

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS**



**Respuesta del metabolismo hepático y fisiológico de juveniles de**  
***Totoaba macdonaldi* ante la inclusión de proteína de soya y**  
**almidón en dietas suplementadas con taurina.**

TESIS

QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA  
OBTENER EL GRADO DE:

**DOCTOR EN CIENCIAS EN OCEANOGRAFÍA COSTERA**

PRESENTA

**MARÍA ISAURA BAÑUELOS VARGAS**

ENSENADA, BAJA CALIFORNIA, MÉXICO. ENERO, 2014.

Universidad Autónoma de Baja California  
Facultad de Ciencia Marinas  
POSGRADO EN OCEANOGRAFÍA COSTERA

**Respuesta del metabolismo hepático y fisiológico de juveniles de *Totoaba macdonaldi* ante la inclusión de proteína de soya y almidón en dietas suplementadas con taurina**

Tesis

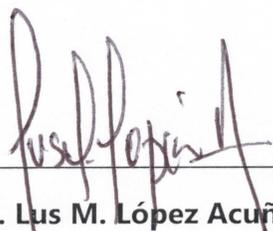
Que para cubrir parcialmente los requerimientos necesarios para obtener el grado de:

Doctor en Ciencias en Oceanografía Costera

Presenta:

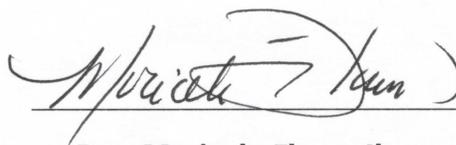
**María Isaura Bañuelos Vargas**

Aprobado por:



**Dra. Lus M. López Acuña**

Directora de tesis



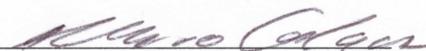
**Dra. Maricela Flores Ibarra**

Sinodal



**Dr. Ricardo Searcy Bernal**

Sinodal



**Dr. Mario A. Galaviz Espinoza**

Sinodal



**Dr. Conal D. True**

Sinodal

Sinodal

Ensenada, B.C., México, a 23 de enero de 2014.

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS**



**Respuesta del metabolismo hepático y fisiológico de juveniles de**  
***Totoaba macdonaldi* ante la inclusión de proteína de soya y almidón**  
**en dietas suplementadas con taurina.**

TESIS

QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA  
OBTENER EL GRADO DE:

**DOCTOR EN CIENCIAS EN OCEANOGRAFÍA COSTERA**

PRESENTA

**MARÍA ISaura BAÑUELOS VARGAS**

ENSENADA, BAJA CALIFORNIA, MÉXICO. ENERO, 2014.

*A Emmanuel,*

*Compañero de aventuras.*

## AGRADECIMIENTOS

A la **Dra. Lus Mercedes López Acuña** y a los investigadores, **Dra. Marisela Flores Ibarra**, **Dr. Ricardo Searcy Bernal**, **Dr. Dominique Bureau** y **Dra. Helena Peres**, **Dr. Conal True** y al **Dr. Mario Galaviz** por sus observaciones, recomendaciones y correcciones realizadas para llevar a buen término la presente tesis.

A la **Facultad de Ciencias Marinas y Facultad de Ciencias (Universidad Autónoma de Baja California)** y la **Facultad de Ciencias (Universidad de Porto, Portugal)** por proveer de las instalaciones, equipos y recursos necesarios para el desarrollo de la investigación realizada en esta tesis.

Al **CONACYT** por otorgarme una beca de manutención, recurso indispensable para la supervivencia durante el desarrollo de mis estudios de posgrado.

A la **Universidad Autónoma de Sinaloa** por otorgar una beca que permitió cubrir una parte importante de mis necesidades de manutención durante mis estudios de posgrado nacional y en el extranjero.

Al **M. en C. Gerardo Garibaldi** por su apoyo durante las diferentes etapas del proceso experimental de mi investigación. A la **Biol. Deyanira Rodarte** y **Dr. Alfonso de la Mora** por la asesoría brindada en el procesamiento y el análisis histopatológicos llevados a cabo en la presente tesis. Al **Dr. Aires Oliva Teles** por compartir sus conocimientos y experiencia para mejorar mi formación profesional.

A la **Dra. Karina Lugo Ibarra** por su amistad y acertados consejos que me dieron conocimiento, fuerza y voluntad necesarios para llegar a cumplir mis metas en esta etapa de vida. Al **M. en C. Emmanuel Vizcaíno**, **M. en C. Idaly Trejo**, **M. en C.**

**Jesús Velázquez, M. en C. Paola Pérez, M. en C. Carolina Castro, M. en C. Felipe Coutinho, Dra. Amalia Pérez** y todos aquellos amigos y compañeros que compartieron su luz para iluminar este sendero. Les agradezco su apoyo profesional, pero especialmente, su amistad y los momentos gratos compartidos.

A mi esposo, **Emmanuel Martínez Montaña**, por todo ese amor, ternura y sabiduría que sin empacho me comparte.

A mis padres, mi hermana, mi sobrina y todos mis familiares, lejanos y cercanos, quienes me recuerdan mis raíces y el para qué de todo este esfuerzo.

**RESUMEN** de la tesis de **María Isaura Bañuelos Vargas**, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de DOCTOR EN CIENCIAS EN OCEANOGRAFÍA COSTERA. Ensenada, Baja California, México. Noviembre de 2013.

**Respuesta del metabolismo hepático y fisiológico de juveniles de *Totoaba macdonaldi* ante la inclusión de proteína de soya y almidón en dietas suplementadas con taurina.**

El desarrollo comercial de la totoaba (*Totoaba macdonaldi*), representa una atractiva oportunidad de diversificación y crecimiento económico para el sector de la acuicultura del Noroeste de México. Si bien se han realizado avances importantes en el desarrollo acuícola de esta especie, aún quedan importantes vacíos de información que permitan avanzar hacia la escala comercial viable. Uno de los retos más importantes es el desarrollo de dietas comerciales apropiadas para la totoaba; sin embargo para desarrollarlas es necesario conocer cuales son sus requerimientos nutricionales y como se adapta su metabolismo ante diferentes combinaciones de las fuentes de nutrientes disponibles. Asimismo, otro de los retos que ha limitado el cultivo de la totoaba, ha sido la mortalidad masiva de organismos bajo condiciones de cultivo piloto-comerciales. Tales mortalidades han sido relacionadas con la presencia del llamado “síndrome de hígado verde”, cuyo agente causal ha sido atribuido a posibles deficiencias de nutrientes en las dietas comerciales utilizadas (no específicas para totoaba). El “síndrome de hígado verde” es considerado una anomalía o hepatopatía que se caracteriza por el cambio en la coloración del órgano hepático hacia tonalidades verdosas y que en consecuencia pueden presentarse por diversas alteraciones fisiológicas en los animales afectados. La literatura sugiere que especies carnívoras, como la totoaba, pueden requerir de la suplementación de taurina, cuya deficiencia ha sido relacionada con el desarrollo del “síndrome de hígado verde” en peces cuya alimentación es a base de ingredientes de origen vegetal. Ya que aún se desconoce el origen del “síndrome de hígado verde” en la totoaba, y de que además la tendencia actual en la acuicultura es la sustitución máxima posible de los ingredientes de origen animal (especialmente de la harina y aceite de pescado) por ingredientes de origen vegetal, como el concentrado de proteína de soya (PS) y los carbohidratos; el objetivo principal del presente trabajo fue estudiar la respuesta del metabolismo intermediario de juveniles de *Totoaba macdonaldi* en relación a la inclusión de proteína vegetal y almidón en dietas sin y con suplemento de taurina y su relación con el “síndrome de hígado verde”. Para lograr los objetivos, fueron realizados 2 experimentos de alimentación con duración de 6 semanas cada uno. En el experimento 1 (EXP I), se evaluó la

respuesta metabólica y fisiológica de juveniles de totoaba ante la inclusión de proteína de soya y almidón en dietas suplementadas con taurina. Para ello se elaboraron 4 dietas experimentales con 30 y 60% de PS en sustitución de la harina de pescado. 2 de estas dietas sin suplemento de taurina (S30 y S60) y las otras 2 suplementadas con 1% de taurina (S30T y S60T). Se utilizó como control, una dieta elaborada con 100% harina de pescado como fuente única de proteína. Para este bioensayo se utilizaron peces con  $7.5 \pm 0.05$ g de peso promedio inicial. Al final del EXP I, los resultados muestran que el uso de PS en las dietas (independiente del nivel y de la suplementación de taurina) provocó una menor ingesta de alimento en las totoaba en comparación a los peces alimentados con la dieta Control. No obstante, tanto el nivel de PS como el suplemento de taurina influenciaron significativamente (pero de manera opuesta) las variables de crecimiento. Así, la dieta S30T produjo los mayores valores de ganancia en peso, mientras que el tratamiento S60 presentó los menores valores. Asimismo, la PS en las dietas provocó una tendencia significativa de disminución en la retención de nitrógeno. Sin embargo, la retención de energía total no fue significativamente influenciada. El uso de PS en las dietas provocó efectos significativos en la composición hepática, aunque solo el glucógeno resultó significativamente disminuido por el aumento del nivel de PS. Por su parte, las actividades de las enzimas del metabolismo intermediario hepático respondieron de manera significativa ante las variaciones de PS y taurina en las dietas. Las actividades de las enzimas clave del catabolismo de aminoácidos (AA), de gluconeogenesis y la enzima glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) resultaron significativamente disminuidas por la falta del suplemento taurina (independiente del nivel de PS). Por su parte, las actividades de las enzimas clave de la glucolisis fueron disminuidas por el aumento de PS en las dietas. La actividad de la enzima del sistema de defensa antioxidante catalasa (CAT) resultó significativamente aumentada con el suplemento de taurina. Además, la actividad de las enzimas CAT y G6PD fueron correlacionadas positivamente con la disminución de los niveles de lipoperoxidación (LPO) hepática. Asimismo, el suplemento de taurina, por si mismo, indujo a la disminución significativa de los niveles de LPO y en el desarrollo del “síndrome de hígado verde” en totoaba. Por otra parte, el aumento de PS (60%) provocó un incremento significativo de agregados inflamatorios en el tejido hepático. Además, se observó que independiente del nivel, el uso de PS indujo a un estado generalizado de vacuolización de los hepatocitos con desplazamiento nuclear hacia la periferia. En la respuesta hematológica y de bioquímica sanguínea, se observó que el aumento de PS afectó la concentración de hemoglobina (HB), albúmina (AL), razón AL: globulinas (AL: G1b) y aumentó la glucosa plasmática (GLU). Por el contrario, la suplementación de taurina generó la recuperación de la mayoría de estas variables y además influenció significativamente la disminución de los eritrocitos circulantes (EC) y el hematocrito (HT). Se observó un efecto significativo de la interacción de factores (PS\*taurina) en el hematocrito (HT), la media de la concentración de hemoglobina corpuscular (MCHC) y la GLU. Así, mientras el nivel de PS provocó la tendencia de aumento de HT, disminución de MCHC y aumento de GLU; la suplementación de taurina indujo al efecto contrario en cada una de estas variables. En general,

los resultados del EXP I indican que la deficiencia de taurina es el factor principal que desencadena en el incremento en los niveles de daño oxidativo hepático y del desarrollo del “síndrome de hígado verde” en los juveniles de totoaba alimentados con dietas con niveles desde el 30% de concentrado de proteína de soya. Además, la presencia del “síndrome de hígado verde” ante la inclusión de PS sin el suplemento de taurina es consistente a lo reportado para otras especies carnívoras de peces marinos, en los que la taurina es considerada un nutriente esencial. Posteriormente fue llevado a cabo el experimento 2 (EXP II), en el que se evaluaron los efectos de la interacción de niveles moderados de carbohidratos con la PS y taurina. Fueron elaboradas 4 dietas experimentales con 18% de almidón gelatinizado en sustitución parcial del aceite de pescado. Dos de estas dietas fueron elaboradas con harina de pescado como fuente principal de proteína sin y con el suplemento de 1% de taurina (A y AT, respectivamente). Las otras 2 dietas se elaboraron con 30% de PS sin y con el suplemento de 1% de taurina (APS y APST, respectivamente). Una dieta control (DC) fue elaborada con harina y aceite de pescado como fuentes principales de proteína y lípidos. Para este experimento se utilizaron peces con  $20.0 \pm 0.5$  g de peso inicial. Al final del EXP II, los parámetros de crecimiento y de eficiencia alimenticia resultaron significativamente afectados por la combinación de almidón + PS (independiente del suplemento de taurina), donde los tratamientos APS y APST mostraron los menores valores en peso ganado, eficiencia alimenticia (EA) y eficiencia proteica (EP). Por otra parte, a diferencia del EXP I, en el EXP II se observó una mayor ingesta de las dietas elaboradas con PS en comparación con la DC. No obstante, el menor crecimiento en peso obtenido en APS y APST se reflejó en una disminución de la EP y de la retención de nutrientes. La composición del hígado fue influenciado por la combinación de almidón + PS, la cual se reflejó en el aumento de lípidos; mientras que el suplemento de taurina indujo al aumento de glucógeno hepático. En cuanto a la respuesta del metabolismo intermediario del EXP II, se observó que la actividad de alanina aminotransferasa (ALAT; enzimas del catabolismo de AA) resultó significativamente aumentada por el suplemento de taurina; mientras que la actividad de la enzima glutamato deshidrogenasa (GDH) fue significativamente disminuida en el tratamiento APS. Por su parte, la dieta AT indujo los valores más elevados en la actividad G6PD, aunque los resultados no indicaron efectos significativos debido a la combinación de alguno de los factores evaluados. Los resultados de las actividades de las enzimas del sistema de defensa antioxidante muestran que la actividad de glutatión peroxidasa (GPX) fue mayor en AT, pero sin observarse efectos significativos generados por los factores almidón + (PS y/o taurina). Similar que en el EXP I, el factor taurina influenció significativamente en la disminución de los niveles de LPO hepática. Cabe mencionar que a diferencia del EXP I, en el EXP II no se presentaron casos del “síndrome de hígado verde” en los juveniles de totoaba alimentados con PS en las dietas. Sin embargo, la combinación de 18% de almidón gelatinizado y 30% de PS provocó cambios significativos de degeneración vacuolar y nuclear en los hepatocitos. Asimismo, ésta combinación de ingredientes provocó la disminución de la HB, media del volumen celular (MVC) y media de la hemoglobina celular (MHC). Mientras que el factor el suplemento taurina tuvo una influencia

significativa en el aumento de la AL y la razón AL:Glb. Se observó un efecto de interacción de factores (PS\*T) en el HB, MVC, MHC y AL:Glb; mientras que la GLU no fue influenciada por la composición de las dietas. Al final de este estudio, y como primera aproximación, los resultados parecen indicar que la acumulación de lípidos, glucógeno y la generalizada vacuolización de los hepatocitos parecen señalar que la totoaba puede ser susceptible a los cambios en la combinación de macronutrientes (proteínas/lípidos/carbohidratos), fuente de ingredientes vegetales (almidón/proteína de soya), así como de la propia disponibilidad de taurina en la dietas. Por otra parte, la suplementación de 10 g de taurina kg dieta<sup>-1</sup> desempeñó un papel fundamental en la regulación de la respuesta del metabolismo intermediario y en la prevención del desarrollo del “síndrome de hígado verde” en los juveniles de totoaba alimentados con dietas elaboradas con proteína de soya y carbohidratos. Por lo que estos resultados pueden ser utilizados como base para el desarrollo de dietas que presenten una combinación más adecuada de ingredientes vegetales y suplementación de taurina. Además, variables como la AL, razón AL: Glb y enzimas como la G6PD y CAT pueden ser herramientas útiles en el monitoreo de la condición de salud hepática de totoaba.

**Palabras clave:** Metabolismo intermediario, *Totoaba macdonaldi*, proteína vegetal, almidón, taurina, retención nutrientes, crecimiento, defensas antioxidante, hígado verde.

ABSTRACT from the thesis presented by **María Isaura Bañuelos Vargas** as a partial requirement to obtain the DOCTORATE degree on COASTAL OCEANOGRAPHY SCIENCE. Ensenada, Baja California, Mexico. November 2013.

**Hepatic metabolism and physiological response of *Totoaba macdonaldi* to the inclusion of soy protein and starch in diets supplemented with taurine.**

The commercial development of totoaba (*Totoaba macdonaldi*), represents an attractive opportunity for diversification and economic growth for the aquaculture industry in the northwestern of México. Significant progress has been made in the development of aquaculture of this species; however there are still important information gaps for moving towards a viable production of totoaba at a commercial scale. One of the biggest challenge is the development of appropriate commercial diets for totoaba, but there is not enough information about its nutritional requirements and it still not known how totoaba metabolism could adapt to different combinations of nutrient sources available. Also, another challenge that has limited the cultivation of this carnivorous species is the huge mortality of organisms under pilot commercial farm production. These mortalities have been related to the "green liver syndrome", whose causal agent might be due deficiencies of nutrients in commercial diets used (not specific for totoaba). The "green liver syndrome" is considered an anomaly that is characterized by the change in the color of the liver organ to green and can be accompanied by different physiological changes in affected animals. The literature suggests that carnivorous species, such as totoaba, might require supplementation of taurine to prevent the development of "green liver syndrome" in fish fed plant based diets. However, the origin of the "green liver syndrome" remains uncertain in totoaba, additionally to the current trend in aquaculture is the maximum possible substitution of ingredients of animal origin (especially fish meal and fish oil) by vegetables ingredients such as soya protein concentrate (PS) and carbohydrates; the main goal of this work was to evaluate the response of the intermediary metabolism of *Totoaba macdonaldi* juvenile fed diets with high inclusion of vegetable protein and starch, with and without taurine supplementation, and its relationship with the development of green liver syndrome. For that, we conducted two feeding experiments lasting 6 weeks each. In the first experiment (EXP I), we assessed the response of intermediary metabolism, antioxidant system defense and the development of green liver in totoaba fed diets made with PS with and without T. 4 experimental diets were made with 30 and 60% of S to replace fishmeal. 2 of these diets were made without taurine (S30 and S60), while the other 2 diets were made with 1% of taurine (S30T and S60T). Control diet was made with 100% of fish meal as a main source of protein. In this trial, the initial weight of fish was of  $7.5 \pm 0.05g$ . At the end

of EXP I, results showed that the PS in the diets (independent of level of taurine) caused a lower intake of nutrients in totoaba compared to control. However, both the level of PS and taurine significantly influenced (but in opposite directions) the growth performance. Thus, S30T diet showed the greatest weight gain and S60 diets the lowest weight gain. Also, the PS in the diets caused a significant trend of decline in nitrogen retention. However, the total energy retention was not significantly influenced. The liver composition was significantly influenced by PS in diets, although only glycogen content was significantly reduced by the increased level of PS. The enzyme activities of intermediary metabolism responded significantly to variations in PS as well as taurine in diets. Thus, the activities of key enzymes of AA catabolism, gluconeogenesis and glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) enzyme were significantly reduced by the lack of taurine (independent of PS level). Meanwhile, the activities of enzymes key of glycolysis were reduced by the levels of PS in diets. On the other hand, the activity of catalase (CAT), an enzyme of antioxidant defense system, was significantly increased with taurine supplementation. Furthermore, the increment on the activities of CAT and G6PD enzymes were positively correlated with decreased levels of lipid peroxidation (LPO). Besides, the taurine supplementation by itself was to decrease significantly LPO level and the “green liver syndrome”. Moreover, PS induced significant changes of cells of hepatic tissue. In the analysis of blood, in general it was observed that the increase of PS reduced the hemoglobin concentration (HB), albumin (AL), AL: globulins ratio (AL: Glb), but increased plasma glucose (GLU). By contrast, taurine restored most of these variables. In addition, taurine significantly decreased circulating erythrocytes (EC) and hematocrit (HT). Also, the interaction of PS versus taurine induced a significant effect on HT, mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC) and GLU. Thus, while the increased level of PS trended to increase HT, it reduced MCHC and increased GLU; the PS with taurine supplementation induced an opposite effect on each of these variables. Overall, results of EXP I indicate that taurine factor plays an evident role on the modulation of metabolism, antioxidant defense and preventing the development of “green liver syndrome” of totoaba fed with at least 30% PS. In the second experiment (EXP II), we evaluated the interaction effects of PS and taurine in high carbohydrate diets. Four experimental diets were prepared with 18% gelatinized starch, partially replacing fish oil. Two of these diets were made with fish meal as the main source of protein, without and with 1% of taurine supplement (A and AT, respectively). The other 2 diets were made with 30% of PS without and with 1% of taurine supplement (APS and APST, respectively). A control diet (DC) was also made with fishmeal and fish oil as major sources of protein and lipids. In this trial, fish initial weight was  $20.0 \pm 0.5$ g. At the end of EXP II, growth performance and feed efficiency were significantly affected by the interaction of starch + PS (independent of taurine supplement), where APS and APST treatments showed lower values for weight gain, feed efficiency (EA) and protein efficiency (EP). Unlike EXP I, results of EXP II showed a higher voluntary feed intake of PS based diets compared with DC. Moreover, APS and APST not only induced a reduction of weight gain but it also decreased protein and energy retention. Unlike EXP I, the composition of the liver was significantly

influenced by both factors: PS and taurine. PS increased liver lipid deposition, whereas taurine induced an increment of liver glycogen content. Regarding the response of intermediary metabolism in EXP II, it appears that only the activity of alanine aminotransferase (ALAT, enzyme of the catabolism of AA) was significantly increased by taurine supplementation. Although, glutamate dehydrogenase (GDH) activity was significantly lower in the treatment APS and G6PD activity was highest in AT diet, there were no significant effects of PS and taurine. The results of antioxidant system defense shown that, the glutathione peroxidase (GPX) activity was highest in fish fed the AT diet, but without significant effects of PS and taurine were observed. However, and similarly to EXP I, taurine significantly decreased LPO levels. It should be noted that unlike the EXP I, results of EXP II showed no cases of “green liver syndrome” in totoaba fed with PS. However, the combination of starch and PS triggered significant nuclear and cytoplasmic degeneration of hepatocytes. Also, results indicate that the combination of starch and PS lead to a significant decrease of HB, mean cell volume (MVC) and mean cell hemoglobin (MHC). Otherwise, taurine supplementation induced an increment of AL and AL: Glb. There was an interaction effect of PS and taurine on HB, MVC, MHC and AL: Glb. However, GLU was not influenced by the composition of the diets. Overall, results of EXP II seem to be in agreement with those reported for other carnivorous species, which has limited ability to use dietary carbohydrates. Furthermore, the absence of the “green liver syndrome” at the end of EXP II might be due to the initial fish weight, as bigger fish may require longer feeding period to induce such liver syndrome. In general, results generated in this study seem to indicate that the accumulation of lipids, glycogen and vacuolation of hepatocytes in totoaba, could be a sign that totoaba may be susceptible to change in the mix of macronutrients (protein / lipid / carbohydrate), source of plant ingredients (starch / soy protein), and the own availability of taurine diets. Finally, results seems to indicate that taurine plays an essential role in the modulation of metabolism, antioxidant defense and preventing “green liver syndrome” in totoaba juvenile fed diets made with soy protein and carbohydrates. Therefore our results may be useful as a basis for the development of diets with appropriate mix of vegetable ingredients and taurine supplementation. In addition, variables such as AL, AL: Glb and enzymes such as G6PD and CAT may be useful tools in monitoring health status of totoaba.

Keywords: Intermediary metabolism, *Totoaba macdonaldi*, vegetable protein, starch, taurine, nutrient retention, growth, antioxidant defenses, green liver.

---

**ÍNDICE**

	<b>Pág.</b>
RESUMEN	I
ABSTRACT	V
Listas de figuras, tablas y anexos	XII

**CAPITULO I**

1 INTRODUCCIÓN	1
1.1 Biología de <i>Totoaba macdonaldi</i>	3
1.1.1 Generalidades	3
1.1.2 Estado actual y retos del futuro	5
1.1.3 Estudios realizados	7
1.2 Generalidades del metabolismo intermediario	10
1.2.1 Metabolismo de proteínas	11
1.2.2 Metabolismo de lípidos	12
1.2.3 Metabolismo de carbohidratos	14
1.3 Generalidades del sistema de defensa antioxidante	16
1.3.1 Radicales libres y especies reactivas en el desarrollo de estrés oxidativo	17
1.3.2 Antioxidantes	18
1.3.3 Antioxidantes enzimáticos	19

---

1.3.4 Antioxidantes no-enzimáticos	22
2 ANTECEDENTES	24
2.1 Papel de la taurina en peces carnívoros	24
2.2 Carbohidratos en nutrición de peces carnívoros	27
3 JUSTIFICACIÓN	30
4 HIPÓTESIS	32
5 OBJETIVO GENERAL	32
5.1 Objetivos específicos	32

## **CAPITULO II**

2 EXPERIMENTO I: Efectos en juveniles de totoaba de dos niveles de concentrado de proteína de soya con y sin suplemento taurina en dietas.	35
2.1 Diseño y elaboración de dietas experimentales	35
2.2 Condiciones de cultivo	37
2.3 Biometrías de peso y obtención de muestras	39
2.4 Parámetros de crecimiento, eficiencia alimenticia y retención de nutrientes	41
2.5 Métodos analíticos	44
2.5.1 Análisis de composición proximal	44
2.5.2 Análisis de enzimas del metabolismo intermediario y del sistema de defensa antioxidante	45

---

2.5.3 Indicador de daño oxidativo: peroxidación de lípidos	46
2.5.4 Análisis para determinar el “síndrome de hígado verde”	47
2.5.5 Análisis histopatológico	48
2.5.6 Análisis hematológico y bioquímica sanguínea	49
2.6 Análisis estadístico	50
2.7 Resultados	51
2.7.1 Crecimiento y eficiencia alimenticia	51
2.7.2 Retención de nutrientes y composición proximal de pez entero y músculo	53
2.7.3 Composición del hígado e índice hepatosomático (IHS)	56
2.7.4 Actividad de enzimas relacionadas con el metabolismo intermediario	57
2.7.5 Estado del sistema antioxidante y peroxidación de lípidos	60
2.7.6 Hígado verde e histopatología	62
2.7.7 Hematología y bioquímica sanguínea	66
2.8 Discusiones	70
2.9 Conclusiones	84

### **CAPITULO III**

3 EXPERIMENTO II: Efectos de dietas elaboradas con sustitución parcial de harina y aceite de pescado por ingredientes vegetales (concentrado	86
--	----

---

de proteína de soya y almidón) con y sin taurina en juveniles de totoaba	
3.1 Diseño de dietas experimentales	86
3.2 Condiciones de cultivo	89
3.3 Biometrías y obtención de muestras	89
3.4 Parámetros de crecimiento, eficiencia alimenticia y retención de nutrientes	90
3.5 Métodos analíticos	90
3.6 Análisis estadístico	91
3.7 Resultados	92
3.7.1 Crecimiento y eficiencia alimenticia	92
3.7.2 Retención de nutrientes y composición proximal de pez entero y músculo	94
3.7.3 Composición del hígado e índice hepatosomático (IHS)	97
3.7.4 Actividad de enzimas relacionadas con el metabolismo intermediario	99
3.7.5 Estado del sistema antioxidante y peroxidación de lípidos	101
3.7.6 Histopatología del hígado	102
3.7.7 Hematología y bioquímica sanguínea	104
3.8 Discusiones	107
3.9 Conclusiones	118
<b>DISCUSIONES GENERALES</b>	<b>119</b>

<b>CONCLUSIONES GENERALES</b>	125
<b>RECOMENDACIONES</b>	125
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	127

### LISTA DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>
<b>Figura 1:</b> <i>Totoaba macdonaldi</i> en etapa adulta (izquierda) y juvenil (derecha) en las instalaciones de la Unidad de Biotecnología en Piscicultura, Facultad de Ciencias Marinas (UABC), Ensenada Baja California.	4
<b>Figura 2:</b> Distribución geográfica de <i>Totoaba macdonaldi</i> en México.	4
<b>Figura 3:</b> Condición de las vísceras de juveniles de totoaba en condiciones de cultivo piloto-comercial.	7
<b>Figura 4:</b> Hígado de totoabas alimentadas con dietas comerciales para trucha y con 25% de almidón.	9
<b>Figura 5:</b> Peso final de juveniles de <i>Totoaba macdonaldi</i> alimentados con proteína de soya sin y con el suplemento taurina.	51
<b>Figura 6:</b> Regresión lineal entre las variables peroxidación de lípidos y la actividad de G6PD ó actividad de CAT en hígado de juveniles de totoaba alimentados con proteína de soya sin y con el suplemento taurina.	62
<b>Figura 7:</b> Incidencia de “hígado verde” en juveniles de <i>Totoaba macdonaldi</i>	63
<b>Figura 8:</b> Micrografía de hígado de juveniles de <i>Totoaba macdonaldi</i> del tratamiento control.	64
<b>Figura 9:</b> Micrografía de hígado de juveniles de <i>Totoaba macdonaldi</i> alimentados con proteína de soya sin y con el suplemento taurina.	65
<b>Figura 10:</b> Peso final de juveniles de <i>Totoaba macdonaldi</i> alimentados con almidón, proteína de soya sin y con el suplemento taurina.	92
<b>Figura 11:</b> Micrografía de hígado de juveniles de <i>Totoaba macdonaldi</i> alimentados con almidón, proteína de soya sin y con el suplemento taurina.	103

## LISTA DE TABLAS

	Pág.
<b>Tabla 1:</b> Ingredientes de las dietas experimentales elaboradas con concentrado de proteína de soya sin y con el suplemento taurina.	36
<b>Tabla 2:</b> Composición proximal y composición de aminoácidos de las dietas experimentales elaboradas con concentrado de proteína de soya sin y con el suplemento taurina.	38
<b>Tabla 3:</b> Crecimiento en peso y eficiencia alimenticia de juveniles de <i>Totoaba macdonaldi</i> alimentados con concentrado de proteína de soya sin y con el suplemento taurina.	52
<b>Tabla 4:</b> Retención de nutrientes de juveniles de <i>Totoaba macdonaldi</i> alimentados con concentrado de proteína de soya sin y con el suplemento taurina.	54
<b>Tabla 5:</b> Composición corporal y muscular de juveniles de <i>Totoaba macdonaldi</i> alimentados con concentrado de proteína de soya sin y con el suplemento taurina.	55
<b>Tabla 6:</b> Composición del hígado e índice hepatosomático de juveniles de <i>Totoaba macdonaldi</i> alimentados con concentrado de proteína de soya sin y con el suplemento taurina.	57
<b>Tabla 7:</b> Actividad específica de enzimas relacionadas con el metabolismo intermediario hepático de juveniles de <i>Totoaba macdonaldi</i> alimentados con concentrado de proteína de soya sin y con el suplemento taurina.	58
<b>Tabla 8:</b> Actividad específica de enzimas relacionadas con el sistema antioxidante y peroxidación de lípidos en hígado de juveniles de <i>Totoaba macdonaldi</i> alimentados con concentrado de proteína de soya sin y con el suplemento taurina.	61
<b>Tabla 9:</b> Histopatología del hígado de juveniles de <i>Totoaba macdonaldi</i> alimentados con concentrado de proteína de soya sin y con el suplemento taurina.	66
<b>Tabla 10:</b> Hematología y bioquímica del plasma sanguíneo de juveniles de <i>Totoaba macdonaldi</i> alimentados con concentrado de proteína de soya sin y con el suplemento taurina.	67

	<b>Pág.</b>
<b>Tabla 11:</b> Composición de ingredientes de las dietas experimentales elaboradas con almidón, concentrado de proteína de soya sin y con el suplemento taurina.	87
<b>Tabla 12:</b> Composición proximal y de aminoácidos de las dietas experimentales elaboradas con almidón, concentrado de proteína de soya sin y con el suplemento taurina.	88
<b>Tabla 13:</b> Crecimiento en peso y eficiencia alimenticia de juveniles de <i>Totoaba macdonaldi</i> alimentados con almidón, concentrado de proteína de soya sin y con el suplemento taurina.	94
<b>Tabla 14:</b> Retención de nutrientes en juveniles de <i>Totoaba macdonaldi</i> alimentados con almidón, concentrado de proteína de soya sin y con el suplemento taurina.	96
<b>Tabla 15:</b> Composición corporal y muscular de juveniles de <i>Totoaba macdonaldi</i> alimentados con almidón, concentrado de proteína de soya sin y con el suplemento taurina.	98
<b>Tabla 16:</b> Composición del hígado e índice hepatosomático de juveniles de <i>Totoaba macdonaldi</i> alimentados con almidón, concentrado de proteína de soya sin y con el suplemento taurina.	99
<b>Tabla 17:</b> Actividad específica de enzimas relacionadas con el metabolismo intermediario hepático de juveniles de <i>Totoaba macdonaldi</i> alimentados con almidón, concentrado de proteína de soya sin y con el suplemento taurina.	101
<b>Tabla 18:</b> Actividad específica de enzimas relacionadas con el sistema antioxidante y peroxidación de lípidos en hígado de juveniles de <i>Totoaba macdonaldi</i> alimentados con almidón, concentrado de proteína de soya sin y con el suplemento taurina.	103
<b>Tabla 19:</b> Histopatología del hígado de juveniles de <i>Totoaba macdonaldi</i> alimentados con almidón, concentrado de proteína de soya sin y con el suplemento taurina.	105
<b>Tabla 20:</b> Hematología y bioquímica del plasma sanguíneo de juveniles de <i>Totoaba macdonaldi</i> alimentados con almidón, concentrado de proteína de soya sin y con el suplemento taurina.	106

## LISTA DE ANEXOS

	<b>Pág.</b>
Anexo 1: Solución Davidson y técnica de deshidratado.	155
Anexo 1.1: Tinción Hematoxilina–Eosina.	156
Anexo 1.2: Índices de evaluación histopatológica del hígado de <i>Totoaba macdonaldi</i> .	157
Anexo 2: Análisis proximales.	160
Anexo 3: Enzimas del metabolismo intermediario y sistema de defensa antioxidante.	163
Anexo 4: Solución Dacie.	184

# CAPÍTULO I

## 1 INTRODUCCIÓN

La producción mundial por acuicultura actualmente se equipara a la producción por extracción en la pesca. Además, los reportes de la FAO indican que la producción de especies para consumo humano por acuicultura crece a una tasa promedio anual del 8.8% (FAO, 2012). En México, la producción por acuicultura muestra una tasa de crecimiento de 4.5% anual (DOF, 31 de enero de 2011), con un continuo y creciente interés por el desarrollo y diversificación de la acuicultura comercial, en particular por la piscicultura marina de especies nativas o regionales, por lo que actualmente se realizan diversos estudios de especies con valor comercial como la cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*), botete diana (*Sphoeroides annulatus*), pargo rojo (*Lutjanus peru*), corvina blanca (*Atractoscion nobilis*) y totoaba (*Totoaba macdonaldi*) (Civera *et al.*, 2002; Duncan *et al.*, 2003; Dumas *et al.*, 2004; López *et al.*, 2006, 2009; Durazo *et al.*, 2009; Rueda-Lopez *et al.*, 2011; Minjarez-Osorio *et al.*, 2012).

No obstante, el desarrollo de la acuicultura comercial de peces, en particular de especies marinas, depende en gran parte de la disponibilidad de alimentos formulados que cubran los mínimos requerimientos nutricionales de los organismos bajo cultivo, además que sean económicamente viables. La harina y aceite de pescado han representado una excelente fuente de proteína y energía en la elaboración de dietas para organismos destinados a la acuicultura. La creciente demanda de estos insumos (especialmente para la acuicultura), junto a las oscilaciones en la producción anual en volumen de harina y aceite de pescado mundial, ha provocado que la elaboración de alimentos formulados para el

cultivo de peces resulte en alimentos comerciales costosos (FAO, 2012; FAO GLOBEFISH, 2013). En este sentido, la industria productora de alimentos para la acuicultura ha optado por el uso de fuentes alternativas, como los insumos de origen vegetal, para reducir los costos de producción de los alimentos formulados comerciales.

Los insumos de origen vegetal son los ingredientes más utilizados en la industria acuícola por su disponibilidad y precio. Sin embargo, es necesario realizar investigación para determinar el uso óptimo de estas fuentes de nutrientes sin repercusiones negativas en los organismos. Lo anterior es de suma relevancia debido a las diferencias que presentan los peces herbívoros respecto a los carnívoros en la capacidad de utilizar insumos vegetales, además de la importancia de mantener el balance de nutrientes para el óptimo crecimiento y salud en los organismos (Wang et al., 2006; Wu, 2009; Oliva-Teles, 2012).

A la fecha se han logrado avances en el conocimiento de los requerimientos nutricionales y de los efectos en la salud y crecimiento de las carencias de nutrientes esenciales para diferentes especies de peces con fines de acuicultura. La información generada ha demostrado que conocer las particularidades específicas de los organismos marca la diferencia en el éxito de la producción acuícola (Oliva-Teles, 2012). Por lo que lo anterior la introducción de nuevas especies requiere de investigación para conocer las particularidades específicas de los organismos ante determinados componentes nutricionales y el impacto de los diferentes recursos disponibles en las respuestas de salud y crecimiento.

## **1.1 Biología de *Totoaba macdonaldi***

### **1.1.1 Generalidades**

*Totoaba macdonaldi* (Gilbert, 1890) es un teleósteo que presenta las tallas más grandes dentro de los miembros de la familia Sciaenidae, con longitudes de hasta 2 metros y pesos superiores a los 100 kg reportados en organismos silvestres (Cisneros-Mata et al., 1995). Las principales características morfológicas de la totoaba son: cuerpo alargado, comprimido y margen del preopérculo casi liso; posee de 15 a 20 espinas en el primer arco branquial (10-16 en la rama inferior); aleta dorsal con una escotadura fuerte con 10 a 11 radios duros y 23 a 26 radios blandos; aleta anal con 2 radios duros, 7 a 8 blandos y una segunda espina moderada; aleta pectoral con 15-17 radios; margen de la aleta caudal puntiaguda, los radiales mediales alargados. Los adultos son de color plateado cenizo y aletas oscuras. La totoaba posee una boca grande, oblicua; hocico puntiagudo, mandíbula inferior saliente sin barbillas; dientes cónicos dispuestos en bandas angostas en la fila externa de la mandíbula superior y algunos dientes puntiagudos al extremo de la mandíbula; fila interna de dientes de la mandíbula inferior ligeramente más grandes que los de la fila externa. Los juveniles se caracterizan por presentar machas circulares en los costados (Figura 1).



Figura 1. *Totoaba macdonaldi* en etapa adulta (izquierda) y juvenil (derecha) en las instalaciones de la Unidad de Biotecnología en Piscicultura, Facultad de Ciencias Marinas (UABC), Ensenada B.C.

Geográficamente, la totoaba es una especie endémica del Golfo de California, México. Los organismos se distribuyen desde la desembocadura del río Colorado hasta Bahía Concepción en la costa occidental del Golfo de California; y hasta la desembocadura del río Fuerte, Sinaloa, en la costa oriental (Figura 2), aunque actualmente, se supone restringida a la zona del Alto Golfo de California (CITES, 2005, Valenzuela-Quñones et al., 2011).



Figura 2. Distribución geográfica de *T. macdonaldi* en México. A) Baja California; B) Sonora; C) Sinaloa; D) Baja California Sur.

Respecto a su hábitat, los adultos de *T. macdonaldi* son organismos demersales que se encuentran desde las zonas costeras hasta profundidades de 25 metros, pero que en época reproductiva migran al delta del río Colorado en el Alto Golfo de California, reconocida como área de desove y crianza. Ahí, los juveniles suelen observarse en las bocas de los ríos y alrededor de arrecifes rocosos durante los primeros 2 ó 3 años de edad. La alimentación en los adultos es principalmente de peces pelágicos como sardinias, anchovetas y jaibas; mientras que los juveniles se alimentan de anfípodos y otros crustáceos bentónicos, así como de pequeños peces como lisas y gruñones (Cisneros-Mata et al., 1995; Rodríguez y Hamman, 1997).

### **1.1.2 Estado actual y retos del futuro**

Desde el punto de vista comercial, la totoaba es una especie muy valorada por los consumidores, debido a la excelente textura y sabor de su carne. No obstante, las características biológicas de la totoaba, como su longevidad (llega a vivir más de 20 años), madurez sexual tardía (inicia entre los 6 y 7 años de edad), la sobreexplotación pesquera y los impactos antropogénicos de su ambiente natural, colocaron a *T. macdonaldi* en la lista de especies en peligro de extinción por la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestre (CITES, 2005). Como medidas implementadas para permitir la recuperación de las poblaciones silvestres de totoaba, se establecieron las disposiciones oficiales de veda total y permanente de la extracción de organismos del Golfo de California. También fue creado un programa para llevar a cabo la

reproducción en cautiverio de esta especie con la finalidad de contribuir a la recuperación de sus poblaciones (True et al., 1997; True, 2012).

Los avances logrados en la producción de juveniles de totoaba por parte de la Universidad Autónoma de Baja California, así como a las características mostradas por esta especie (aceptación de alimentos formulados y rápido crecimiento en cautiverio), ha colocado a la totoaba como especie de alto potencial para la acuicultura comercial en Baja California, Sonora y Sinaloa, México, por lo que actualmente se están realizando cultivos piloto-comerciales de juveniles de totoaba (*Diario oficial de la Federación*, 25 de septiembre de 2009).

N. Schmidt menciona que pese a que los juveniles de totoaba aceptan alimentos comerciales formulados para otras especies (alimento comercial para trucha), a medida que se ha avanzado en el proceso del cultivo comercial de esta especie, se han presentado diversos problemas de salud como letargia, falta de apetito, pigmentación amarillenta de la piel de los peces y en casos extremos mortalidad en los cultivos (comunicación personal, junio 2010). Asimismo, se ha encontrado que el hígado de estos organismos presentó alteraciones avanzadas con apariencia granulosa y tonalidades verdosas, con el apoyo de disecciones de organismos muertos provenientes de cultivos donde los organismos fueron alimentados con formulas comerciales para otras especies, (Figura 3).

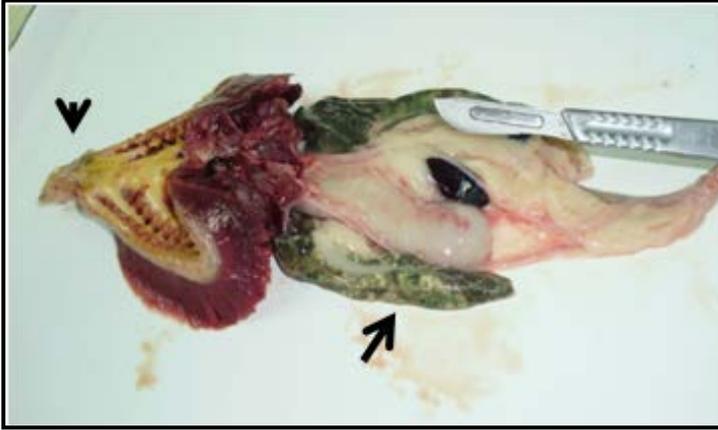


Figura 3: Visceras de juveniles de totoaba en condiciones de cultivo piloto comercial. Nótese la ictericia en arcos branquiales (cabeza de flecha) y los nódulos blancos y la coloración verdosa del hígado (flecha).

La Dra. M. Flores I. comenta que los análisis microbiológicos e histopatológicos de las muestras de totoaba no identificaron la presencia o desarrollo de procesos infecciosos o parasitarios como causas posibles del desarrollo del síndrome de hígado verde (comunicación personal, 2011). Esta problemática se ha convertido en un tema imperante de investigación para generar información que permita enfrentar el problema, y en el mejor de los casos, prevenirlo.

### 1.1.3 Estudios realizados

Los estudios que se han realizado para conocer las características reproductivas de *T. macdonaldi*, reportan que esta especie desova en múltiples ocasiones (3 ó más desoves al año), con un ciclo reproductivo de tipo sincrónico de grupo y cuya época reproductiva está establecida en verano. Estudios del desarrollo larvario y de la expresión y actividad de enzimas digestivas durante el desarrollo del tracto digestivo, indican que la metamorfosis de totoaba tiene lugar entre los 35 y 50 días post-eclosión, mientras que el proceso de destete

con dietas formuladas puede ser realizado a partir del día 27 (True et al., 1997; Morales, 1999; Sandoval, 2002; Galaviz, 2011; True, 2012).

Para conocer parte de los requerimientos nutricionales de la totoaba, se han realizado estudios de composición bioquímica, ácidos grasos en músculo y vísceras de organismos silvestres y cultivados (López et al., 2006). Se han realizado ensayos experimentales para evaluar el crecimiento, composición proximal y sobrevivencia de juveniles de totoaba ante diferentes tasas de alimentación, variación de los niveles de energía en alimentos formulados, niveles dietarios de ácidos grasos (AG) n-3 y variaciones en las razones de proteína: energía y carbohidratos: lípidos (Solórzano et al., 2006; Vizcaíno Pérez, 2008; González Acevedo et al., 2010; Villareal et al., 2011; Minjarez-Osorio et al., 2012). Los resultados de los diferentes estudios reportan que los juveniles tempranos de totoaba (menores de 30 gramos) requieren de bajas a moderadas cantidades de lípidos (8-15%) (Vizcaíno Pérez, 2008; Rueda-López et al., 2011), aunque recomiendan que al menos el 1% del peso seco de la dieta esté representado por los AG n-3 (Villareal et al., 2011). Asimismo, los estudios han encontrado que el óptimo crecimiento de los juveniles de totoaba se presenta con altos contenidos de proteína cruda en las dietas (52%; Minjarez-Osorio et al., 2012). Los reportes sugieren además que es posible incluir hasta 25% de carbohidratos (almidón de maíz gelatinizado) en las dietas para totoaba sin alterar la composición bioquímica del pez entero y contenido energético de la porción muscular de los juveniles (González Acevedo et al., 2010; Rueda-López et al., 2011).

No obstante, González Acevedo (2011), observó que los peces alimentados con niveles mayores de 15% de almidón presentaron coloración hepática anómala (Figura 4b). Mientras que los análisis hematológicos y de bioquímica sanguínea de ese ensayo, encontraron un aumento de la concentración no-pospandrial de glucosa en la sangre y disminución de las proteínas totales en el plasma de los peces alimentados con cantidades mayores al 20% de almidón en sus dietas (Bañuelos Vargas et al., 2010). Puesto que estos son los primeros datos reportados para la especie, aún queda sin esclarecer el efecto del uso de carbohidratos en la respuesta fisiológica y metabólica de totoaba.



Figura 4: Hígado de juveniles de totoabas (4.5 años de edad) alimentadas con dietas comerciales para trucha (A) y de juveniles de 4 meses de edad alimentados con dietas con 25% de almidón gelatinizado (B).

A medida que se ha avanzado en el proceso del cultivo comercial de totoaba y en los estudios experimentales para la evaluación de ingredientes alternativos, han surgido diversas interrogantes como ¿Cuáles son las causas/efectos de los cambios en el órgano hepático de esos organismos? ¿Existe una relación entre los cambios de la apariencia del hígado respecto a la composición nutricional de los alimentos proporcionados? ¿Qué efectos puede

provocar en la salud de los peces y del cultivo?, entre otras. No obstante, la falta de información sobre las características metabólicas o fisiológicas de *T. macdonaldi* bajo condiciones de cultivo, ha dificultado responder a la mayoría de estas preguntas, y por ende, brindar alternativas para su solución. De esta manera, realizar investigación para conocer la respuesta metabólica de la totoaba es indispensable para avanzar en la acuicultura exitosa de la especie.

## **1.2 Generalidades del metabolismo intermediario**

Desde una perspectiva general, las vías de los procesos metabólicos de nutrientes son similares en los peces y vertebrados terrestres. No obstante, particularidades específicas, determinan de forma importante el modo como regulan su metabolismo intermediario e influye directamente en la relación entre energía y nutrientes que requieren (Guillaume, 2004). Además, los peces tienen como característica distintiva, su sensibilidad a los factores bióticos y abióticos, y el papel particular de estos en los diferentes tejidos y órganos. Conjuntamente, los peces marinos, en su mayoría carnívoros, han adaptado su metabolismo para el alto contenido proteico y pocos hidratos de carbono en su alimento, lo que hace inconveniente unificar las respuestas metabólicas ante deficiencias nutricionales entre especies (Drabowski y Guderley, 2002; Guillaume, 2004).

