



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

**SUPLEMENTACIÓN DE METIONINA Y TAURINA EN DIETAS PARA TRUCHA
ARCOIRIS *Onchorhynchus Mykiss* FORMULADAS CON PROTEÍNA VEGETAL Y
SU EFECTO SOBRE EL CRECIMIENTO Y OTRAS RESPUESTAS METABÓLICAS.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

M AESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A:

OMAR EZEQUIEL AGUILLÓN HERNÁNDEZ

TUTOR PRINCIPAL:

LUIS HÉCTOR HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ

(FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA)

COMITÉ TUTOR:

**ARMANDO SHIMADA MIYASAKA (FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN) Y MARIO GARDUÑO LUGO (FACULTAD DE MEDICINA
VETERINARIA Y ZOOTECNIA)**

MEXICO, D. F. JULIO 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo se realizó con fondos del programa PAPIIT
proyecto RR290112.

Dedicatoria.

Dedico esta tesis a mi familia, de quienes recibí mucho apoyo previo y en el transcurso de la maestría. A mi madre, padre y hermana a quienes debo la posibilidad de llegar hasta estas instancias en mi formación académica.

Agradecimientos.

Al Dr. Luis Héctor Hernández Hernández, al Dr. Armando Shimada Miyasaka y al Dr. Mario Garduño Lugo, por sus correcciones, sugerencias y planteamientos durante la realización de los experimentos y el escrito de esta tesis.

A la Dra. Ofelia Mora Izaguirre por su ayuda en la realización del ensayo de la capacidad antioxidante de los hepatocitos.

A CONACYT por el apoyo económico proporcionado durante el programa de maestría, al posgrado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal por los diversos apoyos recibidos durante mis estudios y a la Facultad de Estudios Superiores de Iztacala, donde se llevaron a cabo gran parte de las pruebas del presente estudio.

ÍNDICE

RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	3
2. REVISION DE LA LITERATURA	4
2.1 Sustitutos de la harina de pescado	4
2.2 La soya y la espirulina en la alimentación de peces	6
2.3 Aminoácidos limitantes y su suplementación	7
2.4 Importancia biológica de los aminoácidos azufrados	9
2.5 Metabolismo de compuestos azufrados.	11
2.5.1 Captación celular de metionina y taurina	11
2.5.2 Absorción intestinal de aminoácidos azufrados	12
2.5.3 Absorción intestinal de la taurina	12
2.5.4 Degradación de la metionina	13
2.5.5 Regulación del metabolismo de la metionina	16
2.5.6 Síntesis de taurina	17
2.5.7 Excreción renal de metionina	18
2.5.8 Excreción renal de taurina	19
2.5.9 Excreción renal de sulfatos	20
2.6 Requerimientos de aminoácidos azufrados en peces	20
2.6.1 Metionina y Cisteína	20
2.6.2 Taurina	22
2.7 Importancia económica de la trucha arcoíris	23
3. OBJETIVO GENERAL	25

4.	OBJETIVOS PARTICULARES	25
5.	HIPÓTESIS	26
6.	MATERIALES Y MÉTODOS	27
6.1	Formulación y elaboración de dietas	27
6.2	Primera prueba de alimentación	27
6.3	Segunda prueba de alimentación	28
6.4	Parámetros de crecimiento y supervivencia	29
6.5	Determinación del Coeficiente de Digestibilidad Aparente de la proteína (CDA)	30
6.6	Determinación de consumo de oxígeno, excreción de fósforo (P) y nitrógeno (N)	30
6.7	Determinación del índice hepatosomático	31
6.8	Medición de la capacidad antioxidante de los hepatocitos	31
6.9	Determinación de lípidos en músculo e hígado	31
6.10	Determinación de proteína en músculo e hígado	31
6.11	Actividad de la lisozima en suero	32
6.12	Estallido respiratorio de los macrófagos	32
6.13	Análisis estadísticos	33
7.	RESULTADOS	34
7.1	Experimento 1	34
7.1.1	Crecimiento	34
7.1.2	Composición química corporal	37
7.1.3	Respuesta inmune no específica	40
7.1.4	Digestibilidad aparente de la proteína (DAP)	41
7.2	Experimento 2	43

7.2.1	Crecimiento	43
7.2.2	Composición química corporal	46
7.2.3	Respuesta inmune no específica	50
7.2.4	Capacidad antioxidante de los hepatocitos	51
7.2.5	Consumo de oxígeno y excreción de fósforo y nitrógeno	52
8.	DISCUSIÓN	56
8.1	Experimento 1	56
8.1.1	Crecimiento	56
8.1.2	Composición química corporal	58
8.1.3	Respuesta inmune no específica	60
8.1.4	Digestibilidad aparente de la proteína (DAP)	60
8.2	Experimento 2	61
8.2.1	Crecimiento	61
8.2.2	Composición química corporal	62
8.2.3	Respuesta inmune no específica	63
8.2.4	Capacidad antioxidante de los hepatocitos	64
8.2.5	Consumo de oxígeno y excreción de fósforo y nitrógeno	65
9.	CONCLUSIONES	67
10.	LISTADO DE ABREVIATURAS	68
11.	REFERENCIAS	70
12	ANEXOS	81

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

REVISION DE LA LITERATURA (2)

Cuadro 2.1 Contenido de aminoácidos esenciales de algunas fuentes proteicas y requerimientos de aminoácidos esenciales en salmónidos	8
Cuadro 2.2 Requerimientos de aminoácidos azufrados para trucha arcoíris	22
Figura 2.1 Esquema de la partición de la metionina en el organismo	14
Figura 2.2 Esquema del proceso de donación de metilos y re metilación de la metionina	16
Figura 2.3 Esquema de la síntesis de taurina y degradación de cisteína	18

MATERIALES Y MÉTODOS (6)

Cuadro 6.1 Contenido de Metionina y Taurina de las dietas experimentales	27
Cuadro 6.2 Formulación de la dieta basal	27
Cuadro 6.3 Condiciones fisicoquímicas del agua durante el experimento 1	28
Cuadro 6.4 Condiciones fisicoquímicas del agua durante el experimento 2	29

RESULTADOS (7)

Cuadro 7.1 Efecto de la sustitución Tau/Met en dietas formuladas con base en proteína vegetal sobre las variables productivas de juveniles de trucha arcoiris del experimento 1	34
Cuadro 7.2 Efecto de la sustitución Tau/Met en dietas formuladas con base en proteína vegetal sobre el consumo de alimento, conversión alimenticia, condición corporal y supervivencia de los juveniles de trucha arcoiris del experimento 1	35
Cuadro 7.3 Efecto de la sustitución Tau/Met en dietas formuladas con base en proteína vegetal sobre el crecimiento de juveniles de trucha arcoiris del experimento 2	43
Cuadro 7.4 Efecto de la sustitución Tau/Met en dietas formuladas con base en proteína vegetal sobre la condición corporal y supervivencia de los juveniles de trucha arcoiris del experimento 2	44

Figura 7.1 Análisis de regresión hacia atrás de la ganancia de peso de las truchas del experimento 1	35
Figura 7.2 Efecto de la sustitución Tau/Met en dietas formuladas con base en proteína vegetal sobre la relación longitud-peso de los juveniles de trucha arcoiris del experimento 1	36
Figura 7.3 Efecto de la sustitución Tau/Met en dietas formuladas con base en proteína vegetal sobre el contenido de proteína en músculo de juveniles de trucha arcoiris del experimento 1	37
Figura 7.4 Efecto de la sustitución Tau/Met en dietas formuladas con base en proteína vegetal sobre el contenido de proteína en hígado de juveniles de trucha arcoiris del experimento 1	38
Figura 7.5 Efecto de la sustitución Tau/Met en dietas formuladas con base en proteína vegetal sobre el contenido de lípidos en músculo de juveniles de trucha arcoiris del experimento 1	38
Figura 7.6 Efecto de la sustitución Tau/Met en dietas formuladas con base en proteína vegetal sobre el contenido de lípidos en hígado de juveniles de trucha arcoiris del experimento 1	39
Figura 7.7 Efecto de la sustitución Tau/Met en dietas formuladas con base en proteína vegetal sobre el índice hepatosomático de juveniles de trucha arcoiris del experimento 1	40
Figura 7.8 Efecto de la sustitución Tau/Met en dietas formuladas con base en proteína vegetal sobre la actividad de la lisozima, a los 0.5 minutos, a los 5 y 20 minutos, de las truchas del experimento 1	41
Figura 7.9 Efecto de la sustitución Tau/Met en dietas formuladas con base en proteína vegetal sobre la digestibilidad aparente de la proteína del experimento 1	42
Figura 7.10 Efecto de la sustitución Tau/Met en dietas formuladas con base en proteína vegetal sobre la relación longitud-peso de los juveniles de trucha arcoiris del experimento 2	45
Figura 7.11 Efecto de la sustitución Tau/Met en dietas formuladas con base en proteína vegetal sobre el contenido de proteína en músculo de juveniles de trucha arcoiris del experimento 2	46

Figura 7.12 Efecto de la sustitución Tau/Met en dietas formuladas con base en proteína vegetal sobre el contenido de lípidos en músculo de los juveniles de truchas arcoiris del experimento 2	47
Figura 7.13 Efecto de la sustitución Tau/Met en dietas formuladas con base en proteína vegetal sobre el contenido de proteína en hígado de juveniles de trucha arcoiris del experimento 2	48
Figura 7.14 Efecto de la sustitución Tau/Met en dietas formuladas con base en proteína vegetal sobre el contenido de lípidos en hígado de juveniles de trucha arcoiris del experimento 2	48
Figura 7.15 Análisis de regresión hacia atrás del contenido de lípidos en hígado de las truchas del experimento 2	49
Figura 7.16 Efecto de la sustitución Tau/Met en dietas formuladas con base en proteína vegetal sobre el Índice hepatosomático de juveniles de trucha arcoiris del experimento 2	50
Figura 7.17 Efecto de la sustitución Tau/Met en dietas formuladas con base en proteína vegetal sobre el estallido respiratorio de los macrófagos (ERM) de juveniles de trucha arcoiris del experimento 2	51
Figura 7.18 Efecto de la sustitución Tau/Met en dietas formuladas con base en proteína vegetal sobre la capacidad antioxidante de los hepatocitos de juveniles de trucha arcoiris del experimento 2	52
Figura 7.19 Efecto de la sustitución Tau/Met en dietas formuladas con base en proteína vegetal sobre consumo de oxígeno de juveniles de trucha arcoiris del experimento 2	53
Figura 7.20 Efecto de la sustitución Tau/Met en dietas formuladas con base en proteína vegetal sobre la excreción de nitrógeno de juveniles de trucha arcoiris del experimento 2	54
Figura 7.21 Efecto de la sustitución Tau/Met en dietas formuladas con base en proteína vegetal sobre la excreción de fósforo de juveniles de trucha arcoiris del experimento 2	55

ANEXOS (12)

Figura 12.1 Diluciones de mM de Trolox **86**

**Figura 12.2 Gráfica de la curva patrón para el ensayo de la capacidad antioxidante de los
hepatocitos** **87**

RESUMEN

Para evaluar el efecto de la suplementación de taurina y metionina en dietas para trucha arcoíris formuladas con proteína vegetal se realizaron dos pruebas de alimentación, una en el laboratorio de producción acuícola de la FES Iztacala y otra en la granja “Los Alevines”, ubicada en el municipio de Amanalco de Becerra, estado de México; en la primera prueba se utilizaron truchas de $9.78 \text{ g} \pm 2 \text{ g}$ y $8.29 \text{ cm} \pm 2 \text{ cm}$. En la prueba dos se utilizaron truchas de $0.54 \text{ g} \pm 0.1 \text{ g}$ y $3.61 \text{ cm} \pm 0.24 \text{ cm}$. Se les ofrecieron dietas cuya base proteica principal la constituyo el aislado de proteína de soya y el polvo de espirulina (*Spirulina* spp.), con 45% de PB y 20 MJ de EB. Como dieta control se utilizó la dieta base, y las dietas restantes fueron suplementadas con los aminoácidos azufrados taurina y metionina, realizando una sustitución creciente de taurina por metionina (0, 0.25, 0.5, 0.75 y 1.0). Al término de ambas pruebas de alimentación se evaluó: el crecimiento, consumo de alimento, condición corporal, composición corporal, índice hepatosomático, digestibilidad aparente de la proteína, respuesta inmune no específica, capacidad antioxidante de los hepatocitos, consumo de oxígeno, excreción de fósforo y nitrógeno. Mediante los datos obtenidos se puede concluir, que la suplementación con 0.75% taurina y 0.25% metionina fue la más adecuada para el crecimiento, ya que generó una talla y peso significativamente mayor ($p < 0.05$) a la dieta control en ambos experimentos, además, esta misma suplementación generó una deposición lipídica menor ($p < 0.05$) en el hígado respecto a la dieta control en organismos de 3.6 cm y 0.5 g de peso. Sin embargo, la respuesta inmunológica no se vio favorecida por dicha suplementación e incluso fue significativamente inferior ($p < 0.05$) al control en la actividad de la lisozima sérica. Las suplementaciones 1.0% metionina, 1.0% taurina y 0.5% metionina 0.5% taurina generaron un incremento significativo ($p < 0.05$) en el estallido respiratorio de los macrófagos respecto a la dieta control. En la capacidad antioxidante de los hepatocitos se observó un aumento significativo en la dieta con alimento comercial respecto a la mayoría de las dietas experimentales, excepto la dieta 0.75% taurina 0.25% metionina la cual generó una respuesta intermedia que tampoco se diferenció de la dieta control. Para el resto de variables evaluadas no se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$).

Palabras clave: Taurina; Metionina; Aislado de proteína de soya; Polvo de espirulina; Trucha arcoiris

ABSTRACT

To determine the effect of different ratios of methionine and taurine on diets to rainbow trout formulated with vegetable protein, two feeding trials were performed, one, in aquatic production laboratory from FES Iztacala and other one in the farm "Los Alevines" located in Amanalco de Becerra, Estado de México; at the first trial, we use trouts of $9.78\text{g} \pm 2\text{g}$ and $8.29\text{cm} \pm 2\text{cm}$, at the second trial, we use trouts of $0.54\text{g} \pm 0.1\text{g}$ and $3.61\text{cm} \pm 0.24\text{cm}$. We offered diets with soy protein isolate (SPI) and Spirulina (*Spirulina* spp.) powder (SP) like protein core, with 45% of protein and 20 MJ (Mega Joules) of GE (Gross Energy). We use the basal diet like control, and the rest of diets was supplemented with taurine and methionine, substituting taurine by methionine in increasing form (0, 0.25, 0.5, 0.75 y 1.0). At the end of the two trials was evaluated: the growing, feed consumption, body condition, body composition, hepatosomatic index, protein digestibility, nonspecific immune response, antioxidant capacity of hepatocytes, oxygen consumption, phosphorus excretion and nitrogen excretion. With the data obtained, we can concluded that, the supplementation with 0.75% taurine and 0.25% methionine can improve the growth, because it generated increases ($p < 0.05$) in length and weight values compared with the control diet in both experiments, furthermore, this supplementation can reduce ($p < 0.05$) the liver lipid content compared with the control diet in 3.6 cm and 0.5 g organisms. Nevertheless, the immune response do not get benefits by this supplementation, and even was inferior ($p < 0.05$) to the control diet in the serum lysozyme activity. The supplementation with 1.0% methionine, 1.0% taurine and 0.5% methionine 0.5% taurine, can increase the respiratory burst of macrophage compared with the control diet. In the antioxidant capacity we can observe an increase in the commercial diet compared with the other diets, except to 0.75% taurine 0.25% methionine, that get an intermediate response, that can't be differentiated of control diet. For all other variables assessed, no significant differences were observed ($p < 0.05$).

Key words: Taurine; Methionine; Soy protein isolate; *Spirulina* powder; Rainbow trout

1. INTRODUCCIÓN

El uso de proteína vegetal en la formulación de dietas destinadas a la acuicultura es cada vez más frecuente, sin embargo, estas fuentes proteicas tienen deficiencias importantes en aminoácidos azufrados que pueden afectar el crecimiento de los organismos además de otros aspectos donde su metabolismo está involucrado, como la síntesis y movilización lipídica; la capacidad antioxidante; respuesta inmune etc. Dentro de los aminoácidos azufrados solo se considera a la metionina como esencial para los salmónidos y se ha demostrado su importancia sobre el crecimiento y composición química corporal de la trucha arcoiris (Rodehutschord et al., 1993). Respecto a la taurina su influencia sobre el crecimiento de la trucha arcoiris es más ambigua, existen reportes como el de Page (1978) que concluyen: que en una dieta donde el aporte de AA azufrados es adecuado, la taurina puede perjudicar el crecimiento de la trucha arcoiris y generar incluso cataratas. En el estudio realizado por Gaylord et al. (2007) hacen evidente el beneficio de la taurina sobre el crecimiento de trucha arcoiris alimentadas con proteína vegetal que es deficiente en aminoácidos azufrados, lo cual sugiere que el efecto de la taurina puede diferir según el contenido de aminoácidos azufrados de la dieta. La taurina es sintetizada principalmente en el hígado, sin embargo sus tasas de síntesis varían de especie a especie. En el humano se sabe que la síntesis de taurina hepática es baja (Hayes y Sturman, 1981), y que a pesar de eso, este órgano es de los que más acumula dicho aminoácido, observando disminuciones de su concentración en individuos con dietas bajas en taurina o en aminoácidos azufrados. En este contexto, en el salmón del Atlántico, Espe et al. (2008) determinaron niveles de taurina en el hígado de salmones alimentados con dietas suplementadas con metionina y formuladas con un alto contenido de proteína vegetal y concluyeron que con una correcta suplementación de precursores azufrados (Los niveles recomendados de metionina para el salmón del Atlántico es de 2.2 a 2.3 gramos de metionina por cada 100 gramos de proteína) no se afecta el contenido de taurina hepática, lo cual indicaría una síntesis adecuada de este aminoácido. Sin embargo en otro estudio se expone la importancia de la taurina en la supervivencia de las células hepáticas del salmón (Espe y Holen, 2012), lo cual sugiere que a pesar de que la taurina puede sintetizarse adecuadamente en esta especie, existe un beneficio de su aporte exógeno en la salud de dicho órgano. Otro aspecto que puede afectar los requerimientos de este aminoácido es la edad; en especies marinas se sabe que la síntesis de taurina varía dependiendo de la etapa de desarrollo, siendo en etapas más tempranas un aminoácido semiesencial (Rhodes et al., 2011), en edades

tempranas de salmónidos hay poca información al respecto y se desconoce si sucede así. Respecto a la composición química corporal, se ha demostrado, que la taurina puede disminuir la hipertriglicerihemia en mamíferos (Tsuboyama et al., 2006), y también genera un efecto positivo en el crecimiento y la proporción de músculo en trucha arcoiris (peso del filete/peso total) (Gaylord et al., 2007). Los trabajos en trucha arcoiris y otras especies acuícolas han generado expectativa sobre los beneficios de la metionina y la taurina en el crecimiento y composición de las truchas alimentadas con proteínas vegetales, ya que dichos aminoácidos podrían generar además de un mejor crecimiento, una menor deposición lipídica y mejorar la salud hepática, aspectos que son afectados en peces alimentados con proteína vegetal. Por tal motivo el objetivo principal del presente estudio fue el de evaluar los efectos de la suplementación de ambos aminoácidos sobre el crecimiento, composición química corporal, actividad antioxidante de los hepatocitos y respuesta inmune no específica en juveniles de trucha arcoiris alimentadas con un 100% de proteína vegetal, con miras en mejorar el aprovechamiento de dietas con estas características y prescindir de fuentes proteicas tradicionales como la harina de pescado.

