusiones Generales

1. La técnica de isótopos estables, aplicada para determinar el valor isotópico de AAs individuales, representa una herramienta que ayuda en el estudio sobre la utilización de diferentes aminoácidos en el metabolismo intermediario de los organismos acuáticos, en donde ciertas estimaciones como la ingestión y alimentación restringida son difíciles de llevarse a cabo.
2. El jurel *Seriola lalandi* utiliza preferentemente los ácidos grasos monosaturados en un ambiente de inanición prolongado como fuente energética y retiene los ácidos grasos poliinsaturados, tanto en hígado como en músculo.
3. El hígado del Jurel en inanición es el tejido que presenta un metabolismo activo (catabolismo y anabolismo) en un estado en inanición, ya que desde el segundo día de inanición, el $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ en masa, incrementan en el isótopo pesado, mostrando un reciclamiento o síntesis de fuentes nitrogenadas.
3. En el jurel en inanición, el valor isotópico del nitrógeno ($\delta^{15}\text{N}$) en músculo, no presentó diferencias significativas en los 35 días en inanición, por lo que la síntesis de proteína en el músculo disminuye drásticamente, canalizando los sustratos obtenidos del catabolismo para su mantenimiento energético basal.
4. El factor de enriquecimiento isotópico en masa, nos ayuda visualizar el destino de la proteína ingerida, de tal forma que se puede saber si es utilizada como fuente energética o al crecimiento. Como se pudo observar en el Experimento 3.
5. La Met, Lys, Phe, Gly y Pro no son utilizados por el metabolismo energético del jurel.

6. La Ala, Asp, Glu, Pro, Ile, Leu y Val son utilizados principalmente como fuente energética en un metabolismo basal del Jurel en inanición. Mientras que durante la alimentación (totoaba; Experimento 1 y 2) se incrementan los valores de enriquecimiento isotópico en Ile, Leu, Val, Ala, Asp y Glu

7. La totoaba utiliza preferentemente la Asp como fuente energética ya que sintetiza *de novo* (Experimento 1 y 2), lo cual se ve reflejado en su factor de enriquecimiento isotópico tanto en nitrógeno como en carbono.

Implicaciones

La técnica de isótopos estables por componente específico, si bien es una técnica que nos puede dar idea sobre que AAs individuales están siendo utilizados en el metabolismo (catabolismo y anabolismo) de los organismos, también nos puede ayudar en elucidar a partir de que fuentes de carbono y nitrógeno están siendo sintetizadas parcial o totalmente (Transaminación y reanimación). La hipótesis versaba en que aquellos que tendieran a cero en el enriquecimiento isotópico de cada AAs individual serían su nivel de limitancia. Sin embargo, debido a que los AAs de alguna manera tienen un papel metabólico inevitable como fuente energética y no son destinados totalmente al crecimiento, debemos tener resuelto ante todo, las fuentes más apropiadas de energía. Por otro lado, aún en el caso de que esto llegara a conocerse, habrá que conocer los niveles mínimos de enriquecimiento esperado para cada uno de los AAs en cada especie y fase de vida en los cuales se prueban las dietas. Y con los enriquecimientos obtenidos, se podrá correlacionar las concentraciones de AAs en la dieta y así encontrar una proteína ideal más certera y no sólo a dosis respuesta, como comúnmente se hacen las estimaciones.

En general se demuestra que los peces marinos utilizan mayormente la proteína como sustrato energético. Por lo cual el siguiente paso a seguir será el encontrar los sustratos energéticos más apropiados y sus proporciones para que estimulen su desarrollo fisiológico para potencializar el crecimiento. Disminuyendo así la proteína presente en la dieta, hasta un nivel fisiológicamente aceptable.