Sin bien el análisis del metabolismo intermediario es complejo para cualquier organismo, estudios clásicos destacan el papel clave de sitios reguladores en las diferentes vías (enzimas) a través de los cuales el flujo en los procesos puede ser controlada o darle

seguimiento en la media en que se modifica la velocidad a la que las enzimas catalizan sus reacciones (Drabowski y Guderley, 2002; Salway y Granner, 2004). Así, factores como cambios en la disponibilidad de sustratos, de niveles de co-factores y de la unión intracelular de enzimas, pueden modificar su actividad catalítica o la eficiencia de la transferencia de sustratos entre estas. De esta manera, medir la actividad de las enzimas clave en los tejidos se considera un buen indicador del grado de especialización de dicho tejido u órgano (Drabowski y Guderley, 2002; Salway y Granner, 2004).

En el siguiente apartado se describe de manera sintetizada las principales vías metabólicas, con particular énfasis en el contenido de la presente tesis.

### **1.2.1 Metabolismo de proteínas**

Todos los animales requieren de un constante aporte dietario de AA que cubran sus requerimientos para la síntesis de proteínas estructurales y los componentes que participan en diferentes procesos fisiológicos y metabólicos (Wilson, 2002; Li et al., 2009). Los AA se localizan principalmente en forma de proteínas en los tejidos y estas son constantemente reparadas y renovadas a través de continuos procesos de catabolismo y anabolismo proteico; por lo que los AA que se encuentran en su forma libre pueden tener diferentes orígenes: provenientes de la digestión proteica de la dieta, de la biosíntesis *de novo* o por la hidrólisis de proteínas corporales (Guillaume, 2004).

La síntesis de los AA no esenciales (AANE) se lleva a cabo principalmente en el hígado, mediante procesos de transaminación a partir de intermediarios generados en las vías de la glucólisis, la vía de la pentosa fosfato y del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA, por sus siglas en inglés). Por otro lado, condiciones de ayuno prolongado o un excedente de AA provenientes de la alimentación estimulan los procesos del catabolismo de los AA ya sea para su oxidación, generación de glucosa vía gluconeogénesis o su almacenamiento en forma de grasa (Salway y Granner, 2004). En los peces, el metabolismo muestra preferencia por la oxidación de los AA con fines de obtención de energía, siendo el músculo e hígado capaces de desaminar todos los AA que forman a las proteínas para tal fin a través del proceso de transdesaminación (que involucra las reacciones reversibles de la transaminación y el proceso de desaminación), donde los AA son transformados en intermediarios metabólicos (piruvato, acetil-CoA, succinil-CoA, fumarato, acetoacetato, oxalacetato y  $\alpha$ -cetoglutarato) que pueden entrar al TCA para la obtención de energía. En los peces, resulta fundamental el adecuado suministro de AA proporcionados por la dieta, ya que de esta manera se evita el catabolismo proteico corporal y la consecuente disminución del músculo y crecimiento de los organismos. Por otro lado, un exceso de AA provenientes de la alimentación genera un aumento de la actividad de gluconeogénesis, con la consiguiente producción de desecho nitrogenados, sin que esto signifique el aumento de la síntesis y retención de proteínas corporales (Walton y Cowey, 1982; Guillaume, 2004); mientras que el desbalance en la relación de AA esenciales (AAE)/ AANE puede tener efectos en la regulación de las diferentes vías metabólicas (Li et al., 2009; Oliva-Teles, 2012).

### **1.2.2 Metabolismo de lípidos**

En los peces, particularmente en los carnívoros o en las especies con reducida capacidad de utilización de carbohidratos, los lípidos representan un importante suministro de energía. El metabolismo de lípidos para obtención de energía en los peces, similar que los mamíferos, es llevado a cabo a través del proceso de  $\beta$ -oxidación mitocondrial, donde los AG son oxidados hasta acetyl-CoA, que puede ser utilizada en la vía TCA con fines de obtención de energía o para la producción de precursores metabólicos (Guillaume, 2004). Además, los lípidos de la alimentación son fundamentales para proporcionar los AG poliinsaturados (PUFA, por sus siglas en inglés) de la serie n-6 y n-3, que por no poder ser sintetizados por los organismos son considerados AG esenciales (AGE). Estos AGE son indispensables en el adecuado funcionamiento del metabolismo celular, en el mantenimiento de la integridad de las estructuras de membranas celulares y para la producción de nuevos lípidos durante el crecimiento de los animales. Los peces, a diferencia de los animales terrestres, muestran altos requerimientos por los AGE de la serie n-3 (Sargent et al., 2002; Guillaume, 2004).

Los AG que se encuentran en su forma libre en los tejidos animales pueden provenir tanto de los lípidos dietarios, como por la síntesis de AG *de novo* (obtenidos a partir de acetyl-CoA derivado de los carbohidratos y aminoácidos) llevado a cabo principalmente en el tejido hepático. Diferentes etapas de reducción son necesarias para la síntesis de los AG *de novo* y en cada etapa se requiere de Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido (NADPH) como donador de hidrógeno (principalmente proporcionado por la vía de la pentosa fosfato, descrito más adelante) (Salway y Granner, 2004).

Cabe mencionar que la síntesis de AG *de novo* puede también ser estimulada a partir de la producción de acetil-CoA derivada del catabolismo de los AA. Mientras que el suministro de lípidos por encima de los requerimientos da como resultado la inhibición de los procesos de lipogénesis. Sin embargo, tras ser cubiertas las necesidades energéticas de los animales, los AG libres son esterificados con glicerol para formar triacilglicéridos que son almacenados en los tejidos adiposo, hepático y muscular (Sargent et al., 2002; Guillaume, 2004).

### **1.2.3 Metabolismo de carbohidratos**

Los carbohidratos son uno de los principales elementos orgánicos de los cuales los organismos vivos están compuestos y son la fuente principal de energía química para los tejidos en la mayoría de los organismos. La digestión de los carbohidratos genera como producto principal a la glucosa, que a su vez, requiere ser fosforilada a glucosa 6- fosfato (G6P) para poder ser utilizada en alguna de sus 3 rutas metabólicas principales: glucolisis, glucogénesis y/o la vía de la pentosa fosfato (Drabowski y Guderley, 2002; Salway y Granner, 2004).

En los peces, la principal vía del catabolismo de glucosa es la glucólisis, cuya ruta metabólica es similar a la observada en los mamíferos. A través de esta vía, una molécula de glucosa genera 2 moléculas de ATP una vez que entra en la vía de TCA, lo que es considerado como un aprovechamiento limitado de la energía utilizable de la glucosa por los peces. La mayor actividad de glucólisis en estos organismos se presenta en el músculo

cardiaco, esquelético y tejido hepático, aunque en este último la actividad glucolítica es primordialmente utilizada para suministrar precursores necesarios en la biosíntesis de otras moléculas y/o en los mecanismos de oxido-reducción (Drabowski y Guderley, 2002; Salway y Granner, 2004).

Por otra parte, tras ser cubiertas las necesidades energéticas celulares, la glucosa no utilizada para glucolisis es almacenada en forma de glucógeno. El glucógeno es formado a través del proceso de glucogénesis, donde grandes cantidades de moléculas individuales de glucosa son unidas de manera compacta para formar estructuras esféricas que son acumuladas en el hígado y el músculo. El glucógeno puede ser sintetizado durante y después de la alimentación, bien por la incorporación de la glucosa sanguínea o por la generación de G6P durante la gluconeogénesis (Drabowski y Guderley, 2002).

Otra ruta para el metabolismo de la glucosa es la vía de la pentosa fosfato. La G6P que entra en este proceso es destinada a 2 procesos fisiológicos principales: producción de NADPH y de ribosa 5-fosfato. La NADPH es una molécula cuyo poder reductor es necesario para la biosíntesis de AG, colesterol y en la protección celular contra radicales libres; mientras que la ribosa 5-fosfato es utilizada para la biosíntesis de ácidos nucleicos, nucleótidos, purinas y pirimidinas (Salway y Granner, 2004). Aunque la ruta de la pentosa fosfato es ubicua para todas las células; en los peces, el tejido hepático presenta la mayor actividad, especialmente durante la lipogénesis y en los procesos de adaptación a diferentes temperaturas (Walton y Cowey, 1982; Drabowski y Guderley, 2002; Guillaume, 2004).

Por el contrario, en condiciones de ayuno o ejercicio prolongado, los organismos deben cubrir las necesidades de glucosa de las células del sistema nervioso, sanguíneo y reproductivo. Para conseguirlo, el metabolismo recurre al catabolismo el glucógeno almacenado o a la síntesis de glucosa *de novo* a partir de la vía de gluconeogénesis (Salway y Granner, 2004).

En los peces, la gluconeogenesis es preferentemente utilizada para el suministro de glucosa, donde los aminoácidos (AA) son el sustrato utilizado. Por lo que los carbohidratos no son considerados esenciales en su alimentación. Sin embargo se ha comprobado que la inclusión de carbohidratos en cantidades adecuadas permite el ahorro de parte de los AA que son utilizados con fines de obtención energía (Walton y Cowey, 1982; Oliva Teles et al., 2012). Además, la mayoría de las enzimas que participan en la glucólisis presentan actividad reversible y forman parte del proceso de gluconeogénesis, excepto por la hexoquinasa (HK), glucoquinasa (GK), fosfofructoquinasa (PFK) y piruvato quinasa (PK), cuya actividad irreversible requiere de la intervención de enzimas específicas (Walton y Cowey, 1982; Moon y Foster, 1995; Guillaume, 2004).

### **1.3 Generalidades del sistema de defensa antioxidante**

En los peces, como en el resto de los organismos aerobios, las diferentes vías de catabolismo y anabolismo celular, como de los procesos de la cadena respiratoria, son una fuente constante de agentes oxidantes y radicales libres. La producción de estas moléculas tiene un papel esencial para las reacciones que dan lugar a las diversas formas de vida y

forman parte de la homeostasis celular. Sin embargo, la interacción de los agentes oxidantes y radicales libres con moléculas biológicas (lípidos, proteínas y carbohidratos) puede dar lugar a alteraciones en la estructura y funcionalidad de estas moléculas, derivando en diversas patologías crónicas o degenerativas. Por lo que los organismos han desarrollado diferentes mecanismos de defensa antioxidante para controlar la presencia de los radicales libres y agentes oxidantes, así como eliminar o reparar los componentes celulares ya dañados (Trenzado et al., 2006; Grune, 2005).

### ***1.3.1 Radicales libres y especies reactivas en el desarrollo de estrés oxidativo***

Los radicales libres son definidos como cualquier especie química, átomo o molécula, que presenta uno o más electrones no apareados en uno de sus orbitales electrónicos. Las especies reactivas se caracterizan por poseer al menos un electrón en un orbital de mayor contenido energético que el correspondiente a su estado fundamental. Las especies reactivas derivadas del oxígeno o “especies de oxígeno reactivo” (ROS, por sus siglas en inglés) que incluyen al ión superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y al radical hidroxilo ( $OH^{\bullet}$ ) son consideradas las más importantes por la fuerte toxicidad e inestabilidad que tienen (Packer, 1994; Grune, 2005).

Las fuentes de producción de radicales libres y especies reactivas son diversas y suelen clasificarse en exógenas y endógenas. Los factores endógenos que más generan estos elementos son la cadena de transporte electrónico mitocondrial y la última fase del estallido respiratorio; este último activado ya sea por la presencia de agentes infecciosos o

estímulos no infecciosos, que generan una gran cantidad de radicales libres. Asimismo, los lisosomas y la activación de enzimas del metabolismo intermediario celular como la xantina oxidasa, urato oxidasa y acil-CoA oxidasa contribuyen a las formación de ROS. Las fuentes exógenas que generan cantidades importantes de radicales libres y especies reactivas son los xenobióticos, hiperoxia, radiaciones ionizantes y ozono (Grune, 2005).

El aumento de los radicales libres y ROS, ya sea por el incremento en su producción o por la respuesta insuficiente del sistema antioxidante, son causa de estrés oxidativo. Diversos estudios en salud humana, animales domésticos terrestres y acuáticos, indican que el estrés oxidativo genera daño al ADN, lípidos y proteínas celulares, y por lo tanto repercute en el aumento de los procesos de lipoperoxidación (LPO) de membranas y organelos celulares y de la peroxidación de ácidos nucleicos, proteínas y carbohidratos. El estrés oxidativo se considera la causa principal del desarrollo de múltiples patologías como degeneración de la retina, cardiopatías, arterosclerosis, diabetes mellitus, neoplasias, enfermedades inflamatorias, enfermedades degenerativas del sistema nervioso, del hígado graso, entre otras (Huerta-Jiménez et al., 2005; Pham-Huy et al., 2008). En los peces, se ha demostrado que súbitas variaciones ambientales (temperatura, pH, salinidad, O<sub>2</sub>) o exposición a xenobióticos, así como de deficiencias de antioxidantes en las dietas, generan alta susceptibilidad ante procesos de estrés oxidativo que derivan en la supresión de la respuesta inmune, el aumento en los niveles de LPO y daño hepático (Huerta-Jiménez et al., 2005; Martínez-Álvarez et al., 2005; Pérez-Jiménez et al., 2007; Castro et al., 2012).

### **1.3.2 Antioxidantes**

Los antioxidantes son sustancias que inhiben o retardan la oxidación de sustratos oxidables, impidiendo la formación de los radicales libres y especies reactivas ó eliminándolos cuando ya se han formado, lo que ayuda a prevenir el desarrollo de estrés oxidativo. Los antioxidantes se clasifican en enzimáticos y no enzimáticos (Grune, 2005; Pham-Huy et al., 2008).

### **1.3.3 Antioxidantes enzimáticos**

#### *Superóxido dismutasa (SOD)*

La SOD es la primera línea de defensa contra la producción de ROS, ya que cataliza la dismutación de ión superóxido a peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular. Esta enzima se encuentra ampliamente distribuida en los organismos aerobios, localizada principalmente en el citosol, mitocondrias y lisosomas. En animales vertebrados se ha demostrado una correlación positiva entre la actividad de SOD y la tolerancia a la toxicidad de los ROS (Pérez-Campo et al., 1993). Asimismo, dado que el hígado presenta alta actividad metabólica y consumo de oxígeno, la medición de la actividad de SOD en este órgano suele ser empleado como referencia de la condición del sistema de defensa antioxidante. También se ha determinado que la actividad de la SOD es considerable en los eritrocitos de los peces (Wilhelm-Filho et al., 1993; Trenzado et al., 2006).

Algunos autores han asociado los niveles de actividad de SOD en relación al nicho ecológico que ocupan los peces, de manera que los organismos que requieren una mayor tasa de consumo de oxígeno (como los pelágicos), también mostrarán una mayor actividad de SOD. También se considera que el factor filogenético tiene influencia en la actividad de SOD de los peces, es decir, mientras más antigua la especie, menor actividad de SOD estará presente. (Trenzado et al., 2006).

Por otra parte, si bien la actividad de SOD actúa como primer línea de defensa, el aumento de la actividad de esta enzima debe estar acompañada por el aumento de la actividad de las enzimas catalasa y glutatión peroxidasa (descritas a continuación) para neutralizar los efectos tóxicos del peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) generado durante la actividad de la SOD (Kruk, 1998).

### *Catalasa (CAT)*

La CAT es una enzima cuya función principal es la de descomponer el  $H_2O_2$  en agua y oxígeno molecular, evitando así la acción tóxica del  $H_2O_2$  formada en las células. La CAT puede funcionar como una enzima anti-peroxidante cuando los niveles del  $H_2O_2$  son bajos y existen en el medio donadores de hidrogeno como el metanol, fenol o acido fórmico. La CAT se encuentra ampliamente distribuida en los organismos eucariontes. En los animales, todas las células presentan actividad de CAT, la cual en la mayoría de los casos, se ubica generalmente en los peroxisomas, debido a la alta producción de  $H_2O_2$  durante el proceso de  $\beta$ -oxidación en estos organelos (Winston y Di Giulio, 1991; Kruk, 1998; Grune, 2005).

En los peces, la mayor actividad de CAT se ha reportado en los eritrocitos y el hígado. Diferentes estudios han demostrado que existe correlación positiva entre el aumento de la actividad de CAT con respecto a la SOD en el hígado (Morales et al., 2004; Trenzado et al., 2006; Castro et al., 2012).

### *Glutación peroxidasa (GPx)*

La GPx funciona, al igual que la CAT en cuanto a la descomposición del  $H_2O_2$ . Sin embargo, la GPx es considerada el anti-peroxidante más importante por su capacidad de reducir los peróxidos orgánicos y disminuir la tasa de propagación de los LPO, al convertir los que ya se han producido en compuestos menos tóxicos. La GPx es una enzima de amplia distribución en los organismos eucariontes, incluso en algunas bacterias. En los animales se ha detectado en la mayoría de los tejidos, siendo el hígado y corazón donde se han reportado las actividades más altas. La GPx se localiza en el citosol, retículo endoplásmico, en la matriz mitocondrial y entre la membrana interna y externa de las mitocondrias (Kruk, 1998).

Por otra parte, la GPx es una enzima dependiente de la disponibilidad del antioxidante glutatión reducido (conocido como GSH debido a la presencia del grupo activo SH en la cisteína que forma parte del glutatión). El GSH es un donador de hidrógeno (desde el grupo SH) utilizado por la GPx durante las diferentes reacciones de reducción de los  $H_2O_2$  y otros hidroperóxidos, donde el GSH es oxidado a su forma GSSG. Por lo que, un buen funcionamiento de GPx requiere de un suministro constante y suficiente de GSH (Kruk, 1998).

### *Glutación reductasa (GR)*

La GR es la enzima responsable de proveer la GSH requerido por la GPx. En condiciones fisiológicas normales se considera que la GR ayuda a mantener una relación de GSH: GSSG de 10:1. Para lo cual la GR utiliza una molécula de NADPH y un hidrógeno para transformar una molécula de GSSG a su estado reducido (GSH). Por lo que la distribución de GR en los tejidos y compartimentos celulares es similar a la de GPx (Packer 1994; Kruk, 1998; Grune, 2005).

### *Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (G6PD)*

La G6PD forma parte de la vía de la pentosa fosfatos (descrita en el apartado 1.2.1) cuya función primordial es la de proveer del poder reductor de la NADPH utilizando G6P como sustrato (Salway y Granner, 2004). Dado que el NADPH proporcionado por la G6PD es utilizado para la reducción del GSSG; las enzimas GPx, GR y G6PD son consideradas un sistema antioxidante integral en el hígado y los eritrocitos, cuyas células están constantemente expuestas a los efectos tóxicos de las ROS y radicales libres (Packer 1994; Kruk, 1998).

### **1.3.4 Antioxidantes no-enzimáticos**

Los antioxidantes no-enzimáticos son definidos como las sustancias o compuestos de bajo peso molecular que, al igual que las enzimas del sistema antioxidante, neutralizan o destruyen los ROS y radicales libres; de esta manera contribuyen en la prevención de los

procesos de estrés oxidativo. Entre los diferentes mecanismos a través de los cuales estas moléculas actúan están: remover los excedentes de oxígeno molecular e hidroperóxidos en las células, descomponer los LPO en compuestos menos tóxicos y reactivos, quelar los iones metálicos y el oxígeno singlete. Sin embargo, los antioxidantes no-enzimáticos son también oxidados durante el proceso de neutralizar o destruir los ROS o radicales libres. Por lo que estos componentes deben ser constantemente sintetizados o incorporados a través de la alimentación (Kruk, 1998; Pham-Huy et al., 2008). Los antioxidantes no-enzimáticos de origen metabólico más reconocidos son el GSH, L-arginina, coenzima Q10, melatonina, ácido úrico, bilirrubina, transferrina, albúmina y taurina (Kruk, 1998; Pham-Huy et al., 2008).

## 2 ANTECEDENTES

### 2.1 Papel de la taurina en peces carnívoros

La taurina (ácido 2-amino-etano-sulfónico) es un amino ácido libre que no forma parte de las proteínas, pero es utilizado por los organismos en múltiples funciones biológicas, tales como la conjugación de sales biliares, osmorregulación, estabilización de membranas celulares, participación en el sistema antioxidante, regulación de neurotransmisores, en el desarrollo del sistema visual, neural, muscular y cardiovascular. Además, la taurina participa en la homeostasis de la glucosa sanguínea, en el tratamiento para la prevención de los daños causados por la diabetes, así como en la prevención del desarrollo de esteatosis hepática y en la disminución de los daños provocados por el desarrollo de hepatitis crónica (Huxtable, 1992; Hu et al., 2008; Carneiro et al., 2009; Azuma et al., 2009; Chang et al., 2011).

La taurina es un compuesto ubicuo en los organismos vivos, abundante en el plasma y células animales, pero prácticamente ausente en el reino vegetal. Los animales de origen marino contienen los más altos niveles de taurina, por lo que son considerados una fuente importante de este nutriente en la alimentación humana (Huxtable, 1992; Divakaran, 2006; Dragnes et al., 2009).

La mayoría de los animales poseen los mecanismos de síntesis de taurina a través de la vía cisteinasulfonato, en la cual la enzima L-Cisteinasulfonato descarboxilasa (CSD)

juega un papel clave. Sin embargo, se ha demostrado la esencialidad de la taurina en felinos y algunas especies de peces carnívoros debido a que estos animales carecen o presentan baja actividad de la enzima CSD, que junto a deficiencias de taurina en la dieta generan efectos negativos en la salud de estos organismos. En los primates, incluyendo a los humanos, la taurina es un nutriente condicionalmente esencial, especialmente en las etapas tempranas del desarrollo y ante deficiencias metabólicas para la síntesis de este nutriente (Huxtable, 1992; Hu et al., 2008; Chang et al., 2011).

En acuicultura, la investigación encaminada hacia el estudio de los requerimientos de taurina en la nutrición de los organismos cultivados es relativamente reciente y escasa. No obstante, los estudios realizados han demostrado que la síntesis de taurina presenta variaciones específicas en los peces y depende de las etapas de desarrollo en que se encuentren (Goto et al., 2001; Yokoyama et al., 2001; Kim et al., 2008; Pinto et al., 2010; Takagi et al., 2010). Así, mientras la trucha arcoíris *Oncorhynchus mykiss* posee suficientes mecanismos para llevar a cabo la síntesis de la taurina necesaria para cubrir sus requerimientos; el lenguado Japonés *Paralichthys olivaceus* posee niveles de síntesis de taurina muy bajos comparados con la trucha arcoíris. Por su parte, el jurel cola amarilla *Seriola quinqueradiata*, el atún aleta azul *Thunnus thynnus* y el barrilete *Katsuwonus pelamis* no poseen actividad de síntesis de taurina, por lo que para estas especies la fuente principal de taurina es la aportada por la alimentación (Yokoyama et al., 2001; Park et al., 2002).

En *S. quinqueradiata*, se ha comprobado la esencialidad de la taurina cuando estos organismos son alimentados con dietas a base de proteínas vegetales. Además, se ha

demostrado que el desarrollo del “síndrome de hígado verde” está relacionado con la carencia de taurina en la dieta de estos peces. Asimismo, se ha encontrado que la taurina es fundamental para el mantenimiento de la homeostasis de los eritrocitos, función hepática y prevención del desarrollo del “síndrome de hígado verde” en los juveniles de jurel cola amarilla. Los requerimientos de taurina en *S. quinqueradiata* pueden variar en función del nivel de sustitución de la harina de pescado por proteína vegetal, que pueden ser tan altos como  $45 \text{ mg g}^{-1}$  de dieta cuando los juveniles son alimentados con dietas en las que se ha sustituido el 100% de la harina de pescado por concentrado de proteína de soya (PS) (Watanabe et al., 1998; Matsunari et al., 2005; Takagi et al., 2005, 2008). Para la especie *Pagrus major* o besugo, se tiene reportado que el requerimiento de taurina es de 0.5% de la dieta utilizando caseína en sustitución de la harina de pescado (Matsunari et al., 2008). Por otra parte, estudios posteriores encontraron que al utilizar PS como fuente principal de proteínas en las dietas (sin taurina suplementada) produjeron menor crecimiento, disminución de la eficiencia alimenticia y desarrollo de hígado verde en los juveniles de *P. major*. En ese estudio, los autores reportan que la suplementación de taurina de 1 a 2% en la dieta aumentó el crecimiento en peso final de los peces en comparación con las dietas sin suplemento. Además encontraron que los peces alimentados con las dietas suplementadas con taurina no desarrollaron hígado verde (Goto et al., 2001; Takagi et al., 2006, 2010). En el lenguado *P. olivaceus* se tiene reportado que el requerimiento de taurina es de 1.4% de la dieta para lograr el óptimo crecimiento en peso y eficiencia alimenticia cuando los peces son alimentados con dietas a base de harina de pescado (Park et al., 2002). Se reporta además, que la suplementación del aminoácido cisteína no genera un aumento de la síntesis de

taurina en *P. olivaceus*. Aunque los autores de este estudio no indican que se haya desarrollado el “síndrome de hígado verde” en los peces alimentados con dietas sin taurina.

Diferentes investigaciones han demostrado que la suplementación de taurina en las dietas produce efectos positivos en el crecimiento de peces marinos (Sakaguchi et al., 1988; Lunger et al., 2007; Kim et al., 2007; Martínez et al., 2004; Takagi et al., 2008; Pinto et al., 2010; Lim et al., 2013). Por otra parte, si bien se han realizado importantes avances en el conocimiento de las causas del desarrollo del “síndrome de hígado verde” en los peces carnívoros y su relación con la deficiencia de taurina en las dietas; aún existen vacíos de información importantes acerca del papel que la taurina desempeña en el metabolismo intermediario de los peces, en particular en los animales donde la deficiencia de este nutriente ha mostrado tener impactos negativos en la estructura del tejido hepático y el crecimiento de los peces.

## **2.2 Carbohidratos en nutrición de peces carnívoros**

Diversos estudios se han realizado para determinar los niveles óptimos del uso de carbohidratos en dietas para peces carnívoros con la finalidad de proveer de una fuente de energía económica que permita el ahorro de la utilización de las proteínas de las dietas con este fin. Sin embargo, las investigaciones también han encontrado que la inclusión de carbohidratos en las dietas para animales carnívoros puede ser causa de alteraciones en las respuestas de los peces ante procesos de estrés y aumenta la susceptibilidad de éstos ante el desarrollo de enfermedades (Oliva Teles et al., 2012).

En especies como el bagre *Leiocassis longirostris* se tiene reportado que la inclusión de hasta 23% de carbohidratos en la dieta en sustitución parcial de los lípidos no genera repercusiones negativas en el crecimiento y eficiencia alimenticia en los organismos (Tan et al., 2007). Sin embargo, los autores reportan que mayores niveles de carbohidratos en las dietas (junto a la disminución de la disponibilidad de lípidos), los bagres desarrollan cambios histopatológicos del hígado que se caracterizan por necrosis del parénquima hepático, con morfología irregular de los hepatocitos y condensación del citoplasma. Respuestas similares han sido reportadas para la lobina *Micropterus salmoides* (Amoah et al., 2008; Goodwin et al., 2002). Para esta especie se ha reportado que incrementos del contenido de carbohidratos (>19%) y la exposición prolongada a estos impacta negativamente la morfología e histología hepática de los peces. Los investigadores han encontrado que los peces alimentados por periodos prolongados con altos niveles de carbohidratos presentaron hígados con tamaño y coloraciones anómalas (desde un marrón-gris pálido hasta manchas verdes). Los análisis histológicos revelaron además vacuolización de los hepatocitos con inflamación crónica y granulomas en el tejido hepático de los juveniles de *M. salmoides*. Por otra parte, estudios de Pérez-Jiménez et al. (2009a), reportaron que la especie *Dentex dentex* carece de la capacidad para metabolizar eficientemente altos niveles de carbohidratos en las dietas (28%). No obstante, en esta investigación los autores no encontraron que los carbohidratos generaran daño oxidativo en los lípidos y proteínas del tejido hepático de *D. dentex* (Pérez-Jiménez et al., 2009b).

Se han logrado importantes avances en el conocimiento de los efectos positivos y negativos del empleo de carbohidratos en las dietas para peces carnívoros. No obstante, en especies de recién introducción a la acuicultura como *T. macdonaldi* donde la problemática del desarrollo del “síndrome de hígado verde” observada tanto en organismos alimentados con dietas comerciales (no específicas para totoaba) y con dietas con moderados niveles de carbohidratos (20%), generan nuevas interrogantes acerca del papel que juegan nutrientes específicos como la taurina cuando se utilizan fuentes vegetales de proteínas, incluso ante el uso de carbohidratos en las dietas. Realizar investigación para encontrar respuesta a estas interrogantes es fundamental para comprender la naturaleza de estos organismos y con ello lograr el desarrollo exitoso de la acuicultura de esta especie.

### 3 JUSTIFICACIÓN

Actualmente, el cultivo de *T. macdonaldi* representa una oportunidad prometedora para diferentes sectores de producción acuícola en el noroeste de nuestro país. No obstante, lograr la acuicultura comercial de una especie carnívora depende en gran medida del desarrollo de dietas nutricionalmente balanceadas y económicamente viables, para lo cual es necesario tener conocimientos de los ingredientes potenciales a utilizar en las dietas y de la respuesta de salud y crecimiento de los organismos ante las combinaciones de estos ingredientes. A la fecha se han logrado diferentes avances para conocer los requerimientos de macronutrientes en juveniles de totoaba. Sin embargo, falta información acerca de las características metabólicas, fisiológicas y del sistema de defensa antioxidante en la especie. Información que es fundamental para determinar las repercusiones que pueden generar las variaciones en la composición de nutrientes específicos y/o del uso de ingredientes particulares sobre la condición de salud de los peces.

Por otra parte, la reciente problemática reportada en las granjas de producción de totoaba por la presencia del “síndrome de hígado verde” en los juveniles de totoaba, ha generado el apremio por resolver este problema. En la literatura se tiene reportado que la prevención de este padecimiento es posible con la suplementación de taurina en las dietas de los animales carnívoros afectados por la carencia de este nutriente cuando su alimentación es a base de proteínas de origen vegetal. Sin embargo, en totoaba también se ha observado el “síndrome de hígado verde” en juveniles sujetos a experimentación y alimentados con altos niveles de carbohidratos (cuya fuente de proteína era la de harina de pescado). En este

sentido, y considerando que la totoaba es un animal carnívoro cuya alimentación (en condiciones naturales) contiene cantidades abundantes de proteínas, taurina y bajas en carbohidratos, resulta fundamental realizar investigación respecto al papel que puede tener la sustitución de fuentes naturales de taurina y del uso de los carbohidratos respecto a la respuesta metabólica de la totoaba, así como su relación con el desarrollo del “síndrome de hígado verde”.

La información generada con estos estudios permitirá avanzar en el conocimiento de las características particulares de la especie, así como en la elucidación de soluciones para resolver el “síndrome de hígado verde”.

## **4 HIPÓTESIS**

Los juveniles de *Totoaba macdonaldi* alimentados con concentrado de proteína de soya y almidón gelatinizado (en sustitución de la harina y aceite de pescado) mostrarán variaciones significativas en la respuesta del metabolismo intermediario y de los diferentes procesos fisiológicos de esta especie, lo que repercutirá en la salud y el crecimiento de los organismos. La suplementación de taurina permitirá la recuperación de los procesos fisiológicos de la especie y permitirá un mayor aprovechamiento de los nutrientes desde las fuentes vegetales evaluadas.

## **5 OBJETIVO GENERAL**

Estudiar la respuesta del metabolismo hepático y fisiológico de juveniles de *Totoaba macdonaldi* ante la inclusión de proteína de soya y almidón en dietas suplementadas con taurina

### **5.1 Objetivos específicos**

- a) Evaluar la respuesta de crecimiento y retención de nutrientes de juveniles de totoaba ante la sustitución parcial de harina de pescado por proteína de soya y almidón de maíz suplementas con y sin taurina.

- b)** Evaluar la respuesta de la actividad de enzimas claves del metabolismo intermediario hepático de juveniles de totoaba ante la sustitución parcial de harina de pescado por proteína de soya y almidón de maíz suplementas con y sin taurina.
- c)** Determinar el efecto de la proteína de soya y almidón de maíz con y sin el suplemento taurina sobre la actividad de enzimas claves del sistema antioxidante y los niveles de peroxidación de lípidos en hígado de juveniles de totoaba.
- d)** Medir la respuesta hematológica y de bioquímica sanguínea de juveniles de totoaba ante la sustitución parcial de harina de pescado por proteína de soya y almidón de maíz suplementas con y sin taurina.
- e)** Evaluar los efectos de la inclusión de proteína de soya y del suplemente taurina en el desarrollo y prevención del “síndrome de hígado verde” en los juveniles de *Totoaba macdonaldi*.
- f)** Caracterizar los cambios histológicos del tejido hepático de juveniles de totoaba en relación a la composición de las dietas experimentales.

# CAPÍTULO II

## **EXPERIMENTO I: Efectos en juveniles de totoaba de dos niveles de concentrado de proteína de soya con y sin suplemento taurina en dietas.**

### **2.1 Diseño y elaboración de dietas experimentales**

Fueron elaboradas 4 dietas experimentales con 2 niveles de concentrado de proteína de soya (PS) en sustitución de la harina de pescado (30 y 60%) sin y con el suplemento de 1% de taurina (PS30, PS60, PS30T y PS60T, respectivamente). Se elaboró una dieta control (control) tomando como base los mejores resultados en estudios preliminares con totoaba (López et al., 2006; Solórzano et al., 2006; Vizcaíno Pérez, 2008; González Acevedo, 2011), la cual se preparó con 55% de proteína cruda (con harina de pescado como fuente principal de proteínas) y 10% de almidón de maíz gelatinizado. Las dietas experimentales fueron suplementadas con metionina hasta niveles similares a los proporcionados por la dieta control. El contenido de ingredientes se presenta en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Ingredientes de las dietas experimentales elaboradas con concentrado de proteína de soya sin y con el suplemento taurina.

Ingredientes (g kg <sup>-1</sup> materia seca)	Control	PS30	PS30T	PS60	PS60T
Harina de pescado <sup>1</sup>	627	430	430	235	235
Concentrado de proteína de soya <sup>2</sup>	0	195	195	389	389
Harina de krill	90	90	80	90	80
Gelatina	50	50	50	50	50
Almidón de maíz	100	100	100	100	100
Celulosa	42	24	23	6	5
Aceite de pescado	34	52	52	69	69
Mezcla de Minerales <sup>3</sup>	30	30	30	30	30
Mezcla de Vitaminas <sup>4</sup>	28	28	28	28	28
Metionina <sup>5</sup>	0.0	2.2	2.3	4.4	4.5
Taurina <sup>5</sup>	0.0	0.0	10.0	0.0	10.0

1 Harina de pescado comercial HighPro (proteína cruda: 71%; lípidos crudos: 12%; cenizas: 17%).

2 Concentrado de proteína de soya de SilverCup (proteína cruda: 71%; lípidos crudos: 2.6%; cenizas: 7%; Extracto libre de nitrógeno: 19.4%).

3 Mezcla de minerales (g kg<sup>-1</sup>): KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 320; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 250; Ca (H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, 200; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 150; C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>CaO<sub>6</sub>, 35; C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>FeO<sub>7</sub>, 25; NaCl, 10; ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 3.53; MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O, 1.62; CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O, 0.31; CoCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O, 0.01.

4 Mezcla de Vitaminas (mg kg<sup>-1</sup> dieta): inositol, 256.39; niacina, 51.28; riboflavina; p-aminoácido benzoico, 25.53; ácido pantoténico, 17.92; β-carotenos, 9.39; menadiona, 6.11; tiamina, 3.85; piridoxina, 3.06; ácido fólico, 0.96; biotina, 0.39; colecalfiferol, 25793IU; cianocobalamina, 5.59; cloruro de colina 20.0.

5 Aminoácidos de Pharmaceutical Co., LTD.

Para la elaboración de las diferentes dietas experimentales y dieta control, los ingredientes fueron homogenizados (excepto el aceite de pescado, el almidón, la taurina, metionina y gelatina) en una mezcladora Kitchen Aid. Posteriormente se adicionó el aceite de pescado y el almidón (previamente hidratado en agua caliente). La taurina y la metionina se mezclaron con la gelatina que fue posteriormente hidratada con agua caliente y adicionada a la mezcla de ingredientes. Finalmente, la masa obtenida de los ingredientes fue peletizada a

través de una boquilla con salidas de 3 mm. Los pellets formados fueron secados a 65 °C por 24 h en una estufa de convección. Las dietas secas fueron almacenadas en bolsas de plástico selladas herméticamente a -20 °C hasta su uso. La composición bioquímica proximal y de aminoácidos (AA) de las dietas (metodología descrita más adelante) es presenta en la Tabla 2 (ver apartado de métodos analíticos abajo).

## **2.2 Condiciones de cultivo**

Para el presente experimento, 480 ejemplares de *T. macdonaldi* fueron proporcionados por la Unidad de Biotecnología en Piscicultura (UBP) de la Facultad de Ciencias Marinas de la UABC. Asimismo, el desarrollo experimental del cultivo se realizó en la UBP.

Los 480 juveniles de totoaba (con peso inicial de  $7.5 \pm 0.5$  g) fueron distribuidos en grupos de 32 organismos por réplica (tanque), con 3 réplicas para cada tratamiento. La distribución de las réplicas fue de manera aleatoria simple.

**Tabla 2** Composición proximal y composición de aminoácidos esenciales (AAE) y no esenciales (AANE) de las dietas elaboradas con concentrado de proteína de soya sin y con el suplemento taurina.

Composición proximal, %	Control	PS30	PS30T	PS60	PS60T
Materia seca	94.1	94.2	94.3	93.9	93.3
Proteína cruda	55.3	54.5	55.5	56.1	54.8
Lípidos crudos	12.6	12.3	12.6	12.2	12.6
Almidón	10.5	9.80	10.1	10.9	9.60
Cenizas	15.7	14.1	13.5	13.1	13.1
ELN <sup>1</sup>	0.00	3.50	2.60	1.60	3.20
Energía total (kJ g <sup>-1</sup> dieta)	19.5	20.4	20.9	20.3	19.7
<b>Aminoácidos, g 100g<sup>-1</sup></b>					
<b>Materia Seca</b>					
<b>AAE</b>					
Histidina	1.7	1.8	1.5	1.7	1.4
Arginina	3.8	4.0	3.9	3.8	3.6
Treonina	2.4	2.5	2.3	2.6	2.5
Valina	2.7	3.0	2.9	3.2	2.8
Metionina	1.6	1.7	1.6	1.7	1.6
Lisina	3.9	3.9	3.6	3.9	3.5
Isoleucina	2.7	2.4	3.0	2.7	2.3
Leucina	4.5	4.4	4.4	4.8	4.4
Fenilalanina	2.4	2.7	2.8	3.1	2.8
<b>AANE</b>					
Ácido aspártico	3.7	4.1	4.6	5.0	4.2
Serina	2.5	2.8	2.9	3.1	2.9
Ácido glutámico	8.7	8.2	7.8	7.2	7.2
Glicina	4.5	3.8	3.3	3.6	3.8
Alanina	4.1	3.5	3.0	3.3	3.0
Prolina	3.6	3.3	3.3	3.8	3.4
Tirosina	1.9	2.0	2.1	2.3	2.2
<b>Condicionamente esencial</b>					
Taurina	0.5	0.2	1.3	0.3	1.5

<sup>1</sup> Extracto libre de nitrógeno = 100 – (humedad+proteína cruda + lípidos crudos + almidón + cenizas).

El bioensayo de alimentación fue realizado en un sistema de cultivo con 16 tanques de 70 L y una tasa de recambio de agua de  $1.5 \text{ L min}^{-1}$  dentro de cada tanque. Se utilizó agua de mar filtrada a través de un filtro de arena, seguido por 2 filtros de cartuchos de 20 y  $10 \mu\text{m}$ , con exposición final a una lámpara de luz UV. En el transcurso del experimento fueron monitoreados y controlados los parámetros de temperatura ( $23.5 \pm 0.5 \text{ }^\circ\text{C}$ ), oxígeno ( $6 \pm 0.5 \text{ mg L}^{-1}$ ) y fotoperiodo (12 h luz: 12 h oscuridad).

El período experimental tuvo una duración de 45 días. Los peces fueron alimentados hasta aparente saciedad, 3 veces al día (8:00, 13:00 y 18:00h), 7 días a la semana. Se tomó especial cuidado para evitar que en los tanques no quedara alimento sin consumir por los peces. Al final de la última alimentación de cada día fue registrando el consumo del alimento por día por tanque ( $\pm 0.01\text{g}$ ). Después de la primer y última alimentación del día (pasado un periodo de al menos 90 minutos) se procedía a realizar la limpieza individual de los tanques a través de sifoneo.

### **2.3 Biometrías de peso y obtención de muestras**

Previo a las biometrías de peso y longitud, los peces se sometieron a ayuno por 24 horas. Los peces fueron anestesiados con una mezcla de  $150 \text{ mg L}^{-1}$  de aceite de clavo (grado SIGMA) diluido en etanol al 70% a razón de 1:9. Posteriormente se realizaron las mediciones individuales de peso ( $\pm 0.01\text{g}$ ) y longitud ( $\pm 0.1\text{cm}$ ) al inicio y final del experimento. Al inicio del experimento, del lote donde se obtuvieron los organismos para experimentación, se tomaron 8 muestras de hígado y 4 muestras de pez entero para los análisis de composición proximal inicial.

Después de la biometría final, los peces fueron alimentados de manera regular por 3 días para disminuir los efectos del estrés por manejo. Posteriormente los peces fueron sometidos a 24 horas de ayuno. Para los análisis hematológicos, se colectaron muestras individuales de sangre de 8 peces por réplica (24 por tratamiento). La sangre se colectó a través de punción cardíaca con jeringas con 0.1 ml de solución EDTA ( $7.5 \text{ mg ml}^{-1}$  sangre) como anticoagulante. Las muestras se procesaron inmediatamente para los análisis de eritrocitos circulantes, hemoglobina y hematocrito. El resto de las muestras de sangre fue centrifugada a 12,000 rpm por 5 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  (Atencio-García et al., 2007). Se colectó el plasma y se almacenó en refrigeración para los análisis de concentración de proteínas totales, albúmina y glucosa. Posterior a la colecta de sangre, los peces utilizados para hematología fueron sacrificados con sobredosis de anestesia de triclaína (MS-222) para los análisis de composición proximal en hígado y pez entero (4 peces para hígado y 4 para pez entero por cada réplica).

Los peces restantes fueron alimentados de manera regular por 3 días. Al cuarto día y después de 6 h de la primera alimentación, 6 peces por réplica fueron anestesiados por inmersión en 1:1000 (v/v) de solución de aceite de clavo y sacrificados con un corte rápido de la cabeza. El hígado de cada organismo fue rápidamente colectado en una cama de hielo frío, congelado de inmediato en hielo seco y almacenado a  $-80^{\circ}\text{C}$  para posteriores análisis de glucógeno, enzimas del metabolismo intermediario y sistema antioxidante (2 peces para glucógeno y 4 para las enzimas del metabolismo intermediario y sistema antioxidante).

Finalmente, 3 peces más por réplica fueron sacrificados con una sobredosis de anestesia. El hígado de cada pez fue extraído y sumergido en la solución fijadora Davidson (Anexo 1) a una razón de 1:10 partes de muestra: solución, respectivamente, durante 24 horas. Posteriormente las muestras fueron deshidratadas e incluidas en parafina (Anexo 1) para su posterior procesamiento y análisis histopatológico (descritos más adelante).

## **2.4 Parámetros de crecimiento, eficiencia alimenticia y retención de nutrientes**

A continuación se describen los cálculos para cada uno de los parámetros utilizados en este trabajo:

### Supervivencia:

Supervivencia (%) = (Número de peces al final / Número de peces al inicio) \* 100.

### Peso ganado:

Peso ganado ( $g\ kg\ ABW^{-1}\ day^{-1}$ ) =  $[(PF-PI) \times 1000] / ABW / \text{días}$

ABW (promedio del peso corporal) =  $(PF+PI) / 2$

Donde PF es el peso final, PI es el peso inicial (ambos en gramos).

### Índice de crecimiento diario (ICD):

ICD =  $((PF^{1/3} - PI^{1/3}) / \text{días}) \times 100$

### Índice Hepatosomático (IHS):

IHS (%) = (Peso hígado / peso del pez) × 100

Ingestión diaria de alimento (IDA):

$$IDA \text{ (g kg ABW}^{-1} \text{ día}^{-1}) = (ID * 1000) / ABW / \text{días}$$

Donde ID es el promedio de ingesta de alimento (materia seca) (g pez<sup>-1</sup> día<sup>-1</sup>); ABW es el promedio del peso corporal (descrito anteriormente).

Eficiencia Alimenticia (EA):

$$EA = (\text{Peso húmedo ganado} / \text{alimento seco consumida}).$$

Eficiencia Proteica (EP):

$$EP = (\text{Peso húmedo ganado} / \text{peso seco de proteína consumida}).$$

**Retención de nutrientes**

La retención de nutrientes (nitrógeno, lípidos y energía) fueron realizados con base a los resultados de los análisis de composición corporal de pez entero. Los cálculos para determinar la retención de nitrógeno, lípidos y energía fueron realizados de acuerdo con Cho y Kaushik, (1990):

Retención de nitrógeno

$$NI \text{ (g kg ABW}^{-1} \text{ día}^{-1}) = [(((AI \times PC) / 100)) / 6.25] / ((PI + PF) / 2)$$

$$N_R \text{ (g kg ABW}^{-1} \text{ día}^{-1}) = [(PF \times PFC - PI \times PIC) / 6.25 / ((PI + PF) / 2)] / \text{días}$$

$$N_R \text{ (\% NI)} = (N_R / NI) \times 100$$

Donde NI es el nitrógeno ingerido desde la dieta; ABW es el peso promedio corporal; AI es el alimento ingerido (materia seca de la dieta) por pez por día; PC es la proteína cruda (materia seca) de la dieta; PF y PI son el peso final y peso inicial corporal del pez.  $N_R$  ( $\text{g kg ABW}^{-1} \text{ día}^{-1}$ ) es la cantidad de nitrógeno retenido desde la dieta; PFC y PIC son el contenido de proteína final e inicial del pez entero.

### Retención de lípidos

$$LI (\text{g kg ABW}^{-1} \text{ día}^{-1}) = [(AI \times LC) / 100] / ((PI + PF) / 2)$$

$$L_R (\text{g kg ABW}^{-1} \text{ día}^{-1}) = [(PF \times LFC - PI \times LIC) / ((PI + PF) / 2)] / \text{días}$$

$$L_R (\% LI) = (L_R / LI) \times 100$$

Donde LI es el contenido de lípidos ingeridos desde la dieta; ABW es el peso promedio corporal; AI es el alimento ingerido (materia seca de la dieta) por pez por día; LC es el contenido de lípidos crudos (materia seca) de la dieta; PF y PI son el peso final y peso inicial corporal del pez.  $L_R$  ( $\text{g kg ABW}^{-1} \text{ día}^{-1}$ ) es la cantidad de lípidos retenidos desde la dieta; LFC y LIC son el contenido de lípidos final e inicial del pez entero.

### Retención de energía

$$EI (\text{g kg ABW}^{-1} \text{ día}^{-1}) = [(AI \times EC) / 100] / ((PI + PF) / 2)$$

$$E_R (\text{g kg ABW}^{-1} \text{ día}^{-1}) = [(PF \times EFC - PI \times EIC) / ((PI + PF) / 2)] / \text{días}$$

$$E_R (\% EI) = (E_R / EI) \times 100$$

Donde EI es el contenido de energía ingerida desde la dieta; ABW es el peso promedio corporal; AI es el alimento ingerido (materia seca de la dieta) por pez por día; EC es el contenido de energía (materia seca) de la dieta; PF y PI son el peso final y peso inicial corporal del pez.  $E_R$  ( $\text{g kg ABW}^{-1} \text{ día}^{-1}$ ) es la cantidad de energía retenida desde la dieta; EFC y EIC son el contenido de energía final e inicial del pez entero.

## **2.5 Métodos analíticos**

### ***2.5.1 Análisis de composición proximal***

La composición proximal de dietas y muestras de tejido se realizaron de acuerdo a las especificaciones de la AOAC (2000) para humedad, cenizas y proteína cruda. El método modificado de Folch et al. (1957) fue utilizado para cuantificar lípidos totales. El contenido de almidón se obtuvo de acuerdo a la metodología modificada de Thivend et al. (1972). El contenido de glucógeno en hígado fue determinado con la metodología de Plummer (1987), para lo cual el glucógeno fue hidrolizado hasta glucosa y está se determinó con un kit comercial (*Pointe Scientific, INC*). Las descripciones de las metodologías utilizadas se presentan en el anexo 2. Para el análisis de aminoácidos de las dietas, las muestras fueron hidrolizadas en HCl 6N a 112 °C bajo una atmosfera de nitrógeno por 23 h. posteriormente, las muestras fueron derivatizadas de acuerdo con el método Pico-tag descrito por Cohen et al. (1989) y realizado por cromatografía de intercambio de gradientes (muestreador automático Waters modelo 717 plus; bomba binaria Waters modelo 1525; detector dual de absorbancias Waters modelo 2487). El contenido calórico total de las muestras secas se

determinó por combustión directa en una bomba calorimétrica adiabática (PARR model 1261).