2. REVISION DE LA LITERATURA.

2.1 Sustitutos de la harina de pescado.

La alimentación en las producciones acuícolas intensivas o semi intensivas puede representar hasta el 60% de los costos de producción (Moncada, 2000), lo cual genera una alta demanda del sector sobre los alimentos formulados conforme aumentan estos sistemas de producción. Hasta el 75% del costo de los alimentos balanceados proceden de las materias primas (Krishen et al., 2009), de las cuales, han sido durante muchos años grandes protagonistas los aceites y las harinas de pescado. En la actualidad estos recursos son cada día más escasos debido a la presión ejercida por la pesca en los mares, que ha disminuido las capturas de diversas especies incluida la anchoveta que es una de las principales especies utilizadas en la elaboración de harina de pescado (Greenpeace México, 2010). Debido a esto, y a la presencia de economías más fuertes como la China que compiten por la importación de harina de pescado con el resto del mundo, países como México deben mirar hacia recursos proteicos alternativos. Uno de los recursos proteicos alternativos son las harinas provenientes de semillas de uso agrícola, las cuales tienen limitantes como: diversos anti nutrientes, concentraciones de aminoácidos poco adecuadas para los requerimientos de especies acuáticas; baja digestibilidad de la proteína; antigenicidad de algunas

de sus proteínas (gluten, β conglucina etc.) y presencia de sustancias con actividad biológica como las isoflavonas (fitoestrógenos) (Yueming, 2002). Estos inconvenientes hacen que dichas materias primas tengan que sufrir procesos térmicos o químicos para eliminar algunos de estos componentes, o en el caso de las deficiencias de aminoácidos se tenga que recurrir al uso de otra fuente proteica o a la suplementación con aminoácidos sintéticos, lo cual puede aumentar los costos del alimento formulado con estas harinas limitando su inclusión en las dietas comerciales. Un aspecto a destacar del uso de proteínas vegetales sobre las proteínas animales es el bajo contenido de fósforo que se encuentra en ellas, lo que genera una disminución de este elemento en las aguas de desecho provenientes de las granjas disminuyendo el impacto ambiental (Médale et al., 1998); además de no generar problemas de antagonismos o sinergismos existentes en la absorción de los minerales dietarios (Calcio y fósforo por ejemplo) como si lo pueden hacer algunas harinas animales, como la harina de pescado blanca (Satoh et al., 1987) o las harinas de carne y hueso. Por otra parte, los fitatos, que es la forma como se almacena la mayor parte del fósforo en la semilla de soya, pueden disminuir la absorción de minerales (como Calcio y Zinc) uniéndose a estos (Fredlund et al., 2006) generando signos de deficiencia en algunos organismos, sin embargo, la concentración de estos compuestos es disminuida durante los procesos químicos de aislamiento proteico. Otro aspecto positivo de las harinas vegetales es su costo y su disponibilidad, en general, estas harinas son baratas y fáciles de encontrar ya que la industria ha generado una amplia gama de productos elaborados a partir de las principales especies vegetales cultivadas (maíz, soya, trigo, frijol etc.). Actualmente productos procesados de soya, como el concentrado de proteína de soya (CPS) y el aislado de proteína de soya (APS), tienen precios similares a los de la harina de pescado (APS 2.5-3.2 USD /Kg, CPS 1.5 USD/kg; en tanto que la harina de pescado 1.85-2 USD/kg), sin embargo, la harina de pescado (HP) se pronostica que seguirá aumentando en precio debido a su escasez, lo cual hace que tanto el APS y el CPS (debido a su accesibilidad y precio) se utilicen como constituyentes importantes de las dietas acuícolas actuales y quizá futuras. El APS y el CPS son fuentes proteicas con una menor cantidad de anti nutrientes debido a los procesos químicos a los que son sometidas (Yueming, 2002), además, presentan menos componentes no proteicos que afecten su digestibilidad.

Otro recurso proteico importante, son las algas, que superan en balance de aminoácidos a las proteínas de origen agrícola; tienen un alto contenido de vitaminas y contienen cantidades variables de ácidos grasos polinsaturados de importancia nutricional. De entre sus limitantes se

encuentran: el contenido de polisacáridos no digeribles, algunos desbalances minerales (Henry, 2012) y el precio tan elevado de algunos de estos recursos, este último aspecto y la poca cantidad en el comercio de estas fuentes proteicas lo convierten en un recurso que rara vez se incluye en dietas comerciales. Las harinas de origen animal, principalmente subproductos de los mataderos, son disponibles como fuente de algunos aminoácidos que se encuentran en poca cantidad en las proteínas vegetales, sin embargo, las de mayor calidad tampoco son recursos baratos, y pueden tener cantidades elevadas de algunos minerales, afectando la salud de los organismos (Tacon, 1992) pudiendo contribuir a contaminar el ambiente.

2.2 La soya y la espirulina en la alimentación de peces.

La harina de soya y sus formas más refinadas como el concentrado (CPS) o el aislado de proteína de soya (APS) ya son usadas en la formulación de alimentos acuícolas desde hace varios años, sin embargo, su inclusión depende en gran medida del proceso recibido durante la elaboración de dichos alimentos. La harina de soya en alimentos extruidos puede sustituir hasta 25% de la harina de pescado sin generar afección sobre el crecimiento de los organismos (Barrows et al., 2007), usando CPS se puede disminuir la inclusión de harina de pescado (HP) hasta representar solo el 25% de la proteína dietaria generando un crecimiento adecuado en la trucha (Médale et al., 1998). El APS puede incluirse como única fuente de proteína en alimentos extruidos con una adecuada suplementación de aminoácidos (Scott et al., 2012), ya que a pesar de que el APS tiene un alto contenido de proteína, la concentración de algunos aminoácidos esenciales (metionina y lisina) no es adecuada para muchas especies acuáticas, lo cual hace necesaria la suplementación de aminoácidos sintéticos o el uso de otras fuentes proteicas. La mezcla de diferentes fuentes proteicas es una estrategia para mejorar el aprovechamiento de la proteína dietaria, ya que las deficiencias de aminoácidos no son siempre las mismas en las diversas fuentes proteicas, sin embargo, en pocos casos se ha logrado cumplir los requerimientos de las especies acuáticas con proteínas enteras. Existe un trabajo, realizado en trucha, donde una mezcla de proteínas vegetales represento el 95% de la proteína dietaria, con solo una aportación del 5% de harina de krill (con la intención de ser un saborizante), generando resultados en crecimiento muy similares a una dieta formulada con harina de pescado (Yuxing et al., 2012).

Respecto a la espirulina, existe un trabajo que demuestra su posible uso como sustituto de la harina de pescado hasta en un 50% (El-Sayed, 1994) sin generar diferencias en el crecimiento, el

cual se vio disminuido cuando se incluyó en 75% y 100% el polvo de espirulina. También se ha usado esta alga como sustituto de la harina de soya en dietas para trucha arcoíris; hay un estudio donde se sustituyó la harina de soya por polvo de espirulina en proporciones crecientes de 20 hasta el 80% sin afectar el crecimiento de los organismos; es importante señalar que en dicho estudio se utilizó la HP en una inclusión fija y la inclusión de la espirulina no fue más del 16% de la proteína dietaria. Otros estudios donde se incluyó la espirulina en una concentración del 10% total de la dieta reemplazando a la harina de pescado generó un crecimiento muy similar a la dieta no suplementada (Ahmadzadenia et al., 2011), en algunos estudios, se menciona que una sustitución del 10 hasta 80% de espirulina por HP aumenta la ganancia de peso en carpa (Nasreen et al., 2014); estos datos hacen pensar que la espirulina es una mejor fuente proteica que la soya para peces de cultivo, y que además, puede sustituir en buena proporción a la HP; debido a que la espirulina es una buena fuente de aminoácidos (AA) esenciales para algunas especies acuícolas además de tener una buena digestibilidad y ausencia de antinutrientes, sin embargo, el costo en el mercado de la espirulina es su principal limitante, ya que este puede llegar en la actualidad hasta los 80 USD/kg.

2.3 Aminoácidos limitantes y su suplementación.

Todos los recursos proteicos contienen concentraciones variables de AA esenciales, los cuales, pueden tener similitudes a los requerimientos de alguna especie, sin embargo, la proteína que cubra el 100% de los requerimientos de AA esenciales de una especie dada no existe. La baja concentración de alguno de los AA esenciales respecto a los requerimientos de una especie limita el uso del recurso para dicha especie (delimita su inclusión). En el caso de la mayoría de proteínas vegetales se considera a la lisina y/o a la metionina como los más limitantes (Tacon et al., 1983) y suelen ser suplementados en alimentos formulados con estas fuentes proteicas. Es importante recordar que la deficiencia de AA esenciales provenientes de la dieta puede suprimir el crecimiento de los organismos, al igual el exceso de algunos de estos AA puede generar la misma consecuencia, por tal motivo es que se busca acercarse lo más posible a dichas demandas, usando estrategias como la combinación de diferentes fuentes proteicas y/o la suplementación con aminoácidos sintéticos.

Aunque la harina de pescado es capaz de sostener el crecimiento de muchas especies acuícolas como única fuente de proteína, el efecto de la adición de otros recursos proteicos aumenta el

desempeño de las dietas, lo mismo que la suplementación de algunos AA, sin embargo, al comparar las diferencias en las concentraciones de AA esenciales de muchas proteínas vegetales se registran deficiencias profundas (Cuadro 2.1) que deben ser resueltas para no afectar el crecimiento de los organismos (Ketola, 1982), ya que si se utilizan estos productos en concentraciones altas en los alimentos acuícolas; se ha visto un cese del crecimiento en muchas especies (Yueming, 2002).

La suplementación con aminoácidos sintéticos es necesaria cuando se utilizan recursos proteicos vegetales (ya sean solos o en combinación), sin embargo, como anteriormente se había mencionado, la concentración de dichos AA debe ser muy específica para evitar problemas en el desarrollo de los organismos, lo que implica el conocer la concentración de AA esenciales de las materias primas y si es posible hasta su digestibilidad, para calcular la cantidad adecuada que debe ser incluida.

Cuadro 2.1. Contenido de aminoácidos esenciales de algunas fuentes proteicas y requerimientos de aminoácidos esenciales en salmónidos g/100 g de proteína

Aminoácidos	Harina de soya	Mezcla vegetal	Concentrado de proteína de pescado	Requerimientos (Salmónidos NRC)
Arginina	7.6	7.2	6.3	6.0
Histidina	2.4	2.4	2.1	1.8
Lisina	6.4	6.3	8.8	5.0
Met + Cist	3.1	3.1	3.6	4.0
Triptofano	1.3	1.3	1.0	0.5
Fen + Tir	9.4	9.2	7.9	5.1
Leucina	7.6	7.7	8.4	3.9
Isoleucina	5.2	5.2	5.5	2.2
Valina	5.4	5.4	6.3	3.2
Treonina	4.0	4.1	4.1	2.2

(Ketola, 1982)

Un error al suplementar fuentes alternativas de proteína es solo considerar la ganancia de peso de los organismos, ya que existen otras respuestas relacionadas a la importancia de los aminoácidos

en diferentes tejidos que se verán alteradas ante un aporte deficiente, debido a esto, estudios que ofrezcan datos de la retención de los aminoácidos en los organismos, así como el funcionamiento de los sistemas dependientes de estos, pueden servir como un referente más fidedigno de los requerimientos reales. Un aporte subóptimo puede generar: cambios en la composición del individuo, menor rendimiento de la canal, cambios en la respuesta inmune y susceptibilidad a enfermedades.

2.4 Importancia biológica de los aminoácidos azufrados

Los aminoácidos azufrados son la principal fuente de azufre para los vertebrados y su importancia radica en todos los procesos donde este elemento está involucrado. Algunas funciones, de este elemento, en el organismo son:

- La formación de puentes de sulfuro para la estructuración de múltiples proteínas estructurales o con actividad biológica.
- Transporte de electrones (proteínas hierro/azufre)
- Compuesto necesario para vitaminas del complejo B como tiamina y biotina.
- Influencia sobre la capacidad antioxidante celular (cisteína aminoácido clave en la síntesis de glutatión)
- Síntesis de acetil coenzima A

La amplia gama de funciones del azufre hace que la presencia de este compuesto sea vital para garantizar el adecuado desarrollo y supervivencia de los organismos. Aunque existen algunos mecanismos compensatorios para tolerar algunas deficiencias de aminoácidos azufrados, un aporte insuficiente de estos generará cambios patológicos en diversos órganos y sistemas, por ejemplo, la formación de condroitina y colágeno puede verse limitada (Silve, 2000); también la producción de glutatión, afectando la capacidad antioxidante de muchos tejidos, que de entre los más sensibles se encuentra la retina, la cual puede verse seriamente afectada en su funcionalidad ante una depleción de los aminoácidos azufrados (Cowey et al., 1992).

Los aminoácidos azufrados son importantes en el funcionamiento hepático, ya que estos, están involucrados en diversos procesos metabólicos que se llevan a cabo en el hígado como son: la síntesis de fosfatidilcolina a partir de etanolamina; síntesis de creatina; síntesis de cisteína; síntesis

de glutatión (Scott, 1998) y la detoxificación. En todos estos procesos actúan productos de la degradación de metionina, que si bien no es una actividad exclusiva de los hepatocitos, si es el lugar donde la mayor parte de estos compuestos se metabolizan. Mención aparte merece la taurina, otro producto de la degradación de la metionina y cisteína, este aminoácido está involucrado en la generación de sales biliares y eliminación del colesterol en el hígado. Cómo es de esperar en el tejido hepático existen altas concentraciones de compuestos azufrados, e incluso, es fuente de productos de la degradación de estos aminoácidos que tienen importancia biológica en otros sistemas o células (Hayes, 1981)

En el tejido muscular existe evidencia del beneficio de los aminoácidos azufrados sobre la síntesis proteica. Este proceso se verá favorecido por la metionina, ya que, es el aminoácido de iniciación de la traducción en todas las células eucariontes. Esta actividad no es única para el músculo pero debido a que este es el tejido que se comercializa en todas las especies cómo fuente de proteína es el más notorio; hay un estudio realizado en cultivos de células musculares que confirma que la metionina puede influenciar el contenido de proteína muscular siempre y cuando se encuentre en concentraciones adecuadas al requerimiento (Métayer-Coustard et al., 2010). De una forma menos directa la metionina provee de un compuesto vital para la utilización de ATP a nivel muscular; la fosfocreatina la cual, es sintetizada en músculo mediante ATP y creatina procedente del hígado, en el cual la metionina y la arginina son cruciales para su síntesis.

En otras formas, como N acetil cisteína, los aminoácidos azufrados pueden ejercer un rol importante cómo moléculas con actividad antioxidante, manteniendo la integridad muscular y aumentando su desempeño durante el ejercicio (Zembron-Lacny et al., 2009) además, la taurina, la cual se encuentra en concentraciones considerables en el tejido muscular, juega un papel importante en la estabilización de membranas celulares (Shcaffer et al., 2010) y en la sensibilidad de este tejido a la insulina, hormona que regula el anabolismo muscular (Carneiro et al., 2009). Estudios recientes han demostrado un efecto de la taurina sobre la síntesis de proteínas contráctiles en ratones, relacionando este efecto a la modulación de la concentración de calcio intracelular generada por este aminoácido (Horvath, 2011).

Respecto al sistema inmune, los compuestos azufrados que favorecen la capacidad antioxidante como: el glutatión, la taurina y otras sustancias con grupos tiol (Atmaca, 2004), pueden incrementar la capacidad de formación de radicales libres por parte de las células fagocíticas

impactando sobre la respuesta inmune no específica. En el caso de la taurina las cloraminas que esta puede formar, con los hipocloritos producidos en el estallido respiratorio de los fagocitos, pueden actuar como moduladores de la respuesta inmune disminuyendo la liberación de interleucinas y otras sustancias proinflamatorias (Park et al., 1993). Otros compuestos azufrados, como la homocisteína, pueden generar efectos adversos en la liberación de sustancias proinflamatorias, lo cual puede generar daño a diversos tejidos (Suresh y Leighton, 2009); estas características otorgan un carácter ambivalente al efecto de los compuestos azufrados sobre las células fagocíticas, por lo cual, su adecuada concentración influirá de forma importante en la actividad inmunológica.

Las células del sistema inmune son principalmente captadoras de AA presentes en la poza plasmática, y la acumulación de ciertos aminoácidos o sustancias derivadas puede cambiar según el estado metabólico de estas. Así por ejemplo, durante el estallido respiratorio, los fagocitos pueden aumentar su captación de glutatión hasta 10 veces más que en un estado no activado (Seres et al., 2000).

2.5 Metabolismo de compuestos azufrados.

2.5.1 Captación celular de metionina y taurina

En mamíferos las células tienen un amplio rango de mecanismos para transportar los aminoácidos a través de las membranas plasmáticas (Palacin et al., 1998), los transportadores han sido clasificados en distintos sistemas, según su especificidad de sustrato; mecanismo de transporte y propiedades regulatorias (Hyde et al., 2003). La concentración intracelular de aminoácidos puede ser mayor o igual a la concentración en el fluido extracelular, y muchos mecanismos de transporte activo son utilizados para mantener dichas concentraciones (Hyde et al., 2003). Una gran cantidad de estos transportadores de aminoácidos son dependientes de sodio para, generar un cambio en la polarización de membrana e interiorizar los aminoácidos (Christensen, 1990). La actividad de la bomba sodio/potasio ATPasa ayuda a mantener el gradiente transmembranal de sodio en equilibrio; otras actividades de transporte dependen de otros iones como: K, H y OH (Broer, 2002). Un movimiento neto de carga eléctrica ocurre durante el transporte de ciertos aminoácidos el cual, afecta directamente el potencial de membrana.

El consumo de un aminoácido en un tipo celular específico puede llevarse a cabo por diferentes sistemas, por ejemplo, la glutamina puede ser transportada en el hepatocito por al menos 2

transportadores activos secundarios (Sistema A y N) y también por el sistema ASC (Bode, 2001). Para el caso de la metionina los transportadores identificados son: el sistema A, el PHE, el B⁰, y⁺ L sodio-dependientes y el b⁰ y L sodio-independientes (Hyde et al., 2003). Estos transportadores estarán presentes, y tendrán menor o mayor relevancia según el tipo celular, por ejemplo, el sistema B⁰ es utilizado principalmente por blastocitos y en el borde de cepillo de los enterocitos.

Para el caso de la taurina el principal sistema implicado en su obtención es el sistema BETA, mediante el transportador Taut, el cual es dependiente de sodio (Hyde et al., 2003).

2.5.2 Absorción intestinal de aminoácidos azufrados

La metionina al igual que todos los aminoácidos neutros es transportada al interior del enterocito por el sistema B⁰ (dependiente de sodio) y por el sistema L (independiente de sodio) en humanos (Gropper y Smith, 2009); el transporte de la metionina en aves, que utiliza otros sistemas, puede incrementarse hasta 4.5 veces con el aumento de sodio, desde una concentración de 1 a 100 mM lo cual indica una elevada importancia de los mecanismos dependientes de sodio en la absorción de este aminoácido (Soriano et al., 1998). En peces marinos existen también sistemas de transporte dependientes e independientes de sodio, sin embargo, en estas especies, parece que el sistema dependiente es el que más afinidad muestra a la metionina además, de compartir funciones con la valina (Balocco et al., 1993).

El transporte de la metionina al espacio vaso lateral se realiza, en el caso del enterocito humano, mediante otro sistema de transporte sodio-dependiente denominado A, así mismo el sistema L, opera en este lugar de la célula; liberando los aminoácidos absorbidos por el enterocito al plasma sanguíneo. En peces se ha demostrado que existe un sistema de transporte independiente de sodio en la membrana vaso lateral del enterocito, y es responsable del transporte de los aminoácidos del espacio intracelular al plasma (Storelli y Verri, 2008).

2.5.3 Absorción intestinal de la taurina

En los peces aún existe poca información sobre los transportadores intestinales de los diferentes aminoácidos, sin embargo, en el humano se sabe que la taurina es absorbida en el borde de cepillo mediante un transportador específico denominado Taut que también, transporta a otro β -aminoácido, la β -alanina. Este sistema es dependiente de cloro y de sodio. A bajas concentraciones de taurina dietaria este sistema es el que prevalece, sin embargo, a altas

concentraciones otros transportadores como el PAT1 (este último dependiente de H⁺) adquieren mayor importancia en la absorción del aminoácido (Anderson et al., 2009).

La transferencia de la taurina a la parte vaso lateral del enterocito, ha sido poco descrita, no se sabe exactamente el sistema involucrado aunque, podría tratarse de Taut ya que se ha demostrado que su transporte es dependiente de sodio (Bröer, 2008).