Bibliografía citada

- Antoniewicz, A.M., Van Vuuren, A.M., van der Koelen, C.J. & Kosmala, I. 1992. Intestinal digestibility of rumen undegraded protein of formaldehyde-treated feedstuffs measured by mobile bag and in vitro technique. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 39, 111–124.
- Badillo, D, Herzka, S. Z., Viana, M. T. 2014. Protein retention assessment of four levels of poultry by-product substitution of fishmeal in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) diets using stable isotopes of nitrogen ($\delta^{15}\text{N}$) as natural tracers. *PLoS ONE* 9(9):e107523. doi:10.1371/journal.pone.0107523
- Badillo, Z. D., Lazo, J. P., Herzka, S., Viana, M. T. 2016. The effect of substituting fishmeal with poultry by-product meal in diets for *Totoaba macdonaldi* juveniles. *Aquacult Res* 47: 1778-1789.
- Bañuelos-Vargas I., López L. M., Pérez-Jiménez A., Peres H. 2014. Effect of fishmeal replacement by soy protein concentrate with taurine supplementation on hepatic intermediary metabolism and antioxidant status of totoaba juveniles (*Totoaba macdonaldi*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*. 170; 18-25
- Barnes, C., Sweeting, C. J., Jennings, S., Barry, J. T., Polunin N. V. C. 2007. Effect of temperature and ration size on carbon and nitrogen stable isotope trophic fractionation. *Functional Ecology*. Vol. 21:356–362.
- Bender, D. A. 2012. *Amino Acid Metabolism* (3rd edn) West University College London, UK, John Wiley & Sons Ltd. 456p.

- Berg, J. M., Tymoczko, J. L., & Stryer, L. 2002. Biochemistry (5th ed.). New York:W. H. Freeman.
- Boecklen, W. J., Yarnes C. T., Cook, B. A., James A. C. 2011. On the Use of Stable Isotopes in Trophic Ecology. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 42:411–40.
- Bonrdner, E. C., D'bramo, L., Conklin, E. D. 1983. Assimilation of nutrients by cultured hybrid lobster (*Homarus* sp.) fed experimental diets. *Journal World Aquaculture Society*. Vol. 14:11-24.
- Bosley, L. K., Witting, A. D., Chambers, C. R., Wainringht, C. S. 2002. Estimating turnover rates of carbon and nitrogen in recently metamorphosed Winter flounder *Pseudopleuronectes americanus* with satble isotopes. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* Vol . 236:233-240.
- Campell, P. N., Smith, A. D., Peters, T. J. 2005. Biochemistry Illustrated (Edinburgh: Elsevier Ltd).
- Conceição, L. E. C., Grasdalen, H. & Rønnestad, I. 2003. Amino acid requirements of fish larvae and post-larvae: new tools and recent findings. *Aquaculture*, 227, 221-232.
- Conover, J. R. 1966. Assimilation of organic meter by zooplankton. *Limnology Oceanography*. Vol. 11:338-345.
- Cowey, C. B. 1994. Amino acid requirements of fish: a critical appraisal of present values. *Aquaculture* 124: 1-11.
- Chikaraishi, Y., Kashiyama, Y., Ogawa N., Kitazato, O., Hiroshi, O., Naohiko. 2007. Metabolic control of nitrogen isotope composition of amino acids in macroalgae and

gastropods: Implications for aquatic food web studies. *Marine Ecology Progress Series*, 342; 85-90

Chikaraishi, Y., Ogawa, N. O., Kashiyama, Y., Takano, Y., Suga, H., Tomitani, A., Miyashita, H., Kitazato, H., Ohkouchi, N. 2009. Determination of aquatic food-web structure based on compound-specific nitrogen isotopic composition of amino acids. *Limnology and Oceanography: Methods* 7. 740-750.

Chikaraishi, Y., Steffan, Shawn, A., Takano, Y., Ohkouchi, N. 2015. Diet quality influences isotopic discrimination among amino acids in an aquatic vertebrate. *Ecology and evolution*. 5 (10); 2048-2059.