### ***2.5.2 Análisis de enzimas del metabolismo intermediario y del sistema de defensa antioxidante***

Antes de realizar los análisis enzimáticos, las muestras de hígado se homogenizaron en grupos de 2 peces (6 grupos por tratamiento) en proporción 1:4 de muestra de hígado: tampón Tris-HCl 100 mM pH 7.8, con Tritón X-100 al 0.1% y EDTA 0.1 mM. Todo el proceso de homogeneización se realizó en frío utilizando baños de hielo molido. El homogenado fue centrifugado a 30,000 g a 4 °C durante 30 minutos y el sobrenadante se recuperó y almacenó en viales de plástico guardados a -80 °C hasta el momento de su análisis (Pérez-Jiménez et al., 2009a).

Para determinar la actividad de las diferentes enzimas, fue utilizado un lector de microplacas PowerWaveX, de Bio-Tek Instruments (Inc., USA) donde fueron monitoreados los cambios de absorbancia. Todas las enzimas (metabolismo intermediario y del sistema de defensa antioxidante) fueron analizadas a 37°C en un volumen final de la “mezcla de reacción” de 200 µl. Para esta tesis se midió la actividad de las siguientes enzimas clave del metabolismo intermediario: aspartato aminotransferasa (ASAT, E.C. 2.6.1.1), alanina aminotransferasa (ALAT, E.C. 2.6.1.2), glutamato deshidrogenasa (GDH, E.C. 1.4.1.2),

hexoquinasa (HK, E.C. 2.7.1.1), glucoquinasa (GK; E.C. 2.7.1.2), fructosa 1-6 bifosfatasa (FBPasa, E.C. 3.1.3.11), glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PD, E.C. 1.1.1.49), enzimas málicas (EM, E.C. 1.1.1.40) y ácido graso sintetasas (FAS; EC 2.3.1.38). Asimismo, se midieron las actividades de las siguientes enzimas del sistema de defensa antioxidante: superóxido dismutasa (SOD; EC 1.15.1.1), glutathion peroxidasa (GPX, E.C. EC 1.11.1.9), glutathion reductasa (GR, E.C. 1.6.4.2) y catalasa (CAT, E.C. 1.11.1.6).

Las condiciones específicas, para cada una de las enzimas del metabolismo intermediario y del sistema de defensa antioxidante se describen en el anexo 3.

### ***2.5.3 Indicador de daño oxidativo: peroxidación de lípidos***

En el presente estudio, se utilizó como índice de daño oxidativo hepático la concentración de malondialdehído (MDA) en el tejido, ya que el MDA es uno de los productos finales generados tras la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados causada por la acción de los radicales libres. La concentración de MDA en el tejido hepático fue determinada con el método de Buege y Aust (1978) descrito a continuación.

Fue preparada una solución con 15% (w/v) de ácido tricloroacético (TCA), 80% (v/v) ácido hidroclicórico (HCl) 0.25 N, 0.375% (w/v) ácido tiobarbiturico (TBA) y 0.01% (w/v) hidroxitolueno butilado (BHT). Para la elaboración de esta solución y de la solución MDA-bis 0.1mM, utilizada para realizar la curva de calibración, se utilizó agua desionizada miliQ.

Las muestras utilizadas en este análisis fueron los homogenizados que se prepararon previamente (ver sección 2.5.4). Se mezcló una alícuota (50  $\mu\text{L}$ ) de la muestra antes mencionada con 250  $\mu\text{L}$  de la solución TCA-HCl-TBA-BHT (arriba descrito). El homogenizado fue calentado a 100°C por 15 min. Después de enfriarse a temperatura ambiente fueron centrifugados a 1500 g por 10 min. El sobrenadante colectado fue medido a 535 nm de absorbancia frente a un blanco de reactivos.

Los niveles de peroxidación lipídica, expresados como nmol de MDA  $\text{g}^{-1}$  de tejido, se calcularon a través de los valores densidad óptica de las muestras respecto a la curva de calibración realizada.

#### ***2.5.4 Análisis para determinar el “síndrome de hígado verde”***

Se consideró como “síndrome de hígado verde” la presencia de manchas de coloración verde en el hígado de los peces, independientemente del área e intensidad afectada (Takagi et al., 2005). Para el presente análisis fueron realizadas observaciones anatómicas individuales del hígado de 3 peces por réplica (9 por tratamiento) en los se determinó para cada individuo la presencia o ausencia del “síndrome de hígado verde”.

#### ***2.5.5 Análisis histopatológico***

Para los análisis histopatológicos del hígado de totoaba, se utilizaron muestras de tejido hepático teñidas a través del método de hematoxilina-eosina (H-E). Para lo cual, las muestras previamente incluidas en parafina, fueron sometidas a cortes de 5  $\mu\text{m}$  en un micrótopo (Leica-RM 2125 RT)). Los cortes fueron colocados en un baño de flotación con agua destilada a 45 °C para extender el tejido y depositarlo en un portaobjetos. Posteriormente, los cortes fueron colocados en una estufa a 60° para ser desparafinados, teñidos con H-E y fijadas permanentemente en resina (Anexo 1.1). Se utilizó un microscopio óptico BH-2 Olympus (Japón) para los análisis histopatológicos. Con una cámara digital PAXcam2 y el software Pax-it (versión 6, Mis Inc., USA) se tomaron fotografías de los tejidos.

Las alteraciones histopatológicas se evaluaron semi-cuantitativamente utilizando los protocolos descritos por Bernet et al. (1999) y modificado por Agamy (2012). La evaluación microscópica se llevó a cabo para calcular el porcentaje de las zonas que presentan una alteración específica. Se asignaron valores de 0-3 en función del porcentaje de cada alteración. Cada alteración hepática se clasificó dentro de uno de los siguientes patrones: perturbación circulatoria, vacuolización, cambios nucleares y agregados inflamatorios. A cada patrón de alteración se le asignó un factor de importancia (FI) como medida de las alteraciones específicas que pueden afectar a la salud del pez, en el que altos valores del FI representan un mayor potencial de impacto en la salud de los peces (Bernet et al., 1999). En el Anexo 1.2 se describen las características de asignación del FI y de los cálculos para determinar el índice del patrón de cada alteración ( $I_{PA}$ ) y del índice de alteración del órgano hepático ( $I_{org}$ ).

### **2.5.6 Análisis hematológico y bioquímica sanguínea**

La cuenta total de eritrocitos circulantes (EC,  $1 \times 10^6$  cel  $\mu\text{L}^{-1}$ ) se realizó mediante la dilución de 20  $\mu\text{L}$  de sangre en solución de Dacie para peces (Anexo 4) a razón de 1:50, muestra: solución, respectivamente (Blaxhall y Daisley, 1973; De Pedro et al., 2004). Después de homogenizar las muestras, se tomaron 10  $\mu\text{L}$  para colocarlos en la cámara Neubauer. Para el posterior conteo de los eritrocitos, fueron tomadas fotografías de la cámara Neubauer a través de una cámara digital PAXcam2 (Pax-it versión 6, Mis Inc., USA) software conectada un microscopio óptico BH-2 Olympus (Japón).

El hematocrito (HT, %) fue determinado por el método de microhematocrito, para lo cual las muestras de sangre fueron centrifugadas 10,000 rpm por 5 min y se utilizó el lector para tubos capilares de hematocrito *Spiracrit Lancer*. La concentración de hemoglobina (HB,  $\text{g dl}^{-1}$ ) se determinó utilizando kits de *Pointe Scientific, INC*.

Los datos obtenidos de la cuenta total de EC, concentración de HB y HT fueron utilizados para calcular los índices de Wintrobe como se describe a continuación:

$$\text{Media del volumen celular (eritrocitos) (MVC, fL)} = \text{HT} * 10^7 / \text{EC}$$

$$\text{Media de hemoglobina celular (MHC, pg)} = \text{HB} * 10^7 / \text{RBC}$$

$$\text{Media de la concentración de hemoglobina corpuscular (MCHC, g dl}^{-1}\text{)} = \text{HB} * 100 / \text{HT}.$$

La concentración de proteínas totales (PT, g dl<sup>-1</sup>), albúmina (AL, g dl<sup>-1</sup>) y glucosa (GLU, mg dl<sup>-1</sup>) fueron medidos a través de kits comerciales de *Pointe Scientific, INC*.

## **2.6 Análisis estadístico**

El diseño experimental fue aleatorio simple. Los resultados son reportados como promedio  $\pm$  error estándar (del grupo de datos). Los análisis de normalidad y homocedasticidad de los grupos de datos fueron realizados con las pruebas de Kolmogorov-Smirnov y Levene, respectivamente. Para determinar diferencias entre los resultados obtenidos en cada tratamiento experimental en comparación con el tratamiento control, fue realizado el análisis de comparaciones múltiples de Dunnet de ANOVA de una vía. Para determinar los efectos independientes del nivel de concentrado de proteína de soya (PS), taurina y de su interacción, se realizó un ANOVA de dos vías. Los resultados que presentaron 2 o más datos por réplica (tanque), fueron anidados dentro del tratamiento correspondiente. Para determinar la significancia de la presencia/ausencia de hígado verde, así como de diferencias en los cambios histopatológicos entre tratamientos, se realizó el análisis estadístico No-paramétrico de Mann-Whitney U para determinar diferencias en comparaciones por pares de tratamientos. Para los diferentes análisis estadísticos se consideró como efectos o diferencias significativas cuando  $P < 0.05$ . Los análisis estadísticos fueron realizados a través del programa SPSS versión 20.0 para Windows (SPSS, Inc.).

## 2.7 Resultados

### 2.7.1 Crecimiento y eficiencia alimenticia

Con un peso promedio inicial de  $7.5 \pm 0.05$ g para los diferentes tratamientos; al final del experimento, los juveniles de totoaba alimentados con la dieta PS30T presentaron los valores de peso final más altos (46.3 g, peso promedio), sin embargo, estos no fueron significativos con respecto al control (43.1 g, peso promedio) (Figura 5).

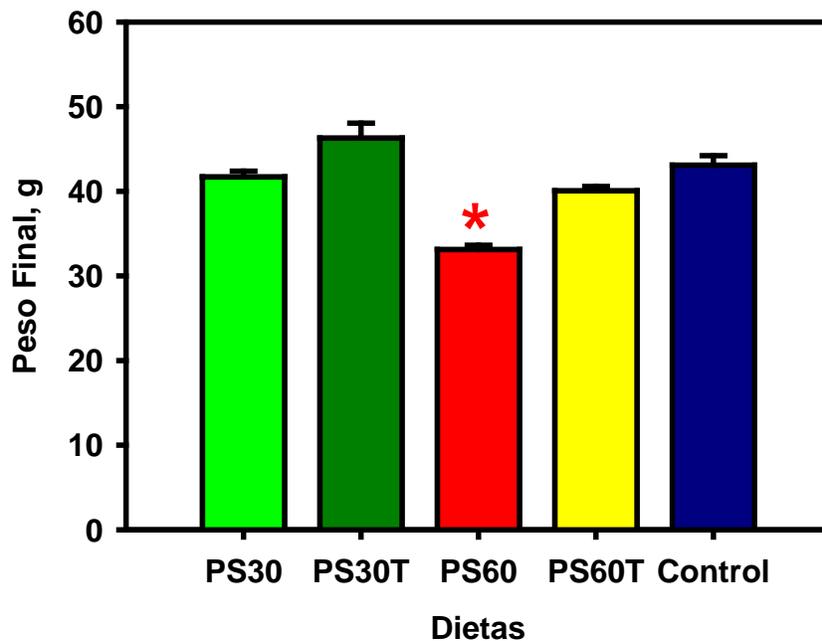


Figura 5. Peso final (promedio  $\pm$ error estándar,  $n=96$ ) de juveniles de *Totoaba macdonaldi* alimentados con concentrado de proteína de soya sin y con el suplemento taurina. Asteriscos sobre las columnas indican diferencias significativas, donde  $\text{Control} > *$ , cuando  $P < 0.05$ .

Los valores de peso final, peso ganado e ICD de las dietas PS30, PS30T y PS60T no resultaron significativamente diferentes al control (Figura 5, Tabla 3). Por su parte, la dieta PS60 mostró los valores más bajos de peso final, peso ganado e ICD (33.1, 27.9 y 2.78,

respectivamente) en comparación con el control (43.1, 31.1 y 3.42, respectivamente). La ANOVA de 2 vías indicó que el incremento de 30 a 60% de PS en las dietas provocó disminución en el peso ganado e ICD de totoaba (Tabla 3); mientras que la suplementación de taurina indujo a la recuperación de estos parámetros.

**Tabla 3** Crecimiento en peso y eficiencia alimenticia de juveniles de *Totoaba macdonaldi* alimentados con concentrado de proteína de soya sin y con el suplemento de taurina.

Dietas	Control	PS30	PS30T	PS60	PS60T	SEM <sup>1</sup>
Peso ganado, g kg <sup>-1</sup> ABW <sup>-1</sup> day <sup>-1</sup>	31.1	30.8	31.8	27.9†	30.1	0.08
ICD	3.42	3.34	3.59	2.78†	3.22	0.02
IDA, g kg <sup>-1</sup> ABW <sup>-1</sup> day <sup>-1</sup>	23.1	20.8†	20.8†	20.1†	20.5†	0.34
EA	1.33	1.49‡	1.52‡	1.35	1.49‡	0.03
EP	2.48	2.81‡	2.81‡	2.47	2.80‡	0.05
Sobrevivencia	100	99.0	100	99.0	97.9	1.20

**ANOVA de 2 vías (valores de P en tabla)**

	Fuentes de variación		
	PS <sup>2</sup>	Taurina	Interacción
Peso ganado	<0.01	<0.01	0.06
ICD	<0.01	<0.01	0.15
IDA	0.40	0.74	0.76
EA	0.15	0.14	0.35
EP	0.12	0.12	0.12

1 SEM: error estándar. ICD: índice de crecimiento diario; IDA: ingesta diaria de alimentos; EA: eficiencia alimenticia; EP: eficiencia proteica. Valores en el mismo renglón con símbolos significan diferencias significativas entre las dietas experimentales (PS30, PS30T, PS60, PS60T) y la dieta control (Control), donde ‡>Control>† cuando  $P < 0.05$ . En la parte inferior de la tabla se muestran los resultados del ANOVA de 2 vías donde el efecto significativo se presenta cuando  $P < 0.05$ . 2 Concentrado de proteína de soya.

Por otra parte, la IDA fue significativamente menor para las dietas elaboradas con PS (20.6, promedio) en comparación con el control (23.1) (Tabla 3). No obstante, los peces alimentados con PS30, PS30T y PS60T mostraron los mayores valores en EA y EP ( $\geq 1.49$  y  $\geq 1.80$ , respectivamente) en comparación al control (1.33 y 2.48, respectivamente). Al final de

los 45 días de alimentación, las diferentes dietas experimentales no produjeron efectos significativos en la supervivencia de los juveniles de totoaba, la cual mostró valores mayores al 98% para los diferentes tratamientos (Tabla 3).

### ***2.7.2 Retención de nutrientes y composición proximal de pez entero y músculo***

La ingesta de nitrógeno, lípidos y energía total fue menor en las dietas PS30, PS30T, PS60 y PS60T en comparación con el control (Tabla 4). Sin embargo, los peces alimentados con la dieta PS30T mostraron los valores significativamente más altos en retención de nitrógeno (37.8) y energía en comparación con el tratamiento control (31.8). Por su parte, el análisis de ANOVA de 2 vías indicó que el incremento en el nivel de PS indujo a una menor retención de nitrógeno en los juveniles de totoaba.

**Tabla 4.** Retención de nutrientes de juveniles de *Totoaba macdonaldi* alimentados con concentrado de proteína de soya sin y con el suplemento taurina.

Dietas	Control	PS30	PS30T	PS60	PS60T	SEM <sup>1</sup>
<i>Nitrógeno</i>						
Ingesta (g kg ABW <sup>-1</sup> día <sup>-1</sup> )	2.42	2.14†	2.18†	2.14†	2.13†	0.03
Retención (g kg ABW <sup>-1</sup> día <sup>-1</sup> )	0.77	0.76	0.83	0.67	0.73	0.02
Retención (%)	31.8	35.5	37.8‡	31.3	34.4	0.89
<i>Lípidos</i>						
Ingesta (g kg ABW <sup>-1</sup> día <sup>-1</sup> ) <sup>1</sup>	3.46	3.02†	3.10†	2.91†	3.07†	0.056
Retención (g kg ABW <sup>-1</sup> día <sup>-1</sup> )	0.67	0.64	0.68	0.62	0.66	0.025
Retención (%)	19.4	21.3	21.9	21.4	21.4	0.726
<i>Energía</i>						
Ingesta (kJ kg ABW <sup>-1</sup> día <sup>-1</sup> ) <sup>1</sup>	5.46	5.01†	4.98†	4.83†	4.77†	0.08
Retención (kJ kg ABW <sup>-1</sup> día <sup>-1</sup> )	1.14	1.35	1.45‡	1.24	1.31	0.05
Retención (%)	20.9	27.0	29.3‡	25.6	27.7	1.13

**ANOVA de 2 vías (valores de P en tabla)**

	Fuentes de variación		
	PS <sup>2</sup>	Taurina	interacción
Ingesta Nitrógeno	0.58	0.81	0.63
Retención (g kg ABW <sup>-1</sup> día <sup>-1</sup> )	<b>0.03</b>	0.11	0.98
Retención (%)	<b>0.04</b>	0.18	0.88
Ingesta lípidos	0.37	0.17	0.60
Retención(g kg ABW <sup>-1</sup> día <sup>-1</sup> )	0.78	0.58	0.97
Retención (%)	0.92	0.88	0.89
Ingesta Energía	0.15	0.70	0.89
Retención (g kg ABW <sup>-1</sup> día <sup>-1</sup> )	0.10	0.25	0.81
Retención (%)	0.48	0.29	0.98

1 SEM: error estándar. Valores en el mismo renglón con símbolos significan diferencias significativas entre las dietas experimentales (PS30, PS30T, PS60, PS60T) y la dieta control (Control), donde ‡>Control>† cuando P < 0.05. En la parte inferior de la tabla se muestran los resultados del ANOVA de 2 vías donde el efecto significativo se presenta cuando P < 0.05. 2 Concentrado de proteína de soya.

Los resultados de los análisis de composición proximal del cuerpo entero de juveniles de totoaba muestran que no hubo diferencias significativas entre los tratamientos experimentales y el control (Tabla 5).

**Tabla 5.** Composición corporal (peso húmedo) y muscular (peso húmedo) de juveniles de *Totoaba macdonaldi* alimentados con concentrado de proteína de soya sin y con el suplemento taurina.

<i>Composición proximal, %</i>	Control	PS30	PS30T	PS60	PS60T	SEM <sup>1</sup>
<b>Pez entero</b>						
Humedad	80.4	80.4	79.4	80.9	80.6	0.30
Proteína	14.7	14.7	15.4	14.1	14.3	0.24
Lípidos	2.07	2.01	2.05	2.10	2.09	0.07
Cenizas	2.72	2.64	2.76	2.58	2.56	0.05
<b>Músculo</b>						
Humedad	77.6	77.7	77.0	78.3	77.4	1.50
Proteína	20.1	20.0	20.8	19.6	20.5	0.14
Lípidos	0.79	0.93	0.88	0.88	0.89	0.04
Cenizas	1.53	1.38	1.37	1.25†	1.20†	0.05

**ANOVA de 2 vías (valores de P en tabla)**

	Fuentes de variación		
	PS <sup>2</sup>	Taurina	Interacción
<b>Pez entero</b>			
Humedad	0.57	0.08	0.74
Proteína	0.20	0.43	0.70
Lípidos	0.74	0.94	0.89
Cenizas	0.35	0.73	0.63
<b>Músculo</b>			
Humedad	0.14	<b>0.03</b>	0.88
Proteína	0.20	<b>&lt;0.01</b>	0.88
Lípidos	0.87	0.87	0.75
Cenizas	0.10	0.70	0.79

1 SEM: error estándar. Valores en el mismo renglón con símbolos significan diferencias significativas entre las dietas experimentales (PS30, PS30T, PS60, PS60T) y la dieta control (Control), donde †>Control>† cuando  $P < 0.05$ . En la parte inferior de la tabla se muestran los resultados del ANOVA de 2 vías donde el efecto significativo se presenta cuando  $P < 0.05$ . 2 Concentrado de proteína de soya.

Los resultados de los análisis de composición proximal del músculo de juveniles de totoaba muestran que el contenido de cenizas disminuyó significativamente en los tratamientos PS60 y PS60T con respecto al control (Tabla 5), sin embargo el contenido de humedad, proteínas y lípidos no resultó afectado por la composición de las dietas experimentales en comparación al control. Por otra parte, los resultados de ANOVA de 2 vías

indican que la suplementación de taurina indujo a una tendencia de disminución del contenido de humedad y aumento de las proteínas.

### ***2.7.3 Composición del hígado e índice hepatosomático (IHS)***

En el presente estudio, se encontró que el uso de PS en las dietas provocó alteraciones en la composición proximal de humedad, proteínas (excepto PS30T), lípidos y glucógeno del hígado de los juveniles de totoaba (Tabla 6). Los resultados muestran que, por un lado, la inclusión de PS provocó la disminución del contenido de proteínas y humedad del hígado con aumento en el contenido de lípidos y glucógeno fueron aumentados. Por otro lado, se observó que el aumento del nivel de PS (de 30 a 60% e independiente de taurina) indujo una tendencia significativa de disminución en la capacidad de almacenamiento de glucógeno en totoaba.

**Tabla 6.** Composición del hígado (% peso húmedo) e índice hepatosomático (IHS) de juveniles de *Totoaba macdonaldi* alimentados con concentrado de proteína de soya sin y con el suplemento taurina.

Dietas	Control	PS30	PS30T	PS60	PS60T	SEM <sup>1</sup>
<i>Composición hígado</i>						
Humedad	79.5	71.3†	72.2†	71.7†	71.3†	0.96
Proteína	7.71	5.65†	6.62	4.90†	5.78†	0.38
Lípidos	9.53	15.9‡	14.6‡	17.1‡	16.6‡	0.84
Glucógeno	2.28	6.23‡	5.53‡	4.85‡	4.95‡	0.39
Cenizas	1.30	1.14	1.17	1.21	1.17	0.03
IHS*	1.14	1.39	1.33	1.37	1.28	0.03

**ANOVA de 2 vías (valores de P en tabla)**

	Fuentes de variación		
	PS <sup>2</sup>	Taurina	Interacción
Humedad	0.87	0.86	0.66
Proteína	0.37	0.31	0.96
Lípidos	0.21	0.44	0.73
Glucógeno	<b>0.01</b>	0.34	0.19
Cenizas	0.56	0.96	0.56
IHS	0.52	0.20	0.72

1 SEM: error estándar. Valores en el mismo renglón con símbolos significan diferencias significativas entre las dietas experimentales (PS30, PS30T, PS60, PS60T) y la dieta control (Control), donde ‡>Control>† cuando  $P < 0.05$ . En la parte inferior de la tabla se muestran los resultados del ANOVA de 2 vías donde el efecto significativo se presenta cuando  $P < 0.05$ .

\*Índice hepatosomático: (peso húmedo del hígado / peso total del pez entero) x 100.

2 Concentrado de proteína de soya.

La composición de las diferentes dietas experimentales no provocó diferencias significativas en el IHS de los juveniles de totoaba en comparación al IHS observado en el tratamiento control, cuyos valores promedio oscilaron entre 1.14 y 1.39 (Tabla 6).

#### 2.7.4 Actividad de enzimas relacionadas con el metabolismo intermediario

En general, la actividad de la mayoría de los enzimas clave en las principales rutas del metabolismo intermediario mostró ser influenciada por la composición de las dietas experimentales (Tabla 7).

**Tabla 7.** Actividad específica de enzimas relacionadas con el metabolismo intermediario hepático de juveniles de *Totoaba macdonaldi* alimentados con concentrado de proteína de soya sin y con el suplemento taurina. Los datos se expresan como  $\text{mU mg}^{-1}$  proteína.

Dietas	Control	PS30	PS30T	PS60	PS60T	SEM <sup>1</sup>
<i>Catabolismo de aminoácidos</i>						
Aspartato aminotransferasa (ALAT)	1747	984†	1991	1179†	1805	86
Alanina aminotransferasa (ASAT)	417	241†	441	238†	401	18
Glutamato deshidrogenasa (GDH)	414	277†	424	233†	370	16
<i>Glucólisis</i>						
Hexoquinasa (HK)	20.2	22.4	25.9‡	17.0	19.3	0.73
Glucoquinasa (GK)	3.50	2.74	2.34	4.06	5.01	0.43
<i>Gluconeogénesis</i>						
Fructosa-1,6-bisfosfatasa (FBPasa)	77.2	51.8†	73.7	49.3†	61.8†	3.2
<i>Lipogénesis</i>						
Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD)	72.3	56.8	82.1	37.5†	80.1	4.02
Enzimas málicas (EM)	17.2	18.3	21.7‡	17.3	18.0	0.64
Ácido graso sintetasa (FAS)	1.34	1.51	1.39	1.62	1.58	0.07

**ANOVA de 2 vías (valores de P en tabla)**

	Fuentes de variación		
	PS <sup>2</sup>	Taurina	Interacción
ALAT	0.97	<0.01	0.17
ASAT	0.23	<0.01	0.29
GDH	0.01	<0.01	0.74
HK	<0.01	0.01	0.46
GK	0.02	0.70	0.36
FBPasa	0.01	<0.01	0.04
G6PD	0.95	<0.01	0.16
EM	0.18	0.24	0.44
FAS	0.31	0.56	0.76

1 SEM: error estándar. Valores en el mismo renglón con símbolos significan diferencias significativas entre las dietas experimentales (PS30, PS30T, PS60, PS60T) y la dieta control (Control), donde ‡>Control>† cuando  $P < 0.05$ . En la parte inferior de la tabla se muestran los resultados del ANOVA de 2 vías donde el efecto significativo se presenta cuando  $P < 0.05$ . 2 Concentrado de proteína de soya.

Los tratamientos PS30 y PS60 presentaron los valores de actividad de aspartato aminotransferasa (ASAT), alanina aminotransferasa (ALAT) y glutamato deshidrogenasa (GDH) significativamente menores (1082, 240 y 255 mU mg<sup>-1</sup> proteína, promedios para ASAT, ALAT y GDH, respectivamente) en comparación con el control (1747, 417 y 414 mU mg<sup>-1</sup> proteína, para ASAT, ALAT y GDH, respectivamente). El análisis de ANOVA de 2 vías muestra que la suplementación de taurina (independiente del nivel de PS) produjo efectos significativos en la actividad de las diferentes enzimas del catabolismo de aminoácidos. Los resultados también muestran que la actividad de GDH fue influenciada por la variación del nivel de PS en las dietas (independiente de taurina).

Los peces alimentados con la dieta PS30T presentaron los mayores valores (25.9 mU mg<sup>-1</sup> proteína) de actividad de hexoquinasa (HK) en comparación al control (20.2 mU mg<sup>-1</sup> proteína) (Tabla 7). Los resultados del análisis de ANOVA de 2 vías indicaron que el incremento en el nivel de PS en las dietas (independiente de taurina) tuvo un efecto de disminución de la actividad de HK; mientras que el factor taurina indujo al aumento de la actividad de esta enzima. Respecto a la actividad de la glucoquinasa (GK), los resultados muestran que no hubo diferencias en las dietas experimentales y el control. Sin embargo, el análisis de ANOVA de 2 vías indicó que el aumento en el nivel de PS indujo a una tendencia de aumento de la actividad de GK.

La actividad de la enzima fructosa-1,6-bisfosfatasa (FBPasa) resultó similar entre los tratamientos PS30T (73.7 mU mg<sup>-1</sup> proteína) y control (77.2 mU mg<sup>-1</sup> proteína) con los valores más altos con respecto a los tratamientos PS30, PS60 y PS60T que mostraron los menores

valores de FBPasa ( $\leq 61.8$  mU  $\text{mg}^{-1}$  proteína, valor promedio), Tabla 7. El análisis de 2 vías encontró significativos efectos en la interacción de los factores PS y taurina,.

Respecto a la lipogénesis, la actividad de Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) resultó significativamente disminuida en los peces alimentados con la dieta S60 (37.5 mU  $\text{mg}^{-1}$  proteína) respecto del control (72.3 mU  $\text{mg}^{-1}$  proteína, ver Tabla 7). Los análisis de datos indicaron que el factor taurina indujo un efecto significativo en la actividad de G6PD (independiente del nivel de PS). Por su parte, la actividad de las enzimas málicas (EM) fue mayor en los peces alimentados con PS30T (21.7 mU  $\text{mg}^{-1}$  proteína) respecto al control (17.2 mU  $\text{mg}^{-1}$  proteína). Sin embargo, no se obtuvieron efectos significativos de los factores sobre la actividad de las EM. La actividad de las enzimas ácido graso sintetasas (FAS) no mostró ser influenciadas por la composición de las dietas experimentales en comparación al control.

### ***2.7.5 Estado del sistema antioxidante y peroxidación de lípidos***

En el presente estudio, se observó que la actividad de las enzimas superóxido dismutasas (SOD) se incrementó en el hígado de los peces alimentados con las dietas elaboradas con PS, lo cual resultó significativo para el tratamiento PS30 (162 U  $\text{mg}^{-1}$  proteína, valor promedio) en comparación con el control (valor 115 U  $\text{mg}^{-1}$  proteína; ver Tabla 8). El análisis de datos no encontró efectos significativos de los factores sobre la actividad de SOD. Respecto a la actividad de las enzimas glutatión peroxidasa (GPX) y glutatión reductasa

(GR), esta no resultó significativamente influenciada por la composición de las dietas experimentales en comparación al control.

**Tabla 8.** Actividad específica de enzimas antioxidantes y peroxidación de lípidos en hígado de juveniles de *Totoaba macdonaldi* alimentados con concentrado de proteína de soya sin y con el suplemento taurina.

Dietas	Control	PS30	PS30T	PS60	PS60T	SEM <sup>1</sup>
Superóxido dismutasa, U mg <sup>-1</sup> proteína	115	162‡	138	144	140	5.27
Catalasa, U mg <sup>-1</sup> proteína	132	140	203‡	126	172‡	6.84
Glutación peroxidasa, mU mg <sup>-1</sup> proteína	31.2	33.3	30.0	29.8	31.0	0.93
Glutación reductasa, mU mg <sup>-1</sup> proteína	5.11	5.88	6.08	6.58	6.90	0.26
Peroxidación de lípidos, nmol MDA g tejido <sup>-1</sup>	9.44	10.9	8.26	13.2‡	8.27	0.46

**ANOVA de 2 vías (valores de P en tabla)**

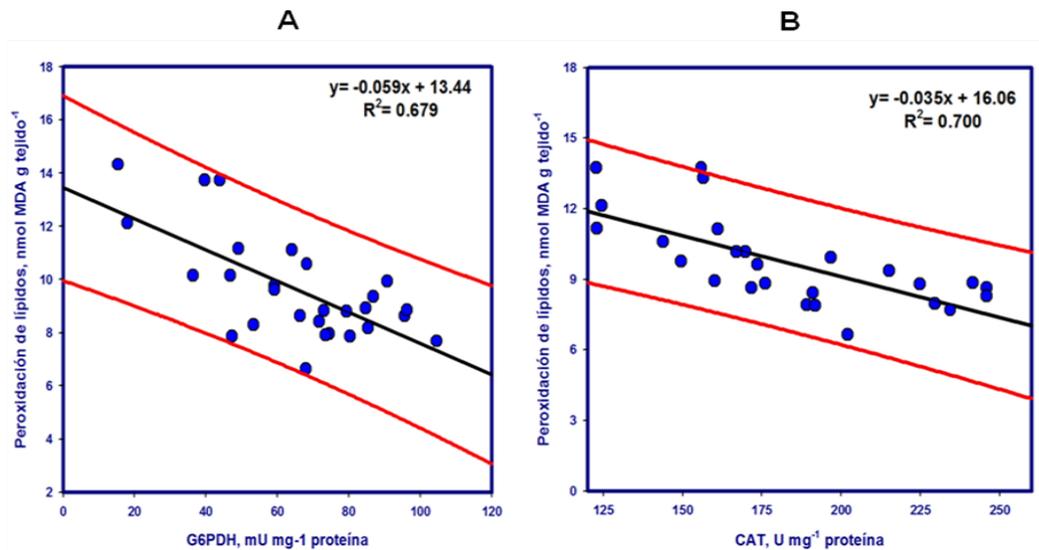
	Fuentes de variación		
	PS <sup>2</sup>	Taurina	interacción
Superóxido dismutasa	0.56	0.31	0.46
Catalasa	0.10	<0.01	0.51
Glutación peroxidasa	0.51	0.61	0.26
Glutación reductasa	0.25	0.67	0.92
Peroxidación de lípidos	0.14	<0.01	0.14

1 SEM: error estándar. Valores en el mismo renglón con símbolos significan diferencias significativas entre las dietas experimentales (PS30, PS30T, PS60, PS60T) y la dieta control (Control), donde ‡>Control>† cuando P < 0.05. En la parte inferior de la tabla se muestran los resultados del ANOVA de 2 vías donde el efecto significativo se presenta cuando P < 0.05. 2 Concentrado de proteína de soya.

Por otra parte, la actividad de la enzima antioxidante catalasa (CAT) se mostró significativamente incrementada en los peces alimentados con las dietas PS30T y PS60T (203 y 172 U mg<sup>-1</sup> proteína, respectivamente) respecto al control (valor 132 U mg<sup>-1</sup> proteína, ver Tabla 8). Además, los resultados indican que el factor taurina indujo a un aumento significativo de la actividad de la CAT.

En relación a la peroxidación de lípidos (LPO) en hígado, los datos indican que los peces alimentados con PS60 obtuvieron los mayores niveles de LPO hepática (valor 13.2 nmol MDA g tejido<sup>-1</sup>, ver Tabla 8). Además, los análisis de ANOVA de 2 vías indican que la

disminución de los niveles de LPO fueron altamente influenciados ( $P < 0.01$ ) por el factor taurina (independientemente del nivel de PS). Adicionalmente, el incremento de los niveles de LPO hepáticos mostró estar relacionado con la disminución de la actividad de las enzimas G6PD ( $R^2 = 0.679$ ,  $P < 0.01$ ) y CAT ( $R^2 = 0.700$ ,  $P < 0.01$ ), como se muestra en las Figuras 6, A y B, respectivamente.



**Figura 6.** Regresión lineal entre las variables peroxidación de lípidos y la actividad de G6PD (A) ó actividad de CAT (B) en hígado de juveniles de *Totoaba macdonaldi* alimentados con concentrado de proteína de soya sin y con el suplemento taurina, donde se muestra el intervalo de predicción de la media con un 95% de confianza.

### 2.7.6 Hígado verde e histopatología

Al final de las 6 semanas de alimentación, se observó la presencia del “síndrome de hígado verde” en el 100% de los juveniles de totoaba analizados ( $n = 9$ ) de los tratamientos PS30 y PS60, lo cual resultó significativamente mayor al control (Figura 7). El tratamiento

PS30T presentó 0% de incidencia del “síndrome de hígado verde”. Cabe mencionar que en el control y en el tratamiento PS60T se presentó un caso de hígado verde, lo que representó al 11% de las muestras analizadas (n= 9).

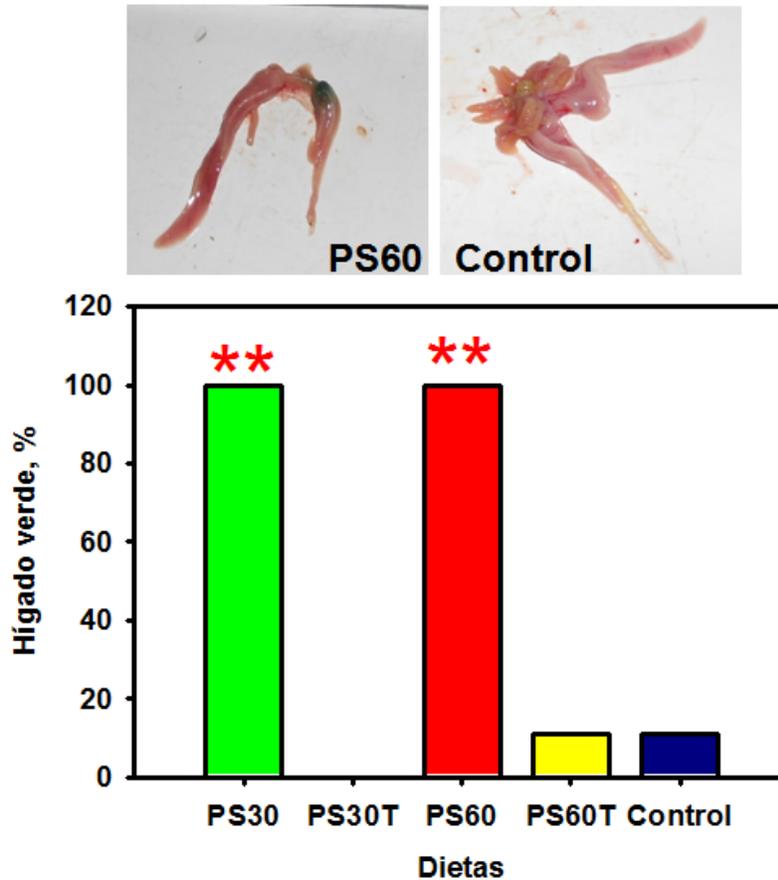


Figura 7. Incidencia de “hígado verde” en juveniles de *Totoaba macdonaldi* alimentados con concentrado de proteína de soya sin y con el suplemento taurina. Esquina superior izquierda muestra de “hígado verde” en pez alimentado con PS60. Esquina superior derecha muestra de hígado “normal” en tratamiento Control. Gráfico inferior muestra los valores de mediana (n= 9). El gráfico inferior muestra los resultados del análisis estadístico de la prueba U de Mann-Whitney, donde el signo \*\* indica diferencias significativas con respecto al Control, cuando  $P < 0.05$ .

En cuanto a los análisis histopatológicos del hígado de totoaba, las muestras del grupo control muestran un tejido constituido por hepatocitos con su núcleo y nucléolo prominente centrales, rodeado por abundante citoplasma granular y algunas vacuolas periféricas (Figura 8). También se observa que los hepatocitos están dispuestos en cordones compactos bordeados por sinusoides con algunos eritrocitos.

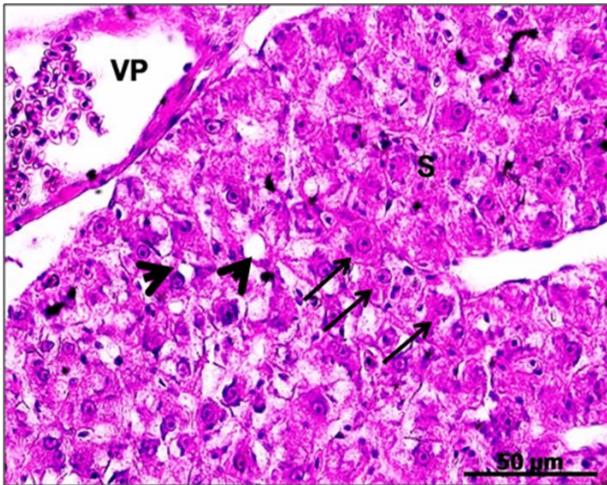


Figura 8. Micrografía de hígado de juveniles de *Totoaba macdonaldi* alimentados con la dieta Control. Tinción H&E. Vista a 40X. Hepatocitos con núcleos centrales normales (flechas) y hepatocitos con vacuolas (cabeza de flecha); vena porta (VP); sinusoides (S).

En el presente estudio, las alteraciones más manifiestas que se encontraron en el tejido hepático fueron: cambios en los patrones de circulación sanguínea o perturbación circulatoria (Figura 9c), presencia de vacuolas en los hepatocitos ó vacuolación, sin y con desplazamiento nuclear ó cambios nucleares (Figura 9c), así como la presencia de agregados inflamatorios dispersos en el tejido (Figura 9c). Los cambios estructurales observados en la presente investigación figuraron dentro de los patrones de reacción y factores de importancia considerados como moderados y reversibles (descritos en el Anexo 1.2).

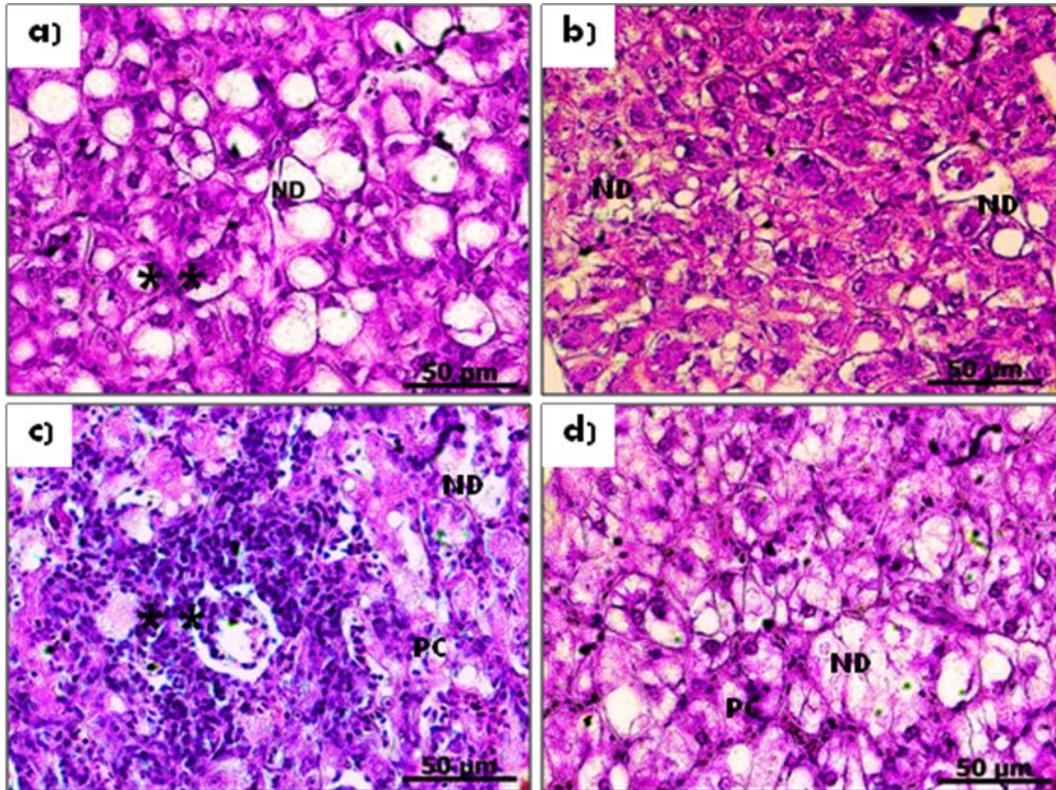


Figura 9. Micrografía de hígado de juveniles de *Totoaba macdonaldi* alimentados con concentrado de proteína de soya sin y con el suplemento taurina. Tinción H&E. Vista a 40X. a) Dieta PS30: Hepatocitos vacuolados con núcleos desplazados y/o ausentes (ND) y agregados inflamatorios (\*\*); b) Dieta PS30T: hepatocitos con ND; c) Dieta PS60: tejido con perturbación circulatoria (PC), agregados inflamatorios (\*\*) y hepatocitos con ND; d) Dieta PS60T: tejido con PC y hepatocitos con ND.

Los resultados del análisis del tejido hepático de los peces alimentados con las dietas elaboradas con PS indican diferencias significativas con respecto a lo observado en el tejido hepático del tratamiento control (Tabla 9). Además, los resultados muestran que el tratamiento PS60 fue el que presentó el valor más alto del índice hepático.

**Tabla 9.** Índice del patrón de alteración e índice de alteración hepática de juveniles de *Totoaba macdonaldi* alimentados con concentrado de proteína de soya sin y con el suplemento taurina.

	Control	PS30	PS30T	PS60	PS60T
Perturbación circulatoria <sup>1</sup>	0	0	0	1‡	1‡
Vacuolización <sup>1</sup>	4	12‡	12‡	12‡	12‡
Cambios nucleares <sup>1</sup>	0	2‡	2‡	8‡	2‡
Agregados inflamatorios <sup>1</sup>	0	8‡	0	8‡	8‡
Índice hepático <sup>2</sup>	4	22‡	14‡	29‡	21‡

Valores de mediana (n= 9). La tabla muestra los resultados del análisis estadístico de la prueba U de Mann-Whitney observados, donde los valores en el mismo renglón con símbolos significan diferencias significativas entre las dietas experimentales (PS30, PS30T, PS60, PS60T) y la dieta control (Control), donde ‡>Control cuando P < 0.05.

1 El índice de cada patrón de alteración (perturbación circulatoria, vacuolización, cambios nucleares y agregados inflamatorios) se obtuvo de la sumatoria de alteraciones relevantes (ver anexo 1.2), donde el incremento de este índice indica aumento del daño de leve a moderado (reversible) o severo (irreversible).

2 El índice hepático se obtuvo de la sumatoria de los índices de los patrones de alteración evaluadas (perturbación circulatoria, vacuolización, cambios nucleares y agregados inflamatorios), donde el incremento de este índice es un indicador del aumento de la alteración y daño hepático.

### 2.7.7 Hematología y bioquímica sanguínea

En la Tabla 10 se muestran los resultados de los análisis hematológicos y de bioquímica sanguínea de los juveniles de totoaba. Como se puede observar, los resultados muestran que los peces alimentados con las dietas elaboradas con PS sin suplementación de taurina (dietas PS30 y PS60) presentaron los valores más elevados de eritrocitos circulantes (EC, 3.39 y 3.58  $1 \times 10^6$  cel  $\mu\text{L}^{-1}$ , respectivamente) y hematocrito (HT, 38.0 y 36.3%, respectivamente) respecto al control (2.88 y 29.9%, para EC y HT, respectivamente). El análisis de ANOVA de 2 vías indicó que la taurina fue el factor que influyó significativamente en el EC; mientras que el HT fue significativamente influenciado por el efecto de interacción de factores (PS \* taurina).

**Tabla 10.** Hematología y bioquímica del plasma sanguíneo de juveniles de *Totoaba macdonaldi* alimentados con concentrado de proteína de soya sin y con el suplemento taurina.

<b>Dietas</b>	<b>Control</b>	<b>PS30</b>	<b>PS30T</b>	<b>PS60</b>	<b>PS60T</b>	<b>SEM<sup>1</sup></b>
Eritrocitos circulantes (EC), $1 \cdot 10^6$ cel $\mu\text{L}^{-1}$	2.88	3.39‡	2.70	3.58‡	2.54	0.70
Hematocrito (HT), %	29.9	38.0‡	25.7	36.3‡	33.9	0.94
Hemoglobina (HB), g $\text{dL}^{-1}$	5.79	5.13	5.10	3.49†	3.51†	0.14
Media del volumen celular (MVC), fL	107	111	94	103	129	3.64
Media de HB corpuscular (MHC), pg	20.0	15.7†	18.4	9.84†	13.5†	0.52
Media de concentración HB (MCHC), %	19.3	13.9†	19.9	10.0†	11.5†	0.59
Albúmina (AL), g $\text{dL}^{-1}$	0.70	0.73	0.79‡	0.38†	0.45†	0.02
Globulinas (Glb), g $\text{dL}^{-1}$	1.16	1.42‡	1.61‡	1.71‡	1.61‡	0.03
Razón AL:Glb	0.62	0.46†	0.50†	0.22†	0.29†	0.02
Glucosa (GLU), mg $\text{dL}^{-1}$	36.7	33.4	37.3	56.7‡	35.3	1.10

**ANOVA de 2 vías (valores de P en tabla)**

	<b>Fuentes de variación</b>		
	<b>PS<sup>2</sup></b>	<b>Taurina</b>	<b>Interacción</b>
EC	0.85	<b>&lt;0.01</b>	0.18
HT	0.20	<b>&lt;0.01</b>	<b>0.04</b>
HB	<b>&lt;0.01</b>	0.70	0.75
MVC	0.25	0.85	0.05
MHC	<b>&lt;0.01</b>	<b>&lt;0.01</b>	0.46
MCHC	<b>&lt;0.01</b>	<b>&lt;0.01</b>	<b>&lt;0.01</b>
AL	<b>&lt;0.01</b>	<b>0.04</b>	0.67
Glb	0.06	0.41	0.06
AL:Glb	<b>&lt;0.01</b>	<b>0.02</b>	0.32
GLU	<b>&lt;0.01</b>	<b>&lt;0.01</b>	<b>&lt;0.01</b>

1 SEM: error estándar. Valores en el mismo renglón con símbolos significan diferencias significativas entre las dietas experimentales (PS30, PS30T, PS60, PS60T) y la dieta control (Control), donde ‡>Control>† cuando  $P < 0.05$ . En la parte inferior de la tabla se muestran los resultados del ANOVA de 2 vías donde el efecto significativo se presenta cuando  $P < 0.05$ . 2 concentrado de proteína de soya.