2.5.4 Degradación de la metionina

El catabolismo de este aminoácido se realiza principalmente en el hígado, y está establecido que las reacciones principales son la transmetilación y la transulfuración (Finkelstein y Martin, 1986), aunque existe también un proceso de transaminación, a través del cual se forma 3-metiltiopropionato (Figura 2.1).

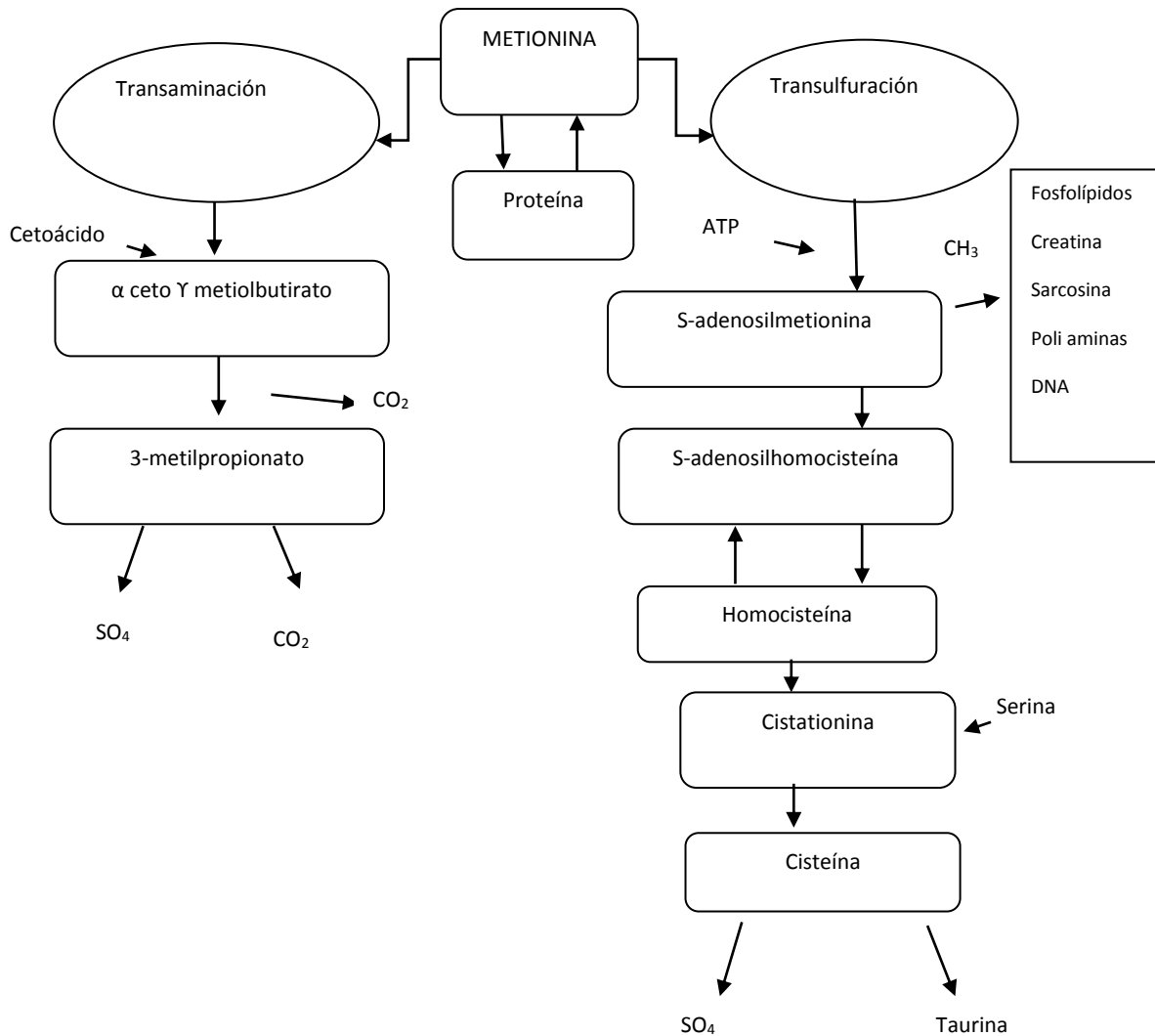


Figura 2.1. Esquema de la partición de la metionina en el organismo (Scott, 1998).

La transulfuración se lleva a cabo principalmente en hígado, aunque también existe en el riñón, páncreas e intestino, y consiste en que la metionina sea transformada a S-adenosil metionina mediante la enzima metionina adenosiltransferasa (MAT) y ATP. Después de la donación del grupo metilo la S-adenosil metionina se transforma en S-adenosil homocisteína, y mediante la enzima adenosilhomocisteínasa se transforma en homocisteína, molécula clave en la transformación de metionina a cisteína (Baker, 1977), ya que esta puede seguir dos rutas: una re metilación para formar de nuevo metionina o la transformación a cistationina a través de la enzima cistationina beta sintasa (CBS); la cistationina es finalmente transformada en cisteína por medio de la

cistationasa. La transformación de homocisteína a cisteína es un proceso irreversible en los vertebrados (Finkelstein y Martin, 1986).

La cisteína cumple diversas funciones en el organismo, incorporada en proteínas o de forma libre, y en el hígado puede almacenarse un poco en forma de glutatión (Yokoyama y Nakazoe, 1992). La cisteína forma parte de moléculas muy importantes como la coenzima A y el glutatión. Este último tiene un papel importante en la formación de leucotrienos, y también puede funcionar como un mecanismo de transporte de cisteína hacia el hígado y riñones.

El compuesto tiol en la cisteína le confiere a esta una gran reactividad, el grupo tiol es el equivalente al grupo alcohol OH pero con azufre, este se puede oxidar formando cistina y homocistina, de ahí su importancia en las reacciones Redox (Atmaca, 2004). La degradación de este aminoácido puede seguir también 2 rutas distintas; después de ser oxidado a cisteinsulfonato, puede degradarse por transaminación generando piruvato, sulfato y amonio, o mediante un proceso de descarboxilación generar taurina (Daniels y Stipanuk, 1982); (De La Rosa y Stipanuk, 1985). Alrededor del 70% del exceso de cisteína es transformada en taurina en ratas (Daniels y Stipanuk, 1982) sin embargo, esta cantidad puede variar en distintas especies y en algunas de ellas puede ser extremadamente baja.

La metionina en su forma S-adenosil metionina es un importante donador de metilos, estos grupos metilos están involucrados en la síntesis de creatina, de fosfatidilcolina, poliaminas y de ADN metilado. La partición de la metionina en el organismo dependerá de la cantidad de sustancias donadoras de metilo presentes en la dieta, tales como: la colina, la betaína y el tetrahidrofolato, las cuales determinaran la remetilación de la S adenosilmetionina; permitiendo que quede más metionina para otras funciones (Figura 2.2). Ante una falta de estos grupos donadores de metilo los requerimientos de metionina se pueden elevar, y con una deficiencia aún más grave puede generarse un aumento de la homocisteína en plasma (Obeid, 2013), produciendo trastornos en el proceso de metilación ya que, este compuesto es un fuerte inhibidor de las metiltransferasas.

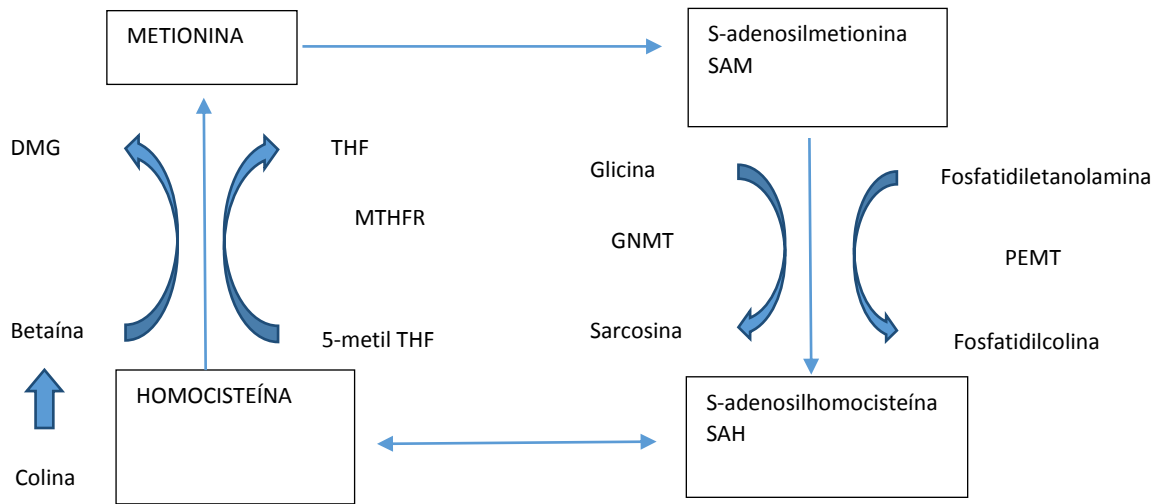


Figura 2.2. Proceso de donación de metilos y re metilación de la metionina: Enzimas en marcos azules MTHFR= Metileno tetrahidrofolato reductasa, GNMT= Glicina N-metiltransferasa y PEMT= Fosfatidil etanolamina N-metiltransferasa (Brosnan y Brosnan, 2005)

2.5.5 Regulación del metabolismo de la metionina

Los medios más importantes por los cuales el metabolismo de la metionina es regulada son: 1) La regulación alostérica de S-Adenosil metionina (SAM) y 2) la regulación de la expresión genética de enzimas clave, donde SAM ejerce efectos fuertes sobre diferentes loci. Metionina adenosil transferasa (MAT) la enzima responsable de la formación de SAM tiene una alta afinidad por la metionina, y tiene una alta capacidad para remover el exceso de metionina, esta enzima exhibe una retroalimentación con su producto SAM (Cabrero et al., 1987); esto hace que la eliminación de metionina sea muy sensible a la concentración de la misma (Martinov et al., 2000). SAM es un activador alostérico de la cistationina beta sintasa (CBS) y un inhibidor alostérico de la Metileno tetrahidrofolato reductasa (MTHFR) (Finkelstein, 2001). La elevación de SAM promueve la transulfuración (degradación de metionina) e inhibe la re metilación (conservación de metionina). Muchas de las enzimas involucradas en el catabolismo de la metionina aumentan con la ingestión elevada de proteína (Finkelstein, 2001).

En adición a esto, la transulfuración provee de cisteína para la síntesis de glutatión sin embargo, la síntesis de glutatión a partir de cisteína es limitada, concentrando la cisteína restante en un gran

número de células. Al menos la mitad de la cisteína requerida proviene de la transulfuración aun en presencia de concentraciones fisiológicas de cisteína (Mosharov et al., 2000). La transulfuración es sensible al balance de prooxidantes y antioxidantes, los peróxidos incrementan la transulfuración y los antioxidantes la minimizan (Vitvitsky et al., 2003). La regulación redox ocurre a nivel de la CBS la cual contiene un grupo hemo que sirve de sensor del estatus oxidativo (Banerjee y Zou, 2005).

2.5.6 Síntesis de taurina

La taurina es sintetizada a partir de cisteína, y se realiza en varios órganos, de los principales se consideran al cerebro y el hígado, este último de gran variabilidad entre las especies (Hayes, 1981). La taurina se puede generar por medio de dos vías diferentes, una es la transformación de la cisteína a ácido cisteinosulfínico (Figura 2.3), para posteriormente ser transformado a ácido cistéico y ser descarboxilado para formar taurina, y la segunda vía, en la cual la cisteína sufre una oxidación enzimática por medio de la cisteína dioxigenasa transformándola a ácido cisteinosulfínico, posteriormente la enzima ácido sulfínico descarboxilasa transforma el ácido cisteinosulfínico en hipotaurina, finalizando con la transformación a taurina por la enzima hipotaurina deshidrogenasa. En todo este proceso la molécula es oxidada, descarboxilada y al final adquiere un protón, quedando un aminoácido sin grupo carboxilo y con un grupo sulfónico. La enzima de mayor importancia en el proceso de síntesis de la taurina es la ácido sulfínico descarboxilasa (CSAD), y esta se toma como referente de la capacidad de un tejido para generar taurina (Hayes, 1981), sin embargo, esta puede variar a diferentes edades y entre diferentes especies; donde los individuos más jóvenes y las especies carnívoras pueden tener una capacidad inferior de síntesis. La CSAD requiere piridoxal 5 fosfato como coenzima (Sturman, 1978) lo cual, genera que una deficiencia de vitamina B6 afecte negativamente la síntesis de taurina. Algunas hormonas pueden influir la síntesis de taurina. Los machos tienen una mayor actividad de la CSAD hepática que las hembras y es un hecho demostrado que el estradiol inhibe la actividad de esta enzima (Jacobsen et al., 1968), la tiroxina también disminuye la actividad de la CSAD, generando concentraciones elevadas en los tejidos en ciertos estados patológicos como el hipotiroidismo (Heinonen, 1975). La hidrocortisona incrementa la actividad de la CSAD, y al mismo tiempo, inhibe la conjugación de la taurina en sales biliares (Jacobsen et al., 1968). También se ha documentado el efecto de la taurina sobre hormonas, por ejemplo, en la hormona del crecimiento (por sus siglas

en ingles GH) la cual, puede aumentar su concentración plasmática en ratas alimentadas con cantidades elevadas de taurina (Mantovani, 1979).

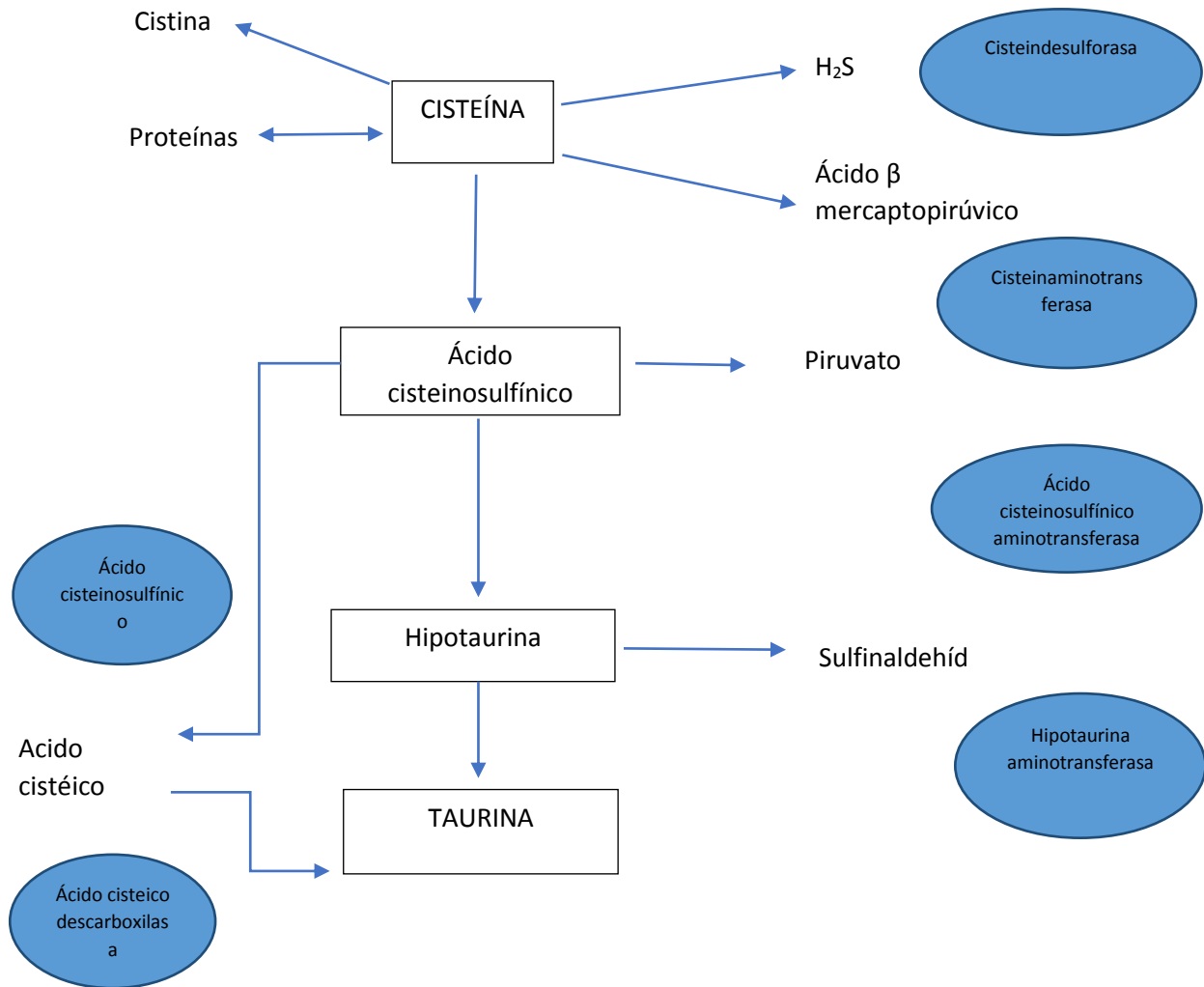


Figura 2.3. Esquema de la síntesis de taurina y degradación de cisteína: Enzimas en globos azules (Hayes, 1981)

2.5.7 Excreción renal de metionina

Los aminoácidos que son absorbidos en el intestino, una vez que llegan a circulación, pueden ser excretados o reabsorbidos por las células de los túbulos renales las cuales, tienen los mismos o similares transportadores que los enterocitos (Broer et al., 2004). Su concentración en el filtrado final dependerá de las concentraciones de diversos electrolitos así como de la concentración del mismo y otros aminoácidos en el lumen del túbulo. Para el caso de la metionina, el transportador

que se conoce es el B^o, el cual es similar al que se encuentra en el borde de cepillo de los enterocitos, y al igual que este es dependiente de sodio. En la parte vaso lateral de las células de los túbulos renales, un sistema parecido al L es el principal encargado de transferir dicho aminoácido del epitelio del túbulo renal al plasma en la membrana vaso lateral (Bröer, 2008). Bajo condiciones normales de consumo de metionina más del 90% de este aminoácido es retenido en el organismo (Shils et al., 2006) y utilizado en los procesos de transulfuración, transmetilación, re metilación y síntesis de proteínas. Mucha de la metionina es excretada en otras formas, como azufre inorgánico o como algún compuesto formado a partir de su degradación.

2.5.8 Excreción renal de taurina

La taurina es excretada tal cual en los túbulos renales y ejerce cierta función de osmolito (Uchida et al., 1991), ya que su distribución en estas estructuras puede variar en las diferentes porciones de la nefrona que están expuestas a un mayor estrés osmótico. La taurina también puede ser excretada en el intestino en forma de ácido tauro cólico, la cual, tiene alta relevancia en la digestibilidad de los lípidos, específicamente, en la actividad de las lipasas pancreáticas ya que esta sal biliar facilita (aún más que los conjugados con glicina) la solubilidad de los lípidos.

La reabsorción renal de la taurina se realiza por medio del transportador Taut, el cual, es dependiente de sodio y cloro; la absorción renal de este aminoácido puede ser inhibida por otros β aminoácidos y el GABA (Bröer, 2008). En los túbulos proximales la captación de taurina es mayor en la membrana apical, en los distales es mayor en la membrana vaso lateral, dicha diferencia se debe al distinto estrés osmótico al que son sometidas estas estructuras. La taurina a diferencia de otros aminoácidos no es reabsorbida en su totalidad por los túbulos renales, y su concentración plasmática se regula a ese nivel, donde pueden expresarse o no los transportadores de dicho aminoácido en las células de los túbulos renales, así por ejemplo un individuo con una dieta vegetariana que tiene un bajo aporte de taurina puede excretar 250 $\mu\text{mol}/\text{día}$ en orina, mientras un individuo omnívoro excretara 400 $\mu\text{mol} /\text{día}$ (Rana y Sanders, 1986), (Laidlaw et al., 1988) ya que esta reabsorción será totalmente dependiente del aporte de taurina o precursores azufrados en la dieta. En la rata, por ejemplo, la concentración de taurina en plasma y en orina puede ser la misma en condiciones de un aporte óptimo de taurina dietaria o precursores azufrados. Otros factores que pueden afectar la excreción renal de taurina es el Zinc, ya que, este mineral está

involucrado en la oxidación y la movilización de la taurina de diferentes tejidos (Anthony et al., 1971).