Cho, C. Y. and Kaushik, S. J. 1985 Effects of protein intake on metabolizable and net energy values of fish diets. In *Nutrition and feeding in fish*, edited by C.B. Cowey, A.M. Mackie and J.G. Bell. Academic Press, London, pp. 95–117

Date, Y., Murakami N., Toshinai, k., Matsukura, S., Nijima, A., Matsuo, H., Kangawa, K., Nakazato, M. 2002. The Role of the Gastric Afferent Vagal Nerve in Ghrelin-Induced Feeding and Growth Hormone Secretion in Rats. *Gastroenterology*, 123:1120-1128.

De Silva, S. S., Gunasekera, R. M., Austin, C. M. 1997. Changes in the fatty acid profiles of hybrid red tilapia, *Oreochromis mossambicus* X *O. niloticus*, subjected to short-term starvation, and a comparison with changes in seawater raised fish. *Aquaculture*, 153;273-290.

Devlin, T. M. ed. 2006. *Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations* (Hoboken: Wiley-Liss).

- Drazen, J. C., Reisenbichler K.R., Robiso, K.H. 2007. A comparison of absorption and assimilation efficiencies between four species of shallow- and deep-living fishes. *Mar. Biol.* 151, 1551–1558.
- Drewnowski, A., Bellisle F. 2003. The control of food intake In: *Nutrition & metabolism*. (Eds) Blackwell Science, Iowa, USA. Pp 318-323. ISBN 0-632-05625-8
- Erickson, R. H., Kim Y. S. 2003. Digestion and absorption of dietary protein. *Annual Review of Medicine*, 41:133:139
- Fantle M. S., Diettel A. S., Schwalm S. M., Epifanio C. E. y Fogel M. L. 1999. A food web analysis of juvenile blue carb, *Callinectes sapidus*, using stable isotopes in whole animals and individual amino acids. *Oceanologia*. Vol. 120: 416-426.
- Feling, P. 1973. The Glucose-Alanine Cycle, *Progress in endocrinology and metabolism*. *Metabolism*, 22 (2);179-207
- Fry, B. 2006. *Stable isotope ecology*. Springer, New York, NY.
- Focken, U. 2008. Application of Stable Isotopes in Aquaculture Nutrition Research. 258-270 pp. *Avances en Nutrición Acuícola IX*. IX Simposio Internacional de Nutrición Acuícola. 24-27 Noviembre. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, México.
- Fuller, M. F., McWilliam, R. T., Wang, T. C., Giles, L. R. 1989. Optimum dietary amino acid pattern for growing pig. *British Journal of Nutrition*, 62:255-267

- Gao, F. Q., Paul, K. S., Lin, G. H., Chen, S. P. Cheung, S. G. 2006. Stable isotope and fatty acid evidence for uptake of organic waste by Green-lipped mussels *Perna viridis* in a polyculture fish farm system. *Mar Ecol Prog Ser.* Vol 317:273-283.
- Gao, F. Q., Wang, Y. S., Dong, S. L., Sun, Z. L., Wang, F. 2011. Absorcion of different food source by sea cucumber *Apostichopus japonicus* (Selenka) evidence from carbón stable isotope. *Aquaculture.* Vol 319:272-276.
- Gamboa-Delgado, J. y Le Vay, L. 2009. Natural stable isotopes as indicators of the relative contribution of soy protein and fish meal to tissue growth in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) fed compound diets. *Aquaculture.* VOL. 291:115–123.
- Gamboa-Delgado, J., Rojas-Casas, M. G., Nieto-López, M. G., Cruz-Suárez, L. E. 2013. Simultaneous estimation of the nutritional contribution of fish meal, soy protein isolate and corn gluten to the growth of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) using dual stable isotope analysis. *Aquaculture.* 380-383; 33-40.
- Gaylord, T., Barrows, F. 2009. Multiple amino acid supplementations to reduce dietary protein in plant-based rainbow trout, *Oncorhynchus mukiss*, feeds. *Aquaculture.* Vol. 287:180-184.
- Gaye-Siessegger, J., Focken, U., Abel, H. J., Becker, K. 2007. Starvation and low feeding levels result in an enrichment of ^{13}C in lipids and ^{15}N in protein of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) *J. Fish Biol.* 71: 90-100.
- Germain, L. R., Koch, L. P., James, H., Matthew, D. M. 2013. Nitrogen isotope fractionation in amino acids from harbor seal: implication for compound-specific trophic position calculations. *Mar Ecol Ser.* Vol. 482:265-277.