Por su parte, los valores de la hemoglobina (HB) de los peces alimentados con las dietas PS30, PS30T y el control no mostraron diferencias significativas (con un promedio mínimo de 5.10 y máximo de 5.79 g  $\text{dL}^{-1}$ ; ver Tabla 10). Sin embargo, se observaron los valores significativamente más bajos en los tratamientos PS60 y PS60T (3.49 y 3.51 g  $\text{dL}^{-1}$ , respectivamente). Asimismo, los resultados de ANOVA de 2 vías indicaron que el incremento en los niveles de PS (Independiente de taurina) influyó significativamente en la disminución de la HB de totoaba. Respecto a los índices Wintrobe, la media del volumen celular (MVC) no

mostró ser influenciada por la composición de las diferentes dietas experimentales. Sin embargo, la media de HB corpuscular y la media de concentración HB (MCH y MCHC, respectivamente) resultaron significativamente disminuidos en los peces alimentados con las dietas elaboradas con PS (valores menores a 16 pg y 14%, para MCH y MCHC respectivamente), excepto para la PS30T que presentó valores similares al control (20 pg y 19.3%, para MCH y MCHC respectivamente). Los análisis de ANOVA de 2 vías muestran que cada factor (PS y taurina) produjo efectos significativos (independiente y contrarios entre sí) en los valores de la MCH; mientras que los análisis indican que un significativo efecto de interacción de factores (PS \* taurina) fue observada para la MCHC.

Los juveniles de totoaba alimentados con la dieta PS30T presentaron mayor concentración de albúmina (AL, 0.79 g dL<sup>-1</sup>, valor promedio) respecto al control (0.70 g dL<sup>-1</sup>, valor promedio; ver Tabla 10). No obstante, la AL resultó significativamente disminuida con el incremento del PS (independiente de taurina); aunque el factor taurina mostró producir efectos significativos (independiente de PS) en la AL. Por otra parte, se observó un aumento significativo en los valores de globulinas (Glb) de los peces alimentados con las dietas elaboradas con PS ( $\geq 1.42$ ) respecto al tratamiento control (1.16, valor promedio). No obstante, no se observó un efecto debido al nivel de PS o de taurina en las dietas. La relación albúmina: globulinas (AL:Glb) resultó significativamente disminuida en los peces alimentados con PS ( $\leq 0.50$ ) en comparación al control (0.62, valor promedio), lo cual también se reflejó en el análisis de factores. Aunque, el factor taurina también generó un significativo aumento en la relación AL:Glb (independiente de la PS).

La concentración de glucosa plásmatica (GLU) fue mayor en los peces alimentados con PS60 (56.7, valor promedio) comparados con el control (36.7, valor promedio; ver Tabla 10). El análisis de ANOVA de 2 vías indicó que un efecto significativo de interacción de efectos entre los factores PS y taurina sobre la concentración de GLU en totoaba.

## 2.8 Discusiones

En el presente estudio, los resultados mostraron que las dietas elaboradas con 30% de concentrado de proteína de soya (PS) en sustitución de la harina de pescado no provocaron repercusiones negativas en la respuesta de crecimiento y eficiencia alimenticia de los juveniles ( $7.5 \pm 0.05$ g peso promedio inicial) de totoaba. En este estudio el incremento del contenido de PS en las dietas (60%) impactó de manera negativa la ganancia en peso y el índice de crecimiento diario (ICD). Nuestros resultados difieren de lo reportado para la cobia del Atlántico (*Gadus morhua*), especie que ha mostrado la aceptación de la sustitución de harina de pescado por niveles mayores al 50% de proteína de soya sin repercusiones negativas en el crecimiento (Hansen et al., 2007; Walker et al., 2010). Sin embargo, se reconoce que la inclusión de proteínas alternativas como la PS en dietas para peces puede afectar negativamente el crecimiento por diferentes factores, entre los que se incluye la deficiencia de aminoácidos como la metionina y taurina (Oliva-Teles, 2012). Por lo anterior, la suplementación de metionina en las dietas formuladas para trucha arcoíris ha permitido la inclusión de hasta 100% de proteína de soya en sustitución de la harina de pescado en las dietas con aumento en la utilización de nutrientes (Mambrini et al., 1999; Gaylord et al., 2007). En el presente estudio todas las dietas elaboradas con PS fueron suplementadas con metionina hasta niveles similares a los proporcionados por la dieta control. Además, el análisis de composición de aminoácidos muestra que todas las dietas elaboradas con PS contenían cantidades similares de AAE y AANE, excepto para el nutriente taurina. Por lo que, la reducción del crecimiento observada en los juveniles de totoaba alimentados con PS60 en comparación con PS60T y el control, sugiere que la metionina no fue un nutriente limitante para este estudio. Por el contrario, la taurina demostró jugar un papel importante para

mantener el crecimiento de totoaba cuando la harina de pescado es reemplazada hasta por 30% por PS. Se ha demostrado que la suplementación de taurina en las dietas para peces carnívoros produce efectos benéficos en la respuesta de crecimiento y eficiencia alimenticia en *D. labrax* (Martínez et al., 2004), *P. olivaceus* (Kim et al., 2005), *S. quinquerediata* (Matsunari et al., 2005; Takagi et al., 2006), trucha arcoíris (Gaylord et al., 2007) y la cobia *Rachycentron canadum* (Lunger et al., 2007). Entre los efectos benéficos reportados por el suplemento de taurina, es el aumento de la digestibilidad de lípidos en *D. dentex* debido al incremento de la eficiencia enzimática de las lipasas dependientes de sales biliares (Chatzifotis et al., 2008). En los peces, se ha demostrado que los ácidos biliares se conjugan principalmente con taurina, por lo que el aumento de los niveles de taurina en la dieta incrementan los ácido biliares conjugados con taurina (Iwashita et al, 2009; Kim et al, 2007, 2008). Además, estudios de Iijima et al. (1998) reportaron que las lipasas digestivas de *Pagrus major* mostraron su mayor actividad en presencia de taurocolato de sodio; mientras que Gjellesvik et al. (1992) encontraron que para la cobia del Atlántico, las lipasas digestivas dependientes de sales biliares (conjugadas con taurina) son las principales enzimas que participan en la digestión de lípidos de la dieta. Rueda López (2013) reportan que las mayores actividades de lipasas digestivas observadas en la totoaba se presentaron con la adición de taurocolato de sodio (solución 6 mM). Por lo que es posible que los mayores valores de crecimiento observadas en el presente estudio pudieran estar relacionadas a los efectos de la taurina a nivel de utilización de nutrientes desde la dieta.

Por otra parte, debido a las características de bajo peso molecular, contenido de nitrógeno, solubilidad en agua y propiedades de ácido-base de la taurina, han generado que

este nutrientes sea considerado como atráctante en el consumo de las dietas en peces (Martínez et al., 2004; Kim et al., 2005; Lunger et al., 2007; Matsunari et al., 2008). No obstante, en el presente estudio se observó que pese a la suplementación de taurina en las dietas, los juveniles de totoaba alimentados con PS (independiente del nivel) obtuvieron valores de ingestión diaria de alimento (IDA) significativamente menores al control. Trushenski et al. (2011) evaluaron los efectos de dietas elaboradas con diferentes niveles de proteína de soya con y sin adición de un atráctante en juveniles de *R. canadum*. Los investigadores sugirieron que el incremento del nivel de proteína de soya provocó un menor consumo del alimento, lo que a su vez condujo a la disminución en el crecimiento de los animales. Está reportado que el concentrado de proteína de soya pueden contener antinutrientes como las isoflabonas, reconocidas por afectar la palatabilidad de este ingrediente y provocar la disminución de su consumo y del crecimiento de los peces (Mambrini et al., 1999; Francis et al., 2001). Si bien los compuestos antinutricionales pueden ser removidos en su mayor parte con métodos de extracción alcohólica acuosa, diferentes factores (variedad de soya, temporada de cosecha, lugar de siembra o estado de madures de los granos) pueden ser causa de menor eficiencia en la separación de estos compuestos indeseados (Francis et al., 2001). En este trabajo de tesis no se midieron los componentes antinutricionales presentes en el lote del concentrado de proteína de soya utilizado; sin embargo, los resultados podrían sugerir que posibles componentes antinutricionales en la PS hayan interferido en la disminución de la IDA, además de los efectos negativos del factor PS se observaron en el crecimiento, la respuesta fisiológica y metabólica (discutidas más adelante) de juveniles de totoaba.

En el presente estudio, las dietas fueron elaboradas para contener niveles de proteína y energía similares. No obstante, la inclusión de PS en las dietas provocó una disminución en la ingesta de nutrientes (nitrógeno, lípidos y energía total) en los juveniles de totoaba alimentados con estas dietas. Sin bien la retención de nitrógeno, lípidos y energía total de los tratamientos elaborados con PS no resultó afectada al compararla con el control. Por otro lado, se observó que el aumento del nivel de 30 a 60% de PS provocó una tendencia significativa de disminución en la retención de nitrógeno. Lo que sugiere que un mayor nivel de PS (mayor al 30%) en dietas para totoaba puede repercutir de manera negativa en la retención de nutrientes y por consiguiente en el crecimiento de los peces. Por otra parte, en comparación al control, la suplementación de taurina incrementó significativamente la retención de nitrógeno y energía en la dieta con 30% de PS (tratamiento PS30T), pero tales efectos no fueron observados en la dieta elaborada con 60% de PS (tratamiento PS60T). Como ha sido mencionado con anterioridad, una de las principales funciones que han sido atribuidos a la taurina es el aumento de la digestibilidad de lípidos a través del incremento de la eficiencia enzimática de las lipasas dependientes de sales biliares (Gjellesvik et al., 1992; Iijima et al., 1998; Chatzifotis et al., 2008; Rueda López, 2013); por lo que es posible que, pese al menor consumo en las dietas elaboradas con PS de alimento en los juveniles de totoaba, el aumento en la retención de nitrógeno y energía fuera el resultado de los beneficios de la taurina. Aunque mayores estudios son necesarios para verificarlo.

Desde una perspectiva general, se considera que los peces tienen la capacidad para adaptar su metabolismo a diferentes condiciones nutricionales como las impuestas por el uso de altos niveles de proteínas de origen vegetal o por variaciones en la disponibilidad de

nutrientes como las proteínas (Metón et al., 1999; Martin et al., 2003; Vilhelmsson et al., 2004; Dias et al., 2005; Messina et al., 2007; Pérez-Jimenez et al., 2009a). No obstante, particularidades específicas determinan el modo como los peces regulan su metabolismo intermediario y como éste influye directamente en la relación entre energía y nutrientes que requieren, por lo anterior, no es conveniente tratar de unificar las respuestas metabólicas ante deficiencias nutricionales entre especies (Drabowski y Guderley, 2002; Guillaume, 2004). En este sentido, este trabajo proporciona la primera base de datos acerca de la respuesta de la actividad de las enzimas claves del metabolismo hepático de juveniles de *T. macdonaldi* ante el uso de diferentes condiciones nutricionales.

Los resultados observados en este experimento indican que la utilización de PS en las dietas de totoaba provocó disminuciones significativas en las enzimas glutamato deshidrogenasa (GDH), hexoquinasa (HK), glucoquinasa (GK) y fructosa 1-6 bifosfatasa (FBPasa), independiente de la adición de taurina. A diferencia de nuestros resultados con la totoaba, se ha reportado que el metabolismo de los aminoácidos de la trucha arco iris no resultó afectado por la sustitución del 100% de harina de pescado con una mezcla de proteínas vegetales (gluten de maíz, gluten de trigo, trigo entero extruído, chícharo extruídos y harina de canola) (Vilhelmsson et al, 2004). Mientras que para la dorada (*S. aurata*) y la corvina europea (*D. labrax*), está reportado que los cambios en la actividad de enzimas ALAT, ASAT y GDH (que participan en el catabolismo de los AA) puede estar relacionada a un desbalance en el perfil de AAE y AANE de sus dietas (Gómez-Requeni et al., 2003; Peres y Oliva-Teles, 2006, 2007), ya que la proteína vegetal puede presentar una limitada disponibilidad de AAE como arginina, lisina y metionina (Francis et al., 2001). Sin embargo, las dietas experimentales utilizadas en el presente estudio fueron formuladas para

proporcionar niveles de AAE y AANE similares a los de la dieta control, a excepción de la taurina. Al respecto, nuestros resultados muestran que el factor taurina desempeñó un papel altamente significativo en la regulación de las diferentes enzimas clave del metabolismo intermediario (catabolismo de AA, glucólisis, gluconeogénesis y lipogénesis) de la totoaba, incluso a diferentes niveles de PS en las dietas.

Por otra parte, si bien el factor taurina indujo un aumento significativo de la actividad de la enzima FBPasa (relacionada a la gluconeogénesis), con aumento además de la actividad de las enzimas GK (glucólisis) y glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) (vinculada a la lipogénesis) en el hígado de los juveniles de totoaba; la actividad de las enzimas málicas (EM) y ácido graso sintetasa (FAS, lipogénesis) no resultaron influenciadas. Las actividades de las enzimas EM y FAS son indispensables para la etapa final de producción de ácidos grasos y triglicéridos *de novo* en los animales (Salway, 2004). Sin embargo, dado que en nuestros resultados se observó que la actividad de las enzimas EM y FAS no fueron estimuladas en los tratamientos donde se observó un aumento significativo en la cantidad de lípidos almacenados en el hígado (PS30, PS30T, PS60 y PS60T), esto nos sugieren que la síntesis *de novo* de la glucosa observada en nuestro estudio (aumento de la actividad de la FBPasa) no fue utilizada para la síntesis *de novo* de lípidos. Por otro lado, debido a que los resultados en el contenido de lípidos y glucógeno hepáticos fue significativamente mayor en los peces alimentados con las dietas a base de PS, esto parecen indicar una posible reducción del catabolismo de glucógeno y lípidos hepáticos en lugar del aumento de la síntesis *de novo* de estas reservas energéticas. Por lo que, estos resultados podrían indicar que dietas a base de PS inducen a un estado de energía desfavorable en los juveniles de totoaba, lo que conduce a una disminución de la regulación

de las enzimas del catabolismo de aminoácidos y de gluconeogénesis, así como a una disminución de la regulación de la movilización de la energía de reserva (glucógeno y lípidos) hepáticos.

Por otra parte, el aumento de G6PD debido al factor taurina está posiblemente en relación con la respuesta del sistema de defensa antioxidante de totoaba (que se discute más adelante). En la lobina europea, la actividad de G6PD es casi 20 veces más alta que la actividad de las EM, por lo que se considera que para esta especie, los equivalentes reductores citoplásmicos de NADPH son proporcionados principalmente por la vía de las pentosas fosfato (Dias et al., 1998). Resultados similares han sido reportados para el lenguado, *Solea senegalensis* (Dias et al., 2004) y el besugo, *Pagellus bogaraveo* (Figueiredo-Silva et al., 2009), en los que se ha encontrado una mayor actividad de G6PD en comparación con la actividad de EM. En la presente investigación, los juveniles de totoaba alimentados con las dietas experimentales suplementadas con taurina (PS30T y PS60T) y la dieta control mostraron actividad de G6PD al menos 3 veces mayor que la observada para las EM. Además, pese al aumento de la actividad de G6PD, la actividad de las FAS no mostró estar influenciada por la composición de las dietas. Por lo que esto podría sugerir que la enzima G6PD encontrada en la totoaba es el productor principal de NADPH, que a su vez parece ser utilizadas más para fines de reducción de equivalentes que para la producción de compuestos energéticos de almacén (lípidos *de novo*).

Respecto al estado oxidativo hepático de totoaba, el uso de concentrado de proteína de soya en sustitución de la harina de pescado parece haber inducido una situación de estrés oxidativo hepático, ya que los niveles de lipoperoxidación (LPO) se incrementaron en los

peces alimentados con las dietas PS30 y PS60, con un aumento significativo en PS60. Además, se observó un aumento de la actividad de la superóxido dismutasa (SOD) en las dietas elaboradas con PS, la cual resultó significativa para el tratamiento PS30, lo que sugiere una mayor presencia de radicales superóxido de oxígeno ( $O_2^{\cdot-}$ ), lo que podría ser en parte una consecuencia del aumento de lipoperoxidación (LPO) observado en el hígado o los hepatocitos de los peces alimentados con las dietas sin el suplemento de taurina, debido a que en estas se observó una falta de respuesta en la actividad de las enzimas catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPX), responsables de neutralizar los productos de  $H_2O_2$  generados por la SOD. Por otra parte, el uso de taurina invirtió los efectos negativos al anular el estrés oxidativo inducido por la PS. Si bien diferentes factores pueden estar involucrados en este proceso, se reconoce que la taurina posee atributos para funcionar como antioxidante y de protección de tejidos como el corazón, hígado, eritrocitos y riñón al neutralizar y eliminar algunos productos reactivos intermedios como el ácido hipocloroso generado por mieloperoxidasa (Hu et al., 2008; Azuma et al., 2009; Chang et al., 2011). Asimismo, está reportado que la taurina mejora el sistema de defensa antioxidante a través de la inhibición de procesos de LPO, mitigando así el consumo de GSH. Además, la taurina puede proteger a las células como un antioxidante indirecto a través de la osmorregulación y estabilización de membranas, lo que evita alteraciones de la funcionalidad y la integridad del metabolismo celular (Timbrell et al., 1994; Guillaume, 2004; Mas et al., 2004; Chesney et al., 2012). Otros estudios han propuesto que los antioxidantes no enzimáticos como la taurina pueden jugar un papel fundamental en defensa contra el estrés oxidativo en los peces, ya que se han detectado altos niveles de antioxidantes no enzimáticos con respecto a la actividad de las enzimas antioxidantes (Martínez-Álvarez et al., 2005). En este sentido, los resultados del presente estudio podrían señalar que es posible que la taurina podría desempeñara un papel

crucial en el mantenimiento del sistema de defensa antioxidante de la totoaba, no sólo al participar directamente en la eliminación de especies de oxígeno reactivas e inhibir el proceso de peroxidación lipídica, sino también mediante la estimulación de la acción/síntesis de enzimas antioxidantes como CAT, observado en este estudio.

Por otro lado, los resultados indican que la disminución del daño oxidativo de las células hepáticas de los juveniles de totoaba estuvo significativamente relacionada con el aumento de la actividad de la enzima G6PD. En diferentes especies animales, se ha propuesto que la enzima G6PD es la fuente predominante de NADPH para defender contra el estrés oxidativo, debido a que una de las funciones principales del NADPH es mantener los niveles de GSH intracelular a través de la reducción de GSSG a GSH por la enzima glutathion reductasa (GR) en las células (Salvemini et al., 1999; Leopold y Loscalzo, 2000; Kirsch y De Groot, 2001; Morales et al., 2004; Castro et al., 2012). Además, se ha encontrado que la NADPH se une fuertemente a la enzima CAT con el fin de evitar que esta enzima pueda inactivarse por su propio substrato (Kirkman et al., 1999; Leopold y Loscalzo, 2000; Gaetani et al., 2005). Otros autores han propuesto que el NADPH podría actuar como antioxidante directo al eliminar radicales libres y en la reparación de biomoléculas dañadas (Kirsch y De Groot, 2001). En los mamíferos, la disminución en la actividad de G6PD esta asociada con el aumento de la vulnerabilidad de los hepatocitos y eritrocitos al ataque oxidativo y el consiguiente daño a las estructuras y funciones celulares (Salvemini et al, 1999; Leopold y Loscalzo, 2000; Abele y Puntarulo, 2004; Morales et al., 2004). En este sentido, nuestros resultados sugieren que la actividad de la enzima G6PD podría ser importante para la defensa antioxidante, y por tanto, en el mantenimiento del estado redox de las células de

totoaba a través de la generación de NADPH necesario en la modulación de las defensas antioxidantes.

En la presente investigación, los resultados muestran que el uso de PS sin la suplementación de taurina en las dietas indujo la anomalía conocida como “síndrome de hígado verde” en los juveniles de totoaba. No obstante, los análisis estadísticos indican, que independiente del nivel de PS utilizada en las dietas, el factor taurina fue determinante para prevenir el “síndrome de hígado verde” en totoaba. Diferentes estudios como los de jurel cola amarilla y la dorada japonesa han demostrado que existe una relación entre el desarrollo del “síndrome de hígado verde” y la deficiencia de taurina en sus dietas, cuando éstas son elaboradas sin harina de pescado o con harina de pescado sin taurina (Takagi et al., 2005, 2006, 2008, 2010, 2011). Los autores reportan que, para estas especies, el “síndrome de hígado verde” puede ser debido a la acumulación del pigmento biliverdina (producto de la destrucción de los eritrocitos y metabolismo del grupo heme) causado por la desestabilización de membranas y la alteración de los procesos de osmorregulación en los eritrocitos por deficiencia de taurina. Los investigadores reportan que los peces con “síndrome de hígado verde” presentaban además una disminución de la excreción de los pigmentos biliares hepáticos (bilirrubina, sintetizada a partir de biliverdina) hacia la bilis. En el presente estudio, las dietas elaboradas con PS sin suplemento de 1% taurina contenían niveles de taurina similares a los proporcionados por la dieta control elaborada solo con harina de pescado (0.5% de la dieta). Sin embargo, el aumento de actividad de las enzimas SOD, de los niveles de LPO y la presencia del “síndrome de hígado verde” sugieren que la PS indujo mayor estrés oxidativo en el hígado de los juveniles de totoaba, y por lo tanto, una mayor demanda metabólica de taurina. Lo anterior debido a que los tratamientos elaborados con PS y

suplementados con 1% de taurina indujeron la recuperación del metabolismo intermediario, del sistema de defensa antioxidante y previnieron el “síndrome de hígado verde” durante las 6 semanas que duró el experimento. En este sentido, la disminución del contenido de proteínas hepáticas, con aumento de lípidos y glucógeno, así como la depresión metabólica, el aumento de los niveles de daño oxidativo, los procesos de daño (reversible) del tejido hepático, los cambios severos en el tejido sanguíneo (que se discuten más adelante), junto a una disminución de la tasa de crecimiento en los peces alimentados con PS sin suplemento de taurina, sugieren el posible desarrollo de un proceso patológico que probablemente se podría manifestar de manera más clara ante periodos de cultivo prolongados con dietas formuladas con altos contenidos de proteína de soya y limitada disponibilidad de taurina.

Como se ha mencionado anteriormente, la taurina es esencial para el mantenimiento de la homeostasis de los eritrocitos y de los hepatocitos en peces carnívoros como el jurel cola amarilla y la dorada japonesa (Watanabe et al., 1998; Matsunari et al., 2005; Takagi et al., 2005, 2008; Espe y Holen, 2013). Asimismo, los resultados del presente estudio indican que la taurina funciona como un importante regulador de variables hematológicas como el número de eritrocitos circulantes (EC), hematocrito (HT), media de hemoglobina celular (MHC) y media de la concentración de hemoglobina celular (MCHC) en totoaba. Por otro lado, el aumento de los niveles de PS en las dietas para totoaba repercutieron con efectos negativos en las variables HB, MCH y MCHC. Si bien se desconocen los intervalos de referencia de las diferentes variables hematológicas para diagnosticar la condición de salud de *T. macdonaldi*, la disminución de la concentración de hemoglobina y de reducción de los valores de MCHC, comparada con el tratamiento control, son considerados indicadores de

procesos de anemia en los animales en general (Thrall, 2004; Brockus, 2010). En este sentido, es posible que el aumento de los valores de EC y HT observados en los juveniles de totoaba alimentados con las dietas elaboradas con PS (sin taurina) fuera la respuesta de un mecanismo de compensación en los organismos afectados por la disminución de HB en la sangre. Por otra parte, la disminución de la HB en los juveniles de totoaba debido al aumento del nivel de PS en las dietas, pudiera estar relacionado con los fitatos. Este componente antinutricional de la soya es conocido por causar efectos que pueden degenerar en procesos de anemia al formar complejos insolubles con cationes metálicos de importancia nutricional como el zinc, hierro, cobre, magnesio y calcio, que al no ser absorbidos durante el proceso digestivo degeneran en deficiencias nutricionales. Asimismo, está documentado que pese al avance tecnológico para eliminar la mayoría de los componentes anti nutricionales de los productos derivados de la soya, los fitatos son uno de los antinutrientes que más han resistido a tales procesos (Mendoza et al., 1998; Storebakken et al., 2000; Barac et al., 2004; Deak y Johnson, 2007; Brockus, 2010). Otros investigadores recomiendan el uso de fitasas en dietas elaboradas con PS para los peces, ya que estas enzimas parecen reducir de manera significativa la cantidad de fitatos en el tracto digestivo y por ende, sus efectos adversos (Storebakken et al., 2000; Francis et al., 2001; Ngandzali et al., 2011). En este sentido, nuestros resultados sugieren que el uso de mayores cantidades de PS en dietas para totoaba puede requerir además del aumento de la suplementación de taurina, el uso de otros suplementos que permitan una mejor utilización de la PS sin repercusiones en la salud de los organismos.

Consecuentemente con la disminución de la HB en los juveniles alimentados con el mayor nivel de PS en las dietas, también se presentó una disminución en la concentración de albúmina (AL), pero con aumento de la concentración de las globulinas (Glb) y de la glucosa plasmática (GLU) en el plasma sanguíneo de los juveniles de totoaba. En los animales, la AL y Glb representan más del 95% de las proteínas circulantes en el plasma sanguíneo, y si bien los valores de la relación AL: Glb está en función de cada especie, un desequilibrio en la relación de estas variables es considerado un indicador de inflamación y/o de procesos de disfunción hepática (Kaysen et al., 2002; Mazzaferro et al., 2002; Giannini et al., 2005). Por otro lado, el incremento no-posprandial de la glucosa en la sangre de los peces pudiera advertirse como una respuesta ante factores de estrés crónico (Vijayan et al., 1990; Trenzado et al., 2006). Dado que en el presente estudio se observó un aumento significativo de agregados de células inflamatorias en el tejido hepático de los peces alimentados con el mayor nivel de PS, es posible que el aumento de las Glb esté relacionado a un proceso de hipersensibilidad causada por el aumento de PS. Anti-nutrientes como las saponinas, isoflavonas y los fitatos de los concentrados de soya han sido relacionados con el aumento de las reacciones inflamatorias en la trucha arcoíris, en el salmón del Atlántico y el salmón *Oncorhynchus tshawytscha* (Bureau et al., 1998; Storebakken et al., 2000; Francis et al., 2001; Knudsen et al., 2008). Por lo que, como se ha sugerido en el presente escrito, es posible que el aumento de los niveles de PS en las dietas conllevara a una mayor exposición de sus componentes antinutricionales en la totoaba. Además, en el presente estudio se observó una significativa disminución de la concentración de AL en el plasma sanguíneo de los juveniles de totoaba alimentados con el mayor nivel de PS en la dieta (60%). En los animales terrestres está descrito que diferentes factores pueden ser causa de hipoalbuminemia, tales como cirrosis y lipidosis hepática, enteritis e inflamación

gastrointestinal, alteraciones endócrinas, enfermedades renales, diabetes, entre otras (Mazaferro et al., 2002). Por lo tanto, es posible que los resultados de la disminución de AL observada en el presente estudio esté en relación con los diferentes procesos de alteración hepática y/o de enteritis por hipersensibilidad en los peces alimentados con el mayor nivel de PS (PS60, 60%), y que la suplementación de taurina a este nivel de PS (PS60T) no fuera suficiente para mantener los niveles de síntesis de AL en totoaba. Estudios sobre los requerimientos de taurina en el jurel cola amarilla han reportado que esta especie carnívora presenta alrededor del 1% de requerimiento de taurina en dietas elaboradas a base de harina de pescado. Sin embargo, los autores indican que la sustitución del 100% de la harina de pescado por concentrado de proteína de soya provoca un aumento de los requerimientos de taurina de hasta en un 4% de la dieta para evitar procesos de disfunción hepática y anemia hemolítica (Matsunari et al., 2005; Takagi et al., 2005, 2008). Futuros estudios son necesarios para aclarar los niveles de requerimiento de taurina en los juveniles de totoaba ante diferentes niveles de inclusión de ingredientes vegetales.

## 2.9 Conclusiones

Este estudio indica que la taurina puede ser un nutriente esencial para el mantenimiento de las condiciones fisiológicas y metabólicas normales de la totoaba ante la inclusión de proteínas vegetales. Asimismo, los resultados indican que la deficiencia de taurina es el factor principal que desencadena el incremento de los niveles de daño oxidativo hepático y del desarrollo del “síndrome de hígado verde” en los juveniles de totoaba alimentados con dietas a base de concentrado de proteína de soya; por lo que la taurina resulta esencial para el mantenimiento de la salud hepática de los juveniles de totoaba. Por otra parte, presencia de organismos con “síndrome de hígado verde” (11% de muestras analizadas) en el tratamiento control (cuyo contenido de taurina fue de 0.5% de la dieta) sugiere que los juveniles de totoaba pueden tener mayores requerimientos de taurina ante condiciones de cultivo prolongadas.

Finalmente, los resultados de la presente investigación indican que las dietas elaboradas con 30% de sustitución parcial de harina de pescado con concentrado de proteína de soya y suplementadas con 1% de taurina pueden ser utilizadas para la alimentación de juveniles de totoaba durante 6 semanas sin provocar efectos negativos en la condición de salud hepática de la totoaba y además producir valores de crecimiento comparable a los peces alimentados con una dieta a base de harina de pescado.

# CAPÍTULO III

## **EXPERIMENTO II: Efectos de dietas elaboradas con sustitución parcial de harina y aceite de pescado por ingredientes vegetales (concentrado de proteína de soya y almidón) con y sin taurina en juveniles de totoaba.**

### **3.1 Diseño de dietas experimentales**

Para este experimento (EXP II) fueron elaboradas 4 dietas experimentales con isoenergéticas (19 kJ digestibles g<sup>-1</sup> dieta) e isoproteicas (50% proteína cruda). Estas 4 dietas fueron elaboradas con niveles “moderados” de carbohidratos (18% de almidón de maíz gelatinizado) en sustitución parcial del aceite de pescado (Tabla 11). Dos dietas de este grupo fueron elaboradas con harina de pescado como fuente principal de proteínas sin y con el suplemento de 1% de taurina (AHP y AHPT, respectivamente). Las otras 2 dietas fueron elaboradas con concentrado de proteína de soya (PS) en sustitución parcial del 30% de la harina de pescado sin y con el suplemento taurina (APS y APST, respectivamente). El contenido de PS utilizado se obtuvo a partir de los mejores resultados obtenidos del EXP I de la presente tesis. También se formuló una dieta control (DC) con 50% de proteína cruda (con harina de pescado como fuente principal de proteínas) y únicamente con 10% de almidón de maíz gelatinizado. Las dietas experimentales (AHP, AHPT, APS y APST) fueron suplementadas con metionina y mezcla de minerales hasta niveles similares a los proporcionados por la DC. La composición de los diferentes ingredientes en las dietas experimentales y la DC se presenta en la Tabla 11.

**Tabla 11.** Composición de ingredientes de las dietas experimentales elaboradas con almidón, concentrado de proteína de soya sin y con el suplemento taurina.

Ingredientes, g kg <sup>-1</sup> materia seca	DC	AHP	AHPT	APS	APST
Harina de pescado <sup>1</sup>	605	605	605	416	416
Concentrado de proteína de soya <sup>2</sup>	00	00	00	178	178
Harina de krill	60	60	50	60	50
Gelatina	50	50	50	50	50
Almidón de maíz	100	180	180	180	180
Celulosa	60	14	14	00	00
Aceite de pescado	72	38	38	53	53
Mezcla de Minerales <sup>3</sup>	25	25	25	33	33
Mezcla de Vitaminas <sup>4</sup>	28	28	28	28	28
Metionina <sup>5</sup>	0.0	0.0	0.0	2.0	2.0
Taurina <sup>5</sup>	0.0	0.0	10.0	0.0	10.0

1 Harina de pescado comercial HighPro (proteína cruda: 71%; lípidos crudos: 12%; cenizas: 17%).

2 Concentrado de proteína de soya de SilverCup (proteína cruda: 71%; lípidos crudos: 2.6%; cenizas: 7%; Extracto libre de nitrógeno: 19.4%).

3 Mezcla de minerales (g kg<sup>-1</sup> dieta): KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 320; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 250; Ca (H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, 200; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 150; C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>CaO<sub>6</sub>, 35; C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>FeO<sub>7</sub>, 25; NaCl, 10; ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 3.53; MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O, 1.62; CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O, 0.31; CoCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O, 0.01.

4 Mezcla de Vitaminas (mg kg<sup>-1</sup>): inositol, 256.39; niacina, 51.28; riboflavina; p-aminoácido benzoico, 25.53; ácido pantoténico, 17.92; β-carotenos, 9.39; menadiona, 6.11; tiamina, 3.85; piridoxina, 3.06; ácido fólico, 0.96; biotina, 0.39; colecalciferol, 25793IU; cianocobalamina, 5.59; cloruro de colina 20.0.

5 Aminoácidos de Pharmaceutical Co., LTD.

La elaboración y almacenamiento de las diferentes dietas utilizadas en el EXP II se realizó de acuerdo con la metodología descrita previamente en el apartado 2.1 de la presente tesis. La composición proximal final, composición de AAE y AANE de las diferentes dietas (metodología descrita en el apartado 2.5) es presenta en la Tabla 12.

**Tabla 12** Composición proximal, de aminoácidos esenciales (AAE) y no esenciales (AANE) de las dietas experimentales para juveniles de *Totoaba macdonaldi* utilizados en el EXP II.

Composición proximal, %	DC	AHP	AHPT	APS	APST
<b>Materia seca</b>					
Materia seca	93.2	95.4	94.9	91.5	92.1
Proteína cruda	50.4	49.9	50.5	49.1	50.2
Lípidos crudos	14.4	11.0	10.5	10.8	10.6
Almidón	8.8	17.8	17.2	16.7	16.0
Cenizas	13.9	14.3	13.9	12.8	14.7
ELN <sup>1</sup>	5.80	2.08	2.83	2.14	0.55
Energía total (kJ g <sup>-1</sup> dieta)	21.4	19.0	19.4	19.0	19.6
<b>Aminoácidos, g 100g<sup>-1</sup> dieta, materia seca</b>					
<b>AAE</b>					
Histidina	1.2	1.3	1.3	1.4	1.3
Arginina	3.5	3.1	3.4	3.3	3.4
Treonina	2.2	2.3	2.2	2.3	2.3
Valina	2.7	2.4	2.7	2.8	2.8
Metionina	1.7	1.6	1.6	1.6	1.6
Lisina	3.6	3.6	3.5	3.5	3.5
Isoleucina	2.6	2.3	2.4	2.2	2.2
Leucina	4.6	4.2	3.9	4.0	3.9
Fenilalanina	2.3	2.5	2.5	2.5	2.4
<b>AANE</b>					
Ácido aspártico	3.9	3.8	2.9	3.3	2.9
Serina	2.2	2.6	2.5	2.1	2.3
Ácido glutámico	7.3	7.7	7.0	7.2	6.6
Glicina	3.7	3.7	3.8	3.8	3.9
Alanina	3.5	3.3	3.3	3.3	3.5
Prolina	3.0	3.1	3.3	3.4	3.2
Tirosina	1.8	1.9	1.8	1.9	1.8
<b>Condicionamente esencial</b>					
Taurina	0.4	0.2	1.4	0.3	1.5

<sup>1</sup> Extrato libre de nitrógeno= 100- (humedad + proteína cruda + lípidos crudos + almidón + cenizas).

### **3.2 Condiciones de cultivo**

375 juveniles de *T. macdonaldi* fueron proporcionados por la Unidad en Biotecnología en Piscicultura (UBP), de la Facultad de Ciencias Marinas de la UABC, para el desarrollo del EXP II. Asimismo, el EXP II fue realizado en las instalaciones proporcionadas por la UBP.

Los 375 juveniles de totoaba, con peso inicial de  $20.3 \pm 2.5$  g, fueron distribuidos en grupos de 25 organismos por réplica (tanque). A cada tratamiento (dieta) le fueron asignadas 3 réplicas de manera aleatoria. El bioensayo de alimentación fue realizado en el sistema de cultivo utilizado en el EXP I (descrito en el apartado 2.2 de la presente tesis). Durante el transcurso del experimento, los parámetros de temperatura ( $23.5 \pm 0.5$  °C), oxígeno ( $6 \pm 0.5$  mg L<sup>-1</sup>) y fotoperiodo (12 h luz: 12 h oscuridad) fueron monitoreados y controlados. El período de alimentación tuvo una duración de 45 días. Los peces fueron alimentados hasta aparente saciedad 3 veces al día (8:00, 13:00 y 18:00h), 7 días a la semana. Se tomó especial cuidado para evitar que en los tanques no quedara alimento sin consumir por los peces. Al final de la última alimentación de cada día fue registrado el consumo del alimento por día por tanque ( $\pm 0.01$ g). Después de la primer y última alimentación del día (pasado un periodo de al menos 90 minutos) se procedía a realiza la limpieza individual de los tanques a través de sifoneo.

### **3.3 Biometrías y obtención de muestras**

Pala la obtención del peso y longitud de los peces, estos fueron previamente sometidos a un periodo de 24 horas de ayuno. Posteriormente, los peces fueron anestesiados y tomadas las mediciones individuales de peso ( $\pm 0.01$ g) y longitud ( $\pm 0.1$ cm) al inicio, mitad y

final del experimento. Al inicio del experimento se tomaron muestras de hígado, músculo y pez entero para los análisis de composición proximal inicial.

Después de la biometría final, los peces fueron alimentados de manera regular por 3 días para disminuir los efectos del estrés por manejo. Posteriormente los peces fueron sometidos a 24 horas de ayuno. Se utilizó la metodología descrita en el EXP I (apartado 2.3) para los análisis hematológicos, colecta de muestras para los análisis de composición proximal en hígado y pez entero, así como para la colecta de muestras de hígado para los análisis de las diferentes enzimas (descrito en el apartado 2.5.3 de la presente tesis) del metabolismo intermediario, del sistema de defensa antioxidante, para análisis de glucógeno y análisis histológicos.

### **3.4 Parámetros de crecimiento, eficiencia alimenticia y retención de nutrientes**

Los parámetros de crecimiento y eficiencia alimenticia determinados para este experimento están descritos en el apartado 2.4 de esta tesis.

### **3.5 Métodos analíticos**

Las metodologías para determinar la composición proximal de dietas y tejidos, composición de amino ácidos de las dietas, actividad de las enzimas del metabolismo intermediario y del sistema de defensa antioxidante, análisis de peroxidación de lípidos

hepática o LPO, análisis histopatológicos y análisis hematológicos, fueron realizadas de acuerdo con los métodos descritos previamente en el apartado 2.5 de esta investigación.

### **3.6 Análisis estadístico**

El diseño experimental fue aleatorio simple. Los resultados son reportados como promedio  $\pm$  error estándar (del grupo de datos). Los análisis de normalidad y homocedasticidad de los grupos de datos fueron realizados con las pruebas de Kolmogorov-Smirnov y Levene, respectivamente. Para determinar diferencias entre los resultados obtenidos en cada tratamiento experimental en comparación con el tratamiento control, fue realizado un análisis de comparación múltiple de Dunnet de ANOVA de una vía. Para determinar los efectos de los factores independientes de concentrado de proteína de soya (PS), taurina y de su interacción, se realizó un ANOVA de dos vías. Los resultados que presentaron 2 o más datos por réplica (tanque), fueron anidados dentro del tratamiento correspondiente. Para determinar la significancia de los cambios histopatológicos entre tratamientos, se realizó el análisis estadístico No-paramétrico de Mann-Whitney para determinar diferencias en comparaciones por pares de tratamientos. Para los diferentes análisis estadísticos se consideró como efectos o diferencias significativas cuando  $P < 0.05$ . Los análisis estadísticos fueron realizados a través del programa SPSS versión 20.0 para Windows (SPSS, Inc.).

### 3.7 Resultados

#### 3.7.1 Crecimiento y eficiencia alimenticia

Al final del experimento, los peces alimentados con las dietas AHPT y DC (69.5 y 71.5 g, respectivamente) no presentaron diferencias significativas en el peso final (Figura 10). Sin embargo, los tratamientos AHP, APS y APST (65.5, 60.0 y 59.6 g, valor promedio respectivamente) mostraron los valores menores de peso final en comparación a la DC.

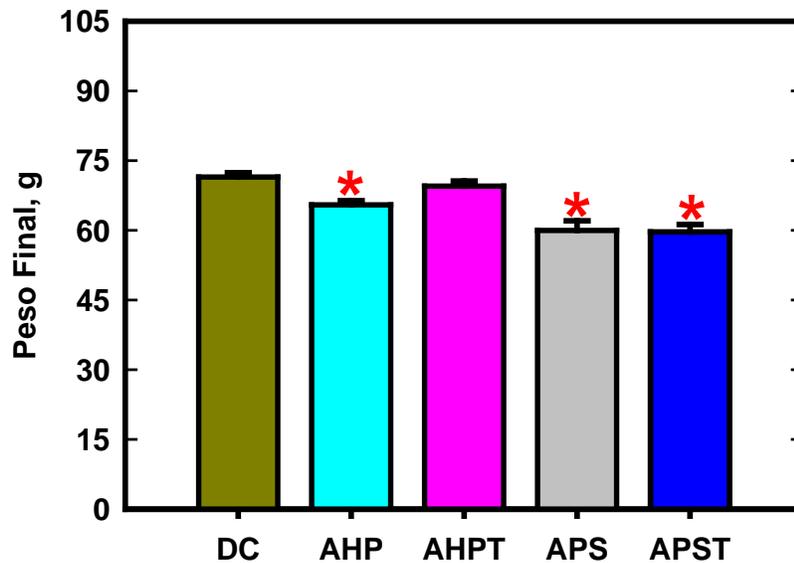


Figura 10. Peso final (promedio  $\pm$  error estándar,  $n=75$ ) de juveniles de *Totoaba macdonaldi* alimentados con almidón (A), concentrado de proteína de soya (PS) sin y con el suplemento taurina. Asteriscos sobre las columnas indican diferencias significativas, donde  $DC > *$ , cuando  $P < 0.05$ .

Los tratamientos AHPT y DC mostraron valores similares de peso ganado e ICD, mientras que el resto de las dietas experimentales presentaron los valores menores en estos parámetros (Tabla 13). Los resultados estadísticos indican que el factor PS (independiente de taurina) afectó significativamente los diferentes parámetros de crecimiento determinados en este estudio.

**Tabla 13** Crecimiento en peso y eficiencia alimenticia de juveniles de *Totoaba macdonaldi* alimentados con almidón, concentrado de proteína de soya sin y con el suplemento taurina.

Dietas	DC	AHP	AHPT	APS	APST	SEM <sup>1</sup>
Peso ganado, g kg <sup>-1</sup> ABW <sup>-1</sup> day <sup>-1</sup>	24.8	23.2†	24.4	21.7†	21.9†	0.4
ICD	3.16	2.87†	3.08	2.60†	2.62†	0.07
IDA, g kg <sup>-1</sup> ABW <sup>-1</sup> day <sup>-1</sup>	27.4	26.6	26.9	29.8‡	29.4‡	0.40
EA	1.16	1.15	1.17	0.98†	1.00†	0.02
EP	2.30	2.31	2.31	2.00†	2.00†	0.05
Sobrevivencia, %	100	98.7	98.7	100	100	1.19

**ANOVA de 2 vías (valores de P en tabla)**

	Fuentes de variación		
	PS <sup>2</sup>	Taurina	Interacción
Peso ganado	<0.01	0.16	0.29
ICD	<0.01	0.17	0.23
IDA	<0.01	0.80	0.98
EA	<0.01	0.55	0.97
EP	<0.01	0.99	0.92

1 SEM: error estándar. ICD: índice de crecimiento diario; IDA: ingesta diaria de alimentos; EA: eficiencia alimenticia; EP: eficiencia proteica. Valores en el mismo renglón con símbolos significan diferencias significativas entre las dietas experimentales (AHP, AHPT, APS, APST) y la dieta control (DC), donde ‡>DC>† cuando P < 0.05. En la parte inferior de la tabla se muestran los resultados del ANOVA de 2 VIAS donde el efecto significativo se presenta cuando P < 0.05. 2 Concentrado de proteína de soya (PS).

Los peces alimentados con las dietas AHP y AHPT no presentaron diferencias significativas en los valores de IDA, EA y EP respecto al tratamiento DC (Tabla 13). Por su parte, los tratamientos APS y APST mostraron un aumento significativo de la IDA ( $\geq 76.5 \text{ g kg}^{-1} \text{ABW}^{-1} \text{day}^{-1}$ ), pero con los valores menores de EA y EP ( $\leq 1.00$  y  $\leq 2.00$ , respectivamente) en comparación al tratamiento DC (70.3, 1.16 y 2.30, para IDA, EA y EP respectivamente). Los resultados del análisis de ANOVA de 2 vías indican que la combinación de PS (independiente de taurina) fue el factor que influyó en el aumento de IDA y en la disminución de la EA y EP en los juveniles de totoaba. Por otra parte, tanto los tratamientos experimentales, como la DC, mostraron valores de sobrevivencia mayores al 98%.

### ***3.7.2 Retención de nutrientes y composición proximal de pez entero y músculo***

Al final del experimento, la ingesta de nutrientes (nitrógeno, lípidos y energía total) fue similar entre los tratamientos AHP, AHPT y la DC (1.74-1.78, 2.44-2.56 y 4.22-4.61  $\text{g kg ABW}^{-1} \text{ día}^{-1}$ , para nitrógeno, lípidos y energía, respectivamente); mientras que los tratamientos APS y APST presentaron los mayores valores en ingesta de nitrógeno y lípidos ( $\geq 2.06$  y  $\geq 2.95 \text{ g kg ABW}^{-1} \text{ día}^{-1}$ , respectivamente) (Tabla 14).

**Tabla 14.** Retención de nutrientes en juveniles de *Totoaba macdonaldi* alimentados con almidón, concentrado de proteína de soya sin y con el suplemento taurina.

Dietas	DC	AHP	AHPT	APS	APST	SEM <sup>1</sup>
<i>Nitrógeno</i>						
Ingesta (g kg ABW <sup>-1</sup> día <sup>-1</sup> )	1.74	1.78	1.78	2.06‡	2.09‡	0.05
Retención (g kg ABW <sup>-1</sup> día <sup>-1</sup> )	0.43	0.42	0.49	0.47	0.43	0.02
Retención (%)	24.7	23.7	27.5	22.6	20.5	0.90
<i>Lípidos</i>						
Ingesta (g kg ABW <sup>-1</sup> día <sup>-1</sup> )	2.44	2.56	2.45	2.95‡	2.99‡	0.07
Retención (g kg ABW <sup>-1</sup> día <sup>-1</sup> )	0.41	0.54	0.55	0.44	0.44	0.02
Retención (%)	16.8	21	22.4	15.2	14.9	1.10
<i>Energía</i>						
Ingesta (kJ kg ABW <sup>-1</sup> día <sup>-1</sup> )	4.61	4.25	4.28	4.98	5.11‡	0.11
Retención (kJ kg ABW <sup>-1</sup> día <sup>-1</sup> )	0.85	0.86	0.98	0.93	0.85	0.03
Retención (%)	18.4	20.3	22.8‡	18.6	16.7	0.70

**ANOVA de 2 vías (valores de P en tabla)**

	Fuentes de variación		
	PS <sup>2</sup>	Taurina	Interacción
Ingesta Nitrógeno	<b>&lt;0.01</b>	0.79	0.77
Retención (g kg ABW <sup>-1</sup> día <sup>-1</sup> )	0.80	0.72	0.20
Retención (%)	<b>0.03</b>	0.61	0.10
Ingesta lípidos	<b>&lt;0.01</b>	0.68	0.39
Retención (g kg ABW <sup>-1</sup> día <sup>-1</sup> )	0.09	0.90	0.92
Retención (%)	<b>0.01</b>	0.79	0.69
Ingesta Energía	<b>&lt;0.01</b>	0.59	0.75
Retención (kJ kg ABW <sup>-1</sup> día <sup>-1</sup> )	0.67	0.78	0.19
Retención (%)	<b>0.01</b>	0.78	0.09

1SEM: error estándar. Valores en el mismo renglón con símbolos significan diferencias significativas entre las dietas experimentales (AHP, AHPT, APS, APST) y la dieta control (DC), donde ‡>DC>† cuando P < 0.05. En la parte inferior de la tabla se muestran los resultados del ANOVA de 2 VIAS donde el efecto significativo se presenta cuando P < 0.05. 2 Concentrado de proteína de soya (PS).