2.5.9 Excreción renal de sulfatos

Los sulfatos son filtrados libremente a través del glomérulo renal, y son reabsorbidos solo entre el 5 y el 20%; el resto es excretado en orina (Silve, 2000). La captación de sulfato tubular está a cargo de un sistema de transporte acoplado a sodio (Murer et al., 1994), y una vez dentro de la célula tubular los sulfatos salen por medio de un intercambio aniónico. Actualmente se tienen identificados los dos transportadores de sulfato: el NaSi-I y el sulfato/oxalato-bicarbonato intercambiador aniónico (Sat-1) (Markovich et al., 1993), que están implícitos en este proceso fisiológico. Estos transportadores están localizados en la membrana apical y vaso lateral de las células de los túbulos renales.

Hay algunos indicios que hacen pensar que la vitamina D juega un papel importante en el metabolismo de los sulfatos, ya que, se han encontrado cambios en la agregación de los sulfatos en la matriz del cartílago de crecimiento en ratas con deficiencia de vitamina D (Fernandes et al., 1997), además de que el intestino y el riñón que son los principales órganos responsables de las concentraciones de sulfatos extracelulares son también el blanco principal de la vitamina D (Murer et al., 1994). Un trabajo en ratas deficientes en vitamina D, ha demostrado, que el déficit de dicha vitamina genera un aumento de la excreción urinaria de sulfatos (Fernandes et al., 1997), lo cual evidencia la importancia de la vitamina sobre la retención de sulfatos.

El exceso de desechos provenientes de compuestos azufrados en el organismo puede traer algunas consecuencias adversas, una de las más importantes es la acidosis, debido entre otras cosas a la pérdida de carbonatos generada durante la elevación de ácido sulfhídrico H_2S . Dicha acidosis se ha observado en aves alimentadas con un exceso de cisteína, en las cuales la acidosis puede tornarse letal (Ryan y Baker, 2008).

2.6 Requerimientos de aminoácidos azufrados en peces

2.6.1 Metionina y Cisteína

La Metionina es el único aminoácido azufrado esencial y principal fuente de azufre para los vertebrados, el resto de sustancias orgánicas que contienen azufre derivan de este aminoácido esencial, como: cisteína, cistina, α ceto- γ -metiltiobutirato, α hidroxio- γ -metiltiobutirato.

Homocisteína, cistationina, s-adenosilmetionina, taurina, ácido cistéico, ácido lipóico, acetil coenzima A, glutatión, condroitina, fibrinógeno y heparina (Baker, 1977). La metionina pertenece al grupo de los aminoácidos no polares sin carga, y debido a su grupo R, es poco soluble en agua.

La metionina es de los principales aminoácidos limitantes de muchas harinas, incluyendo la de pescado (Cowey et al., 1992), y es de gran relevancia, ya que sus roles biológicos incluyen: ser el constituyente principal en la síntesis de proteína; donador de grupos metilo y ser precursor de cisteína y taurina, AA azufrados que entre otras funciones tienen la de proteger a la célula de radicales libres. En este contexto la metionina puede generar importantes cambios en la composición de los organismos y sobre su estado de salud.

Existe considerable literatura al respecto de los requerimientos de metionina para la trucha arcoíris, que han utilizado diferentes métodos para evaluar dichos requerimientos; desde las pruebas de crecimiento dosis – respuesta; las que involucran presencia de cambios patológicos; las predictivas basadas en la composición de los organismos y las que involucran concentraciones plasmáticas de amonio y del aminoácido en estudio. Estos trabajos han llegado a resultados distintos (influidos también por componentes ambientales o inherentes al organismo), pero que se asemejan. Aunque el requerimiento de metionina varía desde 0.5 hasta 1.1% de la dieta (Kim et al., 1992), (Rumsey et al., 1978), el requerimiento de aminoácidos azufrados en promedio es del 1% de la dieta (Cuadro 2.2), considerando que el único esencial es la metionina una concentración de 1% es adecuada para el desarrollo de la trucha (Walton et al., 1982). Esta cantidad de metionina, sin embargo, es muy difícil de encontrar en las fuentes proteicas, por tal motivo, la inclusión de cisteína en las dietas pueden disminuir el requerimiento de metionina hasta un 50%, esto debido al hecho de que un uso muy importante de la metionina es servir como precursor de la cisteína, que también, se ha discutido sobre las cantidades adecuadas de inclusión, las cuales tienen un rango desde 0.3 hasta 0.5% (Rumsey et al., 1978; Kim et al., 1984). Una investigación reciente donde se midieron concentraciones plasmáticas de metionina y amonio en truchas alimentadas mediante sondas con una inclusión de cisteína al 0.5% encontraron, que la concentración adecuada que no genera aumentos en el amonio plasmático pero sí un aumento significativo en la concentración de metionina era la de 0.6% (Jun-Young et al., 2011), la cual coincide con algunos autores que obtuvieron un resultado similar mediante pruebas de alimentación que midieron crecimiento como respuesta (Cowey et al., 1992).

Cuadro 2.2. Requerimientos de aminoácidos azufrados para trucha arcoíris

Metionina	Cisteína	TAA	Referencia
1.0	0	1.0	Walton et al., (1982)
1.1	0.3	1.4	Rumsey et al., (1978)
1.0	0.5	1.5	Kim et al., (1984)
0.6	0.2	0.8	Cowey et al., (1992)
0.5	0.5	1.0	Kim et al., (1992)

Los datos están en porcentaje (%) de la materia seca (Scott, 1998)

De entre los factores que pueden afectar los estimados de los requerimientos de la trucha, una de los más importantes es la edad, la (NRC, 2011) tiene unos estimados obtenidos mediante un modelo factorial de los requerimientos de AA esenciales en trucha arcoíris de diferentes pesos, en donde, para organismos de 0.2 a 20 gramos se calculó un requerimiento del 1.32% de la dieta de AA azufrados, mientras que, para organismos de 20 a 500 gramos el modelo dio un resultado de 1.23 % , y para los individuos de 500 a 1500 gramos un requerimiento del 1.1%. Estos datos nos muestran que en organismos de menor talla (más jóvenes) los requerimientos de aminoácidos pueden ser más altos que los que se han calculado para organismos más pesados (adultos), motivo por el cual dependiendo de la talla los organismos pueden responder de forma distinta a una misma suplementación. Otros factores que pueden afectar estas estimaciones es la composición de la dieta (Bureau y EncarnaÇao, 2006), principalmente la energía la cual afecta la utilización de los aminoácidos; las fuentes de proteína también pueden afectar ya que la digestibilidad de los aminoácidos puede variar mucho entre los distintos recursos proteicos. Por último la temperatura es otro factor que puede influir en el aprovechamiento de las dietas debido a que los requerimientos de proteína son distintos en una misma especie a diferentes temperaturas (Sliger et al., 1997).

2.6.2 Taurina

La taurina es un ácido sulfónico el cual se genera a partir de cisteína, algunos autores no lo consideran propiamente un aminoácido al carecer de grupo carboxilo, sin embargo, también se describe con un β aminoácido que se encuentra de forma libre y en raras ocasiones asociado a pequeños péptidos, el cual es abundante en los tejidos animales (El-Sayed, 2013). En algunos

animales carnívoros como el gato, la taurina es un aminoácido esencial, y en otras especies como los primates puede ser un factor condicionante del crecimiento (Hayes, 1981). En peces dulce-acuícolas por lo general se considera un aminoácido no esencial, que sin embargo, puede tener algunos efectos benéficos al ser incluida en las dietas, como una mayor producción de ácidos biliares, enzimas digestivas, mejor aprovechamiento de la energía dietaria, mayor actividad inmunológica etc. (El-Sayed, 2013). Aun así una concentración adecuada de precursores azufrados como la metionina o la cisteína bastan para generar una concentración adecuada de este aminoácido (Espe, 2008), lo cual hace que la taurina suplementada solo cobre importancia en dietas cuyo aporte de AA azufrados es baja, como las dietas formuladas con proteína vegetal; ya que en dietas con un contenido adecuado de AA azufrados la inclusión de taurina puede incluso reducir el crecimiento y desarrollar problemas oculares (Page, 1978).

En este contexto existe un trabajo que concluyo que la taurina en una concentración de 0.5% es necesaria para el correcto desarrollo de la trucha arcoíris alimentada con una dieta con proteína vegetal (Gaylord et al., 2007), en otras especies como la carpa la suplementación de taurina en 1.0 % y 5.0 % no generó diferencias en ganancia de peso ni en longitud, pero si generó mejoras en la composición: reducción de lípidos y un aumento en la concentración de taurina en los organismos (Liu et al., 2006), también en esta especie se encontró que una suplementación de 0.05% al 2.0% generaba un aumento de la respuesta inmune no específica y de la capacidad antioxidante (Qiu Xiao et al., 2008). En salmónidos, hay un estudio en cultivos de hepatocitos de salmón del Atlántico donde se demuestra que la taurina es un aminoácido importante para la sobrevivencia de estas células (Espe y Holen, 2012). Tales estudios han generado expectativa respecto al uso de la taurina como un recurso importante para mejorar el aprovechamiento de las dietas por las especies dulce-acuícolas cultivadas.

En especies marinas caso contrario a las especies dulce-acuícolas se ha demostrado la importancia de la taurina para generar un crecimiento adecuado en varias especies como el lenguado o la cobia, en estas especies la taurina se considera condicionalmente esencial (El-Sayed, 2013) .

2.7 Importancia económica de la trucha arcoíris

La trucha en el contexto mundial se integra dentro del grupo de salmónidos. Como producto se obtiene principalmente por técnicas de acuicultura en aguas dulces, salobres y marinas; así también en un menor grado por métodos de pesca (FAO, 2004).

La FAO registró (según información facilitada por los países productores) en 2004 un volumen total de 2'856,718 toneladas. Siendo el salmón la especie más importante, logrando una producción de 1'827,302 toneladas que representa el 64% del total (FAO, 2004).

En 2004 la trucha registró un volumen de 593,234 toneladas producidas en todo el mundo, de las cuales 584,329 son de cultivo (98.5%) y 8,905 (1.5%) de captura. La trucha arcoíris, producida por acuicultura, alcanzó en el mismo año 504,876 toneladas, de las cuales 290,007 toneladas (57.4%) son por cultivo en agua dulce y 203,385 (40.3%) por maricultura (FAO, 2004). La Trucha por su volumen se encuentra posicionada en el lugar 19 de la producción de especies acuáticas en México; sin embargo, por su valor la encontramos en el lugar 6 (según datos de CONAPESCA, 2009). La tasa media de crecimiento anual de la producción en los últimos 10 años es positiva y es de 2.11 %. El 76% de la producción de trucha nacional proviene de la acuicultura con un valor total para el año 2009 de 288, 141, 000 pesos (CONAPESCA, 2009). La trucha se produce en su mayoría en el Estado de México el cual representa el 46.6% de la producción nacional (CONAPESCA, 2009).

3. OBJETIVO GENERAL.

Determinar el efecto de la suplementación de taurina y metionina, en una dieta formulada con un 100% de proteína vegetal, sobre el crecimiento y respuestas metabólicas de juveniles de trucha arcoíris (*Onchorhynchus mykiss*).

4. OBJETIVOS PARTICULARES.

- Determinar el efecto de la suplementación de taurina y metionina, en dietas formuladas con proteína vegetal, sobre el crecimiento en juveniles de trucha arcoíris.
- Determinar el efecto de la suplementación de taurina y metionina, en dietas formuladas con proteína vegetal, sobre la condición corporal en juveniles de trucha arcoíris.
- Determinar el efecto de la suplementación de taurina y metionina, en dietas formuladas con proteína vegetal, sobre la conversión alimenticia en juveniles de trucha arcoíris.
- Determinar el efecto de la suplementación de taurina y metionina, en dietas formuladas con proteína vegetal, sobre la digestibilidad de la proteína en juveniles de trucha arcoíris.
- Determinar el efecto de la suplementación de taurina y metionina, en dietas formuladas con proteína vegetal, sobre la concentración de proteína y lípidos en hígado y en filete en juveniles de trucha arcoíris.
- Determinar el efecto de la suplementación de taurina y metionina, en dietas formuladas con proteína vegetal, sobre el índice hepatosomático de juveniles de trucha arcoíris.
- Determinar el efecto de la suplementación de taurina y metionina, en dietas formuladas con proteína vegetal, sobre la capacidad antioxidante de los hepatocitos en juveniles de trucha arcoíris.
- Determinar el efecto de la suplementación de taurina y metionina, en dietas formuladas con proteína vegetal, sobre la respuesta inmune no específica en juveniles de trucha arcoíris.
- Determinar el efecto de la suplementación de taurina y metionina, en dietas formuladas con proteína vegetal, sobre el consumo de oxígeno en juveniles de trucha arcoíris.

- Determinar el efecto de la suplementación de taurina y metionina, en dietas formuladas con proteína vegetal, sobre la excreción de fósforo y nitrógeno en juveniles de trucha arcoíris.

5. HIPÓTESIS.

La suplementación de diferentes concentraciones de taurina y metionina en dietas formuladas con proteína vegetal para juveniles de trucha arcoíris, permitirá obtener mejoras en el crecimiento, en la conversión alimenticia y composición química corporal con respecto a la misma dieta sin suplementar, además de generar cambios en la capacidad antioxidante y la respuesta inmune no específica.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Formulación y elaboración de dietas

Se formuló una dieta con un 45 % de proteína y de 21.18 MJ EB, en la cual, los principales recursos proteicos fueron el APS y PS, con un contenido de metionina de 0.6% y 0.7% de cisteína procedentes de la dieta (Anexo 9). A partir de la formulación basal se elaboraron seis dietas, cinco con las suplementaciones que se presentan en la Cuadro 6.1 y una sin suplementar (Cuadro 6.2).

Cuadro 6.1. Suplementaciones de Metionina y Taurina de las dietas experimentales

Dieta	Metionina (%)	Taurina (%)
0T/100M	1	0
25T/75M	0.75	0.25
50T/50M	0.5	0.5
75T/25M	0.25	0.75
100T/0M	0	1

La cantidad de metionina (M) y taurina (T) se adicionó, según el requerimiento de AA azufrados totales (NRC 2011)

Cuadro 6.2. Formulación de la dieta basal y experimental

Ingrediente	Dieta experimental (g/kg)	Dieta basal (g/kg)
APS	392	401.5
PS	22	22.5
Aceite de hígado de bacalao	50	50
Lecitina de soya	50	50
Pre mezcla vitamínica (Rovimix)	40	40
Dextrina	186	186
Gluten de trigo	150	150
Aminoácidos	10	0
Alfa celulosa	90	90

6.2 Primera prueba de alimentación

La primera prueba de alimentación se realizó en las instalaciones del laboratorio de producción acuícola de la Facultad de Estudios Superiores (FES) Iztacala de la Universidad Nacional Autónoma de México, las condiciones fisicoquímicas promedio del agua se muestran en el Cuadro 6.3.

Cuadro 6.3. Condiciones fisicoquímicas del agua durante el experimento 1 (valores promedio \pm desviación estándar)

pH	Temperatura	O ₂ disuelto
7.8 \pm 0.5	17.2 \pm 1.5 C°	5 \pm 1 mg/L

Las dietas se suministraron a 270 organismos, con un peso inicial de 9.78g \pm 2g, una longitud inicial de 8.29cm \pm 2cm y un factor de condición K, de 1.1 \pm 0.08. Se contó con 3 repeticiones por tratamiento, quedando 15 individuos por tanque de 100 L. La ración ofrecida correspondió al 5% del peso de la biomasa por tanque (basados en las tablas de alimentación de la dieta comercial del Pedregal[®]), y se ajustó según los registros obtenidos por las biometrías. La duración de la prueba fue de 55 días, realizándose biometrías cada 10 días, que consistieron en pesaje (individual y por grupo) y medición de la longitud (individual). En el transcurso de la prueba de alimentación se contabilizó el alimento consumido diariamente, de igual forma la mortalidad fue registrada, ajustando la ración por cada baja. Al finalizar la prueba, 10 organismos fueron seleccionados de cada grupo para ser sacrificados mediante una sobredosis de Eugenol 400 ppm, y obtener las muestras de tejido para determinar el contenido de: lípidos, proteína y el índice hepatosomático. Además de las muestras de tejido, de los organismos sacrificados, se tomaron muestras de suero para el posterior análisis de la actividad de la lisozima. Los organismos restantes se alimentaron a saciedad con las dietas respectivas (a las cuales se adiciono óxido de cromo Cr₂O₃ Sigma-Aldrich 203068 al 1% como marcador) durante 5 días extras, tiempo en el cual se extrajeron heces (mediante sifoneo de los tanques) para obtener la digestibilidad aparente de la proteína de forma indirecta por el método de marcador externo.

6.3 Segunda prueba de alimentación

La segunda prueba de alimentación se realizó en el rancho “Los alevines” ubicado en el municipio de Amanalco de Becerra, Estado de México. Las condiciones fisicoquímicas del agua se muestran en el Cuadro 6.4.

Cuadro 6.4. Condiciones fisicoquímicas del agua durante el experimento 2 (valores promedio \pm desviación estándar)

pH	Temperatura	O ₂ disuelto
7.2 \pm 0.2	15 \pm 0.5 C°	4 \pm 0.1 mg/L

Las dietas se suministraron a 490 organismos con peso inicial de 0.54g \pm 0.1g y una talla inicial de 3.61cm \pm 0.24cm, con 2 repeticiones por tratamiento, quedando 35 individuos por tanque de 500 L. La ración ofrecida correspondió al 5% del peso de la biomasa por tanque, y se ajustó según los registros obtenidos por las biometrías. La duración de la prueba de alimentación fue de 70 días, tiempo durante el cual se realizaron biometrías cada 10 días que consistieron en pesaje (individual y por grupo) y medición de la longitud (individual). Durante la prueba de alimentación la mortalidad fue registrada ajustando la ración por cada baja. Al finalizar la prueba 10 organismos de cada grupo fueron sacrificados, mediante una sobredosis de Eugenol 400 ppm, para obtener las muestras de tejido, para determinar: el contenido de lípidos, proteína, el índice hepatosomático, el estallido respiratorio de los macrófagos y la medición de la capacidad antioxidante de los hepatocitos. De los organismos restantes 5 fueron seleccionados por grupo para la obtención del consumo de oxígeno, excreción de fósforo y nitrógeno mediante una cámara herméticamente sellada.

6.4 Parámetros de crecimiento y sobrevivencia.

Para la obtención de los parámetros de crecimiento y sobrevivencia se utilizaron los datos recabados en las biometrías a lo largo del periodo de alimentación.

Para evaluar los efectos de las dietas en el crecimiento de los organismos se utilizaron las siguientes formulas:

Ganancia en peso, GP = $(PF - PI) / PI \times 100$ (PF=Peso final, PI=Peso inicial)

Tasa de crecimiento específico, TCE = $(\logaritmo PF - \logaritmo PI) / t \times 100$

Conversión alimenticia CA = $Total\ de\ la\ dieta\ en\ peso\ seco\ (g) / GP\ (g)$

Consumo = $((Alimento\ ofrecido - Alimento\ sobrante) / Alimento\ ofrecido) * 100$

Condición corporal, $K = (\text{Peso en g} / \text{Longitud en mm}^3) * 100000$

Supervivencia, $SV = (\text{NFO} / \text{NIO}) * 100$ donde NIO= Número inicial de organismos y NFO= Número final de organismos.

Relación talla-peso: se determinó en base a la siguiente ecuación: $P = a * L^b$; donde P= peso del pez (g); a= intercepto; b= pendiente; L= longitud del pez (cm)

6.5 Determinación del Coeficiente de Digestibilidad Aparente de la proteína (CDA).

Para determinar CDA, se utilizó la técnica de marcador externo Cr_2O_3 , primero se cuantificó la concentración de cromo en las heces recolectadas durante los 5 días de alimentación extras con las dietas con marcador, para esto se realizó una digestión mediante ácidos y calor según la técnica de (Furukawa y Tsukahara, 1966), y se utilizó la siguiente fórmula:

$$\% \text{Cr}_2\text{O}_3 = Y - 0.032 / (0.2089 / 4)$$

Y= Absorbancia 350nm.