- Gómez-Requeni, P., Mingarro, M., Calduch-Giner, J. A., Médale, F., Martin, S. A. M., Houlihan, D. F., Kaushik S., Pérez-Sánchez, J. 2004. Protein growth performance, amino acid utilisation and somatotropic axis responsiveness to fish meal replacement by plant protein sources in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*. 232(1-4); 493-510
- Goodman-Lowe, G. D., Carpenter, R. J., Atkinson, S. 1999. Assimilation efficiency of prey in the Hawaiian monk seal (*Monachus schauinslandi*). *Can. J. Zool.* Vol. 77: 653-660.
- Guelinckx, J., Dehairs, F., Ollevier, F. 2008. Effect of digestion on the $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ of fish-gut contents. *Journal of Fish Biology*. 72; 301-309.
- Heady, W. N., Moore, J. W. 2013. Tissue turnover and stable isotope clocks to quantify resource shifts in anadromous rainbow trout. *Oecologia*, 172, 21–34. doi:10.1007/s00442-012-2483-9
- Hernandez, M., Montalvo, L., Sousa, V., Sotelo, A. 1996. The protein efficiency ratios of 30:70 mixtures of animal:vegetable protein are similar or higher than those of the animal foods alone. *Journal of Nutrition*, 126(2):574-581
- Herzka, S. Z. 2005. Assessing connectivity of estuarine fishes based on stable isotope ratio analysis. *Estuarine Coastal and Shelf Science*. Vol. 64:58-69.
- Hesslein, H. R., Haallard, A. K., Ramlal, P. 1993. Replacement of sulfur, carbon and nitrogen in tissue of growing broad whitefish (*Coregonus nasus*) in response to a change in diet traced by $\delta^{34}\text{S}$, $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 50, 2071-2276. Doi: 10.1139/cjfas-2015-0531

- Jomori, K. R., Ducatti, C., Carneiro, J. D., Portella, C. M. 2008. Stable carbon ($\delta^{13}\text{C}$) and nitrogen ($\delta^{15}\text{N}$) isotopes as natural indicators of live and dry food in *Piractus mesopotamicus* (Holmberg, 1987) larval tissue. *Aquac. Res.* Vol 39:370-381.
- Lehninger, A. L. 1975. *Biochemistry* 2nd ed. (New York: Worth Publishers).
- Li, P., Mai K., Trushenski, J., Wu, G. 2008. New developments in fish amino acid nutrition: towards functional and environmentally oriented aquafeeds. Review article. DOI 10.1007/S00726-008-0171-1.
- Lorrain, A., Graham B., Menard, F., Popp, B., Bouillon S., Breugel P. V. y Cherel Y. 2009. Nitrogen and carbon isotope values of individual amino acids: a tool to study foraging ecology of penguins in southern ocean. *Marine Ecology Progress Series.* Vol. 391:293-36.
- Mackenzie, B. R., Leggett, E. C., Peters, R. H. 1990. Estimating larval fish ingestion rate: can laboratory derived values be reliably extrapolated to the wild?. *Marine Ecology Progress Series.* 67: 209-225.
- McClelland, W. J., Montoya, J. P. 2002. Trophic relationships and the nitrogen isotopic composition of amino acids in plankton. *Ecology* 83: 2173-2180.
- Martínez-Montaña, E., Peña, E., Focken, U., Viana, M.T., 2010. Intestinal absorption of amino acids in the Pacific Bluefin Tuna (*Thunnus orientalis*): in vitro uptake of amino acids using hydrolyzed sardine muscle at three different concentrations. *Aquaculture* 299,134-139