Los valores más altos de retención de nutrientes fueron observados para el tratamientos AHPT, la cual fue significativa para la retención de energía total (5.11 kJ kg ABW<sup>-1</sup> día<sup>-1</sup>). Por otro lado, los valores de retención de nutrientes observados en los tratamientos experimentales AHP, APS y APST no mostraron diferencias significativas con respecto al tratamiento DC. Los resultados de ANOVA de 2 vías indican que, por un lado, el

factor PS (independiente de taurina) indujo el aumento de la ingesta, pero en cuanto a su retención el factor PS fue causa de su disminución.

La composición proximal del cuerpo entero de los juveniles de totoaba no resultó significativamente influenciada por la composición de las diferentes dietas experimentales (Tabla 15). Asimismo, la composición proximal de humedad y lípidos del músculo de los juveniles de totoaba alimentados con las dietas experimentales no resultó significativamente diferente al tratamiento DC (Tabla 15). Sin embargo, el contenido de proteínas resultó significativamente menor en el tratamiento APS (18.8%) en comparación a DC (20.3%). El análisis de ANOVA de 2 vías muestra que el factor PS (independiente de taurina) indujo una significativa tendencia de acumulación de lípidos y cenizas en el tejido muscular de los juveniles de totoaba. Por su parte, el factor taurina (independiente de PS) también mostró tener un efecto significativo en el aumento de cenizas en el músculo de totoaba.

**Tabla 15.** Composición corporal y muscular (peso húmedo) de juveniles de *Totoaba macdonaldi* alimentados con almidón, concentrado de proteína de soya sin y con el suplemento taurina.

<i>Composición proximal, %</i>	DC	AHP	AHPT	APS	APST	SEM <sup>1</sup>
<b>Pez entero</b>						
Humedad	83.5	83.3	81.6	82.3	83.4	0.50
Proteína	11.7	11.5	12.9	12.3	11.6	0.32
Lípidos	1.84	2.23	2.28	1.94	1.94	0.08
Cenizas	2.74	2.63	2.96	2.85	2.66	0.08
<b>Músculo</b>						
Humedad	77.0	77.8	77.5	78.0	77.1	0.20
Proteína	20.3	19.7	19.8	18.8†	19.9	0.20
Lípidos	1.48	1.24	1.45	1.88	1.52	0.10
Cenizas	1.26	1.26	1.33	1.39‡	1.45‡	0.02

**ANOVA de 2 vías (valores de P en tabla)**

	Fuentes de variación		
	PS <sup>2</sup>	Taurina	Interacción
<b>Pez entero</b>			
Humedad	0.70	0.81	0.20
Proteína	0.71	0.64	0.19
Lípidos	0.08	0.88	0.89
Cenizas	0.83	0.64	0.14
<b>Músculo</b>			
Humedad	0.80	0.22	0.60
Proteína	0.40	0.17	0.23
Lípidos	<b>0.03</b>	0.60	0.08
Cenizas	<b>&lt;0.01</b>	<b>0.02</b>	0.88

1SEM: error estándar. Valores en el mismo renglón con símbolos significan diferencias significativas entre las dietas experimentales (AHP, AHPT, APS, APST) y la dieta control (DC), donde ‡>DC>† cuando P < 0.05. En la parte inferior de la tabla se muestran los resultados del ANOVA de 2 VIAS donde el efecto significativo se presenta cuando P < 0.05. 2 Concentrado de proteína de soya (PS).

### 3.7.3 Composición del hígado e índice hepatosomático (IHS)

La composición de humedad, proteínas, glucógeno y cenizas del hígado de los peces alimentados con las diferentes dietas experimentales no presentó diferencias significativas con respecto al tratamiento DC (Tabla 16).

**Tabla 16.** Composición del hígado (peso húmedo) e índice hepatosomático (IHS) de juveniles de *Totoaba macdonaldi* alimentados almidón, concentrado de proteína de soya sin y con el suplemento taurina.

Composición hígado, %	DC	AHP	AHPT	APS	APST	SEM <sup>1</sup>
Humedad	66.1	71.0	69.8	69.3	67.1	0.74
Proteína	9.78	10.03	9.95	9.68	9.61	0.34
Lípidos	13.99	9.33†	9.91†	12.60	13.37	0.73
Glucógeno	8.00	7.45	8.92	7.13	8.55	0.23
Cenizas	1.25	1.39	1.32	1.26	1.22	0.02
IHS	0.92	0.85	0.95	1.01	1.06	0.03

**ANOVA de 2 vías (valores de P en tabla)**

	Fuentes de variación		
	PS <sup>2</sup>	Taurina	Interacción
Humedad	0.13	0.22	0.96
Proteína	0.73	0.94	0.99
Lípidos	<b>0.03</b>	0.62	0.95
Glucógeno	0.43	<b>&lt;0.01</b>	0.96
Cenizas	<b>&lt;0.01</b>	<b>0.03</b>	0.49
IHS*	0.11	0.33	0.75

1 SEM: error estándar. Valores en el mismo renglón con símbolos significan diferencias significativas entre las dietas experimentales (AHP, AHPT, APS, APST) y la dieta control (DC), donde ‡>DC>† cuando  $P < 0.05$ . En la parte inferior de la tabla se muestran los resultados del ANOVA de 2 VIAS donde el efecto significativo se presenta cuando  $P < 0.05$ .  
2 Concentrado de proteína de soya (PS).

No obstante, los resultados también indican que el factor taurina (independiente de PS) produjo una tendencia significativa de acumulación de glucógeno hepático en los peces alimentados con las dietas suplementadas con 1% de este nutriente (8.55 y 8.92%, para APST y AHPT respectivamente) con respecto a los tratamientos no suplementados (7.13 y 7.45%, para APS y AHP respectivamente). Por su parte, los tratamientos AHP y AHPT presentaron los menores contenidos de lípidos hepáticos (9.33 y 9.91%, respectivamente) en comparación al tratamiento DC (13.99%). Además, se observó que el factor taurina (independiente de PS) produjo una tendencia de aumento en el contenido de lípidos

hepáticos (13.31 y 9.91%, para APST y AHPT respectivamente) con respecto a los tratamientos no suplementados (9.33 y 12.60%, para APS y AHP respectivamente).

El análisis de ANOVA de 2 vías indica que tanto el factor PS como la taurina (pero independientes entre sí) indujeron una tendencia de disminución en el contenido de cenizas hepáticas. Por otra parte, las diferentes dietas experimentales no provocaron efectos significativos en el IHS de los juveniles de totoaba (Tabla 16).

#### ***3.7.4 Actividad de enzimas relacionadas con el metabolismo intermediario***

Como se puede observar en la Tabla 17, las dietas suplementadas con taurina (AHPT y APST) indujeron los valores más altos en la actividad de las enzimas del catabolismo de AA, lo cual resultó significativo para la enzima ALAT en el tratamiento AHPT (305 mU mg<sup>-1</sup> proteína) en comparación al tratamiento DC (219 mU mg<sup>-1</sup> proteína). Por el contrario, los tratamientos AHP y APS mostraron los valores más bajos de actividad de las enzimas del catabolismo de AA, donde la actividad de GDH resultó significativamente disminuida en el tratamiento APS (96 mU mg<sup>-1</sup> proteína) en comparación con DC (171 mU mg<sup>-1</sup> proteína).

**Tabla 17.** Actividad específica de enzimas relacionadas con el metabolismo intermediario hepático de juveniles de *Totoaba macdonaldi* alimentados con almidón, concentrado de proteína de soya sin y con el suplemento taurina. Los datos se expresan como mU mg<sup>-1</sup> proteína.

Dietas	DC	AHP	AHPT	APS	APST	SEM <sup>1</sup>
<i>Catabolismo de aminoácidos</i>						
Aspartato aminotransferasa (ALAT)	727	645	953	572	650	46
Alanina aminotransferasa (ASAT)	219	195	305‡	184	208	13
Glutamato deshidrogenasa (GDH)	171	124	198	96†	121	10
<i>Glucólisis</i>						
Hexoquinasa (HK)	13.5	15.0	16.8	13.5	12.9	0.60
Glucoquinasa (GK)	7.96	5.98	4.34†	3.46†	5.82	0.65
<i>Gluconeogénesis</i>						
Fructosa-1,6-bisfosfatasa (FBPasa)	28.5	29.2	36.6	25.8	28.3	1.5
<i>Lipogénesis</i>						
Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD)	43.5	45.1	65.0‡	44.8	47.1	2.9
Enzimas málicas (EM)	17.3	18.9	17.3	17	17.3	0.7
Ácido graso sintetasa (FAS)	2.13	2.11	1.89	2.18	2.47	0.09

**ANOVA de 2 vías (valores de P en tabla)**

	Fuentes de variación		
	PS <sup>2</sup>	Taurina	Interacción
ALAT	0.12	0.11	0.32
ASAT	0.07	<b>0.03</b>	0.14
GDH	0.05	0.06	0.31
HK	0.09	0.66	0.42
GK	0.79	0.81	0.33
FBPasa	0.14	0.21	0.52
G6PD	0.25	0.17	0.27
EM	0.63	0.72	0.63
FAS	0.19	0.88	0.30

<sup>1</sup>SEM: error estándar. La actividad de las diferentes enzimas está expresada en mU mg<sup>-1</sup> proteína. Valores en el mismo renglón con símbolos significan diferencias significativas entre las dietas experimentales (AHP, AHPT, APS, APST) y la dieta control (DC), donde ‡>DC>† cuando P < 0.05. En la parte inferior de la tabla se muestran los resultados del ANOVA de 2 VIAS donde el efecto significativo se presenta cuando P < 0.05. <sup>2</sup> Concentrado de proteína de soya (PS).

Los resultados estadísticos del análisis de ANOVA de 2 vías no fueron significativos para GDH, sin embargo, se puede observar que los valores de P para PS y taurina (P= 0.05 y 0.06, para PS y taurina respectivamente) se encuentran en el límite de la significancia.

Respecto a la glucolisis, si bien se observó una menor actividad de GK en los tratamientos AHPT y APS (con valores de 4.34 y 3.46 mU mg<sup>-1</sup> proteína) comparado a DC (7.96 mU mg<sup>-1</sup> proteína), la glucolisis en general (actividad de HK y GK) no se mostró significativamente influenciada por efectos independientes de los factores PS y taurina (Tabla 17). La gluconeogénesis y lipogénesis no resultaron significativamente influenciadas por la composición de las dietas experimentales en comparación al control (Tabla 17), aunque se observó que el tratamiento AHPT presentó los valores más altos en la actividad de G6PD (65 mU mg<sup>-1</sup> proteína) comparado a DC (43.7 mU mg<sup>-1</sup> proteína).

### ***3.7.5 Estado del sistema antioxidante y peroxidación de lípidos***

En la Tabla 18 se puede observar que el tratamiento AHPT presentó los valores más altos de actividad de las diferentes enzimas antioxidantes, los cuales resultaron significativos para GPX (39.3 mU mg<sup>-1</sup> proteína) en comparación a DC (26.1 mU mg<sup>-1</sup> proteína); Asimismo, el tratamiento AHPT mostró los vaores más bajos de LPO.

**Tabla 18** Actividad específica de enzimas antioxidantes y peroxidación de lípidos en hígado de juveniles de *Totoaba macdonaldi* alimentados con almidón, concentrado de proteína de soya sin y con el suplemento taurina.

Dietas	DC	AHP	AHPT	APS	APST	SEM <sup>1</sup>
Superóxido dismutasa, U mg <sup>-1</sup> proteína	88.6	84.0	96.1	93.1	89.5	3.9
Catalasa, U mg <sup>-1</sup> proteína	106.4	107.1	128.8	99.3	115.6	5.6
Glutación peroxidasa, mU mg <sup>-1</sup> proteína	3.41	3.92	4.23	3.71	4.18	0.19
Glutación reductasa, mU mg <sup>-1</sup> proteína	26.1	26.0	39.3‡	20.1	17.6	2.4
Peroxidación de lípidos, nmol MDA g tejido <sup>-1</sup>	8.83	10.45‡	7.55	10.43‡	8.79	0.32

**ANOVA de 2 vías (valores de P en la tabla)**

	Fuentes de variación		
	PS <sup>2</sup>	Taurina	Interacción
Superóxido dismutasa	0.93	0.74	0.55
Catalasa	0.52	0.25	0.87
Glutación peroxidasa	0.06	0.42	0.25
Glutación reductasa	0.83	0.53	0.90
Peroxidación de lípidos	0.48	<b>0.03</b>	0.47

1 SEM: error estándar. Valores en el mismo renglón con símbolos significan diferencias significativas entre las dietas experimentales (AHP, AHPT, APS, APST) y la dieta control (DC), donde ‡>DC>† cuando  $P < 0.05$ . En la parte inferior de la tabla se muestran los resultados del ANOVA de 2 VIAS donde el efecto significativo se presenta cuando  $P < 0.05$ .

2 Concentrado de proteína de soya (PS).

Por otra parte, los peces alimentados con las dietas AHP y APS (sin taurina suplementada) presentaron un incremento significativo en los valores de LPO (10.45 y 10.43 nmol MDA g tejido<sup>-1</sup>, respectivamente) con respecto al tratamiento DC (8.83 nmol MDA g tejido<sup>-1</sup>). Los análisis estadísticos indican que el factor taurina (independiente de PS) produjo una influencia significativa en la disminución de los niveles de LPO en el hígado de juveniles de totoaba.

### 3.7.6 Histopatología del hígado

Los resultados más notables de los análisis histopatológicos del hígado de juveniles de totoaba en el presente experimento, fue la vacuolación generalizada con desplazamiento

nuclear a la periferia (incluso no visibles) de los hepatocitos (abreviado como ND) en los diferentes tratamientos experimentales (Figura 11b-e).

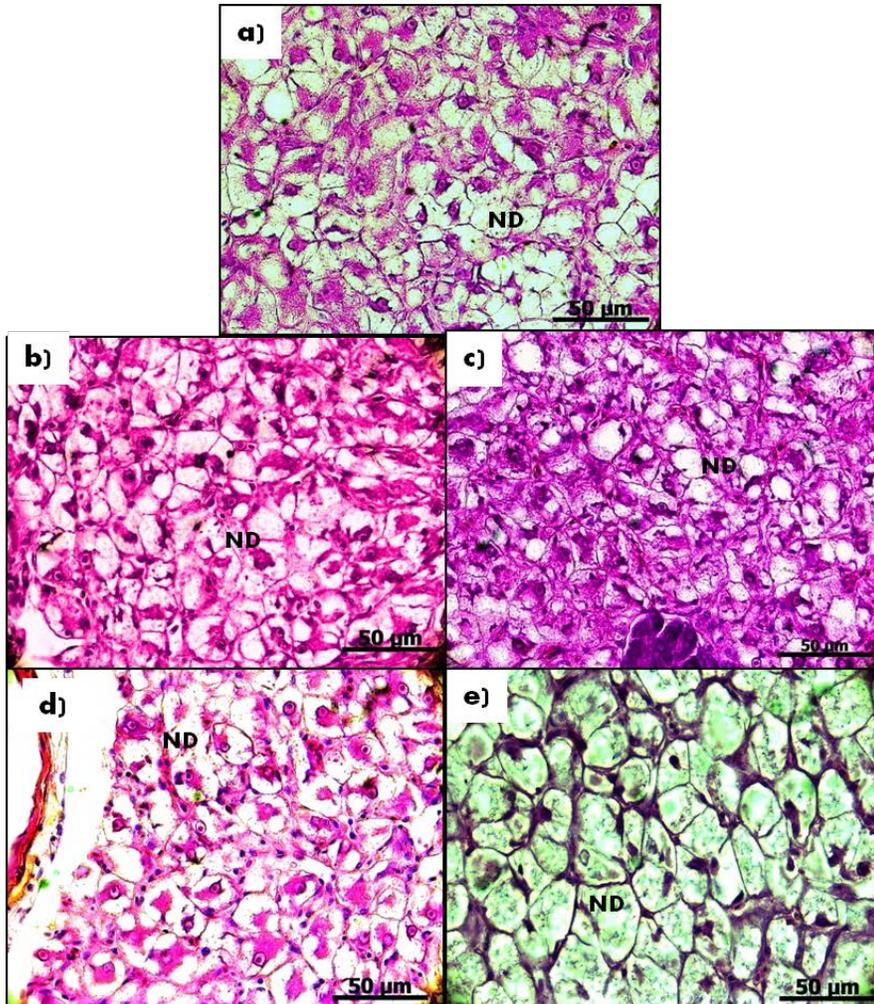


Figura 11. Micrografía de hígado de juveniles de *Totoaba macdonaldi* alimentados con almidón, proteína de soya sin y con el suplemento taurina. Tinción H&E. Vista a 40X. a) Dieta DC: Hepatocitos con vacuolación y núcleos desplazados o ausentes (ND); b) Dieta AHP; c) Dieta AHPT; d) Dieta APS; e) Dieta APST.

Cabe mencionar que el tratamiento DC también mostró la presencia generalizada de vacuolas hepáticas (Figura 11a). Asimismo, los análisis estadísticos indican que no hubo diferencias significativas en las variaciones histológicas entre los tratamientos

experimentales, los cuales mostraron un valor máximo de 14 para el índice hepático (Tabla 19).

**Tabla 19.** Índice del patrón de alteración e índice de alteración hepática de juveniles de *Totoaba macdonaldi* alimentados con almidón, concentrado de proteína de soya sin y con el suplemento taurina.

	DC	AHP	AHPT	APS	APST
Perturbación circulatoria <sup>1</sup>	0	0	0	0	0
Vacuolización <sup>1</sup>	12	12	12	12	12
Cambios nucleares <sup>1</sup>	2	2	2	2	2
Agregados inflamatorios <sup>1</sup>	0	0	0	0	0
Índice hepático <sup>2</sup>	14	14	14	14	14

Valores de mediana (n= 9). La tabla muestra los resultados del análisis estadístico de la prueba U de Mann-Whitney, donde los valores en el mismo renglón sin símbolos significan sin diferencias significativas entre las dietas experimentales (PS30, PS30T, PS60, PS60T) y la dieta control (DC), cuando  $P < 0.05$ .

1 El índice de cada patrón de alteración (perturbación circulatoria, vacuolización, cambios nucleares y agregados inflamatorios) se obtuvo de la sumatoria de alteraciones relevantes (ver anexo 1.2), donde el incremento de este índice indica aumento del daño de leve a moderado (reversible) o severo (irreversible).

2 El índice hepático se obtuvo de la sumatoria de los índices de los patrones de alteración evaluadas (perturbación circulatoria, vacuolización, cambios nucleares y agregados inflamatorios), donde el incremento de este índice es un indicador del aumento de la alteración y daño hepático.

### 3.7.7 Hematología y bioquímica sanguínea

En la Tabla 20 se puede observar que los peces alimentados con la dieta AHP presentaron los valores más altos de HT, HB, MVC y MCH (31.9 %, 6.34 g dL<sup>-1</sup>, 122 fL y 24.7 pg, respectivamente) en comparación a la DC (25.9%, 5.41 g dL<sup>-1</sup>, 98.8 fL y 20.6 pg, respectivamente). Por su parte, el tratamiento AHPT resultó con los mayores valores de EC y

HB ( $3.06 \times 10^6$  cel  $\mu\text{L}^{-1}$  y  $6.15$  g  $\text{dL}^{-1}$ , respectivamente) comparado con la DC ( $2.65 \times 10^6$  cel  $\mu\text{L}^{-1}$  y  $5.41$  g  $\text{dL}^{-1}$ , respectivamente).

**Tabla 20.** Hematología y bioquímica del plasma sanguíneo de juveniles de *Totoaba macdonaldi* alimentados con almidón, concentrado de proteína de soya sin y con el suplemento taurina.

Dietas	DC	AHP	AHPT	APS	APST	SEM <sup>1</sup>
Eritrocitos circulantes (EC), $1 \times 10^6$ cel $\mu\text{L}^{-1}$	2.65	2.62	3.06‡	2.83	2.84	0.40
Hematocrito (HT), %	25.9	31.9‡	28.0	24.4	25.1	0.50
Hemoglobina (HB), g $\text{dL}^{-1}$	5.41	6.34‡	6.15‡	5.26	5.75	0.08
Media del volumen celular (MVC), fL	98.8	122.0‡	91.9	86.1	89.5	2.00
Media de HB corpuscular (MHC), pg	20.6	24.7‡	20.3	18.5	20.5	0.40
Media de concentración HB (MCHC), %	21.2	21.4	22.2	21.7	23.1‡	0.40
Albumina (AL), g $\text{dL}^{-1}$	0.44	0.48	0.61‡	0.53‡	0.55‡	0.01
Globulinas (Glb), g $\text{dL}^{-1}$	1.84	1.88	1.83	1.73	1.94	0.02
Razón AL:Glb	0.24	0.27‡	0.33‡	0.28‡	0.28‡	0.01
Glucosa (GLU), mg $\text{dL}^{-1}$	43.5	35.4	33.6	37.5	38.6	1.10

**ANOVA de 2 vías (valores de P en la tabla)**

	Fuentes de variación		
	PS <sup>2</sup>	Taurina	Interacción
EC	0.84	<b>0.04</b>	0.06
HT	<b>0.01</b>	0.39	0.21
HB	<b>&lt;0.01</b>	0.26	<b>0.04</b>
MVC	<b>&lt;0.01</b>	<b>0.03</b>	<b>0.01</b>
MHC	<b>&lt;0.01</b>	0.15	<b>&lt;0.01</b>
MCHC	0.67	0.44	0.84
AL	0.78	<b>0.02</b>	0.06
Glb	0.58	0.15	0.08
AL:Glb	<b>0.01</b>	<b>&lt;0.01</b>	<b>&lt;0.01</b>
GLU	0.12	0.90	0.46

1 SEM: error estándar. Valores en el mismo renglón con símbolos significan diferencias significativas entre las dietas experimentales (AHP, AHPT, APS, APST) y la dieta control (DC), donde ‡>DC>‡ cuando  $P < 0.05$ . En la parte inferior de la tabla se muestran los resultados del ANOVA de 2 VIAS donde el efecto significativo se presenta cuando  $P < 0.05$ .

2 Concentrado de proteína de soya.

El análisis de ANOVA de 2 vías indica, por un lado, que el factor PS (independiente de taurina) influyó de manera significativa sobre la mayoría de las variables hemáticas (HT, HB, MVC, MHC, MCHC), mientras que el factor taurina (independiente de PS) contribuyó al aumento de EC y disminución de la MVC. Por otro lado, se observó un efecto interacción de los factores (PS\*taurina) en las variables HB, MVC y MCH.

Respecto a la bioquímica del plasma sanguíneo, en la Tabla 20 se muestra que los peces alimentados con las dietas experimentales presentaron los valores más altos de AL y AL: Glb ( $\geq 0.53$  g dL<sup>-1</sup> y  $\geq 0.27$ , respectivamente), los cuales resultaron significativos en comparación a DC ( $\geq 0.44$  g dL<sup>-1</sup> y  $\geq 0.24$ , respectivamente). Además, el análisis de ANOVA de 2 vías muestra que el factor taurina (independientes de PS) influyó en el aumento de los valores de AL y AL: Glb; no obstante, un efecto significativo de interacción de los factores (PS\*taurina) fue observada en la razón AL: Glb. Por otra parte, no se observaron diferencias significativas en los valores de Glb y GLU entre las diferencias experimentales y DC.

### 3.8 Discusiones

Existe información que demuestra que la utilización de carbohidratos por los peces carnívoros está en relación a la fuente de este nutriente, de su complejidad molecular, procesos de tratamiento y niveles de inclusión en las dietas (Krogdahl et al., 2005; Enes et al., 2009, 2011; Oliva-Teles, 2012). En el presente estudio, la disminución del contenido de lípidos del 14 al 11% y el consecuente aumento de los carbohidratos (almidón gelatinizado) del 10 al 18% (sin el suplemento de taurina) indujo la disminución de alrededor del 10% en la tasa de crecimiento de los juveniles de totoaba. Nuestros resultados difieren de lo reportado por González Acevedo (2011), quien reporta que los juveniles de totoaba pueden ser alimentados con hasta 25% de almidón gelatinizado en sus dietas sin afectar su respuesta de crecimiento. El autor de esa investigación sugiere que el probiótico que adicionaron en las dietas experimentales pudo haber participado en beneficio de la utilización de carbohidratos por parte de la totoaba. En el presente trabajo no fue utilizado un probiótico, no obstante, la suplementación de 1% de taurina en las dietas con 18% de carbohidratos (sin PS) estimuló a la recuperación de los parámetros de crecimiento comparables al control. Kim et al. (2007 y 2008) reportan que los juveniles del lenguado japonés alimentados con dietas elaboradas a base de harina de pescado (a la cual le fue extraída la taurina) pero con diferentes niveles de lípidos en las dietas, mostraron un aumento en los parámetros de crecimiento cuando las dietas fueron suplementadas con taurina (hasta en 1.5% de la dieta). Este grupo de investigadores indican además que la suplementación de taurina incrementó el contenido de ácidos biliares conjugados en el saco biliar del lenguado japonés. Debido a que los ácidos biliares conjugados con taurina desempeñan un papel principal para la digestibilidad de los

lípidos, los autores sugieren que el incremento del crecimiento del lenguado japonés estuvo relacionado con una mejor eficiencia en la utilización de lípidos de la dieta. Recientes estudios sobre caracterización de lipasas en juveniles de totoaba, han reportado que para esta especie, el taurocolato de sodio es un activador significativo para las lipasas que poseen en su sistema digestivo (Rueda López, 2013). En nuestro trabajo se utilizaron niveles de 14% lípidos en la dieta control y de ~11% en las dietas experimentales, ambos niveles reportados como niveles adecuados para el crecimiento de los juveniles de totoaba (Vizcaíno Pérez, 2008; González Acevedo; 2011; Rueda López et al., 2011). En este sentido, nuestros resultados de crecimiento sugieren que si bien la sola inclusión de almidón (18%) no condujo a un uso eficiente de los carbohidratos como una fuente de energía, y por lo tanto, al ahorro de energía desde los lípidos y proteínas para el crecimiento, la suplementación de 1% de taurina (sin PS) parece haber participado en una mayor utilización de los nutrientes que se reflejó en la respuesta de crecimiento observada en el tratamiento AHPT. Asimismo, otro de los efectos positivos de la suplementación de taurina en el crecimiento de totoaba puede también estar relacionados con su desempeño en los procesos de regulación fisiológica y del manejo del daño oxidativo en esta especie (lo cual se discute más adelante).

Por otra parte, el factor PS (independientemente de taurina) generó la mayor tasa de consumo de alimento en los juveniles de totoaba, pero los menores valores del ICD, de EA y de EP. Estudios de Takagi et al. (2008) reportan que las dietas elaboradas a base de proteína vegetal (principalmente concentrado de proteína de soya) con 22% de carbohidratos inducen, en el jurel cola amarilla, a un aumento en los requerimientos de taurina en esta especie. Los autores señalan que bajo tales condiciones alimentarias, el jurel cola amarilla requiere de hasta 4.5% de taurina de la dieta para mantener valores de crecimiento y salud comparables

a los peces alimentados con dietas a base de harina pescado y con 10% de carbohidratos. Otros autores reportan que las necesidades de taurina pueden estar en función de la edad o peso corporal de los peces, así como de las condiciones nutricionales previas a las del desarrollo experimental (Matsunari et al., 2008; Takagi et al., 2006; Kim et al., 2007; Takagi et al., 2010; El-Sayed, 2013). Además, se conoce que los carbohidratos con diferentes grados de digestibilidad y cantidad generan diferentes tasas de utilización del alimento en el tracto digestivo, lo que a su vez ocasiona cambios en la composición de la flora intestinal y del propio metabolismo bacteriano (Oliva-Teles, 2012). Las bacterias, a diferencia de los organismos eucariontes, se caracterizan por utilizar taurina como uno de sus sustratos preferidos para la obtención de energía (Cook y Denger et al., 2006). En el presente estudio no fueron evaluadas las condiciones nutricionales de los juveniles de totoaba previo desarrollo del experimento. Sin embargo, la disminución de los valores de crecimiento en el tratamiento AHP en comparación al DC, sugieren que, si bien las dietas DC y AHP contenían cantidades similares de taurina desde la harina de pescado, el aumento de los carbohidratos de 10 a 18% pudo repercutir en la disminución de la disponibilidad de la taurina desde la dieta AHP. Por lo que suplementar 1% de taurina (dieta AHPT) esto fué suficiente para mantener los requerimientos de totoaba para obtener valores de crecimiento comparables al DC. Adicional a esto, también es posible que se haya producido un aumento de la demanda de taurina a causa de la inclusión de PS en las dietas (como se ha discutido previamente en el apartado 2.8 de esta tesis). Por lo tanto, pese a suplementar 1% de taurina en la dieta APST, ésta cantidad pudo no estar en suficiente cantidad para cubrir los requerimientos de los juveniles de totoaba bajo tales condiciones nutricionales, y por lo tanto, provocar la disminución en la tasa de crecimiento en el tratamiento APST.

Está reportado que la suplementación de 0.5% taurina promovió la síntesis de proteínas corporales en *Scophthalmus maximus* y *D. dentex* (Chatzifotis et al., 2008; Li et al., 2009; Qi et al., 2012). A diferencia de lo reportado para las especies *S. maximus* y *D. dentex*, en el presente trabajo se observó que la composición corporal de la totoaba presentó valores similares entre tratamientos experimentales (AHP, AHPT, APS y APST) y el control (DC). Por otro lado, si bien la retención de nitrógeno y lípidos resultó similar entre los tratamientos experimentales en comparación al control, los peces alimentados con la dieta AHPT mostraron los valores más altos en la retención de nitrógeno y lípidos, pero además mostraron un aumento significativo de la retención de energía total en comparación a la DC. Recientes estudios en juveniles de totoaba han encontrado que la actividad de las enzimas que participan en digestión de lípidos son dependientes de las sales biliares conjugadas con taurina (Rueda López, 2013). Por lo que es posible que nuestros resultados estén relacionados con el papel que juega la taurina en el aumento de la digestibilidad de lípidos desde la dieta.

Por otra parte, nuestros resultados muestran que el factor PS provocó una tendencia de aumento significativo en la ingesta de nutrientes pero con disminución en su retención. Resultados similares están reportado por Nguyen et al. (2011) para los juveniles de jurel cola amarilla que fueron alimentados con diferentes variedades de concentrado de proteína de soya. Los investigadores indican que los peces alimentados con estas dietas mostraron un incremento en su ingesta, pero obtuvieron una menor eficiencia alimenticia y del crecimiento. Asimismo, Nguyen et al. (2011) reportan que el contenido de lípidos hepáticos resultó disminuído con el uso de los diferentes productos de la soya. Los autores señalan que estos resultados pudieron ser provocados debido a que el uso de las diferentes variedades de proteína de soya indujo a una menor digestibilidad de los lípidos de la dieta. No obstante, a

diferencia de la respuesta observada en el jurel cola amarilla, nuestros resultados muestran que, los juveniles de totoaba alimentados con las dietas elaboradas con 18% de almidón sin PS (dietas AHP y AHPT) obtuvieron los menores valores en el contenido de lípidos hepáticos en comparación de las dietas elaboradas con PS (APS y APST); asimismo, nuestros resultados indican que el factor PS indujo a la acumulación de lípidos hepáticos. Nuestros resultados también difieren de lo reportado por González Acevedo (2011) quien indicó que la acumulación de lípidos en el hígado de totoaba estuvo más relacionada con el contenido de lípidos en la dieta que con los carbohidratos; ya que en el presente estudio las 4 dietas experimentales contenían cantidades similares de lípidos (~12%) y carbohidratos (~18%). Además, el metabolismo de síntesis de los lípidos en el hígado de totoaba (ver actividad de enzimas lipogénicas, Tabla 17) no resultó estimulado o disminuido en los tratamientos APS y APST, en donde se encontró la mayor acumulación de esta reserva (lípidos), por lo que nuestros resultados sugieren que la acumulación de lípidos hepáticos en totoaba no fue provocado por una mayor absorción de los lípidos desde las dietas elaboradas con PS; por el contrario, nuestros datos parecen indicar que el aumento de carbohidratos a 18% más la inclusión de PS en la dietas, pudieron haber interferido en los procesos de movilización de los lípidos hepáticos de la totoaba, y por lo tanto, verse esto reflejado en un aparente aumento del contenido de lípidos en el hígado (como se observó en el EXP I de esta tesis). Lo anterior pudiera explicar el incremento en la ingesta de alimento que se observó en los organismos alimentados con las dietas elaboradas con PS, en un intento aparente de los peces por cubrir sus demandas energéticas. Por otra parte, en el presente estudio se observó que la acumulación de glucógeno hepático fue similar entre los diferentes tratamientos y el control. Sin embargo, los análisis estadísticos indican que la suplementación de 1% de taurina en las dietas (independiente de PS) indujo una tendencia significativa con mayor acumulación de

glucógeno en el hígado. Nuestros resultados parecen coincidir con lo reportado en mamíferos, en los cuales se ha demostrado que la taurina auxilia en la modulación de la glucosa a través de la regulación de la expresión de genes que participan en la funcionalidad de las células- $\beta$  del páncreas, y por lo tanto, en la secreción de insulina, del transportador de glucosa GLUT-2 y de la regulación de la actividad enzimática de la GK (Carneiro et al., 2009).

Se reporta que los peces carnívoros muestran preferencia por el catabolismo de los AA y/o de los AG para la obtención de energía, mientras que los carbohidratos de la dieta parecen tener menor influencia en el metabolismo intermediario de estos organismos (Hemre et al., 2002; Enes et al., 2009; Oliva-Teles, 2012). Asimismo, en el presente trabajo se observó, en general, que la actividad de las enzimas clave de las vías del catabolismo de AA, gluconeogenesis y de glucolisis hepáticas de los juveniles de totoaba no fueron influenciadas por el incremento de los carbohidratos en un 18% (dieta AHP) en comparación al 10% de carbohidratos contenidos en la dieta DC. Está reportado que para la especie *D. dentex* el aumento de los carbohidratos en la dieta no generó cambios en la actividad de las enzimas clave en el catabolismo de AA y de la gluconeogenesis, además de que el aumento de carbohidratos no afectó el crecimiento de los organismos (Pérez-Jiménez, et al., 2009a, b). Mientras que la trucha arcoíris y *S. aurata* mostraron que su metabolismo intermediario responde a las variaciones de carbohidratos en las dietas y pueden utilizar cantidades moderadas de carbohidratos eficientemente lo que se traduce en un ahorro de proteínas de las dietas (Sánchez-Muros et al., 1998; Metón et al., 1999). Se ha descrito además, que de las enzimas clave en la vía de la glucolisis, la actividad de las enzimas GK se incrementa con la inclusión de carbohidratos en la dieta, mientras que la actividad de la HK parece no responder a la variación de los nutrientes en los peces (Panserat et al., 2000; Enes et al., 2006, 2008; Figueredo-Silva et al., 2009). No obstante, en nuestro trabajo se observó que el

aumento de los carbohidratos en las dietas para totoaba indujo a una disminución del crecimiento; mientras que el suplemento de 1% de taurina en la dieta sin concentrado de proteína de soya (dieta AHPT) indujo a los mayores valores en la actividad de la mayoría de las enzimas clave del metabolismo intermediario en totoaba, tratamiento en el que además, se presentaron valores de crecimiento y eficiencia alimenticia similares a los producidos por la DC. También se observó que la actividad de ALAT respondió significativamente a la variación de taurina en las dietas. Lo que refuerza nuestros resultados discutidos previamente (apartado 2.8) sobre la importancia de la taurina en la regulación de las vías metabólicas en totoaba. Además, dado que la combinación de carbohidratos y proteína de soya (dietas APS y APST) provocó los menores valores de actividad de las enzimas GDH (catabolismo de AA) y GK (glucólisis); nuestros resultados sugieren que esta combinación de ingredientes (18% almidón y 30% de PS) pudieron incrementar las necesidades de taurina en totoaba por encima del 1% que fue suplementado y/o interferir en el aprovechamiento de la taurina proporcionada por estas dietas.

Estudios en *D. dentex* reportan que la adición de carbohidratos en sus dietas influyeron en la disminución del daño oxidativo hepático para esta especie (Pérez-Jiménez, et al., 2009c). No obstante, el aumento de carbohidratos de 10 a 18% en las dietas para totoaba incrementaron significativamente los niveles de LPO en el hígado. Resultados similares están reportados para el lenguado *S. solea* alimentados con dietas con mayor nivel de carbohidratos (Castro et al., 2012). Estos investigadores sugieren que el aumento del daño oxidativo en *S. solea* pudo estar más relacionado al incremento de la ingesta de alimento que al aumento de carbohidratos de la dieta, ya que una mayor ingesta de esas dietas pudo también generar el aumento de la ingesta de los lípidos y por lo tanto, de su oxidación (Castro

et al., 2012). Lo cual contrasta con lo observado en nuestro trabajo, ya que las dietas AHP y AHPT mostraron producir tasas de ingesta similares entre sí, y con respecto a la DC (esta última con mayor contenido de lípidos); sin embargo, los niveles de LPO aumentaron significativamente en los peces alimentados con las dietas AHP y APS (esta última con mayor ingesta de alimento, pero sin aumento de lípidos hepáticos y lipógenesis en comparación al control). En mamíferos es reconocido que problemas de hiperglucemia o diabetes pueden provocar daño oxidativo a los tejidos debido al aumento de los radicales libres generados por la auto-oxidación de la glucosa no metabolizada (De la Puerta et al., 2010). En nuestro trabajo, si bien los peces alimentados con las diferentes dietas experimentales mostraron niveles de glucosa plasmática y de glucógeno hepático similares al control, aún se desconoce si procesos de auto-oxidación pudieran haberse desarrollado en estos compuestos ante el incremento de carbohidratos en las dietas. Por otro lado, los resultados del análisis estadístico indican que la adición de taurina en 1% a las dietas fue un factor determinante para el control de los niveles de LPO en el hígado de totoaba, como se observa en los tratamientos AHPT y APST, que junto al control, mostraron los menores valores de LPO. Se ha propuesto que para los peces, los antioxidantes no-enzimáticos pueden jugar un papel fundamental en defensa contra el estrés oxidativo, debido a que se han detectado altos niveles de antioxidantes no-enzimáticos relacionados a la actividad de las enzimas antioxidantes (Martínez-Álvarez et al., 2005). Además, la taurina puede proteger a las células como un antioxidante indirecto a través de su participación en la osmorregulación y estabilización de membranas, lo que evita alteraciones en la funcionalidad e integridad del metabolismo celular (Timbrell et al., 1994; Guillaume, 2004; Mas et al., 2004; Chesney et al., 2012).

En cuanto a los análisis histopatológicos del hígado de juveniles de totoaba, estos indican que no hubo diferencias significativas entre los diferentes tratamientos experimentales y el control. Sin embargo, es importante denotar que en todos los tratamientos, incluido el control, se observó una vacuolización generalizada de los hepatocitos. Se ha sugerido que los peces marinos son particularmente susceptibles a la acumulación de lípidos en el hígado, y por lo tanto a los procesos de esteatosis hepática, donde cambios en la configuración y arreglo de los hepatocitos pueden dar lugar a procesos de disfunción hepática (Spisni et al., 1998; Wolf y wolfe, 2005; Hardy, 2012). En nuestro estudio, el término vacuolización se utiliza para indicar, genéricamente, la ausencia o reducción de citoplasma en los hepatocitos, si embargo, solo los tratamientos elaborados con PS mostraron un aumento en la acumulación de lípidos hepáticos. Por otro lado, todos los tratamientos mostraron valores de glucógeno hepático similares, por lo que es posible que la vacuolización observada en los hepatocitos de totoaba este relacionada a la acumulación de glucógeno en sus células. Resultados similares de cambios histológicos están reportados para *M. salmoides*, especie en la que el aumento de los niveles de carbohidratos por arriba del 19% indujo una severa vacuolización de los hepatocitos, con disminución del crecimiento y supervivencia de los organismos (Goodwin et al., 2000; Amoah et al., 2008). Asimismo, Pereira et al. (2002) indican que la vacuolización de los hepatocitos observada en la trucha arcoíris estuvo relacionada con incremento de la acumulación de glucógeno hepático tras la alimentación de los peces con elevados niveles de carbohidratos en sus dietas.

Nuestros resultados del análisis de la respuesta hematológica de totoaba muestran que el aumento de los carbohidratos a 18% estimuló variables hemáticas como el HT, la HB, la MVC y la MCH. Puesto que la glucosa es la principal fuente de energía de los eritrocitos

(Brockus, 2010), es posible que al generar una mayor disponibilidad de glucosa resultado de los carbohidratos de la dieta, aumentara la cantidad de eritrocitos circulantes de totoaba. Por el contrario, la inclusión de proteína de soya en las dietas para totoaba indujo una tendencia significativa de disminución en las diferentes variable hemáticas. La presencia de componentes anti-nutricionales, tales como los inhibidores de proteasas, fitatos y lecitinas, es considerada como una de las principales causas para la limitación del uso de la soya en la elaboración de dietas para peces (Mendoza et al., 1998; Storebakken et al., 2000; Barac et al., 2004; Deak y Johnson, 2007; Krogdahl et al., 2010). En este sentido, nuestros resultados sugieren que la salud de los juveniles de totoaba puede verse comprometida ante la combinación de 18% carbohidratos con 30% proteína de soya en la dietas.

Como se ha mencionado anteriormente, la taurina cumple funciones esenciales en la regulación del volumen osmótico de los hepatocitos y eritrocitos (Watanabe et al., 1998; Mas et al., 2004; Matsunari et al., 2005; Takagi et al., 2005, 2008; Chesney et al., 2012). Asimismo, nuestros resultados indican que la suplementación de 1% de taurina en las dietas induce a la recuperación de las variables EC y MVC de totoaba alimentadas con 30% de PS en sus dietas. Adicionalmente, se observó que el efecto más significativo de la taurina fue en la producción de AL y de la recuperación de la razón AL: Glb, variables consideradas indicadores de alteración del metabolismo hepático en animales terrestres (Mazzaferro et al., 2002). Mientras que en el presente trabajo, la concentración de GLU en el plasma sanguíneo no resultó influenciada por la taurina. Esto difiere de lo reportado acerca de las propiedades hipoglucemicas de la taurina para otros animales y en humanos (Cherif et al., 1996; Nakaya et al., 2000; Carneiro, et al., 2009). Estudios anteriores en totoaba señalan que cantidades menores al 20% de carbohidratos en la dieta no genera un incremento significativo de GLU

en el plasma sanguíneo (Bañuelos-Vargas et al., 2010); por lo que es posible que en la presente investigación no se apreciaran los beneficios de la taurina debido a que no se presentaron casos de hiperglucemia en los peces alimentados con el 18% de carbohidratos.

### **3.9 Conclusiones**

Las dietas para totoaba pueden ser elaboradas con 18% de almidón y suplementadas con 1% de taurina sin repercusiones en el metabolismo intermediario y del crecimiento de estos peces durante 6 semanas. Asimismo, la taurina muestra tener un papel fundamental en el mantenimiento del sistema de defensa antioxidante y de la regulación de los niveles de daño oxidativo hepático en los juveniles de totoaba. Sin embargo, la acumulación de lípidos, glucógeno y la generalizada vacuolización de los hepatocitos parecen señalar que la totoaba puede ser susceptible a los cambios en la combinación de macronutrientes (proteínas/lípidos/carbohidratos), fuente de ingredientes vegetales (almidón/proteína de soya), así como de la propia disponibilidad de taurina en la dietas. Por lo tanto, es indispensable realizar mayor investigación para dilucidar la significancia de estos cambios de composición y configuración del tejido hepático sobre el estado general de la salud de la totoaba ante condiciones de cultivo prolongado.

## DISCUSIONES GENERALES

Los resultados del EXP I indican que utilizar concentrado de proteína de soya (PS) en las dietas de totoaba (independiente del nivel de PS y del suplemento de taurina) puede ser causa de la disminución en la ingesta de alimento y de la retención de los diferentes nutrientes. Además de que el mayor nivel de PS utilizado (60%) provocó los menores valores en la respuesta de crecimiento de los peces. Además, se observó que el uso de PS (independiente de su nivel) en las dietas provocó aumento de las Glb y de la infiltración de células inflamatorias hepáticas en los juveniles de totoaba. Las isoflavonas y los fitatos son compuestos anti-nutricionales de la soya que está reportado que pueden causar disminución del consumo de alimento y la reducción del crecimiento en peces (Mambrini et al., 1999; Francis et al., 2001), y que, pese a los diferentes métodos tecnológicos aplicados para la extracción de los compuestos anti-nutricionales de la soya, las isoflavonas son uno de los anti-nutrientes que suelen resistir a la mayoría de estos procesos (Mendoza et al., 1998; Storebakken et al., 2000; Baracé et al., 2004; Deak y Johnson, 2007; Brockus, 2010). Por otra parte, los resultados del EXP I también indican que, por un lado, incrementar el nivel de PS fue causa del descenso de la actividad de algunas enzimas clave en el catabolismo de AA (GDH), glucolisis (HK y GK) y gluconeogénesis (FBPasa), de la concentración de HB sanguínea y de la AL; mientras que por el otro, la taurina demostró ser el factor principal para el mantenimiento de la regulación de la actividad en mayoría de las enzimas clave del metabolismo intermediario hepático (ASAT, ALAT, GDH, HK, FBPasa y G6PD). Además, nuestros resultados también muestran que enzimas clave en el sistema antioxidante hepático (CAT y G6PD) fueron significativamente reguladas por la disponibilidad de taurina en las dietas. Aunado a lo anterior, se pudo observar que es posible que la suplementación de

taurina en 1% de la dieta pudiera ser el factor principal para reducir los niveles de LPO en el hígado y para evitar el desarrollo de “síndrome de hígado verde” en los juveniles de totoaba. Por lo que los resultados del EXP I sugieren que los juveniles de totoaba requieren de la suplementación de taurina (en al menos el 1% de la dieta) para utilizar eficientemente fuentes vegetales de proteína como la PS y sin comprometer el estado de salud hepático de los peces durante las 6 semanas de alimentación con el 30% de PS.

Por otra parte, en el EXP II, la combinación de 18% de carbohidratos (almidón gelatinizado) con 30% de PS en las dietas (dietas APS y APST) produjo un aumento en la ingesta del alimento. Si bien este resultado difiere de lo observado en el EXP I (en cuanto a la ingesta por el uso de hasta 60% de PS), cabe mencionar que la combinación de 18% de carbohidratos y 30% de PS se reflejó en una menor eficiencia alimenticia, menor retención de nutrientes y menor crecimiento de los juveniles de totoaba. Por lo tanto es factible considerar que el aumento en el consumo de las dietas elaboradas con 18% de carbohidratos y 30% de PS (APS y APST), observada en el EXP II, estuviera relacionado con un intento de los organismos por cubrir sus requerimientos de energía y nutrientes causados por la combinación de carbohidratos y PS. Está documentado que la utilización de carbohidratos por los peces carnívoros está en relación a la fuente de este nutriente, de su complejidad molecular, procesos de tratamiento y niveles de inclusión en las dietas (Krogdahl et al., 2005; Enes et al., 2009, 2011; Oliva-Teles, 2012). Otro de los resultados observados en el EXP II, fue que tanto el uso de carbohidratos por sí solos, y en combinación con la proteína de soya, produjeron los valores de LPO más elevados de este experimento. Lo que sugiere que la combinación de 18% de carbohidratos y PS parece provocar limitaciones no solo en la

eficiencia de la utilización de nutrientes de la totoaba, sino que pudiera repercutir en el aumento del estrés oxidativo hepático.