% Cr_2O_3 = Porcentaje de óxido de cromo.

Para calcular la digestibilidad aparente (DA) se utilizó la siguiente formula.

$$\text{DA} (\%) = 100 - [(\% \text{CH} / \% \text{CD}) * (\% \text{NH} / \% \text{ND}) * 100]$$

Dónde:

CH=Cromo en heces.

CD=Cromo en la dieta.

PN=Nutriente en heces.

PN=Nutriente en dieta

El contenido de proteína en heces se determinó mediante el método de Lowry (Lowry et al., 1951)

6.6 Determinación de consumo de oxígeno, excreción de fósforo (P) y nitrógeno (N).

Para obtener el consumo de oxígeno, excreción de fósforo y nitrógeno se utilizaron frascos herméticos de 1 L de capacidad unidos en serie mediante mangueras de 0.5 cm de diámetro, por donde se hizo recircular agua proveniente de la entrada de los estanques, previa medición de la

concentración de oxígeno, fósforo y nitrógeno. Después de llenar los frascos completamente, se cerró la entrada y la salida de los frascos y se introdujo a los organismos previamente pesados. Se dejaron durante 30 minutos y se procedió a medir de nuevo la concentración de oxígeno, fósforo y nitrógeno para determinar el consumo y excreción. Este procedimiento se realizó a las 12 y 24 horas después de la alimentación.

Las muestras obtenidas durante la prueba anteriormente descrita se procesaron de acuerdo a las técnicas de Nessler y de Molibdovanato (Clesceri et al., 1998) para N-NH₃ y PO₄ (ortofosfatos), respectivamente. Para la determinación de estos parámetros se utilizó un espectrofotómetro (HACH). El consumo de oxígeno se determinó mediante el uso de un oxímetro (YSI 85, YSI Incorporated, Ohio, EUA).

6.7 Determinación del índice hepatosomático.

El índice hepatosomático se determinó mediante el pesaje del hígado y la siguiente fórmula

IHS= Índice hepatosomático

Peso del hígado en gramos *100/Peso del pez en gramos

6.8 Medición de la capacidad antioxidante de los hepatocitos

La medición de la capacidad antioxidante se realizó, mediante un kit colorimétrico (QuantiChrom), el cual utiliza como indicador la reducción de Cu²⁺ a Cu⁺. La forma reducida de cobre genera un cambio de color cuantificado como unidades de absorbancia mediante un lector de placas de ELISA con una longitud de onda de 570 nm.

Para la prueba se utilizó 20 µl de un homogenizado de hígado en PBS 1X y centrifugación a 14000 rpm durante 10 minutos para precipitar los restos sólidos.

6.9 Determinación de lípidos en músculo e hígado.

Para obtener la cantidad lípidos en el músculo e hígado se utilizó la técnica reportada por Blight y Dyer (Blight y Dier, 1959).

6.10 Determinación de proteína en músculo e hígado.

Para determinar la proteína en músculo e hígado se utilizó la prueba de micro-Lowry (Lowry et al., 1951), utilizando 0.01g de muestra.

6.11 Actividad de la lisozima en suero

Para determinar del contenido de proteína en plasma se utilizó la técnica de (Lowry et al., 1951). Para la determinación de actividad de la lisozima, se utilizó la técnica reportada por (Taoka et al., 2006); en la que muestras de suero, se mezclan con una suspensión acuosa de *Micrococcus lysodeikticus* (células liofilizadas, Sigma-Aldrich Chemical, MO, EUA) y se incuban a 25 C°, la absorbancia se midió a 530 nm a 0.5, 4.5 y 20 min. La actividad de la lisozima se expresó como unidades de actividad de la lisozima (U) y se define como la cantidad de enzima que causo un decremento en la absorbancia (OD) de 0.001 por mg de proteína.

6.12 Estallido respiratorio de los macrófagos

La explosión respiratoria se ha demostrado en macrófagos y neutrófilos de diversas especies de peces, y es un mecanismo microbicida del sistema de defensa innato. Para el análisis de la explosión respiratoria se utilizó el ensayo de NBT (azul de nitrotetrazolio), para poner de manifiesto la producción de radicales oxidativos intracelulares en macrófagos previamente aislados de riñón mediante el método descrito por (Secombes, 1990); el cual consiste en un tamizado de células del riñón anterior usando una maya de 100 micras, para posteriormente ser incubados a temperatura ambiente durante 72 horas en microplacas de ELISA con el medio de Leibovitz. Posterior a esto se agregó el NBT y se dejó incubar 1 hora para después ser leído en un lector de placas de ELISA a 620 nm.

6.13 Análisis estadísticos.

Los datos de crecimiento, digestibilidad de las dietas, capacidad antioxidante, composición y respuesta inmunológica obtenidos a lo largo de las pruebas de alimentación se analizaron utilizando el siguiente modelo $Y_{ij} = \mu + D_i + E_{ij}$, donde Y_{ij} = variable de respuesta, μ = media general, D_i = efecto de la i -ésima dieta ($i=6$) y E_{ij} = error aleatorio ($j=2-3$), para la comparación de las dietas se utilizó un ANDEVA de una variable, usando las medias de las repeticiones por tratamiento. La comparación de medias entre los tratamientos se evaluó con una prueba de Tukey (Steel y Torne, 1980) considerando un alfa de 5% para cada grupo de comparaciones. Para estimar relaciones entre las diferentes concentraciones de taurina/metionina y las variables de respuesta se realizó un análisis de regresión múltiple hacia atrás utilizando como criterio el valor $P < 0.05$. Las regresiones de longitud-peso se realizaron utilizando los datos promedio de longitud y peso obtenidos durante las biometrías y se utilizó una prueba t para determinar el tipo de crecimiento mediante la siguiente ecuación: $b - 3/S_b$ donde b = la pendiente y S_b = error estándar de la pendiente.

7. RESULTADOS

7.1 Experimento 1

7.1.1 Crecimiento.

Los datos muestran diferencias ($p < 0.05$) en la longitud final, peso final, ganancia de peso y tasa de crecimiento específico; principalmente entre las dietas 50T/50M y 75T/25M y las dietas control (0T/0M) y 0T/100M, obteniendo estas últimas los valores más bajos (Cuadro 7.1). La dieta 100T/0M generó un aumento de la ganancia en peso con respecto a la dieta control, y respecto a la dieta 0T/100M generó un aumento ($p < 0.05$) tanto en longitud como en peso. En la condición corporal (factor K) no se observaron diferencias ($p < 0.05$) entre las dietas (Cuadro 7.2).

Cuadro 7.1. Efecto de la sustitución Tau/Met en dietas formuladas con base en proteína vegetal sobre las variables productivas de juveniles de trucha arcoiris del experimento 1, Los valores son la media \pm desviación estándar

Suplementación Tau/Met	Longitud final	Peso inicial	Peso final	GP (g) ¹	GP% ²	TCE ³
0T/100M	13.5 ^c \pm 2.2	9.8 \pm 2	29.8 ^c \pm 11.5	20 ^b \pm 11.5	204 ^b \pm 117	0.8 ^c \pm 0.3
25T/75M	14.9 ^{ac} \pm 1.8	9.6 \pm 2.5	39.7 ^{ac} \pm 10	29.9 ^{ab} \pm 10	306 ^{ab} \pm 106	1 ^{ac} \pm 0.2
50T/50M	15.4 ^a \pm 1.2	10 \pm 1.8	45 ^a \pm 12.6	35.2 ^a \pm 12.6	360 ^a \pm 129	1.2 ^a \pm 0.2
75T/25M	15.4 ^a \pm 1.5	9.7 \pm 2.2	42.8 ^a \pm 10	33 ^a \pm 11	337 ^a \pm 122	1.1 ^a \pm 0.2
100T/0M	15 ^{ab} \pm 1.5	9.8 \pm 2	42.7 ^{ab} \pm 17.2	32.9 ^a \pm 17.2	336 ^a \pm 176	1 ^{ab} \pm 0.4
0T/0M	13.7 ^{bc} \pm 2.3	10.1 \pm 1.7	31.7 ^{bc} \pm 11.3	21.4 ^b \pm 11.3	219 ^b \pm 116	0.8 ^{bc} \pm 0.3

Letras diferentes indican diferencias significativas $p < 0.05$, $n = 3$ por tratamiento

¹GP = Ganancia de peso

²GP% = Ganancia de peso en porcentaje

³TCE = Tasa de crecimiento específico

Respecto al consumo, supervivencia y conversión alimenticia (CA) no se observaron diferencias ($p < 0.05$) entre las dietas (Cuadro 7.2).

Cuadro 7.2. Efecto de la sustitución Tau/Met en dietas formuladas con base en proteína vegetal sobre el consumo de alimento, conversión alimenticia, condición corporal y supervivencia de los juveniles de trucha arcoiris del experimento 1, Los valores son la media \pm la desviación estándar

Suplementación Tau/Met	Condición corporal	Consumo %	Supervivencia %	Conversión alimenticia
0T/100M	1.15 ^a \pm 0.1	91 ^a \pm 5.8	100 ^a \pm 0	1.23 ^a \pm 0.05
25T/75M	1.16 ^a \pm 0.08	92 ^a \pm 4.8	100 ^a \pm 0	1.24 ^a \pm 0.1
50T/50M	1.18 ^a \pm 0.1	88 ^a \pm 7.9	87.5 ^a \pm 10.8	1.30 ^a \pm 0.07
75T/25M	1.14 ^a \pm 0.09	91 ^a \pm 6.2	91.7 ^a \pm 7.6	1.29 ^a \pm 0.13
100T/0M	1.16 ^a \pm 0.08	91 ^a \pm 5.7	91.7 ^a \pm 10	1.25 ^a \pm 0.15
0T/0M	1.18 ^a \pm 0.27	89 ^a \pm 10.3	91.7 ^a \pm 8	1.27 ^a \pm 0.09

Letras diferentes indican diferencias significativas $p < 0.05$, $n = 3$ por tratamiento

Mediante el análisis de regresión múltiple hacia atrás se logró establecer una relación positiva de la inclusión de taurina sobre la ganancia de peso (Figura 7.1), sin embargo, no se pudo demostrar lo mismo para la longitud.

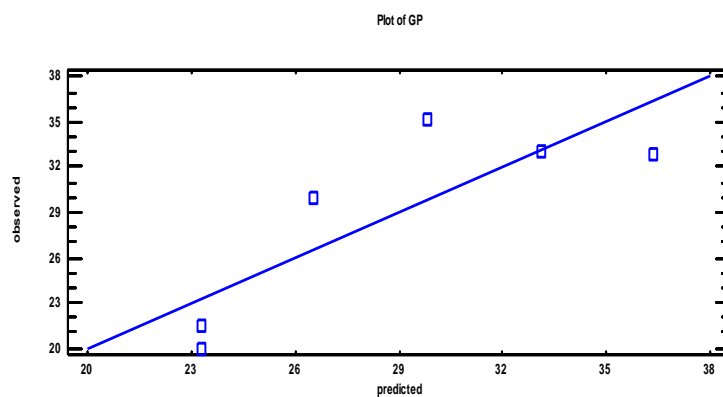
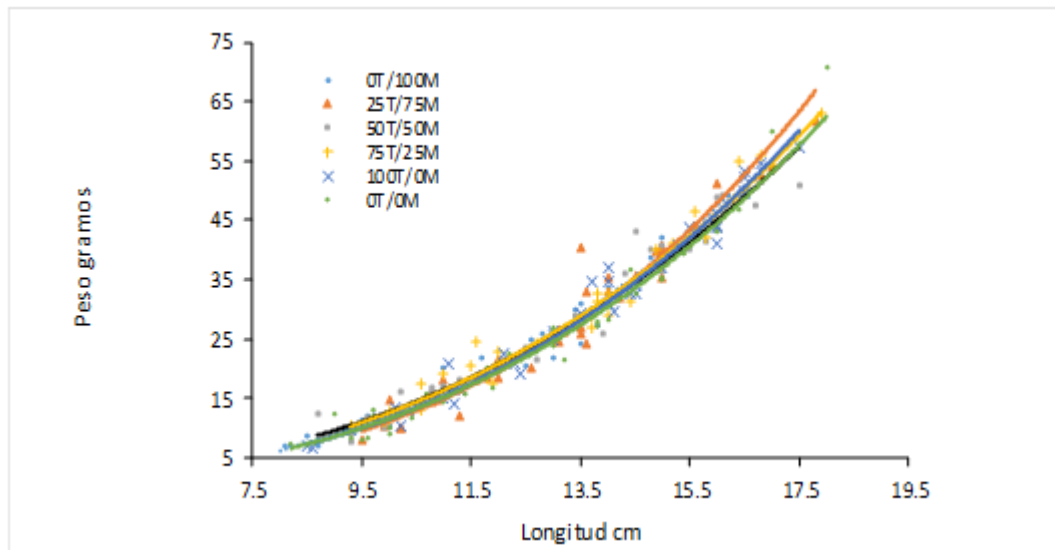


Figura 7.1. Gráfica de valores observados y valores calculados por la ecuación Ganancia de peso = $23.2875 + 13.07 \cdot \text{Taurina}$ ($R^2 = 68.17$), obtenida mediante un análisis de regresión hacia atrás de las variables independientes taurina y metionina

En la relación talla-peso se observó una R^2 entre 0.97 y 0.94, lo cual indica que la ecuación puede explicar más del 90% de la variación, y respecto al comportamiento del crecimiento este se muestra como alométrico negativo para la dieta 75T/25M y 50T/50M, y para el resto de las dietas

se muestra un crecimiento isométrico debido a su valor de pendiente igual a 3 (Figura 7.2).



Dieta	a (Intercepto)	b (Pendiente)	R ² (Coeficiente de determinación)	Tipo de crecimiento
0T/100M	0.014	2.92	0.97	Isométrico
25T/75M	0.008	3.11	0.94	Isométrico
50T/50M	0.024	2.7	0.95	Alométrico negativo
75T/25M	0.02	2.78	0.97	Alométrico negativo
100T/0M	0.013	2.93	0.97	Isométrico
0T/0M	0.015	2.87	0.95	Isométrico

Figura 7.2. Efecto de la sustitución Tau/Met en dietas formuladas con base en proteína vegetal sobre la relación longitud-peso de los juveniles de trucha arcoiris del experimento 1, tipo de crecimiento dado por la prueba $t = b - 3 / S_b$ con un $\alpha = 0.05$, donde $b =$ pendiente y $S_b =$ Error estándar de la pendiente

7.1.2 Composición química corporal

En el contenido de proteína, solo se observaron diferencias ($p < 0.05$) en el contenido en músculo de los organismos alimentados con la dieta 100T/0M, la cual obtuvo los valores más altos. La proteína en hígado no se vio afectada por ninguno de los tratamientos (Figuras 7.3 y 7.4).

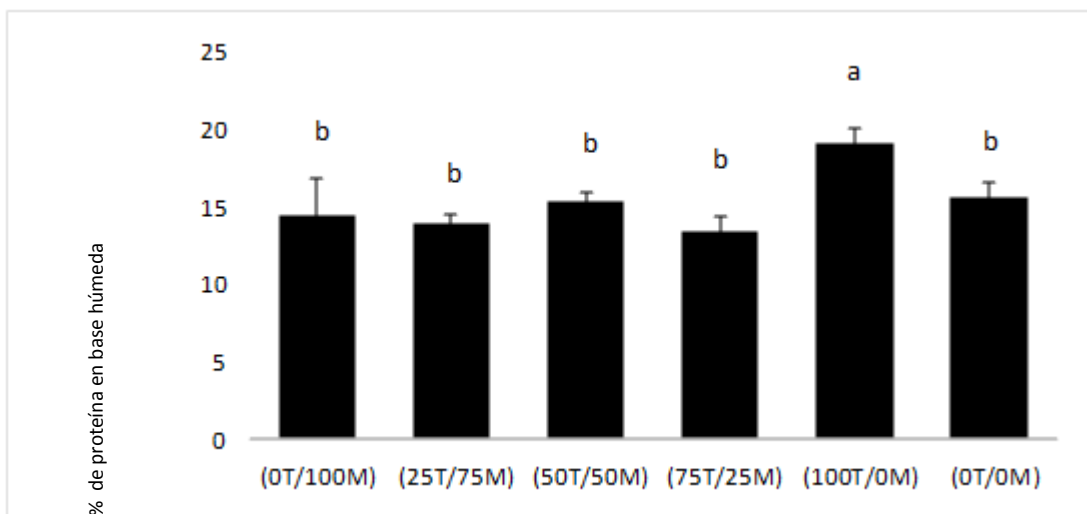


Figura 7.3. Efecto de la sustitución Tau/Met en dietas formuladas con base en proteína vegetal sobre el contenido de proteína en músculo de juveniles de trucha arcoiris del experimento 1, los valores son la media \pm la desviación estándar, letras diferentes indican diferencias significativas $p < 0.05$, $n = 3$ por tratamiento.

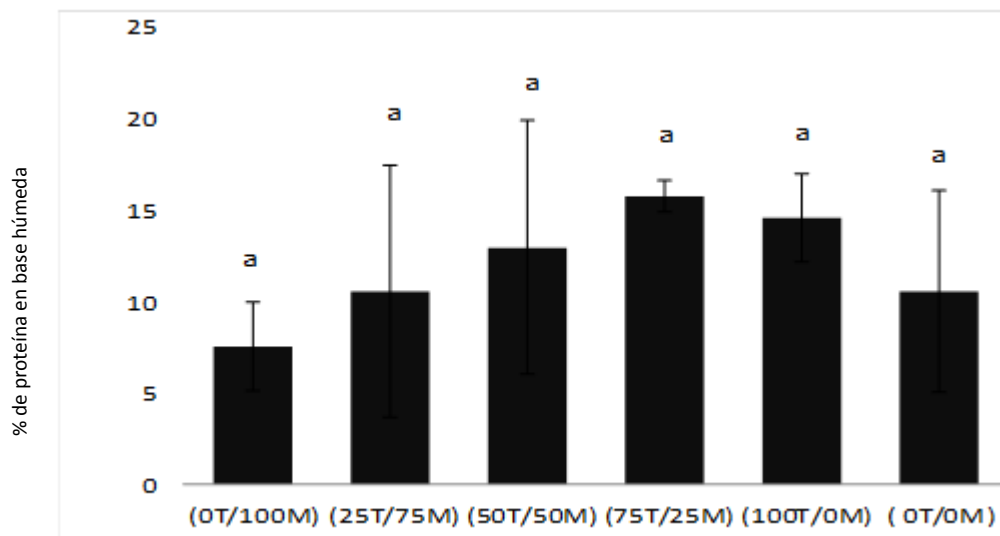


Figura 7.4. Efecto de la sustitución Tau/Met en dietas formuladas con base en proteína vegetal sobre el contenido de proteína en hígado de juveniles de trucha arcoiris del experimento 1, los valores son la media \pm la desviación estándar, letras diferentes indican diferencias significativas $p < 0.05$, $n = 3$ por tratamiento.