- Michener, R. H., Schell, M. D. 1994. Stable isotopes ratios as tracer in aquatic food webs. In. K. Lajtha y Michener, editor. Stable isotopes in ecology and enviromental science. Oxford, UK. Blackwell Scientific. Ppc138-157.
- Minagawa, M., Wada, E. 1984. Stepwise enrichment of ^{15}N along food chains: further evidence and relation between $\delta^{15}\text{N}$ and animal age. *Geochimica Cosmochimica Acta*, 48, 1135-1140.
- McMahon, K. W., Fogel, M. L., Elsedon, T. S., Thorrold, S. R. 2010. Carbon isotope fractionation of amino acids in fish muscle reflects biosynthesis and isotopic routing from dietary protein. *Journal of Animal Ecology*. Vol. 79:1132-1141.
- McMahon, K. W., Polito, M. J., Abel, S., Mccarthy, M. D., Thorrold, S. R. 2015. Carbon and nitrogen isotope fractionation of amino acids in an avian marine predator, the gentoo penguin (*Pygoscelis papua*). *Ecology and Evolution*, 5, 1278–1290.
- McMahon, Kelton, W., McCarthy, Matthew. D. 2016. Embracing variability in amino acid $\delta^{15}\text{N}$ fractionation:mechanisms, implications, and applications for trophic ecology. *Ecosphere* 7(12):e01511. 10.1002/ecs2.1511
- Milgen, J. V., Dourmad, J. Y. 2015. Concept and application of ideal protein for pigs. *Journal of Animal Science and Biotechnology*. 6:15.
- Miura, K., Goto, A. S. 2012. Stable nitrogen isotopic fractionation associated whit transamination of glutamic acid to aspartic acid: implication for understanding ^{15}N trophic enrichment in ecological food webs. *Res. Org. Geochem*. Vol. 28:13-17.

- Mohan, J. A., Smith, S. D., Connelly, T. L., Attwood, E. T., McClelland, J. W., Herzka, S. Z., & Walther, B. D. 2016. Tissue-specific isotope turnover and discrimination factors are affected by diet quality and lipid content in an omnivorous consumer. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 479, 35-45. DOI: 10.1016/j.jembe.2016.03.002
- Nguyen, H. P., Khaoian, P., Fukada, H., Suzuki, N., Masumoto, T. 2013. Feeding fermented soybean meal diet supplemented with taurine to yellowtail *Seriola quinqueradiata* affects growth performance and lipid digestion. *Aquaculture Research*. 46(5); 1-10.
- O'Connell, T. C. 2017. 'Trophic' and 'source' amino acids in trophic estimation: a likely metabolic explanation. *Oceanologia*, 184:317-326
- Poop, B. N., Graham, B. S., Olson, R. J., Hanniendes, C. C. S. Lott, M. J., Lopez-Ibarra G., Galvan-Magana, F., Fry, B. 2007. Insight into the trophic ecology of yellowfin tuna, *Thunnus albacares*, from compound-specific nitrogen isotope analysis of proteinaceous amino acids. In Dawson T, Siegwolf R (eds) *Stable isotopes as indicators of ecological change*. Elsevier, Amsterdam, p 173-190.
- Phillips, D. L., Koch, P. L. 2002. Incorporating concentration dependence in stable isotope mixing models. *Oecologia* 130, 114–125.
- Phillips, L. D. y Gregg. 2003. Source partitioning using stable isotopes: coping with too many sources. *Oceanologia*. Vol. 136:261-269.