Por otro lado, los resultados de ambos experimentos indican que la suplementación de 1% de taurina en las dietas produjo efectos positivos significativos en la mayoría de los parámetros de crecimiento de los juveniles de totoaba. Así, en el EXP I, se observó que la adición de este nutriente contribuyó en el mantenimiento de la tasa de crecimiento de los peces alimentados con 60% de PS en las dietas similar a lo observado en los peces alimentados con la dieta control (elaborada sin PS). Mientras que en el EXP II, la suplementación de taurina mostró sus efectos benéficos con la dieta elaborada con 18% de carbohidratos (dieta AHP, sin PS) al producir tasas de crecimiento comparables a los producidos por la dieta control elaborada solo con 10% de carbohidratos (tratamiento DC). Estudios en el lenguado japonés han demostrado que la suplementación de taurina incrementa el crecimiento de estos peces debido a sus efectos indirectos en la digestibilidad de lípidos de la dieta (Kim et al., 2007, 2008). Estudios recientes encontraron que las sales biliares compuestas únicamente por taurocolato de sodio promueven la máxima actividad de las lipasas digestivas en totoaba (Rueda López, 2013). En nuestro estudio, no fueron evaluados los efectos de la taurina a nivel digestivo, sin embargo, dado los resultados de consumo y retención de nutrientes en ambos experimentos, así como de la composición de lípidos en las diferentes dietas, se podría explicar en parte, porque la retención de energía total obtuvo sus valores más altos en los peces donde las dietas fueron suplementadas con taurina, así como sus efectos benéficos en el crecimiento de los juveniles de totoaba.

Por otra parte, los resultados del presente estudio también indican que ante la combinación de 18% carbohidratos y 30% de PS en las dietas de totoaba, los efectos benéficos de la suplementación de 1% de taurina se muestran severamente disminuidos. Estudios en el jurel cola amarilla han reportado que esta especie carnívora aumenta sus requerimientos de taurina hasta en 4.5% de la dieta, cuando éstas están elaboradas a base de proteína vegetal con 22% de carbohidratos (Takagi et al., 2008). Otros autores denotan que los requerimientos de taurina en los peces puede estar además en función de la edad o peso corporal, así como la condición nutricional previa al desarrollo experimental (Matsunari et al., 2008; Takagi, 2006; Takagi et al., 2010). Al respecto, nuestros resultados sugieren que dietas elaboradas con la combinación de moderados niveles de carbohidratos (18%) y PS (30%) podrían haber generaron mayor demanda de taurina en los juveniles de totoaba, lo que afectó la respuesta de crecimiento de los peces pese a la suplementación de 1% de taurina en las dietas. En este sentido, es posible que sea necesario modificar la suplementación de taurina de acuerdo a las variaciones de combinación de fuente vegetales de nutrientes en las dietas para totoaba que permitan respuestas de crecimiento comparables a las obtenidas con dietas elaboradas con harina y aceite de pescado.

La suplementación de taurina en las dietas de totoaba, no solo se mostró positivamente relacionada con el crecimiento de los juveniles de totoaba. Los resultados de ambos experimentos señalan a la taurina como un nutriente esencial para el adecuado desempeño del metabolismo de totoaba. Este efecto fue evidente ante el aumento de los niveles de PS en las dietas, donde los peces alimentados con las dietas sin el suplemento de taurina obtuvieron los menores valores de actividad de las diferentes enzimas clave del metabolismo intermediario, y a su vez, el menor crecimiento. Por el contrario, al incluir un 1%

de taurina en las dietas, se observó la recuperación de las actividades enzimáticas en los peces comparable a la actividad observada en los organismos alimentados con la dieta control (sin PS). Mientras que en el EXP II, suplementar taurina demostró su influencia positiva en las vías del catabolismo y anabolismo de AA. Otros de los resultados más interesantes sobre el papel de la taurina en la totoaba, fue la relación entre el desarrollo del “síndrome de hígado verde” con la disminución en la disponibilidad de taurina en las dietas para totoaba. Además, se encontraron efectos altamente significativos de la suplementación de taurina en la regulación de las enzimas del sistema antioxidante. Asimismo, se observó un efecto altamente significativo de la suplementación de taurina sobre la disminución de los niveles de daño oxidativo hepático de totoaba. Está demostrado que la taurina, por un lado, protege las células a través de la osmorregulación y estabilización de membranas, y por otro, participa como un antioxidante directo al neutralizar compuestos reactivos como el ácido hipocloroso producido por la mieloperoxidasa en las células inflamatorias (Timbrell et al., 1994; Guillaume, 2004; Mas et al., 2004; Chesney et al., 2012). En este sentido, los resultados en general de la presente investigación sugieren a la taurina como un nutriente esencial para el mantenimiento de la salud de la totoaba ante la inclusión de proteínas vegetales en sus dietas.

Otros de los resultados relevantes del presente estudio, es la relación observada entre el aumento de la actividad de las enzimas G6PD y CAT con respecto a la disminución de los niveles de LPO hepático de totoaba. Diversas investigaciones han señalado que la disminución en la actividad de G6PD esté asociada con el aumento de la vulnerabilidad de los hepatocitos y eritrocitos al ataque oxidativo y el consiguiente daño a las estructuras y funciones celulares (Salvemini et al, 1999; Leopold y Loscalzo, 2000; Abele y Puntarulo,

2004; Morales et al., 2004). Además, se ha encontrado que la NADPH (principal producto de la G6PD) se une fuertemente a la enzima CAT con el fin de evitar que ésta pueda inactivarse por su propio substrato (Kirkman et al., 1999; Leopold y Loscalzo, 2000; Gaetani et al., 2005). Por lo que nuestros resultados indican que las enzimas G6PD y CAT podrían ser herramientas útiles para monitorear la condición del sistema antioxidante de totoaba, y por lo tanto, de su condición de salud hepática.

## CONCLUSIONES GENERALES

El conjunto de las investigaciones que conforman la presente tesis provee de conocimientos relevantes acerca de la respuesta fisiológica y metabólica de los juveniles de totoaba ante variaciones nutricionales en sus dietas. En esta primera aproximación, la suplementación de 10 g de taurina  $\text{kg dieta}^{-1}$  desempeñó un papel fundamental en la regulación de la respuesta del metabolismo intermediario y en la prevención del desarrollo del “síndrome de hígado verde” en los juveniles de totoaba alimentados con dietas elaboradas con proteína de soya y carbohidratos. Asimismo, los resultados indican que la taurina juega un papel primordial en la disminución y prevención de los daños de peroxidación hepática derivada de condiciones nutricionales adversas, como la utilización de proteína de soya en las dietas. Además, variables como la albúmina, razón albúmina: globulinas y la actividad de las enzimas glucosa-6 fosfato deshidrogenasas y catalasa mostraron que pueden ser herramientas útiles en el monitoreo de la condición de salud hepática de totoaba.

## RECOMENDACIONES

Los resultados de la presente tesis sugieren que es recomendable suplementar 1% de las dietas para juveniles de totoaba para obtener mejores rendimientos de crecimiento y eficiencia alimenticia cuando los peces son alimentados con dietas elaboradas hasta con un 30% de proteína de soya en sustitución de la harina de pescado. Por otro lado, se recomienda modificar las cantidades de taurina a suplementar cuando las dietas son elaboradas con cantidades iguales o mayores al 60% de proteína de soya en las dietas.

Asimismo, debido a los efectos significativos de interacción de factores (PS\*taurina), es recomendable llevar a cabo investigación más detallada sobre los requerimientos de taurina de la totoaba ante diferentes condiciones nutricionales, en particular, ante la inclusión de ingredientes vegetales en sus dietas. Además, si bien en el presente estudio se pudo observar un efecto importante de la taurina en la respuesta metabólica y fisiológica de la totoaba, es necesario esclarecer hasta que mecanismos moleculares tiene influencia la taurina en la especie para poder delimitar más concentradamente las funciones de la taurina en ésta especie. Finalmente, es recomendable establecer los requerimientos de taurina de la especie no solo bajo diferentes condiciones nutricionales, también en las diferentes etapas de desarrollo larvario y/o juvenil, así como ante cambios en las condiciones ambientales de cultivo de la especie.

# BIBLIOGRAFÍA

- Abele, D., Puntarulo, S. 2004. Formation of reactive species and induction of antioxidant defence systems in polar and temperate marine invertebrates and fish. *Comp. Biochem. Phys. A* 138, 405- 415.
- Aebi, H., 1984. Catalase in vitro. *Meth. Enzymol.* 105, 121–126.
- AOAC. 2000. Official methods of analysis. Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburg, Maryland, USA. 1018 pp.
- Agamy, E. 2012. Histopathological liver alterations in juvenile rabbit fish (*Siganus canaliculatus*) exposed to light Arabian crude oil, dispersed oil and dispersant. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 75, 171–179.
- Amoah, A., Coyle, S.D., Webster, C.D., Durborow, M.R., Bright, L.A., Tidwell, J.H. 2008. Effects of Graded Levels of Carbohydrate on Growth and Survival of Largemouth Bass, *Micropterus salmoides*. *J. World Aquacult. Soc.* 39, 397-405.
- Atencio-García, V., Genes-López, F., Madariaga-Mendoza, D., Pardo- Carrasco, S. 2007. Hematología y química sanguínea de juveniles de Rubio *Salminus affinis* (Pisces: Characidae) del río Sinú. *Acta biol. Colomb.* 12, 27–40.
- Azuma, J.-I., Schaffer, S.W., Ito, T. 2009. Taurine 7: Advances in Experimental Medicine and Biology Vol. 643. Springer 545 pp.
- Bañuelos Vargas, I., Flores Ibarra, M., López, L., González Acevedo, D., Olmos Soto, J., True, D. 2010. Efectos de la dieta sobre la respuesta hematológica, inmune y

metabólica de *Totoaba macdonaldi*. Simposium internacional de Nutrición Acuícola X. Memorias del X Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 8 al 10 de noviembre del 2010. Monterrey, Nuevo León, México.

Barać, M.B., Stanojević, S.P., Jovanović, S.T., Pešić, M.B. 2004. Soy protein modification - a review. APTEFF 35, 1-280.

Bernet, D., Schmidt, H., Meier, W., Burkhardt-Holm, P., Wahli, T. 1999. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. J. Fish Dis. 22, 25–34.

Blaxhall, P.C., Daisley, K.W. 1973. Routine hematological methods for use with fish blood. J. Fish Biol. 5, 771-782.

Bradford, M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein dye-binding. Anal. Biochem. 72, 248–254.

Brockus, C.W. 2010. Erythrocytes. En: Duncan & Prasse's Veterinary Laboratory Medicine: Clinical Pathology. Latimer, K.S. (Ed.). 5th Edic. 524 pp.

Buege, J.A., Aust, S.D. 1978. Microsomal lipid peroxidation. Methods Enzymol. 52, 302–310.

Bureau, D.P., Harris, A.M., Cho, C.Y. 1998. The effects of purified alcohol extracts from soy products on feed intake and growth of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture 161, 27–43.

Bureau, D.P., Kaushik, S.J., Cho, C.Y. 2002. Bioenergetics. En: Halver, J.E. y R.W. Hardy. 2002. Fish Nutrition. Academic Press. E.U.A. 824 pp.

- Carneiro, E.M., Latorraca, M.Q., Araujo, E., Beltrà, M., Oliveras, M.J., Navarro, M., Bernà, G., Bedoya, F.J., Velloso, L.A., Soria, B., Martín, F. 2009. Taurine supplementation modulates glucose homeostasis and islet function. *J. Nutr. Biochem.* 20, 503–511.
- Castro, C., Pérez-Jiménez, A., Guerreiro, I., Peres, H., Castro-Cunha, M., Oliva-Teles, A. 2012. Effects of temperature and dietary protein level on hepatic oxidative status of Senegalese sole juveniles (*Solea senegalensis*). *Comp. Biochem. Phys. A* 163, 372–378.
- Chakrabarty, K., Leveille, G.A. 1969. Acetyl-CoA carboxylase and fatty acid synthetase activities in liver and adipose tissue of meal-fed rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 131, 1051–1054.
- Chang, H.C., Seidman, I., Teebor, G., Lane, M.D. 1967. Liver acetyl-CoA carboxylase and fatty acid synthetase relative activities in normal state and in hereditary obesity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 28, 682–686.
- Chang, Y.-Y., Chou, C.-H., Chiu, C.-H., Yang, K.-T., Lin, Y.-L., Weng, W.-L., Chen, Y.-C. 2011. Preventive effects of taurine on development of hepatic steatosis induced by a high-fat/cholesterol dietary habit. *J. Agric. Food Chem.* 59, 450–457.
- Chatzifotis, S., Polemitou, I., Divanach, P., Antonopoulou, E. 2008. Effect of dietary taurine supplementation on growth performance and bile salt activated lipase activity of

common dentex, *Dentex dentex*, fed a fish meal/soy protein concentrate-based diet. *Aquaculture* 275, 201–208.

Chesney, R.W., Patters, A.B., Han, X. 2012. Taurine and the kidneys. In: Idrissi, E.A. and L'Amoreaux, W. 2012. Taurine and Health Disease. Transworld Research Network. Kerala, India. ISBN: 978-81-7895-520-9.

Cho, C.Y., Kaushik, S.J. 1990. Nutritional energetics in fish: energy and protein utilization in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *World Rev Nut Diet Karger, Basel* 6, 132–172.

Cisneros-Mata, M., Botsford, L.W., Quinn, J.F. 1997. Projecting of *Totoaba macdonaldi*, a population with unknown age-dependent variability. *Ecol. Appl.* 7 (3), 968-980.

CITES. 2005. Appendices I, II and III (12/01/2005) convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora, Geneva Switzerland, 49 pp.

Civera, R., Ortiz, J.L., Dumas, S., Nolasco, E., Alvarez, A., Anguas, B., Peña, R., Rosales, M., Carrasco, V., García, R., Goytortúa, E. 2002. Avances en la Nutrición de la Cabrilla Arenera *Paralabrax maculatofasciatus*. In: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Gaxiola-Cortés, M. G., Simoes, N. (Eds.). Avances en Nutrición Acuícola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 3 al 6 de Septiembre del 2002. Cancún, Quintana Roo, México.

- Cohen, S.A., Meys, M., Tarvin, T. 1989. The Pico-tag Method. A Manual of Advance Techniques for Amino Acid Analysis. Waters Chromatography Division, Milford, MA. 124 pp.
- Cook, A.M., Denger, K. 2006. Metabolism of taurine in microorganisms: A Primer in Molecular Biodiversity? Springer, New York, 3-13 pp.
- Deak, N.A., Johnson, L.A. 2007. Fate of phytic acid in producing soy protein ingredients. J. Amer. Oil Chem. Soc. 84, 369–376.
- De la Puerta, C., Arrieta, F.J., Balsa, J.A., Botella-Carretero, J.I., Zamarrón, I., Vázquez, C. 2010. Taurine and glucose metabolism: a review. Nutr. Hosp. 25, 910-919.
- De Pedro, N., Guijarro, A., López-Patiño, M.A., Martínez-Álvarez, R.M., Alonso-Bedate, M., Delgado, M.J. 2004. Parámetros hematológicos y bioquímicos en la Tenca (Tinca tinca): ritmos diarios y estacionales. Comunicación Científica CIVA, 173-190.
- Diario oficial de la Federación, 25 de septiembre de 2009. Tercera sección. Programa de conservación y manejo de la reserva de la biosfera Alto Golfo de California y Delta del Rio Colorado. 113 pag.
- Dias, J., Alvarez, M.J., Arzel, J., Corraze, G., Diez, A., Bautista, J.M., Kaushik, S.J., 2005. Dietary protein source affects lipid metabolism in the European seabass (*Dicentrarchus labrax*). Comp. Biochem. Phys. A 142, 19-31.

- Dias, J., Alvarez, M.J., Diez, A., Arzel, J., Corraze, G., Bautista, J.M., Kaushik, S.J. 1998. Regulation of hepatic lipogenesis by dietary protein/energy in juvenile European seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture* 161, 169–186.
- Divakaran, S. 2006. Taurine: an amino acid rich in fish meal. En: Editores: L. Elizabeth Cruz Suárez, Denis Ricque Marie, Mireya Tapia Salazar, Martha G. Nieto López, David A. Villarreal Cavazos, Ana C. Puello Cruz y Armando García Ortega. *Avances en Nutrición Acuícola VIII .VIII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*. 15 - 17 Noviembre. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, México. ISBN 970-694-333-5.
- Drabowski. K., Guderley, H. 2002. Intermediary metabolism. En: Halver, J.E., Hardy, R.W. 2002. *Fish Nutrition*. Academic Press. E.U.A. 824 pp.
- Dragnes, B.T., Stormo, S.K., Larsen, R., Ernsten, H.H., Elvevoll, E.O. 2009. Utilisation of fish industry residuals: Screening the taurine concentration and angiotensin converting enzyme inhibition potential in cod and salmon. *J. Food Comp. Anal.* 22, 714–717.
- Dumas, S., Rosales Vázquez, M.O., Contreras Olgún, M., Hernández Cevallos, D., Silverberg, N. 2004. Gonadal maturation in captivity and hormone-induced spawning of the Pacific red snapper *Lutjanus peru*. *Aquaculture* 234, 615-623.

- Duncan, N., Rodríguez, G., Alock, D., Zohar, Y. 2003. Effects of controlled delivery and acute injections of LHRH-a on bullseye puffer fish *Sphoeroides annulatus* spawning. *Aquaculture* 218, 625-635.
- Durazo, E., Cruz, A.C., López, L.M., Lazo, J.P., Drawbridge, M., Viana, M.T., 2009. Effects of digestible protein levels in isonitrogenous diets on growth performance and tissue composition of juvenile *Atractoscion nobilis*. *Aquacult. Nutr.* 2009.
- El-Sayed, A.F.M. 2013. Is dietary taurine supplementation beneficial for farmed fish and shrimp? a comprehensive review. *Rev. Aquaculture* 5, 1–15.
- Enes, P., Panserat, S., Kaushik, S., Oliva-Teles, A. 2006. Effect of normal and waxy maize starch on growth, food utilization and hepatic glucose metabolism in European sea bass *Dicentrarchus labrax* juveniles. *Comp. Biochem. Phys. A* 143, 89-96.
- Enes, P., Panserat, S., Kaushik, S., Oliva-Teles, A. 2008. Growth performance and metabolic utilization of diets with native and waxy maize starch by gilthead sea bream *Sparus aurata* juveniles. *Aquaculture* 274, 101–108.
- Enes, P., Panserat, S., Kaushik, S., Oliva-Teles, A. 2009. Nutritional regulation of hepatic glucose metabolism in fish. *Fish Phys. Biochem.* 35, 519–539.
- Enes, P., Peres, H., Almeida, I., Couto, A., Oliva-Teles, A. 2011. Growth, feed utilization, and glycemic response in european sea bass, *Dicentrarchus labrax*, juveniles fed carbohydrate of different complexities. *J. World Aquacult. Soc.* 42, 873-879.

- Espe, M., Holen, E. 2013. Taurine attenuates apoptosis in primary liver cells isolated from Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Brit J Nutr.* 110, 20-28.
- FAO. 2012. El estado mundial de la pesca y la acuicultura. Organización de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación. Roma. 218 pp.
- FAO GLOBEFISH. 2013. A quarterly update on world seafood markets. Roma 55 pp.
- Figueiredo-Silva, A.C., Corraze, G., Rema, P., Sanchez-Gurmaches, J., Gutiérrez d, J., Valente, L.M.P. 2009. Blackspot seabream *Pagellus bogaraveo* lipogenic and glycolytic pathways appear to be more related to dietary protein level than dietary starch type. *Aquaculture* 291, 101–110.
- Flohé, L., Günzler, W.A., 1984. Assay of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.* 105, 115–121.
- Folch, J., Lees, M., Sloane-Stanley, G.H.S. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226, 497–509.
- Francis. G., Makkar, H.P.S., Becker, K. 2001. Antinutritional factors present in plant-derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish. *Aquaculture* 199, 197–227.
- Gaetani, G.F., Ferraris, A.M., Sanna, P., Kirkman, H.N. 2005. A novel NADPH:(bound) NADP<sup>+</sup> reductase and NADH:(bound) NADP<sup>+</sup> transhydrogenase function in bovine liver catalase. *Biochem. J.* 385, 763–768.

- Galaviz, M.A. 2011. Expresión y actividad de enzimas digestivas durante el desarrollo del tracto digestivo de *Totoaba macdonaldi*, *Atractoscion nobilis* y *Lutjanus guttatus* bajo condiciones de cultivo. Tesis de doctorado, Facultad de Ciencias Marinas, UABC. Ensenada, México.
- Gaylord, T.G., Barrows, F.T., Teague, A.M., Johansen, K.A., Overturf, K.E., Shepherd, B. 2007. Supplementation of taurine and methionine to all-plant protein diets for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 269, 514–524.
- Giannini, E.G., Testa, R., Savarino, V. 2005. Review: Liver enzyme alteration: a guide for clinicians. *CMAJ* 172, 367-379.
- Gómez-Requeni, P., Mingarro, M., Kirchner, S., Calduch-Giner, J.A., Médale. F., Corraze, G., Panserat, S., Martin, S.A.M., Houlihan, D.F., Kaushik, S., Pérez-Sánchez, J. 2003. Effects of dietary amino acid profile on growth performance, key metabolic enzymes and somatotropic axis responsiveness of gilthead sea bream *Sparus aurata*. *Aquaculture* 220, 749–767.
- González Acevedo, D., López-Acuña, L.M., Olmos Soto, J., Vizcaíno Pérez, E., True C.D. 2010. Respuesta en crecimiento de juveniles de *Totoaba macdonaldi* alimentados con dietas con diferentes niveles de almidón, y adicionadas con un probiótico. Simposium internacional de Nutrición Acuícola X. Memorias del X Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 8 al 10 de noviembre del 2010. Monterrey, Nuevo león, México.

- González Acevedo D. 2011. Respuesta en crecimiento de juveniles de *Totoaba macdonaldi* alimentados con dietas con diferentes niveles de almidón y lípidos, y adicionadas con un probiótico. Tesis de maestría, Facultad de Ciencias Marinas, UABC. Ensenada, México.
- Goodwin, A.E., Lochmann, R.T., Tieman, D.M. 2002. Massive hepatic necrosis and nodular regeneration in largemouth bass fed diets high in available carbohydrate. J. World Aquacult. Soc. 3, 466-477.
- Goto, T., Takagi, S., Ichiki, T., Sakai, T., Endo, M., Yoshida, T., Ukawa, M., Murata, H. 2001. Studies on the green liver in cultured red sea bream fed low level and non-fish meal diets. Relationship between hepatic taurine and biliverdin levels. Fisheries Sci. 67, 58–63.
- Grune, T. 2005. Oxidants and Antioxidant Defense Systems (2<sup>nd</sup>, ed.). Springer, 239 pp.
- Guillaume, J., Kaushik, S., Bergot, P., Métailler, R. 2004. Nutrition and Feeding of Fish and Crustaceans. Mundi Prensa. España. 475 pp.
- Hansen, A.C., Karlsen, O., Rosenlund, G., Rimbach, M., Hemre, G.I. 2007. Dietary plant protein utilization in Atlantic cod, *Gadus morhua* L. Aquacult. Nutr. 13, 200-215.
- Hardy, R.W. 2012. The Nutritional Pathology of Teleosts. En Roberts, R.J. 2012. Fish pathology (4<sup>th</sup>). Wiley-Blackwell. E.U.A. 581 pp.

- Hemre, G.I., Mommsen, T.P., Krogdahl, A. 2002. Carbohydrates in fish nutrition: effects on growth, glucose metabolism and hepatic enzymes. *Aquacult. Nutr.* 8, 175-194.
- Huerta-Jiménez, M., Ortega-Cerrilla, M.E., Cobos-Peralta, M., Herrera-Haro, J.G., Díaz-Cruz, A., Guinzberg-Perrusquía, R. 2005. Estrés oxidativo y el uso de antioxidantes en animales domésticos. *Interciencia* 30, 728-734.
- Hu, Y.H., Lin, C.L., Huang, Y.W., Liu, P.E., Hwang, D.-F. 2008. Dietary amino acid taurine ameliorates liver injury in chronic hepatitis patients. *Amino Acids* 35, 469–473.
- Huxtable, R.J., 1992. Physiological actions of taurine. *Physiol. Rev.* 72, 101–163.
- Iijima, N., Tanaka, S., Ota, Y. 1998. Purification and characterization of bile salt-activated lipase from the hepatopancreas of red sea bream, *Pagrus major*. *Fish Physiol. Biochem.* 18, 59–69.
- Iwashita, Y., Suzuki, N., Matsunari, H., Sugita, T., Yamamoto, T. 2009. Influence of soya saponin, soya lectin, and cholyltaurine supplemented to a casein-based semipurified diet on intestinal morphology and biliary bile status in fingerling rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Fish. Sci.*, 75, 1307–1315.
- Leopold, J.A., Loscalzo, J. 2000. Cyclic strain modulates resistance to oxidant stress by increasing G6PD expression in smooth muscle cells. *Am. J. Physiol.* 279, H2477–H2485.

- Lim, S.J., Oh, D.H., Khosravi, S., Cha, J.H., Park, S.H., Kim, K.W., Lee, K.J. 2013. Taurine is an essential nutrient for juvenile parrot fish *Oplegnathus fasciatus*. *Aquaculture*. 414, 274-279.
- Kaysen, G.A., Dubin, J.A., Ller, H-G.M., Mitch, W.E., Rosales, L.M., Levin, N.W., The Hemo Study Group. 2002. Relationships among inflammation nutrition and physiologic mechanisms establishing albumin levels in hemodialysis patients. *Kidney Int.* 61, 2240–2249.
- Kim, S.-K., Takeuchi, T., Yokoyama, M., Murata, Y., Kaneniwa, M., Sakakura, Y. 2005. Effect of dietary taurine levels on growth and feeding behavior of juvenile Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture* 250, 765–774.
- Kim, S.-K., Matsunari, H., Takeuchi, T., Yokoyama, M., Murata, Y., Ishihara, K. 2007. Effect of different dietary taurine levels on the conjugated bile acid composition and growth performance of juvenile and fingerling Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture* 273, 595–601.
- Kim, S.-K., Matsunari, H., Nomura, K., Tanaka, H., Yokoyama, M., Murata, Y., Ishihara, K., Takeuchi, T. 2008. Effect of dietary taurine and lipid contents on conjugated bile acid composition and growth performance of juvenile Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Fisheries Sci.* 74, 875–881.

- Kirkman, H.N., Rolfo, M., Ferraris, A.M., Gaetani, G.F. 1999. Mechanisms of protection of catalase by NADPH. Kinetics and stoichiometry. *J. Biol. Chem.* 274, 13908–13914.
- Kirsch, M., De Groot, H., 2001. NAD(P)H, a directly operating antioxidant?. *FASEB J.* 15, 1569-1574.
- Knudsen, D., Jutfelt, F., Sundh, H., Sundell, K., Koppe, W., Frokiaer, H. 2008. Dietary soya saponins increase gut permeability and play a key role in the onset of soyabean-induced enteritis in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Br. J. Nutr.* 100, 120-129.
- Krogdahl, A., Hemre, G.I., Mommsen, T.P. 2005. Carbohydrates in fish nutrition: digestion and absorption in postlarval stages. *Aquacult. Nutr.* 11, 103–122.
- Krogdahl, A., Penn, M., Thorsen, J., Refstie, S., Bakke, A.M. 2010. Important antinutrients in plant feedstuffs for aquaculture: an update on recent findings regarding responses in salmonids. *Aquacult. Res.* 41, 333-344.
- Kruk, I. 1998. *Environmental Toxicology and Chemistry of Oxygen Species*. Springer, 261 pp.
- Li, P., Mai, K., Trushenski, J., Wu, G. 2009. New developments in fish amino acid nutrition: towards functional and environmentally oriented aquafeeds. *Amino Acids* 7, 43–53.
- López, L.M., Durazo, E., Rodríguez Gómez, A., True, C.D., Viana, M.T. 2006. Composición proximal y perfil de ácidos grasos de juveniles silvestres y cultivados de *Totoaba macdonaldi*. *Cienc. Mar.* 32, 303-309.

- López, L.M., Durazo, E., Viana, M.T., Drawbridge, M., Bureau, D.P., 2009. Effect of dietary lipid levels on performance, body composition and fatty acid profile of juvenile white seabass, *Atractoscion nobilis*. *Aquaculture* 289, 101-105.
- Lunger, A.N., McLean, E., Gaylord, T.G., Kuhn, D., Craig, S.R. 2007. Taurine supplementation to alternative dietary proteins used in fish meal replacement enhances growth of juvenile cobia (*Rachycentron canadum*). *Aquaculture* 271, 401–410.
- Mambrini, M., Roem, A.J., Cravedi, J.P., Lalles, J.P., Kaushik, S.J., 1999. Effects of replacing fishmeal with soy protein concentrate and of DL-methionine supplementation in high-energy, extruded diets on the growth and nutrient utilization of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *J. Anim. Sci.* 77, 2990–2999.
- Martin, S.A.M., Vilhelmsson, O., Médale, F., Watt, P., Kaushik, S., Houlihan, D.F. 2003. Proteomic sensitivity to dietary manipulations in rainbow trout. *Biochim. Biophys. Acta* 1651, 17–29.
- Martinez, J.B., Chatzifotis, S., Divanach, P., Takeuchi, T. 2004. Effect of dietary taurine supplementation on growth performance and feed selection of sea bass *Dicentrarchus labrax* fry fed with demand-feeders. *Fisheries Sci.* 70, 74–79.
- Martínez-Álvarez, R.M., Morales, A.E., Sanz, A. 2005. Antioxidant defenses in fish: Biotic and abiotic factors. *Rev. Fish Biol. Fisher.* 15, 75–88.

- Mas, M.R., Comert, B., Oncu, K., Vural, S.A., Akay, C., Ilker Tasci a, Ozkomur, E., Serdar, M., Mas, N., Alcigir, G., Yener, N. 2004. The effect of taurine treatment on oxidative stress in experimental liver fibrosis. *Hepatol. Res.* 28, 207–215.
- Matsunari, H., Takeuchi, T., Takahashi, M., Mushiake, K. 2005. Effect of dietary taurine supplementation on growth performance of yellowtail juveniles *Seriola quinqueradiata*. *Fisheries Sci.* 71, 1131–1135.
- Matsunari, H., Yamamoto, T., Kim, S., Goto, T., Takeuchi, T. 2008. Optimum dietary taurine level in casein-based diet for juvenile red sea bream *Pagrus major*. *Fisheries Sci.* 74, 347–353.
- Mazzaferro, E.M., Rudloff, E., Kirby, R. 2002. The role of albumin replacement in the critically ill veterinary patient. *J. Vet. Emerg. Crit. Care (San Antonio)* 12, 113-124.
- McCord, J.M., Fridovich, I. 1969. Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocuprein. *J. Biol. Chem.* 244, 6049–6055.
- Mendoza, C., Viteri, F.E., Lönnerdal, B., Young, K.A., Raboy, V., Brown, K.H. 1998. Effect of genetically modified, low-phytic acid maize on absorption of iron from tortillas. *Am. J. Clin. Nutr.* 68, 1123–7.
- Metón, I., Mediavilla, D., Caseras, A., Cantó, E., Fernández, F., Baanante, I.V. 1999. Effect of diet composition and ration size on key enzymes activities of glycolysis-

gluconeogenesis, the pentose phosphate pathway and amino acid metabolism in liver of gilthead sea bream *Sparus aurata*. *Brit. J. Nutr.* 82, 223–232.

Messina, M., Tulli, F., Messina, C., Tibaldi, E., 2007. Varying plant protein sources in the diet of sea bass *Dicentrarchus labrax* differently affects lipid metabolism and deposition.

*Italian Journal of Animal Science.* 6, 806-808.

McCord, J.M., Fridovich, I., 1969. Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocyte. *J. Biol. Chem.* 244, 6049–6055.

Minjarez-Osorio, C., González-Félix, M.L., Pérez-Velázquez, M. 2012. Biological performance of *Totoaba macdonaldi* in response to dietary protein level. *Aquaculture* 50–54.

Moon, T.W., Foster, G.D. 1995. Tissue carbohydrate metabolism, gluconeogenesis and hormonal and environmental influences. En: Hochachka y Mommsen (eds.), *Biochemistry and molecular biology of fishes*, vol. 4. Elsevier Science.

Morales, A.E., García-Rejón, L., De la Higuera, M. 1990. Influence of handling and/or anaesthesia on stress response in rainbow trout. Effects on liver primary metabolism.

*Comp. Biochem. Physiol. A* 95, 87–93.

Morales, A.E., Pérez-Jiménez, A., Hidalgo, M.C., Abellán, E., Cardenete, G. 2004. Oxidative stress and antioxidant defenses after prolonged starvation in *Dentex dentex* liver.

*Comp. Biochem. Phys. C* 139, 153–161.

- Morales, O.C. 1999. Descripción del desarrollo embrionario de Totoaba (*Totoaba macdonaldi*) bajo condiciones de laboratorio. Tesis de maestría, Facultad de Ciencias Marinas, UABC. Ensenada, México.
- Ngandzali, B.O., Zhou, F., Xiong, W., Shao, Q.J., Xu, J.Z. 2011. Effect of dietary replacement of fish meal by soybean protein concentrate on growth performance and phosphorus discharging of juvenile black sea bream, *Acanthopagrus schlegelii*. *Aquac. Nutr.* 17, 526-535.
- Nguyen, H.P., Khaoian, P., Fukada, H., Nakamori, T., Furuta, H., Masumoto, T. 2011. Effects of different soybean proteins on lipid digestion and growth of yellowtail *Seriola quinqueradiata*. *Fish. Sci.* 77, 357–365.
- Oliva-Teles, A. 2012. Nutrition and health of aquaculture fish. *J. Fish Dis.* 35, 83–108.
- Packer, L. 1994. *Methods in Enzymology: oxygen radicals in biological systems*, Parte C Vol. 233. Elsevier 711 pp.
- Panserat, S., Médale, F., Blin, C., Brèque, J., Vachot, C., Plagnes-Juan, E., Gomes, E., Krishnamoorthy, R., Kaushik, S. 2000. Hepatic glucokinase is induced by dietary carbohydrates in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), gilthead seabream (*Sparus aurata*), and common carp (*Cyprinus carpio*). *Am. J. Physiol.* 278, 1164–1170.

- Park, G.S., Takeuchi, T., Yokoyama, M., Seikai, T. 2002. Optimal dietary taurine level for growth of juvenile Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Fisheries Sci.* 68, 824–829.
- Pereira, O., Rosa, E., Pires, M.A., Fontainhas-Fernandes, A. 2002. Brassica by-products in diets of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and their effects on performance, body composition, thyroid status and liver histology. *Anim. Feed Sci. Technol.* 101, 171–182.
- Peres, H., Oliva-Teles, A. 2006. Effect of the dietary essential to non-essential amino acid ratio on growth, feed utilization and nitrogen metabolism of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture* 256, 395–402.
- Peres, H., Oliva-Teles, A. 2007. Effect of the dietary essential amino acid pattern on growth, feed utilization and nitrogen metabolism of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture* 267, 119–128.
- Pérez-Campo, R., López-Torres, M., Rojas, C., Cadenas, S., Barja, G. 1993. A comparative study of free radicals in vertebrates — I. Antioxidant enzymes. *Comp. Biochem. Physiol. B* 105, 745–749.
- Pérez-Jiménez, A. 2007. Respuesta nutritiva, metabólica y balance redox del dentón (*Dentex dentex*) bajo diferentes condiciones nutricionales. Tesis de doctorado, Facultad De Ciencias, Universidad De Granada, España.

Pérez-Jiménez, A., Hidalgo, M.A., Morales, A.E., Arizcun, M., Abellán, E., Cardenete, G. 2009

a. Use of different combinations of macronutrients in diets for dentex (*Dentex dentex*).

Effects on intermediary metabolism. *Comp. Biochem. Physiol. A* 152, 314–321.

Pérez-Jiménez, A., Hidalgo, M.A., Morales, A.E., Arizcun, M., Abellán, E., Cardenete, G. 2009

b. Growth performance, feed utilization and body composition of *Dentex dentex* fed on

different macronutrient combinations. *Aquac. Res.* 41, 111-119.

Pérez-Jiménez, A., Hidalgo, M.A., Morales, A.E., Arizcun, M., Abellán, E., Cardenete, G. 2009

c. Antioxidant enzymatic defenses and oxidative damage in *Dentex dentex* fed on

different dietary macronutrient levels. *Comp. Biochem. Physiol. C* 150, 537-545.

Pham-Huy, L.A., He, H., Pham-Huy, C. 2008. Free radicals, antioxidants in disease and

health. *International Journal of Biomedical Science* 4, 89-96.

Pinto, W., Figueira, L., Ribeiro, L., Yúfera, M., Dinis, M.T., Aragao, C. 2010. Dietary taurine

supplementation enhances metamorphosis and growth potential of *Solea*

*senegalensis* larvae. *Aquaculture* 309, 159–164.

Plummer, P. 1987. Glycogen determination in animal tissues, *An Introduction to Practical*

*Biochemistry* 3rd edn. McGraw Hill Book, Maidenhead. 332 pp.

Qi, G., Ai, Q., Mai, K., Xu, W., Liufu, Z., Yun, B., Zhou, H. 2012. Effects of dietary taurine

supplementation to a casein-based diet on growth performance and taurine

distribution in two sizes of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Aquaculture* 358–359 y 122–128.

Rodríguez, R., Hammann, G.M. 1997. Age and growth of totoaba, *Totoaba macdonaldi* (Sciaenidae) in the upper Gulf of California. *Fish. Bull.* 95: 620-628.

Rueda-López, S., Lazo, J.P., Correa-Reyes, G., Viana, M.T., 2011. Effect of dietary protein and energy levels on growth, survival and body composition of juvenile *Totoaba macdonaldi*. *Aquaculture* 319, 385–390.

Rueda López, S. 2013. Caracterización comparativa de lipasas en atún aleta azul del Pacífico (*Thunnus orientalis*), totoaba (*Totoaba macdonaldi*) y lobina Rayada (*Morone chrysops* x *M. Saxatilis*). Tesis de maestría, Facultad de Ciencias Marinas e Instituto de Investigaciones Oceanológicas, UABC. Ensenada, México.

Sakaguchi, M., Murata, M., Daikoku, T., Arai, S. 1988. Effects of dietary taurine on tissue taurine and free amino-acid levels of the chum salmon, *Oncorhynchus-Keta*, reared in fresh-water and seawater environments. *Comp. Biochem. Physiol. A* 89, 437–442.

Salway, J.G. 2004. *Metabolism at a Glance*, 3rd Edition. Blackwell Publishing. 128pp.

Salvemini, F., Franzé, A., Iervolino, A., Filosa, S., Salzano, S., Ursini, M.V. 1999. Enhanced glutathione levels and oxido resistance mediated by increased glucose-6-phosphate dehydrogenase expression. *J. Biol. Chem.* 274, 2750–2757.

- Sánchez-Muros, M.J., García-Rejón, L., García-Salguero, De la Higuera, M., Lupiáñez, J.A. 1998. Long-term nutritional effects on the primary liver and kidney metabolism in rainbow trout. Adaptive response to starvation and a high-protein, carbohydrate-free diet on glutamate dehydrogenase and alanine aminotransferase kinetics. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 30, 55–63.
- Sandoval-Garibaldi, G. 2002. Desarrollo morfológico de *Totoaba macdonaldi* (Gilbert, 1890) durante su estadio larval. Tesis de maestría, Facultad de Ciencias Marinas, UABC. Ensenada, México.
- Sargent, J.R., Tocher, D.R., Bell, J.G. 2002. The lipids. En: Halver, J.E., Hardy, R.W. 2002. *Fish Nutrition*. Academic Press. E.U.A. 824 pp.
- Singer, T.D., Mahadevappa, V.G., Ballantyne, J.S. 1990. Aspects of the energy metabolism of lake sturgeon, *Acipenser fulvescens*, with special emphasis on lipid and ketone body metabolism. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 47, 873–881.
- Solórzano, Y., López, L.M., Durazo, E., True, C.D., Sandoval, G. 2006. Efecto de niveles de alimentación sobre el crecimiento y composición química de juveniles de *Totoaba macdonaldi*. *Comunicación Científica - CIVA* (<http://www.civa2006.org>), 1181-1192.
- Spisni, E. Tugnoli, M. Ponticelli, A. Mordenti, T. Tomasi, V. 1998. Hepatic steatosis in artificially fed marine teleosts. *J. Fish Dis.* 21, 177-184.

- Storebakken, T., Refstie, S., Ruyter, B. 2000. Soy products as fat and protein sources in fish feeds for intensive aquaculture. *Soy in Animal Nutrition* (ed. by Drackley, J.K), Fed. Anim. Sci. Soc., Savoy, IL, USA, 127-170.
- Takagi, S., Murata, H., Goto, T., Ichiki, T., Munasinghe, D.M.S., Endo, M., Matsumoto, T., Sakurai, A., Hatate, H., Yoshida, T., Sakai, T., Yamashita, H., Ukawa, M., Kuramoto, T. 2005. The green liver síndrome is caused by taurine deficiency in yellowtail, *Seriola quinqueradiata* fed diets without fishmeal. *Aquacult. Sci.* 53, 279–290.
- Takagi, S., Murata, H., Goto, T., Ichiki, T., Endo, M., Hatate, H., Yoshida, T., Sakai, T., Yamashita, H., Ukawa, M., 2006. Efficacy of taurine supplementation for preventing green liver syndrome and improving growth performance in yearling red sea bream *Pagrus major* fed low-fishmeal diet. *Fisheries Sci.* 72, 1191–1199.
- 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* 280, 198–205.
- Takagi, S., Murata, H., Goto, T., Hatate, H., Endo, M., Yamashita, H., Miyatake, H., Ukawa, M. 2010. Necessity of dietary taurine supplementation for preventing green liver symptom and improving growth performance in yearling red sea bream *Pagrus major* fed nonfishmeal diets based on soy protein concentrate. *Fisheries Sci.* 76, 119–130.

- Tan, Q., Xie, S., Zhu, X., Lei, W., Yang, Y. 2007. Effect of dietary carbohydrate-to-lipid ratios on growth and feed utilization in Chinese longsnout catfish (*Leiocassis longirostris* Gunther). *J. Appl. Ichthyol.* 23, 605–610.
- Thivend, P., Mercier, C., Guilbot, A. 1972. Determination of starch with glucoamylase. In: Whistler, R.L., Bemiller, J.N. *Methods in Carbohydrate Chemistry*. Academic Press, New York, USA. 100–105 pp.
- Thrall, M.A. 2004. Hematology of fish. In: Thrall, M.A., Baker, D.C., Campbell, T.W., DeNicola, D., Fettman, M.J., Lassen, D.E., Rebar, A., Weiser, G. *Veterinary Hematology And Clinical Chemistry*. Lippincott Williams & Wilkins (1st ed.). Maryland, U.S.A. 618 pp.
- Timbrell, J.A., Seabra, V., Waterfield, C.J. 1994. The in vivo and in vitro protective properties of taurine. *Gen. Pharmac.*, 26: 453-462.
- Trenzado, C.E., Morales, A.E., De la Higuera, M. 2006. Physiological effects of crowding in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, selected for low and high stress responsiveness. *Aquaculture* 258, 583-593.
- True, C.,D., Silva, L.A., Castro, C.N. 1997. Acquisition of Broodstock of *Totoaba macdonaldi*: field handling, decompression, and prophylaxis of an endangered species. *Prog. Fish Cult.* 59, 246-248.

- True, D. 2012. Desarrollo de la biotecnia de cultivo de *Totoaba macdonaldi*. Tesis de doctorado, Facultad de Ciencias Marinas, UABC. Ensenada, México.
- Trushenski, J., Laporte, J., Lewis, H., Schwarz, M., Delbos, B., Takeuchi, R., Sampaio, L.A. 2011. Fish meal replacement with soy-derived protein in feeds for juvenile cobia: influence of replacement level and attractant supplementation. *J. World Aquacult. Soc.* 42, 435-443.
- Valenzuela-Quiñónez, F., García-de-León, F.J., De Anda-Montañez, J.A., Balart-Páez, E.F. 2011. La Totoaba del Golfo de California ¿una especie en peligro de extinción? *Interciencia* [en línea]. Disponible en: <<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=33921204005>> ISSN 0378-1844.
- Vijayan, M.M., Ballantyne, J.S., Leatherland, J.F. 1990. High stocking density alters the energy metabolism of brook charr, *Salvelinus fontinalis*. *Aquaculture* 88, 371-381.
- Vilhelmsson, O., Martin, S.A.M., Médale, F., Kaushik, S., Houlihan, D.F. 2004. Dietary plant-protein substitution affects hepatic metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Brit. J. Nutr.* 92, 71-80.
- Villarreal Rodarte, G.E. 2011. Efecto de la concentración de hufas n-3 en la dieta sobre el crecimiento, supervivencia, eficiencia alimenticia e índice de condición en juveniles de *Totoaba macdonaldi*. Tesis de maestría, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior, Ensenada, México.

- Vizcaíno Pérez, E. 2008. Efecto en el crecimiento, consumo, sobrevivencia y composición proximal de juveniles de *Totoaba macdonaldi*, alimentados con dietas isoproteicas formuladas con distintos niveles de energía. Tesis de licenciatura, Facultad de Ciencias Marinas, UABC. Ensenada, México.
- Walker, A.B., Sidor, I.F., O'Keefe, T., Cremer, M., Berlinsky, D.L. 2010. Partial replacement of fish meal with soy protein concentrate in diets of Atlantic cod. *N. Am. J. Aquacult.* 72, 343-353.
- Walton, M.J., Cowey, C.B. 1982. Aspects of intermediary metabolism in Salmonid fish. *Comp. Biochem. Physiol.* 1, 59-79.
- Wang, Y., Kong, L-J., Li, C., Bureau, D.P. 2006. Effect of replacing fish meal with soybean meal on growth, feed utilization and carcass composition of cuneate drum (*Nibea miichthioides*). *Aquaculture* 261, 1307–1313.
- Watanabe, T., Aoki, H., Shimamoto, K., Hadzuma, M., Maita, M., Yamagata, Y., Kiron, V., Satoh, S. 1998. A trial to culture yellowtail with non-fishmeal diets. *Fisheries Sci.* 64, 505–512.
- Wilhelm-Filho, D.W., Giulivi, C., Boveris, A. 1993. Antioxidant defenses in marine fish — I. Teleosts. *Comp. Biochem. Physiol. C* 106, 409–413.
- Wilson, R.P. 2002. Amino Acids and Proteins. En: Halver, J.E., Hardy, R.W. 2002. *Fish Nutrition*. Academic Press. E.U.A. 824 pp.

Winston, G.W., Di Giulio, R.T. 1991. Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. *Aquat. Toxicol.* 19, 137-161.

Wolf, J.C., Wolfe, M.J. 2005. A brief overview of nonneoplastic hepatic toxicity in fish. *Toxicol. Pathol.* 33, 75–85.

Wu, G. 2009. Amino acids: metabolism, functions, and nutrition. *Amino Acids* 37, 1-17.

Yokoyama, M., Takeuchi, T., Park, G.S., Nakazoe, J. 2001. Hepatic cysteinesulphinatase decarboxylase activity in fish. *Aquacult. Res.* 32, 216-220.

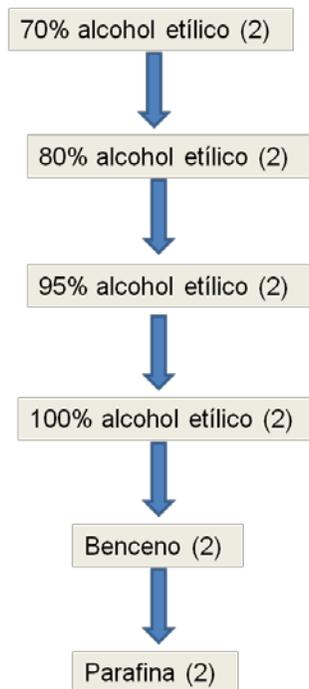
# ANEXOS

## ANEXO 1 Solución Davidson y técnica de deshidratado

La solución Davidson fue preparada con los siguientes reactivos:

Reactivo	Cantidad (mL)
Alcohol etílico 95%	330
Solución de formaldehído 37%	220
Ácido acético glacial	115
Agua destilada	335

La deshidratación e inclusión de las muestras se realizó a través de un deshidratador de tejidos automático (Leica-TP 1040), para lo cual se utilizaron soluciones sucesivas de alcohol etílico, benceno y parafina líquida, tal como se muestra en el siguiente diagrama.