En el contenido de lípidos, tanto en músculo como en hígado, no se observó influencia de las dietas (0.05); lo que se pudo observar es una gran variabilidad entre los individuos (Figuras 7.5 y 7.6)

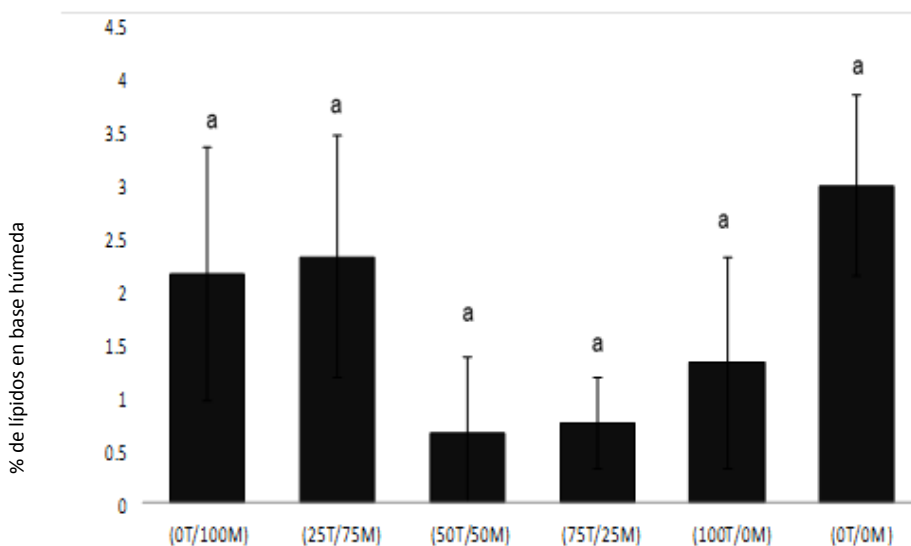


Figura 7.5. Efecto de la sustitución Tau/Met en dietas formuladas con base en proteína vegetal sobre el contenido de lípidos en músculo de juveniles de trucha arcoiris del experimento 1, los valores son la media \pm la desviación estándar, letras diferentes indican diferencias significativas $p < 0.05$, $n = 3$ por tratamiento

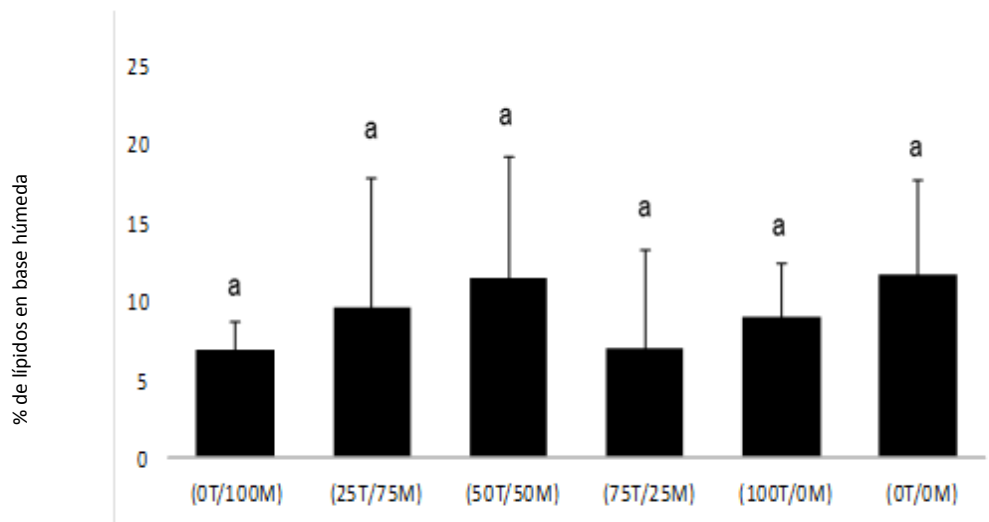


Figura 7.6. Efecto de la sustitución Tau/Met en dietas formuladas con base en proteína vegetal sobre el contenido de lípidos en hígado de juveniles de trucha arcoíris del experimento 1, los valores son la media \pm la desviación estándar, letras diferentes indican diferencias significativas $p < 0.05$, $n = 3$ por tratamiento

En el índice hepatosomático tampoco se observaron diferencias ($p < 0.05$) entre las dietas (Figura 7.7).

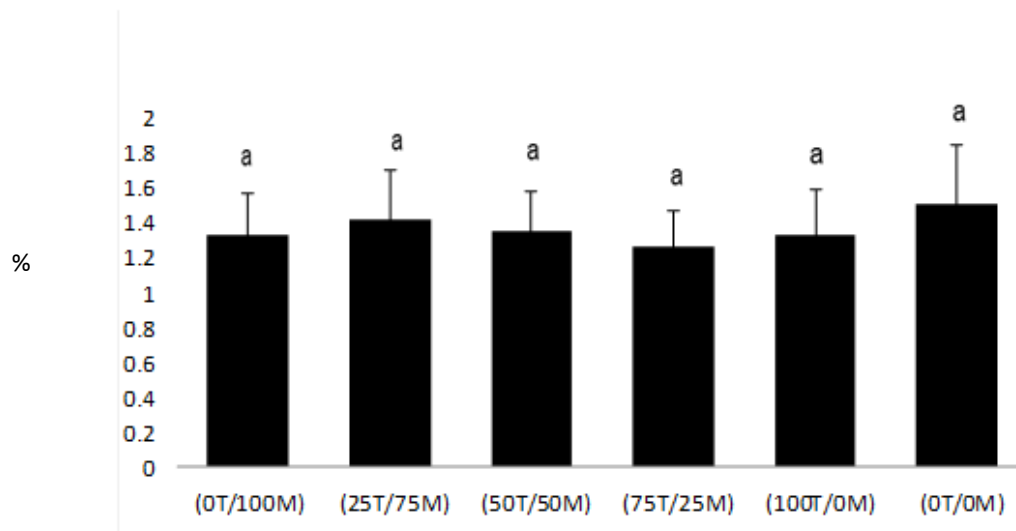


Figura 7.7. Efecto de la sustitución Tau/Met en dietas formuladas con base en proteína vegetal sobre el índice hepatosomático de juveniles de trucha arcoiris del experimento 1, los valores son la media \pm la desviación estándar, letras diferentes indican diferencias significativas $p < 0.05$, $n = 3$ por tratamiento

7.1.3 Respuesta inmune no específica

En la actividad de la lisozima en suero medida a los 0.5, 5 y 20 minutos, se observó una disminución ($p < 0.05$) de la dieta 75T/25M respecto a la dieta control y 0T/100M, obteniendo estas últimas los valores más altos (Figura 7.8).

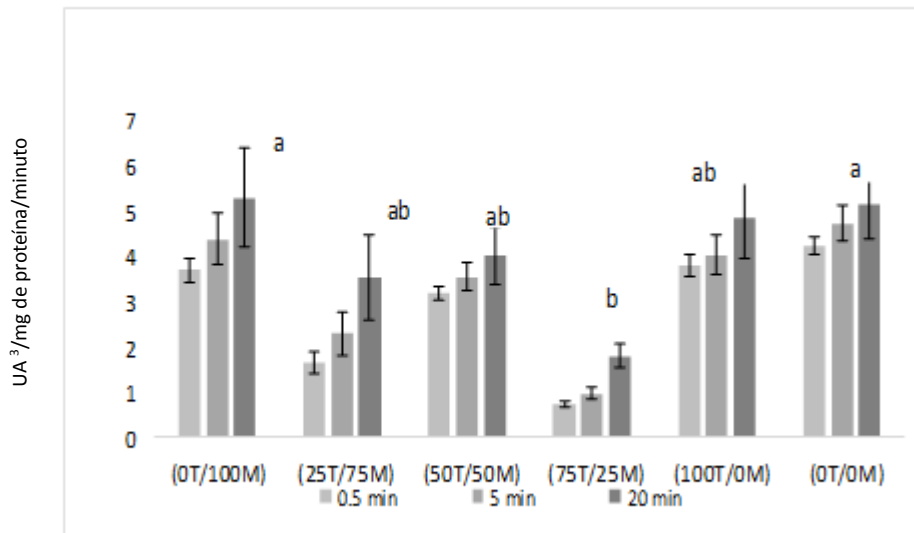


Figura 7.8. Efecto de la sustitución Tau/Met en dietas formuladas con base en proteína vegetal sobre la actividad de la lisozima, a los 0.5 minutos, a los 5 y 20 minutos, de las truchas del experimento 1, los valores son la media \pm la desviación estándar, letras diferentes indican diferencias significativas $p < 0.05$, $n = 3$ por tratamiento.

7.1.4 Digestibilidad aparente de la proteína (DAP)

En lo que respecta a la digestibilidad de la proteína de los juveniles de trucha arcoíris, no se encontraron diferencias entre las dietas ($P < 0.05$) (Figura 7.9).

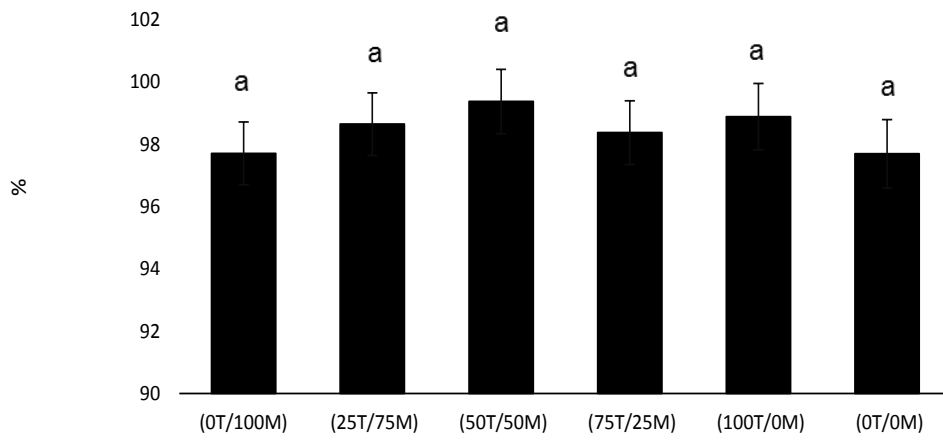


Figura 7.9. Efecto de la sustitución Tau/Met en dietas formuladas con base en proteína vegetal sobre la digestibilidad aparente de la proteína del experimento 1, letras diferentes indican diferencias significativas los valores son la media \pm la desviación estándar, $p < 0.05$, $n = 3$ por tratamiento.

7.2 Experimento 2

7.2.1 Crecimiento

Se observaron valores más altos ($P < 0.05$) en longitud final, peso final, ganancia de peso y TCE en la dieta 75T/25M respecto a las dietas 100T/0M y control. En ganancia de peso en porcentaje (GP%) y TCE también fueron superiores ($p < 0.05$) a la dieta 0T/100M y en la ganancia de peso en % la dieta, 75T/25M fue superior ($p < 0.05$) también a la dieta 25T/75M. En la longitud final la dieta 100T/0M fue significativamente inferior ($p < 0.05$) al resto (Cuadro 7.3).

Cuadro 7.3. Efecto de la sustitución Tau/Met en dietas formuladas con base en proteína vegetal sobre el crecimiento de juveniles de trucha arcoiris del experimento 2, los valores son la media \pm la desviación estándar

Suplementación	Longitud final cm	Peso inicial	Peso final	GP (g) ¹	GP% ²	TCE ³
Tau/Met 0T/100M	5.79 ^{ab} \pm 0.6	0.59 \pm 0.1	1.83 ^{ab} \pm 0.6	1.18 ^{ab} \pm 0.5	177.6 ^c \pm 54	0.6 ^c \pm 0.1
25T/75M	5.90 ^{ab} \pm 0.4	0.56 \pm 0.09	1.96 ^{ab} \pm 0.6	1.4 ^{ab} \pm 0.5	243.4 ^{bc} \pm 68	0.7 ^{bc} \pm 0.1
50T/50M	5.97 ^{ab} \pm 0.4	0.52 \pm 0.09	2.17 ^{ab} \pm 0.4	1.65 ^{ab} \pm 0.4	313.3 ^{ab} \pm 66	0.8 ^{ab} \pm 0.1
75T/25M	6.14 ^a \pm 0.4	0.53 \pm 0.06	2.43 ^a \pm 0.4	1.9 ^a \pm 0.4	358.5 ^a \pm 70	0.9 ^a \pm 0.1
100T/0M	5.01 ^c \pm 0.6	0.49 \pm 0.1	1.40 ^b \pm 0.4	0.91 ^b \pm 0.4	181.4 ^c \pm 54	0.6 ^c \pm 0.1
0T/0M	5.56 ^b \pm 0.5	0.46 \pm 0.1	1.54 ^b \pm 0.3	1.07 ^b \pm 0.3	231.6 ^{bc} \pm 51	0.7 ^{bc} \pm 0.09
AC ⁴	5.97 ^{ab} \pm 0.7	0.51 \pm 0.06	2 ^{ab} \pm 0.6	1.57 ^{ab} \pm 0.5	301.5 ^{ab} \pm 79	0.8 ^{ab} \pm 0.1

Letras diferentes indican diferencias significativas $p < 0.05$, $n = 2$ por tratamiento

¹GP =Ganancia de peso

²GP%=Ganancia de peso en porcentaje

³TCE=Tasa de crecimiento específico

⁴AC = alimento comercial.

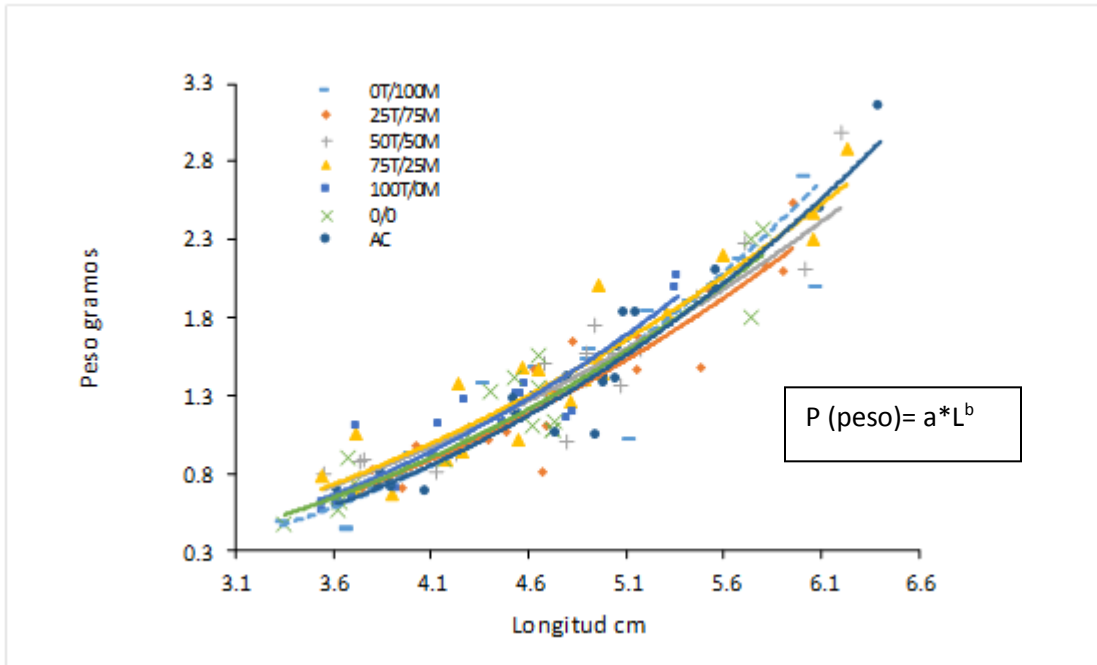
Con respecto a la sobrevivencia y condición corporal no se observó efecto ($p < 0.05$) alguno de las dietas (Cuadro 7.4).

Cuadro 7.4. Efecto de la sustitución Tau/Met en dietas formuladas con base en proteína vegetal sobre la condición corporal y supervivencia de los juveniles de trucha arcoiris del experimento 2, Los valores son la media \pm la desviación estándar

Suplementación	Condición corporal	Supervivencia %
Tau/Met 0T/100M	1.2 ^a \pm 0.06	97 ^a \pm 4.2
25T/75M	1.08 ^a \pm 0.09	98 ^a \pm 2.8
50T/50M	1.18 ^a \pm 0.07	95 ^a \pm 7
75T/25M	1.36 ^a \pm 0.25	100 ^a \pm 0
100T/0M	1.24 ^a \pm 0.07	100 ^a \pm 0
0T/0M	1.14 ^a \pm 0.13	100 ^a \pm 0
AC	1.18 ^a \pm 0.08	95 ^a \pm 7

Letras diferentes indican diferencias significativas $p < 0.05$, $n = 2$ por tratamiento

El comportamiento del crecimiento al igual que el experimento anterior fue alométrico negativo para las dietas 50T/50M y 75T/25M. Los valores R^2 oscilaron entre 0.92 y 0.84 (Figura 7.10).



Dieta	m (Intercepto)	b (Pendiente)	R ² (Coeficiente de determinación)	Tipo de crecimiento
OT/100M	0.014	2.89	0.87	Isométrico
25T/75M	0.026	2.48	0.85	Alométrico negativo
50T/50M	0.038	2.29	0.88	Alométrico negativo
75T/25M	0.035	2.35	0.86	Alométrico negativo
100T/0M	0.021	2.68	0.84	Isométrico
0T/0M	0.023	2.6	0.89	Isométrico
AC	0.017	2.77	0.92	Isométrico

Figura 7.10. Efecto de la sustitución Tau/Met en dietas formuladas con base en proteína vegetal sobre la relación longitud-peso de los juveniles de trucha arcoiris del experimento 2, tipo de crecimiento dado por la prueba $t = b - 3 / S_b$ con un $\alpha = 0.05$, donde $b =$ pendiente y $S_b =$ Error estándar de la pendiente.

7.2.2 Composición química corporal

En el contenido de proteína en músculo no se observó efecto ($p < 0.05$) de ninguna de las dietas. (Figura 7.11)

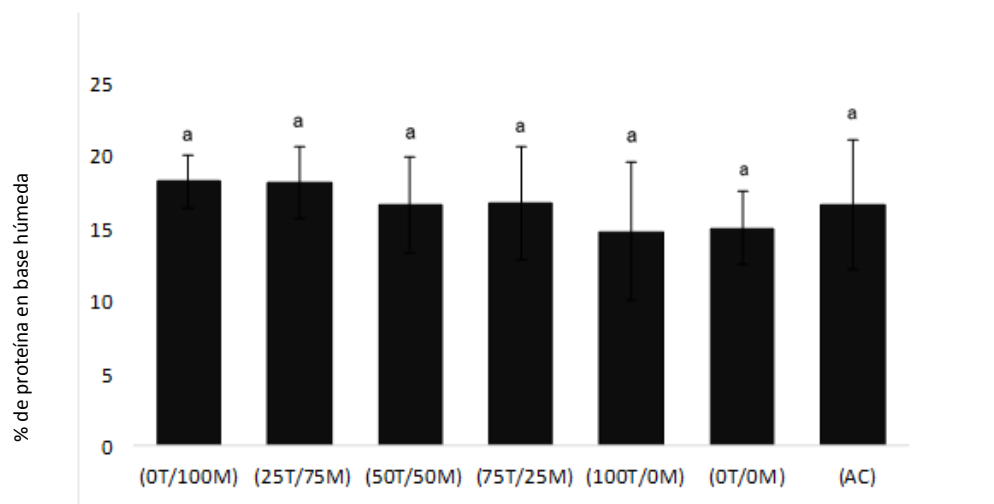


Figura 7.11. Efecto de la sustitución Tau/Met en dietas formuladas con base en proteína vegetal sobre el contenido de proteína en músculo de juveniles de trucha arcoiris del experimento 2, los valores son la media \pm la desviación estándar, letras diferentes indican diferencias significativas $p < 0.05$, $n = 2$ por tratamiento

En lo que respecta al contenido de lípidos en el músculo tampoco se observaron efectos de las dietas ($p < 0.05$) y de nuevo se observó una gran variabilidad entre los individuos (Figura 7.12).

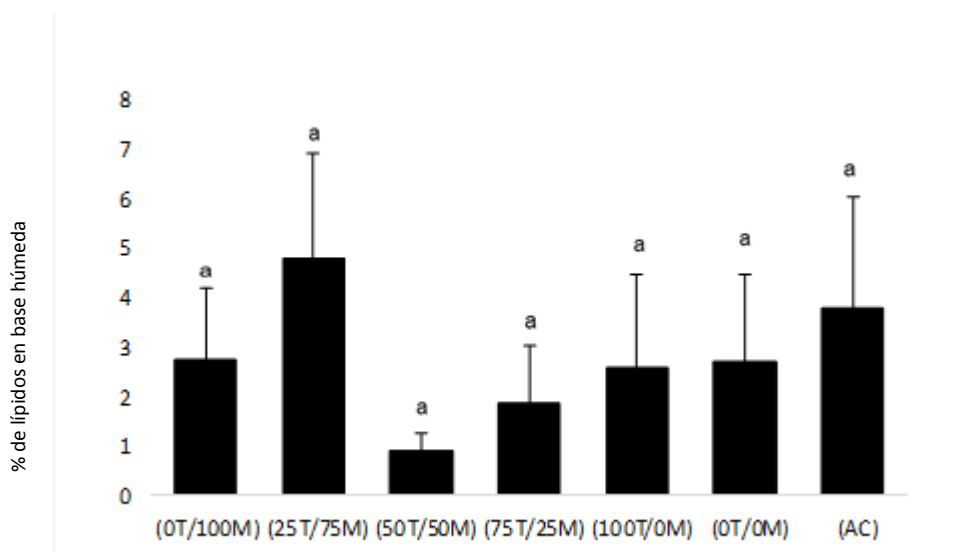


Figura 7.12. Efecto de la sustitución Tau/Met en dietas formuladas con base en proteína vegetal sobre el contenido de lípidos en músculo de los juveniles de truchas arcoiris del experimento 2, los valores es la media \pm la desviación estándar, letras diferentes indican diferencias significativas $p < 0.05$, $n = 2$ por tratamiento

En el contenido de proteína en hígado se observó una clara diferencia entre el alimento comercial AC y las dietas 0T/100M y 25T/75M donde los valores fueron significativamente mayores ($p < 0.05$) en las suplementaciones antes mencionadas (Figura 7.13).