- Quinn, R. H. 1986. Experimental studies of food ingestion and assimilation of the soldier crab, *Mictyris longicarpus* Latreille (Decapoda, Mictyridae). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* Vol. 102:167–181.
- Robins, A. M., Williamson, D. H. 1980. Physiological roles of ketone bodies as substrates and signals in mammalian tissues. *Physiol Rev* 60: 143–187.
- Schlechtriem, C., Focken, U., Becker, K., 2004. Stable isotopes as a tool for nutrient assimilation studies in larval fish feeding on live food. *Aquat. Ecol.* 38, 93-100.
- Schroeder, G.L. 1983. Sources of fish and prawn growth in polyculture ponds as indicated by $\delta^{13}\text{C}$ analysis. *Aquaculture* 35, 29–42.
- Stryer, L. 1995. *Biochemistry* 4th ed. (New York: W. H. Freeman & Company).
- Takagi S, Murata H, Goto T, Endo M, Yamashita H, Ukawa M. 2008. Taurine is an essential nutrient for yellowtail *Seriola quinqueradiata* fed non-fish meal diets based on soy protein concentrate. *Aquaculture* 208: 198-205.
- Takeuchi, T. 2007. Amino acids, Peptides. In: Nakagawa H, Sato M, Gatlin DM (eds) *Dietary supplements for the health and quality of cultured fish*. CAB International, Oxon, UK, pp 47–63
- Tieszen, L. L., Boutton, T. W., Tesdahl, K. G., Slade, N. A. 1983. Fractionation and turnover of stable carbon isotopes in animal tissues: Implications for $\delta^{13}\text{C}$ analysis of diet. *Oecologia*, 57:32-37
- Tocher, R. D. 2003. Metabolism and function of lipids and fatty acids in teleost fish. *Rev Fish Sci* 11: 107-184.

- Ueki, I., Roman, H. B., Hirschberger, L. L., Junior, C., Stipanuk, M. H. 2012. Extrahepatic tissues compensate for loss of hepatic taurine synthesis in mice with liver-specific knockout of cysteine dioxygenase. *Am J Physiol – Endoc M* 302: 1292-1299
- Witting, D. A., Chambers, R. C., Bosley, K. L., Wainright, S. C. 2004. Experimental evaluation of ontogenetic diet transitions in summer flounder (*Paralichthys dentatus*), using stable isotopes as diet tracers. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* Vol. 61 (11):2069–2084.
- Wu, G. 2009. Amino Acids: Metabolism, functions, and nutrition. *Amino Acids* 37: 1-17
- Xia, B., Gao Q. F., Li H., Dong S. L. y Wang F. 2013. Turnover and fractionation of nitrogen stable isotope in tissues of grass carp *Ctenopharyngodon idellus*. *Aquaculture Environmental Interactions*. Vol. 3: 177-183.
- Xia, B., Wang, J. Y., Gao, Q. F., Sun, Y. Z., Zhang, L. M., Ma, J. J., & Liu, X. Q. 2015. The nutritional contributions of dietary protein sources to tissue growth and metabolism of sea cucumber *Apostichopus japonicus* (Selenka): evidence from nitrogen stable isotope analysis. *Aquaculture*, 435, 237–244.
- Yokoyama, H., Higano J., Adachi K., Ishishi Y. Yamada Y. 2002. Evaluation of shrimp polyculture system in Thailand based on stable carbon and nitrogen isotope ratios. *Fisheries Sci.* Vol. 68:745-750

Yamamoto, T., Surgita, T., Furita, H. 2005. Essential amino acid supplementation to fish meal-based diets with low protein to energy ratios improves the protein utilization in juvenile rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture*. Vol. 246:379-391.

Zhang, Y., Dabrowski, K., Hliwa, P., Gomulka, P. 2006. Indispensable amino acid concentrations decrease in tissues of stomachless fish, common carp in response to free amino acid- or peptidebased diets. *Amino Acids* 31:165–172

**Capítulo I. Metabolism of *Seriola lalandi* during Starvation as Revealed
by Fatty Acid Analysis and Compound-Specific Analysis of Stable
Isotopes within Amino Acids.**

Capitulo II. Use of isotopic enrichment to assess the relationship among dietary protein levels, growth and nitrogen retention in juvenile *Totoaba macdonaldi*

**Capitulo III. Protein digestibility impact on the isotopic enrichment by
amino acid, in aquafeeds for *Totoaba macdonaldi*.**