### ANEXO 1.1 Tinción Hematoxilina–Eosina (H-E)

La tinción H-E se realizó de acuerdo a la metodología descrita en el siguiente diagrama:



## **ANEXO 1.2 Índices de evaluación histopatológica del hígado de *Totoaba macdonaldi***

En el presente estudio, las alteraciones hepáticas se clasificaron en 4 patrones de alteración principales (PA): perturbación circulatoria, vacuolización, cambios nucleares y agregados inflamatorios; cada una con características histológicas distintivas que afectan áreas específicas de los tejidos relacionados con la función. La evaluación microscópica se llevó a cabo para calcular el porcentaje de las zonas que presentaban una alteración específica y fueron asignados valores de 0-3 en función del porcentaje de cada alteración de un promedio de 10 campos de 40x.

De acuerdo con los protocolos descritos por Bernet et al. (2001) y Agamy et al. (2012), a cada PA le fue asignado un patrón de reacción (PR) y un factor de importancia (FI) como una medida de las alteraciones específicas que pueden afectar de manera reversible o irreversible la salud del pez, en el que altos valores del PR y FI representan un mayor potencial de impacto en la salud de los peces. Por otra parte, mientras que el PR es un valor asignado para cada tipo de PA, los valores de

FI indican si el nivel de daño es de leve a moderado (reversible) o severo (irreversible).

<b>Alteración</b>	<b>Grado</b>	<b>PR</b>	<b>FI</b>
<i>Perturbación circulatoria</i>			
Ausencia	0	1	0
Presencia (50% del campo)	1	1	1
<i>Vacuolización celular</i>			
<10%	0	2	0
10-30%	1	2	1
30-60%	2	2	2
>60%	3	2	2
<i>Cambios nucleares</i>			
Sin cambios	0	2	0
50 % Desplazados a la periferia	1	2	1
> 50% Desplazados y/o ausentes	2	2	2
<i>Agregados inflamatorios</i>			
Ausencia	0	4	0
Presencia (>40% campo)	1	4	2

Cálculos:

Para determinar el índice de cada patrón de alteración ( $I_{PA}$ ), se utilizó la sumatoria de alteraciones relevantes ( $\sum_{alt}$ ) como se indica en la siguiente fórmula:

$$I_{PA} = \sum_{alt} (\text{Grado} \times \text{PR} \times \text{FI})$$

Donde:

Grado es el porcentaje de un PA determinado, PR es el patrón de reacción constante para ese PA y FI indica el factor de importancia del daño observado.

El índice de alteración del órgano hepático ( $I_{org}$ ) para cada individuo se determinó a través de la siguiente fórmula:

$$I_{org} = \sum_{PA} \sum_{alt} (\text{Grado} \times PR \times FI)$$

Donde:

La  $\sum_{PA}$  indica la sumatoria de los diferentes PA observados en el órgano hepático.

## ANEXO 2 Análisis proximales

Los análisis de composición bioquímica proximal de los ingredientes, dietas y muestras de tejidos se realizaron de acuerdo con los métodos establecidos por la AOAC (2000):

- *Humedad*: El contenido en agua de las muestras fue determinado por diferencia de peso antes y después de desecación en estufa a 105 °C hasta peso constante.
- *Cenizas*: Las muestras fueron sometidas a incineración en horno mufla a 550 °C durante 6 horas. El contenido en minerales fue dado por la diferencia de peso de las muestras sin incinerar e incineradas.
- *Lípidos*: El contenido de La grasa contenida en las muestras se determinó por el método modificado de Folch et al. (1957). Para ello, tubos de vidrio fueron pesados y luego las muestras adicionadas y pesadas. A las muestras se les adicionó 6 mL de metanol: cloroformo (2:1 v/v). La mezcla se mantuvo en agitación durante 3 min. Posteriormente se le adicionó cloruro de potasio al 1.76% (KCl) y se dejó reposar hasta por 12 h. Se retiró la fase metanol: KCl y el cloroformo fue evaporado a 60 °C. El contenido de lípidos se calculó con la siguiente fórmula: Lípidos totales (%) = 
$$\frac{[(\text{tubo} + \text{lípidos}) - (\text{tubo solo})]}{\text{peso muestra}} \times 100.$$

– *Proteína*: El análisis de la fracción proteica se realizó según el método Kjeldahl a través de digestión de las muestras con ácido sulfúrico concentrado y usando como catalizador una mezcla de sulfato de potasio y sulfato de cobre en proporciones 100:3. Las muestras digeridas fueron llevadas a un volumen final de 25 mL. De éstos, se tomó una alícuota que, fue destilada junto con hidróxido de sodio (NaOH) al 40%. El amoníaco generado fue colectado en un vaso de precipitado que contenía ácido bórico al 3% e indicador Shiro-Toshiro (compuesto de rojo de metilo, azul de metileno y etanol). Finalmente el destilado fue valorado con ácido clorhídrico (HCl) 0.02 N. se utilizó el valor 6.25 como factor de conversión del nitrógeno a proteína total. La fórmula que se utilizó fue la siguiente: Proteína total (%)=  $[(\text{mL HCl gastados (muestra - blanco)} \times \text{N de HCl} \times 14.007) / \text{mg de muestra en 5 mL}] \times 100] \times 6.25$ .

– *Almidón*: Para el análisis de almidón se utilizó el método de Thievend et al. (1972). Después de pesar las muestras, se les adicionó Dimetilsulfóxido (DMSO) y HCl 8M. Posteriormente, las muestras fueron colocadas en baño maría con agitación a 60 °C durante 1 h. Luego de sacar las muestras del baño maría, se les adicionó 15 mL de agua destilada y se les ajustó el pH a 4-5. Después las muestras fueron aforadas a 50 mL y se tomó una alícuota de 100 µL y se traspasó a tubos de 1.5 mL. A cada tubo se le agregaron 200 µL de solución de citrato (ácido cítrico y citrato de trisodio a

pH de 4.6) y 20  $\mu$ L de solución de amiloglucosidasa. Los tubos fueron colocados en baño maría con agitación a 60 °C durante 1 h. Para cuantificar el contenido de glucosa liberado del almidón se utilizó un kit comercial de *Pointe Scientific, INC.*

– *Glucógeno*: el método de Plummer (1987) fue utilizado para determinar el glucógeno. Las muestras de hígado congelado fueron inmediatamente pesadas y adicionadas con 2 mL de hidróxido de potasio al 30%. Luego, las muestras fueron colocadas a baño maría a 100 °C durante 20 min, con agitación cada 5 min. Después se colocaron en baño de agua helada y se les adicionó 0.2 mL de sulfato de sodio saturado y 5 mL de etanol 95%. Las muestras fueron homogenizadas y luego reposadas por 5 min. Posteriormente fueron centrifugadas a 2000 g por 10 min. Se tiró el sobrenadante, y el pellet fue disuelto en agua destilada caliente. Después de enfriarse, las muestras fueron llevadas a un volumen de 10 mL y se tomó una alícuota de 1 mL para traspasarla a tubos con 1 mL de HCl 1.2M. Las muestras fueron puestas a baño maría a 100 °C por 2 h. Posteriormente las muestras fueron llevadas a un pH de ~7 utilizando NaOH 0.5M y utilizando como indicador la solución rojo de fenol. Finalmente, el contenido de glucosa liberado del glucógeno se cuantificó a través de un kit comercial de *Pointe Scientific, INC.*

### **ANEXO 3 Enzimas del metabolismo intermediario y del sistema de defensa**

#### **antioxidante**

Para el análisis de las diferentes enzimas del metabolismo intermediario y del sistema antioxidante hepático fue necesario determinar el contenido de proteínas solubles en el tejido. Para lo cual se utilizó la siguiente metodología.

#### **Determinación de proteínas solubles en hígado**

La concentración de proteínas solubles de una muestra se determinó de acuerdo con la técnica de Bradford (1976). El método se basa en la unión del colorante azul de Coomassie a la estructura terciaria de las proteínas, para lo cual se utilizó un kit comercial Bio-Rad cuya sensibilidad es de 1  $\mu\text{g}$ .

– Preparación de estándares para la curva patrón:

	<b>Conc. albúmina (<math>\mu\text{g mL}^{-1}</math>)</b>	<b>Sol. madre de albúmina 0.06 % (<math>\mu\text{L}</math>)</b>	<b>H<sub>2</sub>O destilada (<math>\mu\text{L}</math>)</b>
A	1.4	500	0
B	1.0	375	125
C	0.7	250	250
D	0.35	125	375
E	0.175	250	250
F	0	Sol. D	500

### Procedimiento

En cada pozo de microplaca se adicionaron 5  $\mu$ l de cada estándar y de las muestras de hígado (previamente diluido en tampón de fosfatos, descrito en el apartado 2.5.4). En seguida se adicionaron 250  $\mu$ L del reactivo de Bradford (a temperatura ambiente) y se agitaron las muestras por 30 segundos. Posteriormente, las muestras fueron incubadas en oscuridad y a temperatura ambiente por 10 min. Finalmente se procedió a la lectura de la absorbancia a una longitud de onda de 595 nm.

### Cálculos

A partir de la recta obtenida por la representación de la densidad óptica de las distintas concentraciones de la curva patrón, y por interpolación de los valores de densidad óptica de las muestras, se calculó la concentración de proteína soluble contenida en cada una de ellas, considerando la cantidad de muestra que fue añadida, así como la dilución realizada. Los resultados se expresaron en mg de proteína ml de extracto<sup>-1</sup>.

## **DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE ENZIMAS DEL METABOLISMO**

### **INTERMEDIARIO**

La actividad de todas las enzimas analizadas implicadas en el metabolismo intermediario se realizó mediante la lectura de cambios en la absorbancia de una determinada “mezcla de reacción”, según el enzima a analizar. Para ello se utilizó un espectrofotómetro lector de microplacas (PowerWaveX, de Bio-Tek Instruments, Inc. USA). Las condiciones de temperatura (37 °C) y volumen final de la “mezcla de reacción” (200 µL) fueron las mismas en todas las enzimas analizadas. La concentración óptima de sustrato, así como la dilución más apropiada del extracto de un determinado tejido, fueron establecidas en base a análisis preliminares. La reacción enzimática siempre fue iniciada por adición del extracto de muestra. Todas las soluciones fueron elaboradas con agua destilada, salvo en los casos en los que se especificó lo contrario.

*Aspartato aminotrasnferasa (ASAT, E.C. 2.6.1.1) y Alanina aminotrasnferasa (ALAT, E.C. 2.6.1.2)*

La actividad las enzimas ASAT y ALAT se realizó basándose en la medida espectrofotométrica de la disminución de densidad óptica producida por la oxidación de NADH, para lo cual se utilizaron kits comerciales de Spinreact.

Glutamato deshidrogenasa (GDH, E.C. 1.4.1.2)

La actividad GDH se realizó basándose en la medida espectrofotométrica de la disminución de densidad óptica producida por la oxidación de NADH, para lo cual se utilizó la metodología de Morales et al. (1990):

Reactivos:

- Tampón Imidazol 71.4 mM pH 7.4.
- NADH/ADP 2.9/14.3 mM
- Acetato amónico 3.3 M
- LDH
- $\alpha$ -KG 200mM (sustrato)

Procedimiento

Abs = 340 nm	Concentración en pozo	Volumen ( $\mu$ L) de 200 $\mu$ L
Tampón Imidazol 71.4 mM pH 7.4	50	140
NADH/ADP 2.9/14.3 mM	0.2/1	14
Acetato amónico 3.3 M	100	6
LDH	2 U/mL	0.15
$\alpha$ -KG 200mM (sustrato)	10	10

Hexoquinasa (HK, E.C. 2.7.1.1)

La actividad HK se realizó basándose en la medida espectrofotométrica de la reducción de  $\text{NADP}^+$ , para lo cual se utilizaron la siguiente metodología (Vijayan *et al.*, 1990):

## Reactivos:

- Tampón Imidazol 71.4 mM pH 7.4.
- Solución de  $\text{MgCl}_2$  100 mM.
- Solución de ATP 50 mM.
- Solución de NADP 8 mM.
- Glucosa 6-P deshidrogenasa comercial (G6PD).
- Solución de glucosa 10 mM.

## Procedimiento

Concentración	Volumen ( $\mu\text{L}$ )
---------------	---------------------------

<b>Abs = 340 nm</b>	<b>en pozo</b>	<b>de 200 <math>\mu</math>L</b>
Tampón Imidazol	50 mM	140
MgCl <sub>2</sub>	5 mM	10
ATP	2.5 mM	10
NADP	0.4 mM	10
G6PD	2 UI mL <sup>-1</sup>	0.57
Glucosa	10 mM	10
Muestra		20

*Glucocuinasa (HK IV; E.C. 2.7.1.2)*

La actividad GK se realizó basándose en la medida espectrofotométrica de la reducción de NADP<sup>+</sup>, para lo cual se utilizaron la siguiente metodología (Vijayan *et al.*, 1990):

Reactivos:

- Tampón Imidazol 71.4 mM pH 7.4.
- Solución de MgCl<sub>2</sub> 100 mM.
- Solución de ATP 50 mM.
- Solución de NADP 8 mM.
- G6PD.
- Solución de glucosa 1 M.

Procedimiento

<b>Abs = 340 nm</b>	<b>Concentración en pozo</b>	<b>Volumen (µL) de 200 µL</b>
Tampón Imidazol	50 mM	140
MgCl <sub>2</sub>	5 mM	10
ATP	2.5 mM	10
NADP	0.4 mM	10
G6PD	2 UI mL <sup>-1</sup>	0.57
Glucosa	1 M	10
Muestra		20

*Fructosa 1-6 bifosfatasa (FBPasa, E.C. 3.1.3.11)*

La actividad FBPasa se realizó basándose en la medida espectrofotométrica de la reducción de NADP<sup>+</sup>, para lo cual se utilizó la metodología de Morales et al., (1990):

Reactivos:

- Tampón Imidazol 71.4 mM pH 7.4.
- Solución de MgCl<sub>2</sub> 100 mM.
- Solución de NADP 10 mM.
- β- mercaptoetanol 240 mM
- G6PD.
- FBP 5 mM (sustrato)

## Procedimiento

<b>Abs = 340 nm</b>	<b>Concentración en pozo</b>	<b>Volumen (µL) de 200 µL</b>
Tampón Imidazol 71.4 mM, pH 7.4	42.84	120
MgCl <sub>2</sub> 100 mM	5	10
NADP 10 mM	0.5	10
β- mercaptoetanol 240 mM	12	10
PGI	2 U/mL	0.57
G6PD	2 U/mL	0.57
Agua destilada		20
FBP 5 mM (sustrato)	0.5	20
Muestra		10

### Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PD, E.C. 1.1.1.49)

La actividad G6PD se realizó basándose en la medida espectrofotométrica de la reducción de NADP<sup>+</sup>, para lo cual se utilizó la metodología de Morales et al., (1990):

#### Reactivos:

- Tampón Imidazol 71.4 mM pH 7.4.
- Solución de MgCl<sub>2</sub> 100 mM.
- Solución de NADP 20 mM (disuelto en HCO<sub>3</sub>Na 119mM).
- G6P 10 mM (sustrato)

## Procedimiento

<b>Concentración</b>	<b>Volumen (µL)</b>
----------------------	---------------------

<b>Abs = 340 nm</b>	<b>en pozo</b>	<b>de 200 <math>\mu</math>L</b>
Tampón Imidazol 71.4 mM, pH 7.4	50	140
MgCl <sub>2</sub> 100 mM	5	10
NADP 20 mM	2	10
G6P	1	20
Muestra		10

### Enzimas málicas (EM, E.C. 1.1.1.40)

La actividad EM se realizó basándose en la medida espectrofotométrica de la reducción de NADP<sup>+</sup>, para lo cual se realizó la siguiente metodología (Singer *et al.*, 1990):

Reactivos:

- Tampón Imidazol 71.4 mM pH 7.4.
- Solución de MgCl<sub>2</sub> 100 mM.
- Solución de NADP 8 mM.
- L-malato 40 mM (sustrato)

Procedimiento

<b>Abs = 340 nm</b>	<b>Concentración en pozo</b>	<b>Volumen (<math>\mu</math>L) de 200 <math>\mu</math>L</b>
Tampón Imidazol 71.4 mM, pH 7.4	50	140
MgCl <sub>2</sub> 100 mM	5	10
NADP 20 mM	0.4	10
L-malato 40 mM		10
Agua destilada	2	10

Acido graso sintetasas (FAS; EC 2.3.1.38)

La actividad FAS se realizó basándose en la medida espectrofotométrica de la reducción de malonil-Co A, para lo cual se utilizó el método de Chang et al. (1967) modificado por Chakrabarty y Leveille (1969):

Reactivos:

- Solución A de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0.1 mM): 2.28 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  en 100 mL.
- Solución B de  $\text{KPO}_4\text{H}_2$  (0.1 mM): 2.28 g de  $\text{KPO}_4\text{H}_2$  en 250 mL.
- Tampón de fosfato de potasio (100 mM, pH 6.5): ajustar el pH a 6.5 de la solución A utilizando la solución B.
- NADPH 0.1 mM.
- Acetil Co A 25  $\mu\text{M}$ .
- Malonil coenzima A 0.6 mM (sustrato).

Nota: el NADPH, acetil CoA y malonil coenzima A se prepararán al momento de usarlos. Cada reactivo se pesará por separado, pero el NADPH y acetil CoA se

mezclarán utilizando el tampón de fosfatos (100 mM, pH 6.5) para formar el MIXFAS.

El sustrato (malonil coenzima A) se preparará al momento de usarlo utilizando el tampón de fosfatos (100 mM, pH 6.5).

#### Procedimiento

	Volumen (μL) de 200 μL muestra	Volumen (μL) de 200 μL Blanco
MIXFAS	140	140
Muestra	20	20
Sustrato Malonil coenzima A	20	--
Agua destilada	--	20

#### *Cálculos de las actividades enzimáticas*

La actividad específica de cada una de las enzimas del metabolismo intermediario fue expresada en **mU mg de proteína<sup>-1</sup>**. Una unidad de actividad fue definida como la cantidad de enzima requerida para transformar un μmol de sustrato por minuto bajo las condiciones analíticas descritas. Para el cálculo de dicha actividad se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{mU mg de proteína}^{-1} = (\text{nmol min}^{-1}) \text{ mg proteína}^{-1} = \frac{(\Delta\text{DO} / \Delta t) \times V_t \times f}{\epsilon \times 10^3 \times 10^{-9} \times V_d \times d \times P}$$

Donde:

$\Delta DO/\Delta t$ : incremento o decremento de densidad óptica/minuto.

Vt: volumen total de reacción en mL.

f: factor de corrección por dilución del extracto.

$\epsilon X$ : coeficiente extinción molar, según la longitud de onda de lectura de cada enzima:

$\epsilon_{340} = 6,22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$  (NADH, NADPH)

$\epsilon_{313} = 20,5 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$  (Acetoacetil-CoA)

$\epsilon_{412} = 13,6 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$  (DTNB)

$10^3$ : factor de conversión de litro a mililitro.

$10^{-9}$ : factor de conversión de mol a nmol.

Ve: volumen del extracto añadido en mL.

d: longitud de paso de luz. Para las microplacas el valor es 0.6 cm.

P: mg de proteína por mL.

## **DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE ENZIMAS DEL SISTEMA DE DEFENSA**

### **ANTIOXIDANTE**

La determinación de la actividad de las enzimas antioxidantes se realizó por el mismo sistema y condiciones descritas para las enzimas del metabolismo intermediario, con la excepción de que la reacción enzimática fue iniciada por adición del sustrato en lugar del extracto de muestra.

*Superóxido dismutasa (SOD; EC 1.15.1.1)*

La actividad SOD se realizó basándose en la medida espectrofotométrica de la tasa de inhibición de la reducción del citocromo C producida por la SOD, para lo cual se utilizó el método de McCord y Fridovich (1969):

Reactivos:

- Solución de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ : 3.4 g en 500 mL.
- Solución de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ : 4.35 g en 500 mL.
- Tampón de fosfato de potásico (50 mM, pH 7.8), EDTA 0.1 mM: ajustar el pH a 7.8 de la solución de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  utilizando la solución de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Posteriormente pesar el EDTA para lograr molaridad de 0.1 mM.
- Xantina 1mM (disuelta en calentamiento).
- Citocromo C 1mM (proteger de la luz).
- Solución de xantina oxidasa comercial (XOD)  $1 \text{ UI mL}^{-1}$ .

Nota: la xantina, el citocromo C y la solución de XOD se preparan con el tampón de fosfato de potásico 50 mM, pH 7.8, EDTA 0.1 mM. La xantina puede también ser almacenada en alícuotas congeladas. Pero solo se pueden descongelar una vez.

### Procedimiento

Para realizar el análisis fue necesario preparar volumen suficiente de una “solución de reacción” compuesta por EDTA, xantina y citocromo C, diluidos en tampón fosfato potásico 50 mM pH 7.8, en proporciones 30:6:1, respectivamente. Esta solución fue protegida de la luz, mantenida a 25 °C y llevada a saturación de oxígeno mediante un aireador, durante 90 minutos.

Se realizaron dos mediciones:

– Reacción control: A 195  $\mu$ l de la “solución de reacción” se le añadieron 5  $\mu$ l de la solución de XOD, la cual inició la reacción de reducción del citocromo C que fue seguida mediante lectura del cambio de absorbancia a 550 nm. Para aceptar los resultados de la reacción control, los valores obtenidos debían encontrarse entre 0.023 y 0.028  $\Delta$ DO/minuto ( $d = 1$  cm).

– Reacción problema: Se añadieron las siguientes cantidades de reactivos y extracto en cada pocillo de las microplacas, de forma que al igual que en la reacción control, la adición de la solución de XOD inició la reacción:

<b>Abs = 550 nm</b>	<b>Concentración en pozo</b>	<b>Volumen (µL) de 200 µL</b>
EDTA	0.079 mM	150
Xantina	0.090 mM	30
Citocromo C	0.012 mM	5
XOD*	0.025 UI mL <sup>-1</sup>	5
Muestra		10

\* El valor es simbólico, ya que este se ajusta en función de los resultados de la reacción del control.

### *Cálculos*

Una unidad de de actividad SOD fue definida como la cantidad de enzima requerida para inhibir la tasa de reducción de citocromo C un 50% bajo las condiciones analíticas descritas. La actividad específica fue expresada en **U mg de proteína<sup>-1</sup>**.

Para el cálculo de dicha actividad se utilizó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{[\Delta\text{DO} / \text{min} (\text{control})] - [\Delta\text{DO} / \text{min} (\text{muestra})]}{[\Delta\text{DO} / \text{min} (\text{control})]} \times 100$$

$$\text{U SOD mg de proteína}^{-1} = \frac{\% \text{ Inhibición}}{50\%} \times \frac{f}{V_e \times P}$$

Donde:

$\Delta$  DO/min: incremento de densidad óptica por minuto.

f: factor de corrección por dilución del extracto.

Ve: volumen del extracto añadido en mL.

P: mg de proteína por mL.

Glutation peroxidasa (GPX, E.C. EC 1.11.1.9)

Para determinar la actividad de GPX se utilizó el método de Flohé y Günzler (1984), basado en una medida indirecta de la actividad mediante la lectura a 340 nm del decremento en la absorbancia producido por la oxidación del NADPH, utilizado para regenerar el glutatión reducido (GSH) a partir del glutatión oxidado (GSSG) obtenido por la acción de la glutatión peroxidasa:

Reactivos:

- Solución A de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ : 3.4 g en 500 mL.
- Solución B de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ : 4.35 g en 500 mL.
- Tampón de fosfato de potásico (50 mM, pH 7.1): ajustar el pH a 7.1 de la solución B utilizando la solución A.

- Azida sódica 15.5 mM (inhibe la actividad catalasa).
- EDTA 3.9 mM.
- Glutation reducido (GSH) 25.8 mM.
- NADPH 1.5 mM.
- Glutation reductasa (GR) 9.7 UI ml<sup>-1</sup>.
- Peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 1 mM.

Nota: Todos las soluciones fueron preparadas diluyendo los reactivos en tampón fosfato potásico 50 mM pH 7.1.

Procedimiento:

<b>Abs = 340 nm</b>	<b>Concentración en pozo</b>	<b>Volumen (μL) de 200 μL</b>
Azida sódica	3.88 mM	50
EDTA	0.97 mM	50
GSH	3.87 mM	30
NADPH	0.22 mM	30
GR	0.97 UmL <sup>-1</sup>	20
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0.05 mM	10
Muestra		10

### *Cálculos*

La actividad de GPX fue expresada en **mU mg de proteína<sup>-1</sup>**. Una unidad de actividad fue definida como la cantidad de enzima requerida para transformar un μmol

de sustrato por minuto bajo las condiciones analíticas descritas. La fórmula utilizada es la que fue descrita para las enzimas de metabolismo intermediario.

Glutation reductasa (GR, E.C. 1.6.4.2)

Se determinó la actividad catalítica de GR con el método descrito por Morales et al (2004), basado en la lectura a 340 nm, del decremento en la absorbancia producido por la oxidación del NADPH utilizado por la GR, en el paso de GSSG a GSH.

Reactivos:

- Solución A de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ : 6.0 g en 500 mL.
- Solución B de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ : 7.098 g en 500 mL.
- Tampón fosfato sódico 0.1 M pH 7.5, EDTA 1 mM: ajustar el pH a 7.1 de la solución B utilizando la solución A. Se añadió la cantidad de EDTA necesaria para la molaridad deseada.
- NADPH 0.66 mM.
- GSSG 3.25 mM.

Nota: La solución de NADPH y GSSG fueron preparadas en tampón fosfato sódico 0.1 M pH 7.5, EDTA 1 mM.

Procedimiento:

<b>Abs = 340 nm</b>	<b>Concentración en pozo</b>	<b>Volumen (µL) de 200 µL</b>
NADPH	0.63 mM	180
GSSH	0.16 mM	10
Muestra		10

### *Cálculos*

La actividad de GR fue expresada en **mU mg de proteína<sup>-1</sup>**. Una unidad de actividad fue definida como la cantidad de enzima requerida para transformar un µmol de sustrato por minuto bajo las condiciones analíticas descritas. La fórmula utilizada es la fue descrita para las enzimas de metabolismo intermediario.

### *Catalasa (CAT, E.C. 1.11.1.6)*

Se determinó la actividad catalítica de la enzima con el método descrito por Aebi (1984), basado en la lectura a 240 nm, del decremento en la absorbancia producido por la disminución de la concentración del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

## Reactivos

- Solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10.5 mM en tampón fosfato potásico 50 mM pH 7.0.

## Procedimiento

Abs = 240 nm	Concentración en pozo	Volumen (μL) de 200 μL
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	10 mM	190
Muestra		10

## Cálculos

Una unidad de actividad CAT fue expresada en **U mg de proteína<sup>-1</sup>**. Para el cálculo de dicha actividad se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{U CAT mg de proteína}^{-1} = \frac{[\Delta\text{DO} / \text{min} (\text{control})] - [\Delta\text{DO} / \text{min} (\text{muestra})] \times 100}{[\Delta\text{DO} / \text{min} (\text{control})]}$$

Donde:

$\Delta$  DO/min: decremento de densidad óptica por minuto.

Vt: volumen total de reacción en mL.

f: factor de corrección por dilución del extracto.

$\epsilon_{240}$  = coeficiente de extinción molar del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (39.58 M<sup>-1</sup> × cm<sup>-1</sup>).

10 3: factor de conversión de litro a mililitro.

$10^{-6}$ : factor de conversión de mol a  $\mu\text{mol}$ .

Ve: volumen del extracto añadido en mL.

d: longitud de paso de luz. Para las microplacas el valor es 0.6 cm.

P: mg de proteína por mL.

## ANEXO 4 Solución Dacie

La solución Dacie fue preparada con los siguientes reactivos:

<b>Reactivo</b>	<b>Cantidad</b>
Solución de formaldehído 37%	10 mL
Citrato de trisodio	31.3 g
Azul de cresilo brillante	1 g
Agua destilada	1000 mL

La solución puede ser almacenada por tiempo indefinido. No obstante, esta debe ser filtrada el día de su uso. Las muestras de sangre homogenizadas en solución Dacie pueden ser almacenadas a temperatura ambiente hasta por 2 semanas antes de realizar el conteo de células.



Contents lists available at ScienceDirect

## Comparative Biochemistry and Physiology, Part B

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/cbpb](http://www.elsevier.com/locate/cbpb)

# Effect of fishmeal replacement by soy protein concentrate with taurine supplementation on hepatic intermediary metabolism and antioxidant status of totoaba juveniles (*Totoaba macdonaldi*)

Isaura Bañuelos-Vargas<sup>a,1</sup>, Lus M. López<sup>a,\*</sup>, Amalia Pérez-Jiménez<sup>b,c</sup>, Helena Peres<sup>c,1</sup>

<sup>a</sup> Universidad Autónoma de Baja California (UABC), Facultad de Ciencias Marinas, PO Box 76, Ensenada 22800, B.C., Mexico

<sup>b</sup> Departamento de Zoología, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, Campus Fuentenueva s/n, 18071 Granada, Spain

<sup>c</sup> CIMAR/CIIMAR—Centro Interdisciplinar de Investigación Marina y Ambiental, Universidade do Porto, Rua dos Bragas 289, 4050-123 Porto, Portugal

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 3 November 2013

Received in revised form 16 December 2013

Accepted 14 January 2014

Available online xxx

### Keywords:

Carnivorous fish

Soy protein concentrate

Taurine

Intermediary metabolism

Oxidative status

## ABSTRACT

The effect of dietary incorporation of soy protein concentrate (SPC) and the concomitant supplementation with taurine on hepatic intermediary metabolism and antioxidant status of totoaba (*Totoaba macdonaldi*) juveniles was assessed. Four isoproteic and isolipidic diets were formulated containing either 30 or 60% of SPC (diets SP30 and SP60), supplemented or not with 1% of taurine (diets SP30T and SP60T). A fish meal (FM) based diet, without SPC and taurine supplementation, was used as a control. Triplicate groups of 32 totoaba juveniles (average body mass = 7.5 g) were fed these diets over 45 days. Results revealed that dietary FM replacement by SPC depressed the overall intermediary metabolism. Activity of key enzymes of amino acid catabolism and gluconeogenesis was significantly reduced and a trend to reduce glycolysis and glucose-6-phosphate dehydrogenase activity was observed. The incorporation of the highest level of SPC also significantly increased hepatic lipid peroxidation and the activity of superoxide dismutase. Concomitant taurine supplementation restored the activity of amino acid catabolic and gluconeogenic enzymes and hexokinase to levels similar of those of the control diet. Taurine supplementation also led to a significant increase of glucose-6-phosphate dehydrogenase and catalase activity, as well as to a significant reduction of liver lipid peroxidation. These results suggest that taurine may play an important metabolic modulation action on totoaba fed SPC based diets, contributing to the enhancement of the overall metabolism and to the reduction of liver oxidative damage.

© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

## 1. Introduction

Fish are reported to be able to adapt to different nutritional conditions, such as those imposed by feeding high plant protein diets to carnivorous fish and by shifting their metabolic profile (Metón et al., 1999; Messina et al., 2007; Pérez-Jiménez et al., 2009), including pathways involved in protein and energy utilization (Martin et al., 2003; Vilhelmsson et al., 2004; Dias et al., 2005). Plant feedstuff has amino acid (AA) imbalances, antinutritional factors, lower protein content, and lower digestibility and palatability that may modulate metabolism. Further, replacement of fish meal (FM) by plant protein sources may affect the dietary essential amino acid (EAA) profile and the essential to non-essential AA ratio that have been reported to affect the activity of amino acid metabolizing enzymes (Gómez-Requeni et al., 2003; Martin et al., 2003; Vilhelmsson et al., 2004; Peres and Oliva-Teles, 2006, 2007). Besides these constraints, plant feedstuff also lacks certain

components, such as taurine, hydroxyproline and nucleotides, present in abundance in FM but not in plant protein sources, which appear to have beneficial proprieties on the performance and well-being of carnivorous fish (El-Sayed, 2013).

Taurine is an abundant non-proteic amino acid involved in numerous physiological processes, such as bile acid conjugation, osmoregulation, modulation of calcium levels, detoxification, reproduction, cell membrane stabilization, cell volume regulation and anti-inflammatory events (Divakaran, 2006). Additionally, taurine is recognized as a potent antioxidant, having an oxygen free radical scavenger effect, leading to a reduction of lipid peroxidation, reduction of membrane permeability, and reduction of intracellular oxidation and so protecting tissue from oxidative injury (Hagar, 2004; Parvez et al., 2008; Yu and Kim, 2009; Zeng et al., 2010). Taurine deficiency has been related with a dysfunctional respiratory chain that allows accumulation of electron donors which divert electrons from the respiratory chain to oxygen, forming superoxide anion in the process (Schaffer et al., 2009).

Under normal nutritional conditions, taurine may be synthesized from methionine and cysteine metabolism, but in some specific situations, animals cannot synthesize enough taurine to meet body needs and therefore require a continuous dietary supply (Huxtable, 1992; Roysommuti et al., 2003; Hu et al., 2008; Battin and Brumaghim, 2010).

\* Corresponding author at: Universidad Autónoma de Baja California (UABC), Facultad de Ciencias Marinas, PO 453, Ensenada 22800, Baja California, Mexico. Tel.: +52 6461744570; fax: +52 6461744103.

E-mail address: [llopez@uabc.edu.mx](mailto:llopez@uabc.edu.mx) (L.M. López).

<sup>1</sup> These authors contributed equally to the study.

2009). In fish, limited capacity to synthesize taurine may impose the requirement of this AA, such as during early life stage or when the dietary intake of this AA is insufficient. Indeed, taurine is almost negligible in plant feedstuffs, and so FM replacement by these ingredients may compromise dietary taurine levels (Yokoyama et al., 2001; Park et al., 2002; Matsunari et al., 2005; El-Sayed, 2013). Studies with marine fish species, such as red sea bream *Pagrus major*, Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) and yellowtail (*Seriola quinqueradiata*), have demonstrated that taurine is an essential amino sulfonic acid to maintain normal physiological condition and growth performance when fish are fed plant protein based diets (Goto et al., 2001; Park et al., 2002; Kim et al., 2008; Matsunari et al., 2008; Takagi et al., 2010, 2011). For fresh-water species, like rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), taurine supplementation of all-plant protein diets leads to better growth performance (Yokoyama et al., 2001; Gaylord et al., 2007). Moreover, the lack of taurine may trigger subclinical deficiencies that weaken and negatively affect fish performance, making them more susceptible to disease (Wu, 2009; Oliva-Teles, 2012; El-Sayed, 2013). Nevertheless, little information has been reported about the role of taurine on the metabolic pathway and antioxidant status of carnivorous fish, particularly its effects when supplemented in plant protein based diets.

*Totoaba macdonaldi* is an endemic carnivorous fish that inhabits the Gulf of California and in wild conditions feeds on marine invertebrates and small fish (Valenzuela-Quiñónez et al., 2011). Totoaba is an important species for commercial fisheries in Northwest México, however, due to unregulated capture and habitat loss, this species is classified, since 1975, as critically endangered (IUCN Red List Status; FishBase; Cisneros-Mata et al., 1995; Bobadilla et al., 2011). A breeding program successfully implanted in Baja California, México has allowed its introduction in aquaculture (DOF, 2009). Totoaba, being a strict carnivorous species (trophic level:  $4.1 \pm 0.7$ ; based on food items; FishBase) has a high protein requirement (Rueda-López et al., 2011; Minjarez-Osorio et al., 2012), and is heavily dependent on the dietary incorporation of high levels of high-quality fishmeal (FM) to meet its protein requirement. Due to the increased demand, decreased availability, raising costs and the potential presence of organic and inorganic contaminants in FM, it is of economic and environmental utmost importance to replace or at least decrease diet dependency on FM by replacing it with more sustainable and renewable protein sources, such as plant feedstuffs (FAO, 2012). Therefore, in order to cultivate totoaba, information about how nutritional factors influence its physiology and metabolism is necessary. However, to our knowledge, there is no data regarding the metabolic and antioxidant modulation action of taurine supplementation of plant based diets for totoaba.

In this context, the objective of the present research was to study the influence of soy protein concentrate as a FM replacement and taurine supplementation on intermediary metabolism and hepatic antioxidant status of totoaba (*T. macdonaldi*) juveniles.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Experimental diets

Five experimental diets were formulated to be isonitrogenous and isoenergetic. In test diets, soy protein concentrate (SPC) replaced 30 or 60% of FM protein used in the control diets, supplemented or not with 1% of taurine (SP30, SP60, SP30T and SP60T, respectively). A FM based diet was used as a control diet (CD), without SPC and taurine supplementation. The essential AA profile of test diets was adjusted to that of the control diet, requiring supplementation with crystalline methionine. All dietary ingredients were finely ground, well mixed and pelleted through 3 mm die in a commercial meat grinder. Diets were dried at 65 °C for 24 h, placed in plastic bags and stored at  $-4$  °C. Dietary ingredients and proximate composition are presented in Table 1 and amino acid composition in Table 2.

**Table 1**  
Experimental diet composition and proximate analysis.

	Diets				
	CD	SP30	SP30T	SP60	SP60T
Ingredients (% dry weight)					
Fish meal <sup>a</sup>	62.7	43.0	43.0	23.5	23.5
Soy protein concentrate <sup>b</sup>	0.0	19.5	19.5	38.9	38.9
Krill meal	9.0	9.0	8.0	9.0	8.0
Gelatin	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
Starch	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
Cellulose	4.2	2.4	2.3	0.6	0.5
Fish oil	3.4	5.2	5.2	6.9	6.9
Minerals mix <sup>c</sup>	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
Vitamins mix <sup>d</sup>	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6
Choline chloride	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
Methionine <sup>e</sup>	–	0.22	0.23	0.44	0.45
Taurine <sup>5</sup>	–	–	1.00	–	1.00
Proximate analyses (% dry weight)					
Dry matter (%)	94.1	94.2	94.3	93.9	93.3
Crude protein	55.3	54.5	55.5	56.1	54.8
Crude lipid	12.6	12.3	12.6	12.2	12.6
Starch	9.8	10.1	10.9	9.6	10.5
Ash	15.7	14.1	13.5	13.1	13.1
Gross energy (kJ g <sup>-1</sup> )	19.5	20.4	20.9	20.3	19.7
P/E (mg kJ <sup>-1</sup> )	27.8	26.7	26.0	27.3	28.5

<sup>a</sup> Commercial HighPro fish meal, USA. (crude protein: 71%; crude lipids: 12%; Ash: 17%).

<sup>b</sup> Soy protein concentrate, SilverCup, U.S.A. (crude protein: 71%; crude lipids: 2.6%; Ash: 7%).

<sup>c</sup> Mineral mix (g kg<sup>-1</sup> diet): KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 320; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 250; Ca (H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, 200; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 150; C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>CaO<sub>6</sub>, 35; C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>FeO<sub>7</sub>, 25; NaCl, 10; ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 3.53; MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 1.62; CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 0.31; CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0.01.

<sup>d</sup> Vitamin mix (mg kg<sup>-1</sup> diet): inositol, 256.39; niacin, 51.28; riboflavine; *p*-amino benzoic acid, 25.53; pantothenic acid, 17.92;  $\beta$ -carotene, 9.39; menadione, 6.11; thiamine, 3.85; piridoxine, 3.06; folic acid, 0.96; biotine, 0.39; cholecalciferol, 25,793 IU; cyanocobalamin, 5.59.

<sup>e</sup> Amino acids from Pharmaceutical Co., Ltd., U.S.A.

Proximate analyses of diets were performed according to AOAC methods (AOAC, 2000). For AA analysis, diets were hydrolyzed with 6 N hydrochloric acid at 112 °C under an atmosphere of N<sub>2</sub> for 23 h. Samples were then derivatized with phenylisothiocyanate (PITC) reagent before separation by gradient exchange chromatography (Waters auto sample model 717 plus; Waters binary pump model 1525; Waters dual absorbance detector model 2487), according to the Pico-Tag method as described by Cohen et al. (1989). Chromatographic peaks were identified, integrated and quantified with a Waters Breeze software

**Table 2**  
Amino acid (AA) composition (g 100 g diet<sup>-1</sup>) of the experimental diets.

	Diets				
	CD	SP30	SP30T	SP60	SP60T
Essential AA					
Histidine	1.7	1.8	1.5	1.7	1.4
Arginine	3.8	4.0	3.9	3.8	3.6
Threonine	2.4	2.5	2.3	2.6	2.5
Valine	2.7	3.0	2.9	3.2	2.8
Methionine	1.6	1.7	1.6	1.7	1.6
Lysine	3.9	3.9	3.6	3.9	3.5
Isoleucine	2.7	2.4	3.0	2.7	2.3
Leucine	4.5	4.4	4.4	4.8	4.4
Phenylalanine	2.4	2.7	2.8	3.1	2.8
Non-essential AA					
Aspartic acid	3.7	4.1	4.6	5.0	4.2
Serine	2.5	2.8	2.9	3.1	2.9
Glutamic acid	8.7	8.2	7.8	7.2	7.2
Glycine	4.5	3.8	3.3	3.6	3.8
Alanine	4.1	3.5	3.0	3.3	3.0
Proline	3.6	3.3	3.3	3.8	3.4
Tyrosine	1.9	2.0	2.1	2.3	2.2
Conditionally essential non-protein AA					
Taurine	0.5	0.2	1.3	0.3	1.5

142 package by comparing to a known amino acid standard (Pierce  
143 NC10180). Tryptophan and cysteine were not measured in this study.

## 144 2.2. Experimental conditions and sampling

145 Juveniles of totoaba were provided by the marine finfish hatchery  
146 of the Facultad de Ciencias Marinas, Universidad Autónoma de Baja  
147 California, Ensenada, Mexico, where this study was performed. The  
148 **Q10** growth trial was run in a thermoregulated flow-through system  
149 equipped with 15 fiberglass tanks of 70 L capacity. During the trial, tem-  
150 perature was maintained at  $23.0 \pm 1.0$  °C, salinity averaged  $35 \pm 0.5$ ‰  
151 and photoperiod was maintained on a 12:12 light:dark schedule. Oxy-  
152 gen concentration was kept higher than  $6 \text{ mg L}^{-1}$ . Prior to the trial,  
153 fish were acclimated to the experimental facilities for two weeks.  
154 Then, 480 totoaba juveniles (initial body weight of 7.5 g) were random-  
155 ly selected and stocked in each tank of 70 L (32 fish/tank). Triplicate  
156 groups were fed one of the five experimental diets, to apparent  
157 satiation, by hand, twice daily, seven days a week, for six weeks. Utmost  
158 care was taken to assure that all feed supplied was consumed, and feed  
159 intake was recorded daily. At the end of the feeding period, 4 fish per  
160 tank (12 per treatment) were randomly sampled, 6 h after the morning  
161 meal. Fish were anesthetized by immersion in a 1:10,000 (v/v) clove oil  
162 solution, killed by a fast cut of the head and liver excised, immediately  
163 frozen in dry ice and stored at  $-80$  °C until measurement of enzymatic  
164 activity.

## 165 2.3. Enzyme activity

166 Due to the small liver size, enzymatic analysis was performed in six  
167 pools of two livers per diet (2 replicates per tank). Pooled livers were  
168 homogenized in 4 vol. of ice-cold 100 mM Tris–HCl buffer containing  
169 0.1 mM EDTA and 0.1% (v/v) Triton X-100, pH 7.8. The procedure was  
170 performed on ice. Homogenates were centrifuged at 30,000 g for  
171 30 min, at 4 °C and the resultant supernatants were kept in aliquots  
172 and stored at  $-80$  °C (Pérez-Jiménez et al., 2012). All enzyme assays  
173 were carried out at 37 °C and the changes in absorbance were moni-  
174 tored to determine the enzyme activity using a microplate reader  
175 (ELx808; Bio-Tek Instruments). The optimal substrate and protein con-  
176 centrations for the measurement of maximal activity for each enzyme  
177 were established by preliminary assays. The enzymatic reactions were  
178 initiated by the addition of the tissue extract. The molar extinction coef-  
179 ficients used for  $\text{H}_2\text{O}_2$  and NADPH were  $0.039$  and  $6.22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

180 The specific assay conditions for each enzyme were as follows:

181 *Aspartate aminotransferase* (ASAT/GOT; EC 2.6.1.1) and *alanine*  
182 *aminotransferase* (ALAT/GPT; EC 2.6.1.2) activities were assayed  
183 with kits from Spinreact (ASAT/GOT, ref. LIQ225; ALAT/GPT, ref.  
184 LIQ223) at 37 °C and followed at 340 nm.

185 *Glutamate dehydrogenase* (GDH; EC 1.4.1.2) activity was performed  
186 using a reaction mixture containing 71.4 mM imidazole–HCl buffer  
187 (pH 7.4), 2.9 mM NADH, 14.3 mM ADP, 3.3 M ammonium acetate  
188 and 2 units  $\text{mL}^{-1}$  LDH (Morales et al., 1990).

189 *Hexokinase* (HK; EC 2.7.1.1) and *glucokinase* (HK-IV; EC 2.7.1.2) ac-  
190 tivities were determined according to Vijayan et al. (1990). Reaction  
191 mixture contained 71.4 mM imidazole–HCl buffer (pH 7.4), 50 mM  
192 ATP, 100 mM  $\text{MgCl}_2$ , 8 mM NADP, 2 units  $\text{mL}^{-1}$  G6PD and 10 mM  
193 (HK) or 1 M (HK-IV) glucose.

194 *Fructose 1,6-bisphosphatase* (FBPase; EC 3.1.3.11) activity was deter-  
195 mined according to Morales et al. (1990). Reaction mixture  
196 contained 71.4 mM imidazole–HCl buffer (pH 7.4), 100 mM  $\text{MgCl}_2$ ,  
197 240 mM 2-mercaptoethanol, 10 mM NADP, 2 units  $\text{mL}^{-1}$  G6PD,  
198 2 units  $\text{mL}^{-1}$  PGI and 0.5 mM fructose 1,6-bisphosphate.

199 *Glucose 6-phosphate dehydrogenase* (G6PD; EC 1.1.1.49) activity was  
200 measured using a reaction mixture containing 71.4 mM imidazole–

HCl buffer (pH 7.4), 100 mM  $\text{MgCl}_2$ , 20 mM NADP and 10 mM 201  
glucose-6-phosphate (Morales et al., 1990). 202

*Malic enzyme* (ME; EC 1.1.1.40) activity was performed using a reac- 203  
tion mixture containing 71.4 mM imidazole–HCl buffer (pH 7.4), 204  
100 mM  $\text{MgCl}_2$ , 8 mM NADP, and 40 mM L-malate (Singer et al., 205  
1990). 206

*Fatty acid synthase* (FAS; EC 2.3.1.38.) activity was performed accord- 207  
ing to the methodology of Chang et al. (1967) as modified by 208  
Chakrabarty and Leveille (1969). Reaction mixture consisted of 209  
0.01 mM NADPH, 0.025 mM Acetyl-CoA, 100 mM phosphate buffer 210  
and 0.6 mM malonyl CoA. 211

*Superoxide dismutase* (SOD; EC 1.15.1.1) activity was measured by 212  
the ferricytochrome c method using xanthine/xanthine oxidase as 213  
the source of superoxide radicals. The reaction was monitored at 214  
550 nm according to McCord and Fridovich (1969). Reaction mixture 215  
consisted of 50 mM K-phosphate buffer (pH 7.8), 0.1 mM EDTA, 216  
0.1 mM xanthine, 0.012 mM cytochrome c and 0.025 IU  $\text{mL}^{-1}$  xan- 217  
thine oxidase. Activity is reported in units of SOD per mg of protein. 218  
One unit of activity was defined as the amount of enzyme necessary 219  
to produce a 50% inhibition of the ferricytochrome c reduction rate. 220

*Catalase* (EC 1.11.1.6) activity was determined by measuring the 221  
decrease of hydrogen peroxide concentration at 240 nm according 222  
to Aebi (1984). Reaction mixture contained 50 mM K-phosphate 223  
buffer (pH 7.0) and 10 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  freshly prepared. Activity is report- 224  
ed in units of CAT per mg of protein. 225

*Glutathione peroxidase* (GPX; EC 1.11.1.9) activity was measured fol- 226  
lowing the method of Flohé and Günzler (1984). The oxidized gluta- 227  
thione (GSSG) generated by GPX was reduced by glutathione 228  
reductase (GR), and NADPH consumption rate was monitored at 229  
340 nm. The reaction mixture consisted of 50 mM K-phosphate 230  
buffer (pH 7.1), 1 mM EDTA, 3.9 mM GSH (reduced glutathione), 231  
3.9 mM Na-azide, 1 IU  $\text{mL}^{-1}$  glutathione reductase, 0.2 mM NADPH 232  
and 0.05 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ . 233

*Glutathione reductase* (GR; EC 1.6.4.2) activity was assayed as 234  
described by Morales et al. (2004), measuring the oxidation of 235  
NADPH at 340 nm. Reaction mixture consisted of 0.1 M Na- 236  
phosphate buffer (pH 7.5), 1 mM EDTA, 0.63 mM NADPH and 237  
0.16 mM GSSG. 238

239 Except for SOD and CAT whose expression units have been already  
240 described, enzyme activity is expressed as milliunits per mg of hepatic  
241 soluble protein. Except for SOD, one unit of enzyme activity was defined  
242 as the amount of enzyme required to transform 1  $\mu\text{mol}$  of substrate per  
243 min under the above assay conditions.