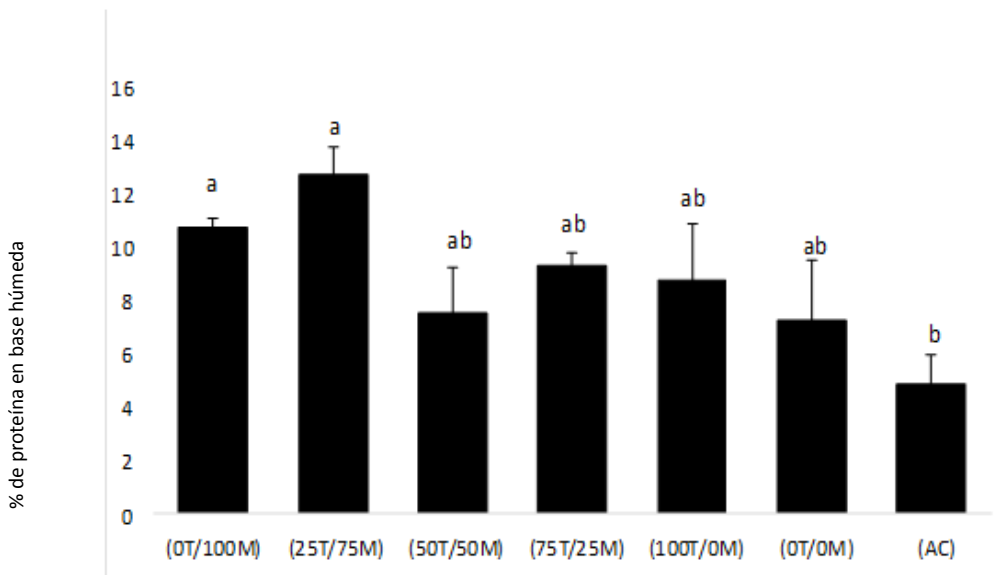


Figura 7.13. Efecto de la sustitución Tau/Met en dietas formuladas con base en proteína vegetal sobre el contenido de proteína en hígado de juveniles de trucha arcoíris del experimento 2, los valores es la media \pm la desviación estándar, letras diferentes indican diferencias significativas $p < 0.05$, $n = 2$ por tratamiento

Todas las suplementaciones generaron una menor ($P < 0.05$) deposición lipídica en el hígado respecto a la dieta control y al alimento comercial (Figura 7.14).

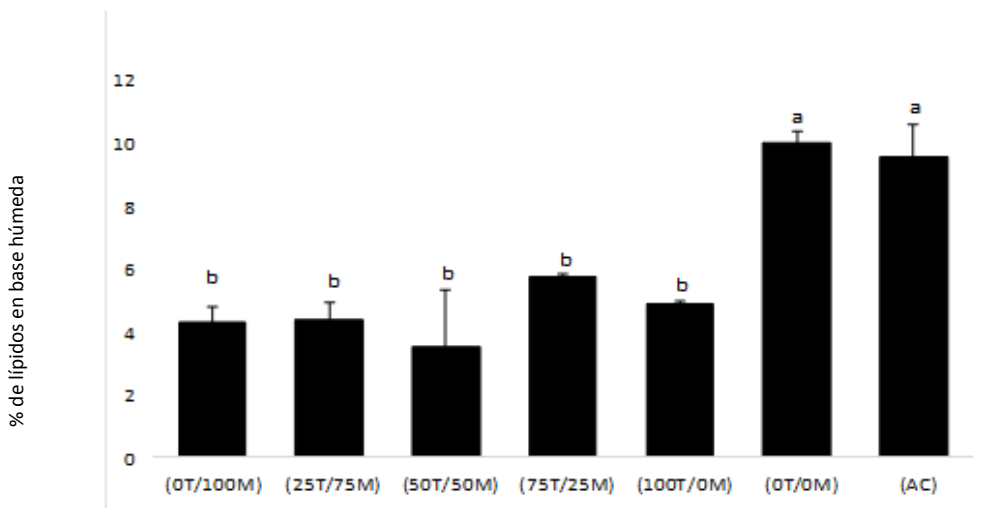


Figura 7.14. Efecto de la sustitución Tau/Met en dietas formuladas con base en proteína vegetal sobre el contenido de lípidos en hígado de juveniles de trucha arcoíris del experimento 2, los valores es la media \pm la desviación estándar, letras diferentes indican diferencias significativas $p < 0.05$, $n = 2$ por tratamiento.

Mediante un análisis de regresión hacia atrás se logró determinar que la inclusión de metionina y taurina en las dietas disminuye el contenido de lípidos en hígado (Figura 7.15).

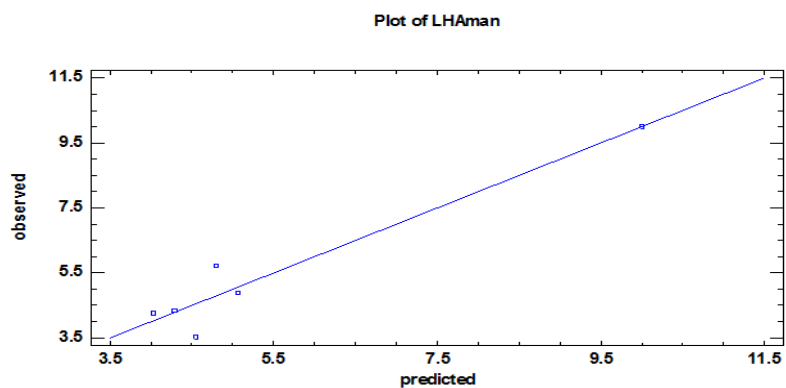


Figura 7.15. Gráfica de valores observados y valores calculados por la ecuación Lípidos en hígado= 10.0 - 5.98153*Metionina - 4.93677*Taurina ($R^2=92.74$), obtenida mediante una analisis de regresion hacia atrás de las variables independientes taurina y metionina

Índice hepatosomático

Respecto al índice hepatosomático al igual que el experimento anterior no se encontraron diferencias entre las dietas, pero al menos 4 de ellas fueron más bajas ($p<0.05$) que el alimento comercial AC (Figura 7.16).

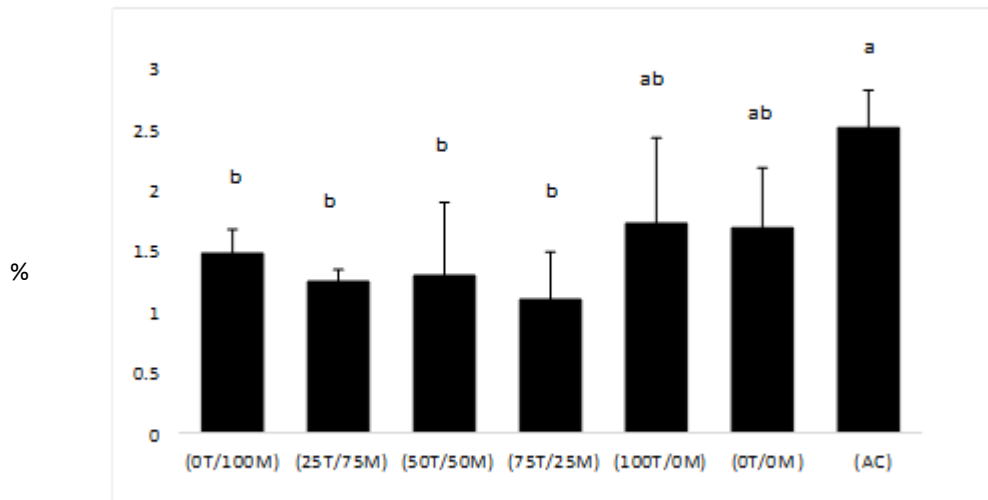


Figura 7.16. Efecto de la sustitución Tau/Met en dietas formuladas con base en proteína vegetal sobre el Índice hepatosomático de juveniles de trucha arcoiris del experimento 2, los valores es la media \pm la desviación estándar, letras diferentes indican diferencias significativas $p < 0.05$, $n = 2$ por tratamiento

7.2.3 Respuesta inmune no específica

En el estallido respiratorio de los macrófagos se observaron valores más altos ($p < 0.05$) en las dietas 50T/50M y 100T/0M respecto al resto de las dietas. Además la dieta 0T/100M generó una respuesta mayor a las dietas 25T/75M, 75T/25M y control, pero sin diferencias con el alimento comercial el cual obtuvo valores similares al resto de las dietas (Figura 7.17).

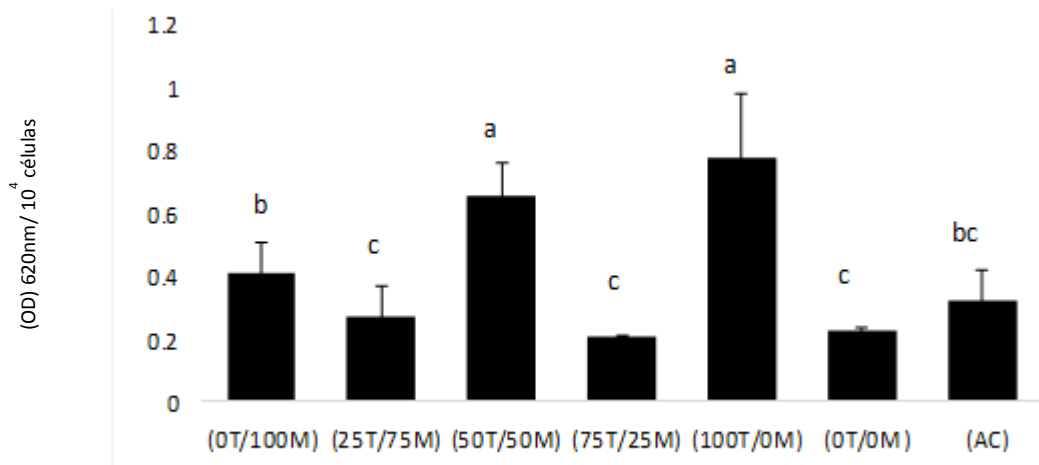


Figura 7.17. Efecto de la sustitución Tau/Met en dietas formuladas con base en proteína vegetal sobre el estallido respiratorio de los macrófagos (ERM) de juveniles de trucha arcoiris del experimento 2, los valores es la media \pm la desviación estándar, letras diferentes indican diferencias significativas $p < 0.05$, $n = 2$ por tratamiento

7.2.4 Capacidad antioxidante de los hepatocitos

Respecto a la capacidad antioxidante no se observaron diferencias entre las dietas experimentales ($P < 0.05$) y solo los valores de la dieta 75T/25M fueron similares estadísticamente a los de la dieta comercial, que obtuvo la capacidad antioxidante más elevada y que generó diferencias con el resto de las dietas (Figura 7.18). Aunque la dieta 75T/25M obtuvo una respuesta similar a la dieta comercial generó una respuesta más bien intermedia entre las dietas experimentales y la dieta control que no permite concluir si existe o no una superioridad de dicha dieta, ya que solo para la dieta 25T/75M la diferencia es significativa ($P < 0.05$).

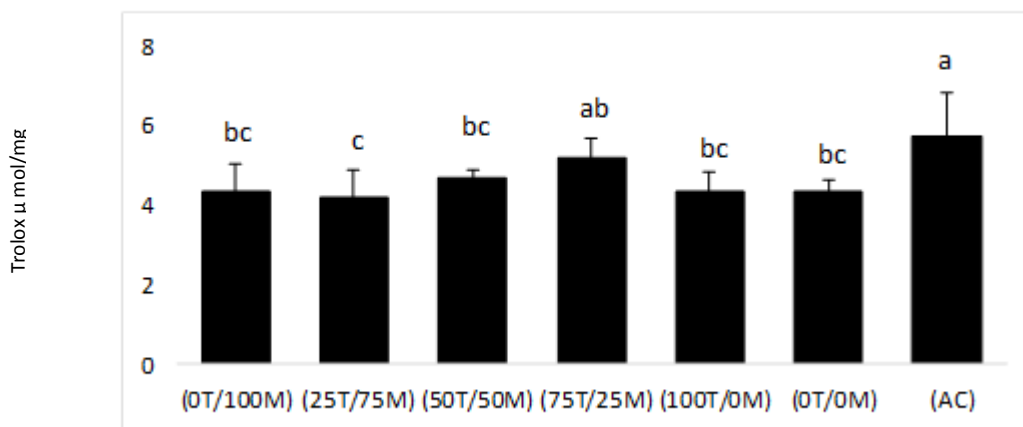


Figura 7.18. Efecto de la sustitución Tau/Met en dietas formuladas con base en proteína vegetal sobre la capacidad antioxidante de los hepatocitos de juveniles de trucha arcoiris del experimento 2, los valores es la media \pm la desviación estándar, letras diferentes indican diferencias significativas $p < 0.05$, $n = 2$ por tratamiento

7.2.5 Consumo de oxígeno y excreción de fósforo y nitrógeno

En cuanto al consumo de oxígeno no se observó ningún efecto ($p < 0.05$) de las dietas a las 12 y 24 horas después de alimentados los organismos (Figura 7.19).

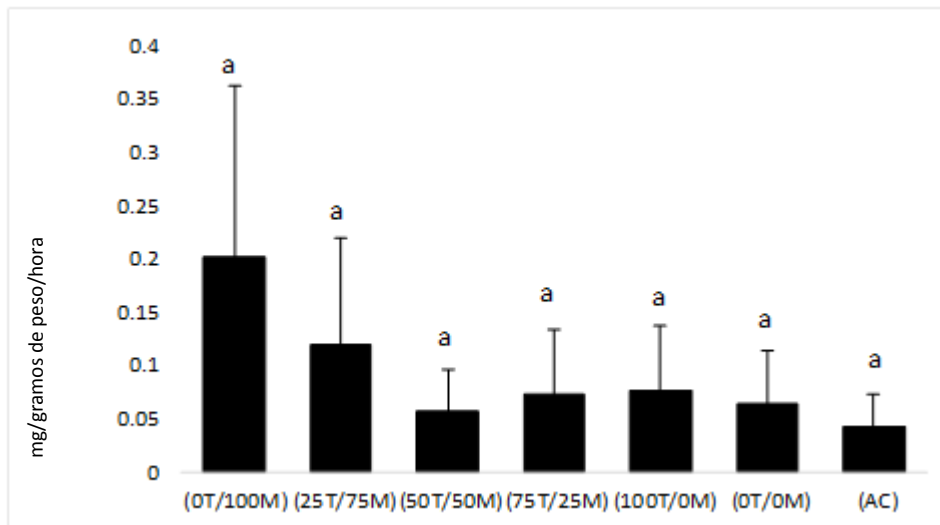


Figura 7.19. Efecto de la sustitución Tau/Met en dietas formuladas con base en proteína vegetal sobre consumo de oxígeno de juveniles de trucha arcoiris del experimento 2, los valores es la media \pm la desviación estándar de la diferencia de consumo 12 horas postpandrias y 24 horas postpandrias, letras diferentes indican diferencias significativas $p < 0.05$, $n = 2$ por tratamiento

No se encontró ninguna diferencia ($p < 0.05$) entre las dietas en lo que refiere a la excreción de NH_3 de los organismos a las 12 y 24 horas posteriores a la alimentación (Figura 7.20)

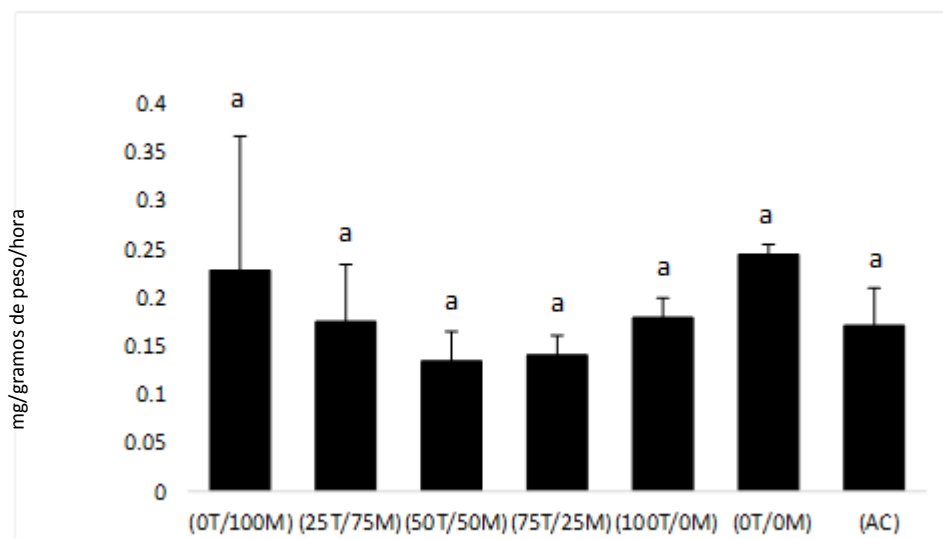


Figura 7.20. Efecto de la sustitución Tau/Met en dietas formuladas con base en proteína vegetal sobre la excreción de nitrógeno de juveniles de trucha arcoiris del experimento 2, los valores es la media \pm la desviación estándar de la diferencia de excreción 12 horas postpandrias y 24 horas postpandrias, letras diferentes indican diferencias significativas $p < 0.05$, $n = 2$ por tratamiento

En la excreción de fósforo 12 y 24 horas posteriores a la alimentación tampoco se encontró diferencia ($p < 0.05$) entre las dietas (Figura 7.21).