244 Soluble protein concentration was determined according to  
245 Bradford (1976) using Sigma protein assay kit and bovine serum  
246 albumin as standard.

## 247 2.4. Lipid peroxidation (LPO) assay

248 Concentration of malondialdehyde (MDA) was determined as a  
249 marker of LPO following the methodology described by Buege and  
250 Aust (1978). An aliquot of supernatant from the homogenate (500  $\mu\text{L}$ )  
251 was mixed with 250  $\mu\text{L}$  of a previously prepared solution containing  
252 15% (w/v) trichloroacetic acid (TCA), 0.375% (w/v) thiobarbituric  
253 acid (TBA), 80% (v/v) hydrochloric acid 0.25 N and 0.01% (w/v)  
254 butylated hydroxytoluene (BHT). The mixture was heated to 100 °C  
255 for 15 min. Then, after being cooled to room temperature and centri-  
256 fuge at 1500 g for 10 min, absorbance was measured at 535 nm in  
257 the supernatant.

258 Concentration was expressed as nmol MDA per gram of tissue, calcu-  
259 lated from a calibration curve.

## 2.5. Statistical analysis

Normality of distributions and homogeneity of variances were tested using the Kolmogorov–Smirnov and Levene's tests, respectively. The Dunnett test was used to compare control diet against each test diet (CD vs SP30, CD vs SP30T, CD vs SP60, CD vs SP60T). Statistical effects of SPC and taurine levels in test diets, excluding the control diet, were evaluated using a two-way ANOVA for liver composition and nested two-way ANOVA for enzymatic analysis, with replicates nested in diets. The lowest unit of replication in these analyses was "fish". A significant level of 0.05 was used in all the analysis. All statistical analyses were carried out using the SPSS version 20.0 for Windows software package.

## 3. Results

At the end of feeding trial, survival was 99% irrespective of the dietary treatment. Daily growth index (DGI) of fish fed the SP30 and SP30T (3.34 and 3.59, respectively) was similar to that of control fish (3.42). Higher SPC incorporation (SP60 diet) significantly reduced DGI (2.78), however DGI was significantly increased to levels similar to those of the control diet through taurine supplementation (diet SP60T with a DGI of 3.22).

Voluntary feed intake was greatly depressed in SPC based diets (20.5 g kg/ABW/day), compared to the FM based diet, and no enhancement was observed by taurine supplementation. Feed and protein efficiency were significantly higher in fish fed the SPC based diet than the FM based diet, except for SP60 diet which was similar to the control diet.

### 3.1. Liver composition and intermediary metabolism

At the end of the six-week feeding trial, liver composition of totoaba was significantly affected by dietary composition (Table 3). Hepatic moisture and protein content (g 100 g<sup>-1</sup> liver) were significantly higher in fish fed CD than the test diets, while the opposite was true for lipid and glycogen contents. Among the test diets, hepatic glycogen content was significantly higher in the low SPC content diets than in high SPC ones.

Table 4 shows the specific activity of key enzymes of the intermediary metabolism of totoaba fed the different dietary treatments. Irrespective of the replacement level of FM by SPC, the activity of ASAT, ALAT

and GDH were significantly reduced. However, the concomitant supplementation with taurine restored the activity of these enzymes to levels similar to those of the control diet. Moreover, the GDH activity significantly decreased with the increase of dietary replacement of FM by SPC.

In line with the above results, FBPase activity was significantly reduced by the dietary FM replacement by SPC, but its activity level was restored with taurine supplementation (Table 4). Fish meal replacement by SPC, with or without taurine supplementation, had no significant effects on the measured glycolytic enzyme activity, except for HK whose activity was significantly higher in fish fed the S30T than the other diets. The higher the SPC incorporation level, the lower the HK activity that was restored with the dietary taurine supplementation. Contrarily, HK-IV activity increased with the increase of dietary SPC level, and taurine supplementation had no significant effect on its activity. Compared to the control diet, the SP60 diet led to a significant lower activity of G6PD. In SPC based diets, taurine supplementation significantly increased the activity of this enzyme. No significant effect of FM replacement by SPC, with or without taurine supplementation was observed on the activity of lipogenic enzymes. Compared to the control diet, fish fed the SP60 diet had higher malic enzyme activity than those fed with other diets (Table 4).

### 3.2. Antioxidant defense system and LPO levels

Irrespective of the incorporation level of SPC, dietary FM replacement by SPC increased the activity of SOD, being significant with the SP30 diet; increased the activity of catalase, being significant in the taurine supplemented diets; and increased the lipid peroxidation levels, being significant with the SP60 diet. In SPC based diets, taurine supplementation significantly increased the catalase activity and decreased the lipid peroxidation levels (Table 5). Regardless of the dietary SPC level, a significant inverse correlation between LPO levels and the activities of CAT ( $r^2 = 0.70$ ;  $P < 0.01$ ) and G6PD ( $r^2 = 0.68$ ;  $P < 0.01$ ) (Fig. 1) was observed.

## 4. Discussion

Despite the increased interest on taurine as a potential supplement for low FM based diets, particularly for carnivorous fish, its role on intermediary metabolism and antioxidant status is still unclear for the majority of aquaculture species. Indeed, to the best of the authors' knowledge, there are no studies on the metabolic effect of taurine supplementation of plant protein based diets in totoaba.

Processed soybean products, like SPC or protein isolate, are considered good protein sources for fish, with higher protein content and lower content of non-starch oligosaccharides and antinutritionals than those of soybean meal (Brown et al., 2008). In the present study, dietary replacement of FM by SPC significantly decreased the activity of key enzymes of amino acid catabolism (GDH, ASAT and ALAT) and gluconeogenesis metabolism (FBPase). These results may be associated to the lower protein intake of fish fed the SPC based diets than those fed the control FM based diet. A similar relationship between protein intake and AA catabolic enzyme activities was reported for European seabass (*Dicentrarchus labrax*) by Pérez-Jiménez et al. (2007). Although an unbalanced dietary essential amino acid profile may also modulate the activity of these enzymes (Gómez-Requeni et al., 2003; Peres and Oliva-Teles, 2006, 2007), that was not expected to occur as the EAA profile of SPC based diets closely matched that of the control diet.

Interestingly, the supplementation of SPC diets with taurine restored the activity of GDH and transaminases to levels similar to those of control FM based diet. Although dietary taurine enrichment did not increase the voluntary feed intake compared to the non-supplemented diets, it may have alleviated the intestinal mucosal damage induced by the SPC, improving the nutrient absorption. Non-starch polysaccharides, fiber, allergenic compounds and especially saponin content of SPC are low, but in some fish species, it induces intestinal and hepatic

**Table 3**

Liver composition (g 100 g<sup>-1</sup> wet weight) of *Totoaba macdonaldi* fed with experimental diets.<sup>a</sup>

Liver composition	Diets					SEM
	CD	SP30	SP30T	SP60	SP60T	
Moisture	79.5	71.3†	72.2†	71.7†	71.3†	0.96
Protein	7.71	5.65†	6.62	4.90†	5.78†	0.38
Lipids	9.53	15.9‡	14.6‡	17.1‡	16.6‡	0.84
Glycogen	2.28	6.23‡	5.53‡	4.85‡	4.95‡	0.25
Hepatosomatic index <sup>b</sup>	1.1	1.39	1.33	1.37	1.28	0.03
Two-Way ANOVA						
Liver composition	Variation source					
	SPC	Taurine	Interaction			
Moisture	ns	ns	ns			
Protein	ns	ns	ns			
Lipids	ns	ns	ns			
Glycogen	0.01	ns	ns			
Hepatosomatic index	ns	ns	ns			

SEM: pooled standard error of the mean.

Two-way ANOVA performed involving only test diets (ns: not significant at  $P > 0.05$ ).

<sup>a</sup> In the same row ‡ and † denote significant differences against control diet (‡ > CD > †;  $P < 0.05$ ; Dunnett test).

<sup>b</sup> Hepatosomatic index: (liver weight / body weight) × 100.

**Table 4**Specific activity (mU mg protein<sup>-1</sup>) of amino acid catabolic, glycolytic, gluconeogenic and lipogenic enzymes in the liver of *Totoaba macdonaldi* fed with the experimental diets.<sup>a</sup>

	Diets					SEM
	CD	SP30	SP30T	SP60	SP60T	
<b>Amino acid catabolism</b>						
Aspartate aminotransferase (ASAT)	1747	984†	1991	1179†	1805	86
Alanine aminotransferase (ALAT)	417	241†	441	238†	401	18
Glutamate dehydrogenase (GDH)	414	277†	424	233†	370	16
<b>Gluconeogenesis</b>						
Fructose-1,6-bisphosphatase (FBPase)	77.2	51.8†	73.7	49.3†	61.8†	3.2
<b>Glycolysis</b>						
Hexokinase (HK)	20.2	22.4	25.9‡	17.0	19.3	0.73
Glucokinase (HK-IV)	3.50	2.74	2.34	4.06	5.01	0.43
<b>Pentose phosphate pathway</b>						
Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD)	72.3	56.8	82.1	37.5†	80.1	4.02
<b>Lipogenesis</b>						
Malic enzyme (ME)	17.2	18.3	21.7‡	17.3	18.0	0.64
Fatty acid synthetase (FAS)	1.34	1.51	1.39	1.62	1.58	0.07
<b>Two-Way ANOVA</b>						
	Variation source					
	SPC		Taurine		Interaction	
Aspartate aminotransferase	ns		<0.01		ns	
Alanine aminotransferase	ns		<0.01		ns	
Glutamate dehydrogenase	0.01		<0.01		ns	
Fructose-1,6-bisphosphatase	0.01		<0.01		0.04	
Hexokinase	<0.01		0.01		ns	
Glucokinase	0.02		ns		ns	
Glucose-6-phosphate dehydrogenase	ns		<0.01		ns	
Malic enzyme	ns		ns		ns	
Fatty acid synthetase	ns		ns		ns	

SEM: pooled standard error of the mean; SPC: soy protein concentrate.

Two-way ANOVA analysis performed involving only test diets (ns: not significant at P &gt; 0.05).

<sup>a</sup> In the same row ‡ and † denote significant differences against control diet (‡ > CD > †; P < 0.05; Dunnett test).

morphometric changes that may impair diet digestibility (Refstie et al., 1999; Buttler et al., 2001; Ostaszewska et al., 2005; Escaffre et al., 2007; Iwashita et al., 2009). In fact, taurine has been reported to increase the nutrient absorption, particularly the lipid fraction, through the strict dependence on taurine for bile acid conjugation and through the normalization of the intestinal morphology. In fish, bile acid is conjugated mainly with taurine, and increased dietary taurine levels have been reported to increase conjugated bile acid (Goto et al., 1996; Iwashita et al., 2009; Kim et al., 2007; Kim et al., 2008), and so increase the

activity of bile salt-activated lipase in common dentex (*Dentex dentex*, Chatzifotis et al., 2008), Japanese flounder (*P. olivaceus*; Kim et al., 2007, Kim et al., 2008) and yellowtail (*S. quinqueradiata*; Sakai et al., 1987). Also in larvae, taurine seems to have beneficial effects on the activity of digestive enzymes, including trypsin, amylase and lipase (Salze et al., 2012). Moreover, intestinal abnormalities of rainbow trout (*O. mykiss*) induced by dietary soy saponin and lectin were normalized by supplemental levels of cholytaurine (Iwashita et al., 2008, 2009).

Consistent with the AA catabolic enzyme activity, gluconeogenesis was also reduced by the dietary replacement of FM by SPC, though hepatic glycogen content significantly increased. Hepatic lipid content also significantly increased in fish fed the SPC based diets, even though the activity of lipogenic enzymes was not significantly affected. These results evinced a possible reduction of hepatic glycogen and lipid catabolism rather than an increase of the de novo synthesis of glucose and lipids, in fish fed the SPC diets, which may contribute to the development of hepatic steatosis. Therefore, it seems that totoaba fed SPC diets were under an unfavorable energy state, which led to a general down-regulation of the amino acid catabolic and gluconeogenic enzymes, as well as a decrease of hepatic energy reserve mobilization.

For terrestrial animals, several studies have shown that taurine is involved in glucose homeostasis, both through the increase of the gene expression for the insulin secretion and by the increase of peripheral insulin sensitivity (Divakaran, 2006). In the present study, taurine seems to have a glycolytic effect, despite its weak effect on the HK-IV (high Km) activity, by increasing the activity of HK. Taurine supplementation increased the HK activity and, despite the low Km of HK, it induced glucose phosphorylation, promoting the subsequent use of glucose-6-phosphate without the need for the induction of HK-IV. This particular pattern of high activity of HK/low activity of HK-IV was previously reported in carp (Capilla et al., 2004) but is opposite to that previously reported for rainbow trout, seabass and seabream (Panserat et al., 2000; Enes et al., 2011). The observed increase of HK activity may be due to the potentiation of insulin actions by taurine, which may have

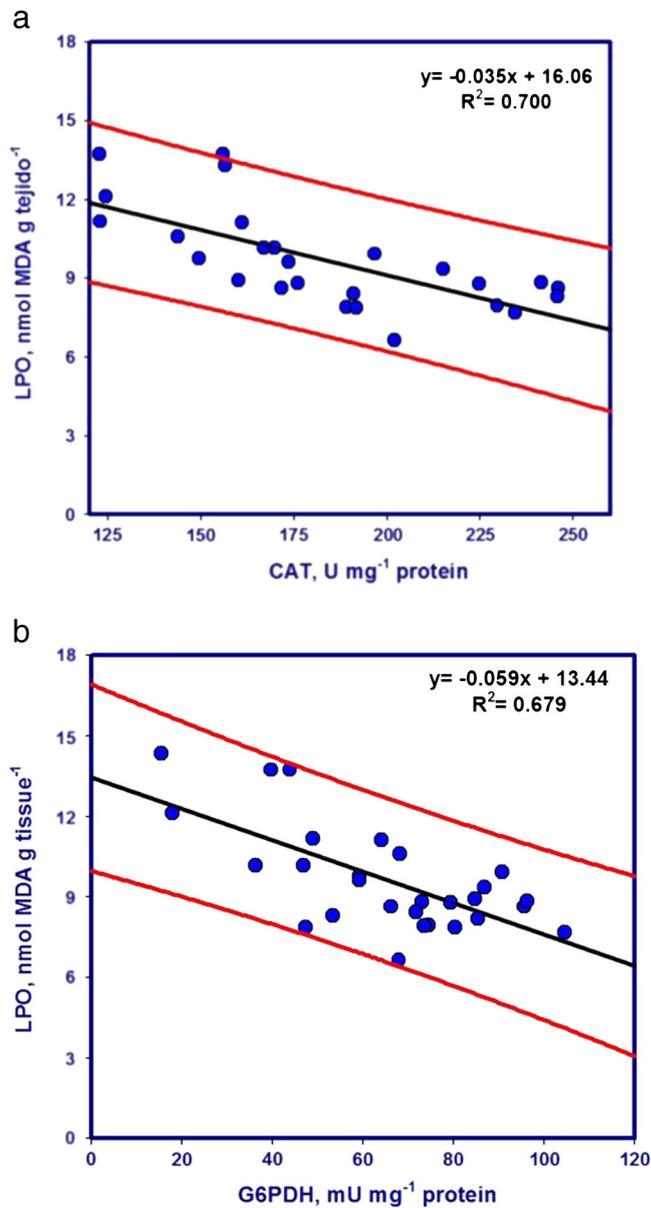
**Table 5**Specific activity of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPX), glutathione reductase (GR) and lipid peroxidation (LPO) in the liver of *Totoaba macdonaldi* fed with the experimental diets.<sup>a</sup>

	Diets					SEM
	CD	SP30	SP30T	SP60	SP60T	
SOD (U mg <sup>-1</sup> protein)	115	162‡	138	144	140	5.27
CAT (U mg <sup>-1</sup> protein)	132	140	203‡	126	172‡	6.84
GPX (mU mg <sup>-1</sup> protein)	31.2	33.3	30.0	29.8	31.0	0.93
GR (mU mg <sup>-1</sup> protein)	5.11	5.88	6.08	6.58	6.90	0.26
LPO (nmol MDA g <sup>-1</sup> tissue)	9.44	10.9	8.26	13.2‡	8.27	0.46
<b>Two-Way ANOVA</b>						
	Variation source					
	SPC		Taurine		Interaction	
SOD	ns		ns		ns	
CAT	ns		<0.01		ns	
GPX	ns		ns		ns	
GR	ns		ns		ns	
LPO	ns		<0.01		ns	

SEM: pooled standard error of the mean; SPC: Soy protein concentrate.

Two-way ANOVA analysis performed involving only test diets (ns: not significant at P &gt; 0.05).

<sup>a</sup> In the same row ‡ and † denote significant differences against control diet (‡ > CD > †; P < 0.05, Dunnett test).



**Fig. 1.** Linear regression between liver lipid peroxidation and catalase activity (a) or glucose-6-phosphate dehydrogenase (b) of *Totoaba macdonaldi* fed with the experimental diets. The red lines indicate 95% predictive interval. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

facilitated the glucose transport through the cellular membrane. In mammals, taurine is known to have a hypoglycemic action not directly related to the increase of insulin release, but by enhancing insulin action, it facilitates the interaction of insulin with its receptor and enhances the glucose transport (Divakaran, 2006). Taurine is also known to be involved in different central and peripheral processes of homeostatic control of glucose, enhancing the action of some secretagogues, such as leucine or arginine as well as peripheral insulin sensitivity (Maturo and Kulakowski, 1998; Cherif et al., 1998; Carneiro et al., 2009). In fish, the taurine effect of glucose homeostasis has been little studied, however this may be of particular interest, particularly for carnivorous fish species. Actually, carnivorous fish are traditionally considered to be glucose intolerant due to the prolonged hyperglycemia observed after a high glucose intake due to several factors, including insulin secretion and action issues (Moon, 2001; Enes et al., 2011; Polakof et al., 2011).

In the present study, taurine had an expressive effect on the enhancement of G6PD activity. The enhanced G6PD activity may have

contributed to the increase of HK and FBPase activities, since the hepatic glycogen content was slightly reduced by taurine supplementation. The glucose 6-phosphate required by G6PD was provided by the increased glucose phosphorylation (increased HK activity) and by the increased de novo synthesis of glucose (increased FBPase activity). The reducing equivalents of NADPH, generated by G6PD activity, were probably destined to a different metabolic pathway rather than to lipogenesis, as the FAS activity and hepatic lipid content were not affected by taurine. Therefore, dietary enrichment with taurine increased the G6PD activity and, as a result, NADPH level may have enhanced the entire antioxidant system.

Principal components of antioxidant system are superoxide dismutases (SODs), glutathione system, catalase and G6PD. Glucose-6-phosphate dehydrogenase is the principal source of the major intracellular reductant NADPH, which is used by the glutathione systems to regenerate reduced forms with antioxidant roles (Salvemini et al., 1999; Leopold and Loscalzo, 2000; Kirsch and De Groot, 2001; Morales et al., 2004; Castro et al., 2012).

Catalase does not use NADPH directly, but it tightly binds to CAT maintaining its most active form and preventing against the toxicity of its own substrate ( $H_2O_2$ ) (Kirkman et al., 1999; Leopold and Loscalzo, 2000; Gaetani et al., 2005). NADPH has been proposed to act like a direct scavenger of free radicals, both by scavenging freely diffusing radicals and repairing biomolecule-derived radicals; NADPH reduces the majority of undesirable free radicals by donation of one electron, which is then rapidly protonated (Kirsch and De Groot, 2001). In totoaba, enhanced G6PD activity induced by taurine supplement could have resulted in increased NADPH levels, which may have acted as both non-enzymatic antioxidant and protective molecule for CAT, increasing its activity in totoaba cells. Thus taurine supplementation may have contributed to the observed reduction of liver lipid peroxidation in fish fed the SPC based diets. In this sense, a positive and significant correlation between liver lipid peroxidation and CAT ( $r^2 = 0.70$ ,  $P < 0.01$ ) or G6PD ( $r^2 = 0.68$ ,  $P < 0.01$ ) activity was observed.

Taurine has been reported to act as a non-specific scavenger of dangerous reactive oxygen species and to stimulate synthesis of antioxidant enzymes (Divakaran, 2006). In terrestrial animals, taurine has been proposed to be involved in cellular mechanisms of protection against oxidative damage by quenching and detoxifying some reactive intermediates, such as hypochlorous acid generated by myeloperoxidase (Divakaran, 2006). However, in fish, little is known regarding the effect of dietary taurine enrichment on the redox status, even though taurine has been reported to be an indirect antioxidant by its action on osmoregulation and membrane stabilization (Timbrell et al., 1994; Goto et al., 2001; Güreş et al., 2001; Mas et al., 2004; Takagi et al., 2005, 2008; Chesney et al., 2012). Recently, it was observed that taurine supplement restored SOD and CAT activities and significantly reduced lipid peroxidation of alcohol exposure in zebrafish (Rosemberg et al., 2010).

Although, several mechanisms could be involved in reduction of liver lipid peroxidation in totoaba fed on taurine supplemented diets, the antioxidant role of taurine, including its action as a scavenger and on CAT activity, needs to be addressed. Further studies are necessary to properly elucidate the antioxidant mechanisms of totoaba juveniles under different dietary conditions.

In conclusion, the present results show that dietary FM replacement by SPC depressed the overall intermediary metabolism, including the activity of key enzymes of AA catabolism and gluconeogenesis, and induced higher hepatic lipid peroxidation. Concomitant taurine supplementation restored the activity of these enzymes, increased significantly the activity of G6PD and CAT and significantly reduced hepatic lipid peroxidation. Together, these results suggest that taurine may play an important metabolic modulation action on totoaba fed SPC based diets, contributing to enhancement of overall metabolism and reduction of liver oxidative damage. Further research is necessary to elucidate the mechanism underlying the antioxidant role of taurine in totoaba, as well

484 as its consequences on totoaba health status fed plant protein based  
485 diets in long-term feeding studies.

### Q23 5. Uncited references

487 Aksnes et al., 2008  
488 Anderson and Wolf, 1995  
489 Deak and Johnson, 2007  
490 Durazo et al., 2010  
491 Enes et al., 2009  
492 Foos and Wu, 2002  
493 Francis et al., 2001  
494 Gautier, 1996  
495 Glencross, 2009  
496 Guillaume et al., 2004  
497 Krogdahl et al., 2003  
498 Mazzaferro et al., 2002  
499 Nguyen et al., 2011  
500 Sanden et al., 2005  
501 Schaffer et al., 2010  
502 Voronina et al., 2002  
503 Williams, 1980

### 504 Acknowledgments

505 This work was partially supported by the Universidad Autónoma de  
506 Baja California (UABC), México, the National Council for Science and  
507 Technology (CONACyT) of Mexico (S0007-2011-08), and the scholarship  
508 number 208572. This work was also partially supported by the European  
509 Regional Development Fund (ERDF) through the COMPETE – Operati-  
510 onal Competitiveness Programme and national funds through FCT –  
511 Foundation for Science and Technology, under the project PEst-C/MAR/  
512 LA0015/2013.  
513 A.P.J. was supported by a grant (SFRH/BPD/64684/2009) from  
514 Fundação para a Ciência e a Tecnologia, Portugal. The authors are grate-  
515 ful to Dr. Aires Oliva-Teles for friendly support at Laboratory of Nutrition  
516 of Porto University, Portugal. We wish to thank Carolina Oliveira Castro  
517 and Filipe Coutinho for their kind assistance with this study.

### 518 References

519 Aebi, H., 1984. Catalase in vitro. *Meth. Enzymol.* 105, 121–126.  
520 Aksnes, A., Mundheim, H., Toppe, J., Albrektsen, S., 2008. The effect of dietary hydroxypro-  
521 line supplementation on salmon (*Salmo salar* L.) fed high plant protein diets.  
522 *Aquaculture* 275, 242–249.  
523 Anderson, R.L., Wolf, W.J., 1995. Compositional changes in trypsin inhibitors, phytic acid,  
524 saponins and isoflavones related to soybean processing. *J. Nutr.* 125 (3 Suppl.),  
525 581–588.  
526 AOAC, 2000. Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemists,  
527 Gaithersburg, Maryland, USA (1018 pp.).  
528 Battin, E.E., Brumaghim, J.L., 2009. Antioxidant activity of sulfur and selenium: a review of  
529 reactive oxygen species scavenging, glutathione peroxidase, and metal-binding  
530 antioxidant mechanisms. *Cell Biochem. Biophys.* 55, 1–23.  
531 Bobadilla, M., Álvarez-Borrego, S., Ávila-Foucat, S., Lara-Valencia, F., Espejel, I., 2011.  
532 Evolution of environmental policy instruments implemented for the protection of  
533 totoaba and the vaquita porpoise in the Upper Gulf of California. *Environ. Sci. Pol.*  
534 14, 998–1007.  
535 Bradford, M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram  
536 quantities of protein using the principle of protein dye-binding. *Anal. Biochem.* 72,  
537 248–254.  
538 Brown, P.B., Kaushik, S., Peres, H., 2008. Protein feedstuffs originating from soybeans. In:  
539 Lim, C.E., Webster, C.D., Lee, C.S. (Eds.), *Alternative Protein Sources in Aquaculture*  
540 Diets. Haworth Press, New York, pp. 205–224.  
541 Buege, J.A., Aust, S.D., 1978. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 52,  
542 302–310.  
543 Buttle, L.G., Burrells, A.C., Good, J.E., Williams, P.D., Southgate, P.J., Burrells, C., 2001. The  
544 binding of soybean agglutinin (SBA) to the intestinal epithelium of Atlantic salmon,  
545 *Salmo salar* and rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, fed high levels of soybean  
546 meal. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 80, 237–244.  
547 Capilla, E., Medale, F., Panserat, S., Vachot, C., Rema, P., Gomes, E., Kaushik, S., Navarro, I.,  
548 Gutierrez, J., 2004. Response of hexokinase enzymes and the insulin system to  
549 dietary carbohydrates in the common carp, *Cyprinus carpio*. *Reprod. Nutr. Dev.* 44,  
550 233–242.

Carneiro, E.M., Latorraca, M.Q., Araujo, E., Beltrá, M., Oliveras, M.J., Navarro, M., 551  
Berná, G., Bedoya, F.J., Velloso, L.A., Soria, B., Martín, F., 2009. Taurine supple- 552  
mentation modulates glucose homeostasis and islet function. *J. Nutr. Biochem.* 553  
20, 503–511. 554  
Castro, C., Pérez-Jiménez, A., Guerreiro, I., Peres, H., Castro-Cunha, M., Oliva-Teles, A., 555  
2012. Effects of temperature and dietary protein level on hepatic oxidative status of 556  
Senegalese sole juveniles (*Solea senegalensis*). *Comp. Biochem. Physiol. A* 163, 557  
372–378. 558  
Chakrabarty, K., Leveille, G.A., 1969. Acetyl-CoA carboxylase and fatty acid synthetase 559  
activities in liver and adipose tissue of meal-fed rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 131, 560  
1051–1054. 561  
Chang, H.C., Seidman, I., Teebor, G., Lane, M.D., 1967. Liver acetyl-CoA carboxylase and 562  
fatty acid synthetase relative activities in normal state and in hereditary obesity. 563  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 28, 682–686. 564  
Chatzifotis, S., Polemitou, I., Divanach, P., Antonopoulou, E., 2008. Effect of dietary taurine 565  
supplementation on growth performance and bile salt activated lipase activity of 566  
common dentex, *Dentex dentex*, fed a fish meal/soy protein concentrate-based diet. 567  
*Aquaculture* 275, 201–208. 568  
Cherif, H., Reusen, B., Ahn, M.T., Hoet, J.J., Remacle, C., 1998. Effects of taurine on the 569  
insulin secretion of rat fetal islets from dams fed a low protein diet. *J. Endocrinol.* 570  
159, 341–348. 571  
Chesney, R.W., Patters, A.B., Han, X., 2012. Taurine and the kidneys. In: Idrissi, E.A., 572  
L'Amoreaux, W. (Eds.), *Taurine and Health Disease*. Transworld Research Network, 573  
Kerala, India. ISBN: 978-81-7895-520-9. 574  
Cisneros-Mata, M.A., Montemayor-López, G., Román-Rodríguez, M.J., 1995. Life history 575  
and conservation of *Totoaba macdonaldi*. *Conserv. Biol.* 9, 806–814. 576  
Cohen, S.A., Meys, M., Tarvin, T., 1989. The Pico-Tag Method. A Manual of Advance 577  
Techniques for Amino Acid Analysis. Waters Chromatography Division, Millipore 578  
Corporation, Milford, MA (124 pp.). 579  
Deak, N.A., Johnson, L.A., 2007. Fate of phytic acid in producing soy protein ingredients. 580  
*J. Am. Oil Chem. Soc.* 84, 369–376. 581  
Diario Oficial de la Federación (DOF), 2009. Aviso por el que se informa al público en 582  
general que la Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas ha concluido la 583  
elaboración del Programa de Manejo de la Reserva de la Biosfera Alto Golfo de 584  
California y Delta del Río Colorado, ubicada en aguas del Golfo de California y en 585  
los municipios de Mexicali. Estado de Baja California, y de Puerto Peñasco y de San 586  
Luis Río Colorado, Estado de Sonora. 25 de septiembre del 2009. 587  
Dias, J., Álvarez, M.J., Arzel, J., Corraze, G., Diez, A., Bautista, J.M., Kaushik, S.J., 2005. Dietary 588  
protein source affects lipid metabolism in the European seabass (*Dicentrarchus* 589  
*labrax*). *Comp. Biochem. Physiol. A* 142, 19–31. 590  
Divakaran, S., 2006. Taurine: an amino acid rich in fish meal. In: Suárez, L.E.C., Marie, D.R., 591  
Salazar, M.T., López, M.G.N., Cavazos, D.A.V., Cruz, A.C.P., García Ortega, Armando 592  
(Eds.), *Avances en Nutrición Acuicola*. VIII Simposio Internacional de Nutrición 593  
Acuicola. 15–17 Noviembre. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, 594  
Nuevo León, México (ISBN 970-694-333-5). 595  
Durazo, E., Cruz, A.C., López, L.M., Lazo, J.P., Drawbridge, M., Viana, M.T., 2010. Effects of 596  
digestible protein levels in isonitrogenous diets on growth performance and tissue 597  
composition of juvenile *Atractoscion nobilis*. *Aquacult. Nutr.* 16, 54–60. 598  
El-Sayed, A.F.M., 2013. Is dietary taurine supplementation beneficial for farmed fish and 599  
shrimp? A comprehensive review. *Rev. Aquac.* 5, 1–15. 600  
Enes, P., Panserat, S., Kaushik, S., Oliva-Teles, A., 2009. Nutritional regulation of hepatic 601  
glucose metabolism in fish. *Fish Physiol. Biochem.* 35, 519–539. 602  
Enes, P., Panserat, S., Kaushik, S., Oliva-Teles, A., 2011. Dietary carbohydrate utilization by 603  
European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) and gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) 604  
juveniles. *Rev. Fish. Sci.* 19, 201–215. 605  
Escaffre, A.M., Kaushik, S., Mambrini, M., 2007. Morphometric evaluation of changes in 606  
the digestive tract of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) due to fish meal replace- 607  
ment with soy protein concentrate. *Aquaculture* 273, 127–138. 608  
FAO, 2012. The State of World Fisheries and Aquaculture 2012 (Rome. 209 pp.). 609  
Flohé, L., Günzler, W.A., 1984. Assay of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.* 105, 610  
115–121. 611  
Foos, T.M., Wu, J.-Y., 2002. The role of taurine in the central nervous system and the 612  
modulation of intracellular calcium homeostasis. *Neurochem. Res.* 27 (1/2), 613  
21–26. 614  
Francis, G., Makkar, H.P.S., Becker, K., 2001. Antinutritional factors present in plant- 615  
derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish. *Aquaculture* 199, 616  
197–227. 617  
Gaetani, G.F., Ferraris, A.M., Sanna, P., Kirkham, H.N., 2005. A novel NADPH:(bound) 618  
NADP<sup>+</sup> reductase and NADH:(bound) NADP<sup>+</sup> transhydrogenase function in bovine 619  
liver catalase. *Biochem. J.* 385, 763–768. 620  
Gautier, H., 1996. Interactions among metabolic rate, hypoxia and control of breathing. 621  
*J. Appl. Physiol.* 81, 521–527. 622  
Gaylord, T.G., Barrows, F.T., Teague, A.M., Johansen, K.A., Overturf, K.E., Shepherd, B., 2007. 623  
Supplementation of taurine and methionine to all-plant protein diets for rainbow 624  
trout *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* 269, 514–524. 625  
Glencross, B.D., 2009. Reduced water oxygen levels affect maximal feed intake, but not 626  
protein or energy utilization efficiency of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). 627  
*Aquacult. Nutr.* 15, 1–8. 628  
Gómez-Requeni, P., Mingarro, M., Kirchner, S., Calduch-Giner, J.A., Médale, F., Corraze, G., 629  
Panserat, S., Martín, S.A.M., Houlihan, D.F., Kaushik, S., Pérez-Sánchez, J., 2003. Effects 630  
of dietary amino acid profile on growth performance, key metabolic enzymes and 631  
somatotrophic axis responsiveness of gilthead sea bream *Sparus aurata*. *Aquaculture* 632  
220, 749–767. 633  
Goto, T., Ui, T., Une, M., Kuramoto, T., Kihira, K., Hoshita, T., 1996. Bile salt composition 634  
and distribution of D-cysteinoic acid conjugated bile salts in fish. *Fish. Sci.* 64, 635  
606–609. 636

- Goto, T., Takagi, S., Ichiki, T., Sakai, T., Endo, M., Yoshida, T., Ukawa, M., Murata, H., 2001. Studies on the green liver in cultured red sea bream fed low level and non-fish meal diets. Relationship between hepatic taurine and biliverdin levels. *Fish. Sci.* 67, 58–63.
- Guillaume, J., Kaushik, S., Bergot, P., Métailler, R., 2004. Nutrition and Feeding of Fish and Crustaceans. *Mundi Prensas, España* (475 pp.).
- Gürer, H., Özgünes, H., Saygin, E., Ercal, N., 2001. Antioxidant effect of taurine against lead-induced oxidative stress. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 41, 397–402.
- Hagar, H.H., 2004. The protective effect of taurine against cyclosporine A-induced oxidative stress and hepatotoxicity in rats. *Toxicol. Lett.* 151, 335–343.
- Hu, Y.H., Lin, C.L., Huang, Y.W., Liu, P.E., Hwang, D.-F., 2008. Dietary amino acid taurine ameliorates liver injury in chronic hepatitis patients. *Amino Acids* 35, 469–473.
- Huxtable, R.J., 1992. Physiological actions of taurine. *Physiol. Rev.* 72, 101–163.
- Iwashita, Y., Suzuki, N., Yamamoto, T., Shibata, J., Isokawa, K., Soon, A.H., Ikehata, Y., Furuita, H., Sugita, T., Goto, T., 2008. Supplemental effect of cholytaurine and soybean lecithin to a soybean meal-based fish meal-free diet on the hepatic and intestinal morphology of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Fish. Sci.* 74, 1083–1095.
- Iwashita, Y., Suzuki, N., Matsunari, H., Sugita, T., Yamamoto, T., 2009. Influence of soya saponin, soya lectin, and cholytaurine supplemented to a casein-based semipurified diet on intestinal morphology and biliary bile status in fingerling rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Fish. Sci.* 75, 1307–1315.
- Kim, S.-K., Matsunari, H., Nomura, K., Tanaka, H., Yokoyama, M., Murata, Y., Ishihara, K., Takeuchi, T., 2008. Effect of dietary taurine and lipid contents on conjugated bile acid composition and growth performance of juvenile Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Fish. Sci.* 74, 875–881.
- Kirkman, H.N., Rolfo, M., Ferraris, A.M., Gaetani, G.F., 1999. Mechanisms of protection of catalase by NADPH. Kinetics and stoichiometry. *J. Biol. Chem.* 274, 13908–13914.
- Kirsch, M., De Groot, H., 2001. NAD(P)H, a directly operating antioxidant? *FASEB J.* 15, 1569–1574.
- Krogdahl, A., Bakke-Mckellep, A.M., Baeverfjord, G., 2003. Effects of graded levels of standard soybean meal on intestinal structure, mucosal enzyme activities, and pancreatic response in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquacult. Nutr.* 9, 361–371.
- Leopold, J.A., Loscalzo, J., 2000. Cyclic strain modulates resistance to oxidant stress by increasing G6PDH expression in smooth muscle cells. *Am. J. Physiol.* 279, H2477–H2485.
- Martin, S.A.M., Vilhelmsson, O., Médale, F., Watt, P., Kaushik, S., Houlihan, D.F., 2003. Proteomic sensitivity to dietary manipulations in rainbow trout. *Biochim. Biophys. Acta* 1651, 17–29.
- Mas, M.R., Comert, B., Oncu, K., Vural, S.A., Akay, C., Tascia, Ilker, Ozkomur, E., Serdar, M., Mas, N., Alcigir, G., Yener, N., 2004. The effect of taurine treatment on oxidative stress in experimental liver fibrosis. *Hepatol. Res.* 28, 207–215.
- Matsunari, H., Takeuchi, T., Takahashi, M., Mushiaki, K., 2005. Effect of dietary taurine supplementation on growth performance of yellowtail juveniles *Seriola quinqueradiata*. *Fisheries Sci.* 71, 1131–1135.
- Matsunari, H., Furuita, H., Yamamoto, T., Kim, S.-K., Sakakura, Y., Takeuchi, T., 2008. Effect of dietary taurine and cystine on growth performance of juvenile red sea bream *Pagrus major*. *Aquaculture* 274, 142–147.
- Maturo, J., Kulakowski, E.C., 1998. Taurine binding to the purified insulin receptor. *Biochem. Pharmacol.* 37, 3755–3760.
- Mazzaferro, E.M., Rudloff, E., Kirby, R., 2002. The role of albumin replacement in the critically ill veterinary patient. *J. Vet. Emerg. Crit. Care (San Antonio)* 12, 113–124.
- McCord, J.M., Fridovich, I., 1969. Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocyte. *J. Biol. Chem.* 244, 6049–6055.
- Messina, M., Tulli, F., Messina, C., Tibaldi, E., 2007. Varying plant protein sources in the diet of sea bass *Dicentrarchus labrax* differently affects lipid metabolism and deposition. *Ital. J. Anim. Sci.* 6, 806–808.
- Metón, I., Mediavilla, D., Caseras, A., Cantó, E., Fernández, F., Baanante, I.V., 1999. Effect of diet composition and ration size on key enzymes activities of glycolysis-gluconeogenesis, the pentose phosphate pathway and amino acid metabolism in liver of gilthead sea bream *Sparus aurata*. *Br. J. Nutr.* 82, 223–232.
- Minjarez-Osorio, C., González-Félix, M.L., Pérez-Velázquez, M., 2012. Biological performance of *Totoaba macdonaldi* in response to dietary protein level. *Aquaculture* 50–54.
- Moon, T.W., 2001. Glucose intolerance in teleost fish: face or fiction? *Comp. Biochem. Physiol. B* 129, 243–249.
- Morales, A.E., García-Rejón, L., De la Higuera, M., 1990. Influence of handling and/or anaesthesia on stress response in rainbow trout. Effects on liver primary metabolism. *Comp. Biochem. Physiol. A* 95, 87–93.
- Morales, A.E., Pérez-Jiménez, A., Hidalgo, M.C., Abellán, E., Cardenete, G., 2004. Oxidative stress and antioxidant defenses after prolonged starvation in *Dentex dentex* liver. *Comp. Biochem. Physiol. C* 139, 153–161.
- Nguyen, H.P., Khaioan, P., Fukada, H., Nakamori, T., Furuta, H., Masumoto, T., 2011. Effects of different soybean proteins on lipid digestion and growth of yellowtail *Seriola quinqueradiata*. *Fish. Sci.* 77, 357–365.
- Oliva-Teles, A., 2012. Nutrition and health of aquaculture fish. *J. Fish Dis.* 35, 83–108.
- Ostaszewska, T., Dabrowski, K., Palacios, M.E., Olejniczak, M., Wieczorek, M., 2005. Growth and morphological changes in the digestive tract of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and pacu (*Piaractus mesopotamicus*) due to casein replacement with soybean proteins. *Aquaculture* 245, 273–286.
- Panserat, S., Médale, F., Blin, C., Brèque, J., Vachot, C., Plagnes-Juan, E., Gomes, E., Krishnamoorthy, R., Kaushik, S., 2000. Hepatic glucokinase is induced by dietary carbohydrates in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), gilthead seabream (*Sparus aurata*), and common carp (*Cyprinus carpio*). *Am. J. Physiol.* 278, 1164–1170.
- Park, G.S., Takeuchi, T., Yokoyama, M., Seikai, T., 2002. Optimal dietary taurine level for growth of juvenile Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Fisheries Sci.* 68, 824–829.
- Parvez, S., Tabassum, H., Banerjee, B.D., Raisuddin, S., 2008. Taurine prevents tamoxifen-induced mitochondrial oxidative damage in mice. *BCPT* 102, 382–387.
- Peres, H., Oliva-Teles, A., 2006. Effect of the dietary essential to non-essential amino acid ratio on growth, feed utilization and nitrogen metabolism of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture* 256, 395–402.
- Peres, H., Oliva-Teles, A., 2007. Effect of the dietary essential amino acid pattern on growth, feed utilization and nitrogen metabolism of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture* 267, 119–128.
- Pérez-Jiménez, A., Guedes, M.J., Morales, A.E., Oliva-Teles, A., 2007. Metabolic responses to short starvation and refeeding in *Dicentrarchus labrax*. Effect of dietary composition. *Aquaculture* 265, 325–335.
- Pérez-Jiménez, A., Hidalgo, M.C., Morales, A.E., Arizcun, M., Abellán, E., Cardenete, G., 2009. Use of different combinations of macronutrients in diets for dentex (*Dentex dentex*). Effects on intermediary metabolism. *Comp. Biochem. Physiol. A* 152, 314–321.
- Pérez-Jiménez, A., Peres, H., Cruz Rubio, V., Oliva-Teles, A., 2012. The effect of dietary methionine and white tea on oxidative status of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Br. J. Nutr.* 108, 1202–1209.
- Polakof, S., Mommmsen, T.P., Soengas, J.L., 2011. Glucosensing and glucose homeostasis: 740 from fish to mammals. *Comp. Biochem. Physiol. B* 160, 123–149.
- Refstie, S., Svihus, B., Shearer, K.D., Storebakken, T., 1999. Nutrient digestibility in Atlantic salmon and broiler chickens related to viscosity and non-starch polysaccharide content in diferente soybean products. *Anim. Feed Sci. Technol.* 79, 331–345.
- Rosemberg, D.B., Da Rocha, R.F., Rico, E.P., Zanotto-Filho, A., Dias, R.D., Bogo, M.R., Bonan, C.D., Moreira, J.C., Klamt, F., Souza, D.O., 2010. Taurine prevents enhancement of acetylcholinesterase activity induced by acute ethanol exposure and decreases the level of markers of oxidative stress in zebrafish brain. *Neuroscience* 171, 683–692.
- Roysmmuti, S., Azuma, J., Takahashi, K., Schaffer, S., 2003. Taurine cytoprotection: from cell to system. *J.C.I.* 16, 17–27.
- Rueda-López, S., Lazo, J.P., Correa-Reyes, G., Viana, M.T., 2011. Effect of dietary protein and energy levels on growth, survival and body composition of juvenile *Totoaba macdonaldi*. *Aquaculture* 319, 385–390.
- Salvemini, F., Franzé, A., Iervolino, A., Filosa, S., Salzano, S., Ursini, M.V., 1999. Enhanced glutathione levels and oxido resistance mediated by increased glucose-6-phosphate dehydrogenase expression. *J. Biol. Chem.* 274, 2750–2757.
- Salze, G., McLean, E., Craig, S.R., 2012. Dietary taurine enhances growth and digestive enzyme activities in larval cobia. *Aquaculture* 362–363, 44–49.
- Sanden, M., Berntssen, M.H.G., Krogdahl, A., Hemre, G.I., Bakke-Mckellep, A.M., 2005. An examination of the intestinal tract of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., parr fed different varieties of soy and maize. *J. Fish Dis.* 28, 317–330.
- Schaffer, S.W., Azuma, J., Mozaffari, M., 2009. Role of antioxidant activity of taurine in diabetes. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 87, 91–99.
- Schaffer, S.W., Jong, C.J., Ramila, K.C., Azuma, J., 2010. Physiological roles of taurine in heart and muscle. *J. Biomed. Sci.* 17 (Suppl. 1), S2.
- Singer, T.D., Mahadevappa, V.G., Ballantyne, J.S., 1990. Aspects of the energy metabolism of lake sturgeon, *Acipenser fulvescens*, with special emphasis on lipid and ketone body metabolism. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 47, 873–881.
- Takagi, S., Murata, H., Goto, T., Ichiki, T., Munasinghe, D.M.S., Endo, M., Matsumoto, T., Sakurai, A., Hatate, H., Yoshida, T., Sakai, T., Yamashita, H., Ukawa, M., Kuramoto, T., 2005. The green liver syndrome is caused by taurine deficiency in yellowtail, *Seriola quinqueradiata* fed diets without fishmeal. *Aquaculture* Sci. 53, 279–290.
- 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* 280, 198–205.
- Takagi, S., Murata, H., Goto, T., Hatate, H., Endo, M., Yamashita, H., Miyatake, H., Ukawa, M., 2010. Necessity of dietary taurine supplementation for preventing green liver symptom and improving growth performance in yearling red sea bream *Pagrus major* fed nonfishmeal diets based on soy protein concentrate. *Fisheries Sci.* 76, 119–130.
- Takagi, S., Murata, H., Goto, T., Hatate, H., Endo, M., Yamashita, H., Miyatake, H., Ukawa, M., 2011. Role of taurine deficiency in inducing green liver symptom and effect of dietary taurine supplementation in improving growth in juvenile red sea bream *Pagrus major* fed non-fishmeal diets based on soy protein concentrate. *Fish. Sci.* 77, 235–244.
- Timbrell, J.A., Seabra, V., Waterfield, C.J., 1994. The *in vivo* and *in vitro* protective properties of taurine. *Gen. Pharmacol.* 26, 453–462.
- Valenzuela-Quirón, F., García-de-León, F.J., De Anda-Montañez, J.A., Balart-Páez, E.F., 2011. La Totoaba del Golfo de California ¿Una especie en peligro de extinción? *Interiencia [On line]*. Available in: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=339212040005> (ISSN 0378-1844).
- Vijayan, M.M., Ballantyne, J.S., Leatherland, J.F., 1990. High stocking density alters the energy metabolism of brook charr, *Salvelinus fontinalis*. *Aquaculture* 88, 371–381.
- Vilhelmsson, O., Martin, S.A.M., Médale, F., Kaushik, S., Houlihan, D.F., 2004. Dietary plant-protein substitution affects hepatic metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Br. J. Nutr.* 92, 71–80.
- Voronina, S., Longbottom, R., Sutton, R., Petersen, H.O., Tepikin, A., 2002. Bile acids induce calcium signals in mouse pancreatic acinar cells: implications for bile-induced pancreatic pathology. *J. Physiol.* 540 (1), 49–55.
- Williams, J.A., 1980. Regulation of pancreatic acinar cell function by intracellular calcium. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 238, 269–279.
- Wu, G., 2009. Amino acids: metabolism, functions, and nutrition. *Amino Acids* 37, 1–17.
- Yokoyama, M., Takeuchi, T., Park, G.S., Nakazoe, J., 2001. Hepatic cysteinylsulphinylate decarboxylase activity in fish. *Aquac. Res.* 32, 216–220.
- Yu, J., Kim, A.K., 2009. Effect of taurine on antioxidant enzyme system in B16F10 melanoma cells. *Adv. Exp. Med. Biol.* 643, 491–499.
- Zeng, K., Xu, H., Chen, K., Zhu, J., Zhou, Y., Zhang, Q., Mantian, M., 2010. Effects of taurine on glutamate uptake and degradation in Müller cells under diabetic conditions via antioxidant mechanism. *MCN* 45, 192–199.