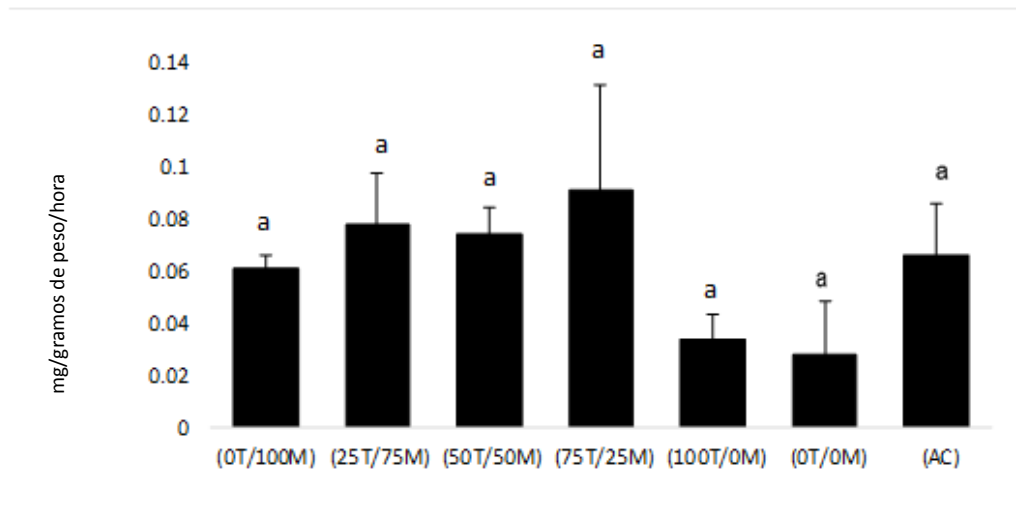


Figura 7.21. Efecto de la sustitución Tau/Met en dietas formuladas con base en proteína vegetal sobre la excreción de fósforo de juveniles de trucha arcoiris del experimento 2, los valores es la media \pm la desviación estándar de la diferencia de excreción 12 horas postpandrias y 24 horas postpandrias, letras diferentes indican diferencias significativas $p < 0.05$, $n = 2$ por tratamiento

8. DISCUSION

8.1 Experimento 1

8.1.1 Crecimiento

Los valores en ganancia de peso y longitud de las dietas 50T/50M y 75T/25M con respecto a la dieta control indican que estas combinaciones pueden generar un mayor desempeño productivo de las truchas alimentadas con APS (aislado de proteína de soya) y PS (polvo de espirulina), y que las otras dietas experimentales a pesar de contener una concentración adecuada de AA azufrados según los requerimientos de la especie (1.3% Anexo 9) pueden no ser tan disponibles generando un menor desempeño. Además del desconocimiento de la digestibilidad de aminoácidos azufrados en esta combinación de proteínas vegetales es importante mencionar su muy baja concentración de taurina, aminoácido al cual se le atribuyen diversos efectos benéficos sobre el crecimiento de los organismos acuáticos y en especial en truchas alimentadas con proteína vegetal (Gaylord et al., 2007). En el trabajo realizado por Gaylord et al. (2007) concluyen, que la taurina es el principal factor que mejora el crecimiento (medido como ganancia en peso) y que la suplementación de metionina no genera ningún beneficio e incluso perjudica el crecimiento y el consumo de alimento; en nuestro caso los datos contradicen de cierta forma estas afirmaciones, ya que aunque la concentración de taurina si se pudo relacionar con un aumento de la GP, no ocurrió lo mismo para la longitud la cual solo aumento con las combinaciones 50T/50M y 75T/25M. Diversos estudios han demostrado el efecto benéfico de concentraciones adecuadas de metionina sobre el crecimiento de trucha arcoíris, sin embargo, también existe información que indica que cuando se suministra una cantidad mayor de metionina a la requerida por la especie, comienza a disminuir la GP debido (entre otras teorías) a la utilización de ATP para el metabolismo de los compuestos azufrados (Daniel y Waisman, 1969); y desajustes en las reacciones de metilación en las que está involucrado dicho aminoácido (Benevenga, 1974), provocando una disminución en el crecimiento de los organismos. La reducción del crecimiento en el bagre (*Ictalurus punctatus*), que sucede después de rebasar el 1.75% de metionina en la dieta (Harding et al., 1977) se ha demostrado, que conlleva a la reducción no solo de la GP sino también de talla, ya que la disminución de GP también se ha relacionado con una baja en la deposición lipídica provocada por la metionina (Rodehutsord et al., 1993), la cual puede ser benéfica sobre todo si esta es en vísceras. En el presente estudio las dietas con mayor contenido de metionina (0T/100M y 25T/75M) no generaron cambios ni en la ganancia

de peso ni en la longitud, lo cual hace pensar que dicho umbral de tolerancia a la metionina no fue tocado por ninguna suplementación, sin embargo, dietas como las 50T/50M, 75T/25M y la suplementada únicamente con taurina (100T/0M) generaron mejor respuesta respecto a la dieta 0T/100M suplementada únicamente con metionina en longitud final y en la GP, lo cual indica que incluso la suplementación de 100T/0M es mejor para el crecimiento de esta especie en esta etapa. Respecto a la dieta control la suplementación 100T/0M solo fue capaz de generar respuesta en la ganancia en peso. Por qué las suplementaciones 75T/25M y 50T/50M fueron las únicas capaces de generar cambios en la longitud queda como interrogante, aunque, se podría relacionar a cambios en la producción de algunas hormonas como la IGF-1 y receptores de la GH que se ha demostrado pueden verse afectadas por las concentraciones de metionina (Rolland, 2014).

Mediante el análisis de regresión hacia atrás los resultados manifestaron correlación lineal entre la GP y la concentración de taurina, lo cual permite concluir que la taurina en esta etapa mejora la GP en organismos de 9.8 a 45 g, esta mejora en la ganancia de peso proporcionada por la taurina podría explicarse por su efecto en la producción de ácidos biliares y una mayor absorción de los lípidos dietarios, así como un posible efecto sobre la producción de insulina hormona con propiedades anabólicas sobre el organismo (L'Amoreaux et al., 2010).

Las regresiones de longitud y peso de las truchas en los distintos tratamientos permiten visualizar la condición de los organismos de una manera más fiel respecto al índice K, ya que este último supone un crecimiento isométrico que no es acorde al crecimiento registrado en el presente estudio los cuales fueron alométricos negativos en su mayoría. Las pendientes obtenidas en la regresión son las que determinan el tipo de crecimiento observado, la isometría genera una pendiente de valor 3 y valores por arriba o por debajo se consideran alométricos el sentido de estas (positivo o negativo) dependerá si el valor es mayor a 3 ó menor a 3. Mediante estas ecuaciones se puede calcular el factor de condición (Pennell y Barton, 1996), el cual será más elevado cuando la pendiente es mayor a 3. Como se mencionó anteriormente las curvas de las dietas 50T/50M y 75T/25M (las cuales fueron mencionadas anteriormente como las mejores suplementaciones) generaron pendientes por debajo de 3, por lo cual el crecimiento fue alométrico negativo, y mostraron valores similares a los reportado por Perdomo et al. (2013) en animales que fueron alimentados con dieta comercial. Basados en lo reportado por Barros y Gonzo (2006), el crecimiento en poblaciones naturales de trucha arcoíris es alométrico negativo y un comportamiento más isométrico podría estar reflejando probablemente un cebamiento de los

individuos que suele ser común en algunas épocas del año en poblaciones naturales o bajo ciertos regímenes alimenticios en cautiverio (Morales, 2004). Para este caso, la dieta es el factor que está determinando un crecimiento diferenciado de la longitud respecto al peso y la información que existe sobre este efecto es poca, sin embargo, se conocen casos similares de cambios generados en la condición corporal por hormonas como la GH (somatotropina), que a pesar de generar mejoras en la longitud y ganancia de peso, estas pueden disminuir el factor de condición, debido entre otras cosas, a la disminución lipídica en vísceras. Por lo cual una disminución en la condición corporal en el caso de estos organismos es consecuencia de un menor peso de las vísceras (Kling et al., 2011), esto podría también observarse (como es el caso de este estudio) en un aumento diferido de la longitud y el peso.

El índice K no mostro diferencias entre las dietas, sin embargo, este únicamente se calculó con la longitud y peso finales, a diferencia de la regresión que se obtuvo de los datos de todas las biometrías realizadas.

Respecto a la sobrevivencia y conversión alimenticia (CA), no se observaron diferencias entre las dietas, lo cual coincide con lo reportado por Gaylord et al. (2007), que no encontraron diferencias en el factor de conversión y la sobrevivencia de truchas alimentadas con dietas suplementadas con taurina y/o metionina. Respecto al consumo a diferencia de lo reportado por el autor anteriormente citado, no se observó disminución del consumo por la metionina.

8.1.2 Composición química corporal

La composición corporal es un aspecto que los estudios de requerimientos de aminoácidos a menudo no consideran, basando sus conclusiones únicamente en el crecimiento (medido como GP en muchos casos), sin embargo hay trabajos en diferentes especies que demuestran que hay diferencias entre los requerimientos para la máxima ganancia de peso y la máxima acreción proteica (Bureau y Encarnaçao, 2006), por lo cual, la composición del organismo cobra gran relevancia, ya que lo deseable es obtener un crecimiento magro. En este aspecto, se encontró un mayor contenido proteico en el músculo de los peces alimentados con la suplementación 100T/0M, lo cual coincide con otros trabajos que han demostrado que la suplementación de taurina puede producir efectos benéficos sobre la composición del músculo, por ejemplo, en el salmón del Atlántico se relaciona a la suplementación de taurina con un aumento en el contenido de AA esenciales en el músculo (Espe et al., 2012), también como reporta Gaylord (2007) el peso del

filete en trucha arcoiris se ve incrementado por la inclusión de taurina, Magalhanes et al. (2014), por su parte, reportaron un aumento en el contenido de proteína en el músculo del Rock bream (*Oplegnathus fasciatus*) con una suplementación del 1% de taurina. Es decir, hay un efecto anabólico de la taurina sobre el tejido muscular que aún no se ha podido elucidar. Algunas teorías sobre el efecto de la taurina en el balance del calcio intracelular y la importancia de este en la contractibilidad e hipertrofia del músculo, podrían estar relacionadas a este efecto (De Luca et al., 2001), además de esto, se ha demostrado en ratas, un aumento en las proteínas contráctiles musculares cuando es suplementado este aminoácido (Deanna, 2011). Otra explicación, podría ser, el efecto de la taurina sobre las células β -pancreáticas en la secreción de insulina, la cual recientemente se ha demostrado se encuentra relacionado a su función como modulador de las concentraciones de calcio (L'Amoreaux et al., 2010). El posible efecto de la taurina sobre la concentración plasmática de hormonas del crecimiento como la GH y la IGF 1, las cuales también pueden interferir en la síntesis de proteína muscular, no se pudo demostrar en el experimento realizado por Gaylord (2007), lo mismo ha ocurrido en otras especies como el goldfish (*Carassius auratus*) donde se demostró que la taurina no es capaz de generar variaciones en la secreción de GH (Trueadu et al., 2000).

En el contenido de lípidos en músculo y en hígado no se observó efecto de ninguna de las dietas (Figuras 7.5 y 7.6), sin embargo hay una gran influencia de la desviación de los datos en la disminución de las diferencias. Esta variabilidad podría explicarse, al igual que la ganancia de talla y de peso, por la competencia entre los individuos por el alimento; donde algunos consumían una mayor cantidad de alimento que el resto, favorecido entre otras cosas, por las características de pellet elaborado que no es muy homogéneo en su granulometría y que a menudo impide a los individuos más pequeños alimentarse. Algunos experimentos como el de Azaza et al. (2010) confirman el hecho de que la granulometría es un factor importante que influye en la heterogeneidad del crecimiento. Otro factor que pudo influir en la ausencia de diferencias entre los tratamientos, pudo ser, la etapa de desarrollo, ya que esta influye de forma importante sobre la composición del individuo, debido a los cambios en requerimientos de aminoácidos y energía.

El hígado es un órgano que puede sufrir grandes cambios en su composición debido a los nutrientes, y en ocasiones es tan notorio que puede reflejarse en su peso con respecto al peso total del individuo, esta relación se denomina índice hepatosomático. Para el caso de este estudio no existieron diferencias en dicho índice, similar a lo reportado por Gaylord et al. (2007) que

encontraron que la suplementación de taurina y/o metionina no generaba efecto alguno sobre el peso del hígado. El peso de este órgano en cambio, podría estar más influenciado por otros aspectos como la energía dietaria.

8.1.3 Respuesta inmune no específica

El sistema inmune es otro aspecto que puede verse influido por la dieta, y más aún en el caso de aminoácidos azufrados, ya que estos por si mismos o a través de sustancias derivadas pueden favorecer las respuestas del sistema inmune, sin embargo, el beneficio de esta mayor actividad podría depender de la forma como ejercen este efecto. La disminución en la actividad de la lisozima en suero, en la dieta 75T/25M, podría sugerir una disminución en la capacidad inmunológica de los organismos, debido a que la actividad de esta enzima por años se ha utilizado como indicador de la inmunidad no específica en peces teleósteos y otros organismos acuáticos (Saurab y Sahoo, 2008), sin embargo, se ha discutido también la relación existente entre la actividad de la lisozima en suero y el estrés, por lo que una respuesta alta en la actividad de la lisozima no siempre es un indicador de una mayor inmunocompetencia; ya que puede indicar también una mayor susceptibilidad al estrés por parte del organismo (Demers y Bayne, 1997). Por tal motivo, el efecto en específico de la dieta 75T/25M sobre la disminución de la inmunocompetencia solo podría evaluarse midiendo otras respuestas plasmáticas como: el nivel de glucosa, el cortisol, el conteo celular de leucocitos y citosinas inflamatorias, que proporcionaría una idea más clara de su estado fisiológico e inmunológico. Otro inconveniente que se suscita, es la poca información que existe sobre la actividad de la lisozima en truchas sanas, ya que al conocer estos parámetros se podría evidenciar si se trata de una reducción en dicha actividad o en realidad se trata de una estimulación menor. Varios estudios, sobre todo en carpa, han asociado a la taurina con una mayor actividad de la lisozima (Qiu Xiao et al., 2008), y también, se ha asociado a la taurina con un aumento de células inmunitarias en otras especies. En el caso de este trabajo, al menos en lo que concierne a la actividad de la lisozima, no se pudo demostrar; sin embargo, cabe aclarar que los efectos de la mezcla de aminoácidos sobre la concentración de taurina y otros compuestos azufrados en el plasma y células inmunitarias no fueron evaluados.

8.1.4 Digestibilidad aparente de la proteína

Existen estudios que han puesto de manifiesto, la influencia de la taurina sobre la actividad de algunas enzimas pancreáticas en larvas de peces marinos (Guillaume et al., 2012), lo cual podría

afectar a la digestibilidad de los nutrientes y el aprovechamiento de estos, sin embargo, en la presente investigación las suplementaciones no generaron diferencias en la digestibilidad de la proteína, debido a que probablemente la actividad de las proteasas pancreáticas no es modificada por la taurina en juveniles de trucha.

8.2 Discusión experimento 2

8.2.1 Crecimiento.

En el caso de este experimento es importante mencionar que las condiciones ambientales y las tallas de los organismos fueron distintas, ya que estas pueden influir en el aprovechamiento de los nutrientes, por lo cual, observamos respuestas muy diferentes a las mismas suplementaciones. La dieta 75T/25M se corroboró como la mejor suplementación, sin embargo, para el caso de la dieta 100T/0M se notó una marcada diferencia con el experimento anterior, siendo esta la de menor longitud de todas, incluso demostrando un comportamiento semejante a la toxicidad; un reporte similar fue hecho por Page et al. (1978), quienes suministraron una dieta purificada con un contenido de metionina adecuado a los requerimientos (0.8 y 1% de la dieta) y encontraron una reducción en el crecimiento además del desarrollo de cataratas, sin embargo, para el caso del presente estudio, la fuente proteica fue de origen vegetal; y trabajos como el de Gaylord et al. (2007) en el que suplementaron taurina en proteínas de origen vegetal contradicen este hecho. Hay investigaciones que muestran interacciones de la taurina dietaria con un mineral de mucha importancia biológica para el crecimiento y la capacidad antioxidante: el Zinc, demostrando que este elemento interacciona de forma negativa con la taurina en el tracto digestivo (Glover y Hogstrand, 2001), según estos investigadores la taurina en ciertas concentraciones (100 μmol) es capaz de disminuir el pasaje del Zinc a los compartimientos post-intestinales; esta disminución del pasaje podría generar una disminución en la concentración del Zinc en el organismo, cuyo principal signo de deficiencia es la disminución del crecimiento y la posterior formación de cataratas (Ketola, 1979). En el presente estudio no se observó la formación de cataratas, pero la reducción del crecimiento podría estar asociada a ese problema, ya que, en los organismos que padecen esta deficiencia, es la longitud la que se ve afectada (enanismo). La diferencia en respuesta a la misma suplementación en ambos experimentos podría ser atribuible a las concentraciones de Zinc en el medio acuático, las cuales podrían compensar las deficiencias generadas por la taurina dietaria, estas concentraciones podrían ser muy diferentes en Amanalco de Becerra y Tlalnepantla de Baz,

municipios mexiquenses donde se realizaron las pruebas de alimentación. La dieta con mayor contenido de metionina en el segundo experimento también tuvo un comportamiento diferente al del anterior experimento, ya que en esta prueba de alimentación, con organismos más pequeños, la dieta 0T/100M no generó diferencias con la dieta 75T/25M ni en longitud ni en peso final, sin embargo, aunque más discretas, se observaron diferencias en la TCE y la ganancia de peso en %, Índices que indican el aumento de masa diario y total de la biomasa, los cuales pueden ser muy fiables, debido a que las raciones en animales acuáticos no se suministran de manera individual.

En cuanto a la sobrevivencia y conversión alimenticia (CA), no se observaron diferencias entre las dietas, lo cual coincide con lo observado en el experimento anterior y lo reportado por Gaylord et al. (2007)

Respecto a la relación longitud-peso, de nueva cuenta, las dietas 50T/50M y 75T/25M obtuvieron los valores de pendiente más bajos, dichos valores estuvieron por abajo de los reportados por la bibliografía (Barros y Gonzo, 2006), sin embargo, hay que destacar la diferencia en las edades así como las condiciones medioambientales que pudieron influir de manera determinante el tipo de crecimiento.

8.2.2 Composición química corporal

Al contrario del anterior experimento, la dieta 100T/0M no aumento el contenido de proteína en el músculo (Figura 7.11), de igual forma que el crecimiento, la respuesta de los organismos a la suplementación fue totalmente diferente, es importante mencionar que quizá la taurina pudo ser excretada en exceso, debido a que como mencionan Hsu y Anthony (1970) algunos elementos como el Zinc condicionan la fijación de la taurina a la membrana plasmática, impidiéndole cuando existe un déficit, realizar algunas funciones biológicas, sin embargo, esto no se puede comprobar y queda como interrogante (si esta podría ser una posible explicación), ya que no se midió la excreción de dicho aminoácido, ni las concentraciones de Zinc en el organismo. Respecto al contenido de lípidos en músculo, se pueden ver valores más bajos en las dietas 50T/50M y 75T/25M, que debido a la variación no fueron significativos (Figura 7.12).

En la composición de hígado, se observaron diferencias con el anterior experimento encontrando una menor deposición de lípidos en todas las suplementaciones, así como un mayor porcentaje de proteína en las dietas con mayor contenido de metionina, esto únicamente respecto al alimento comercial, el cual obtuvo el valor más bajo. La influencia de la metionina sobre la composición de

la trucha ya se había reportado en otros trabajos, donde la inclusión de metionina aumentaba la proporción de proteína y disminuía la de lípidos en todo el cuerpo del pez (Rodehutschord et al., 1993), en el caso de la taurina, se conoce también cierto efecto lipotrópico sobre el hígado de ratas. Para el caso de este estudio, el efecto de las suplementaciones fue principalmente sobre los lípidos hepáticos, ya que el contenido de proteína en hígado fue igual en todas las dietas experimentales

Mediante el análisis de regresión hacia atrás se logró determinar que la inclusión de metionina y taurina en las dietas disminuye el contenido de lípidos en hígado (Figura 7.15), lo cual se podría asociar, en el caso de la metionina, a su papel como compuesto donante de grupos metilo, que facilita la movilización de lípidos. Para el caso de la taurina, su papel sobre la disminución de lípidos hepáticos no es del todo clara, aunque hay evidencias de la importancia de la taurina para el funcionamiento de la acil CoA deshidrogenasa enzima clave de la lipogénesis y la lipólisis (Svend et al., 2010)

Respecto al Índice hepatosomático, no se observaron diferencias entre las dietas experimentales, similar a lo observado en el anterior experimento y a lo reportado por (Gaylord et al., 2007). El aumento del IHS en la dieta comercial respecto a las dietas 0T/100M, 25T/75M, 50T/50M y 75T/25M, pudo deberse entre otras cosas, a un mayor contenido energético en esta dieta.

8.2.3 Respuesta inmune no específica.

En el estallido respiratorio de los macrófagos (ERM), observamos aumentos muy notorios de algunas suplementaciones (0T/100M, 50T/50M y 100T/0M), las respuestas tan distintas entre las dietas pueden estar relacionadas al efecto de ambos aminoácidos sobre los compuestos azufrados en plasma como el glutatión (Seres et al., 2000); homocisteína (Boldyrev, 2010) y cisteína que influyen sobre la actividad oxidativa de los fagocitos, ya que como han evidenciado algunos autores (Gaylord et al., 2007 y Magalhaes et al., 2014), distintas suplementaciones de taurina y metionina pueden generar diferencias en las concentraciones de aminoácidos azufrados en organismos acuáticos. En humanos se sabe que la taurina aumenta la capacidad de los fagocitos de realizar el ERM (Massella y Mazza, 2009), sin embargo en el presente trabajo, el aumento de taurina fue siempre a costa de la metionina, lo cual puede generar cambios en otros compuestos azufrados que influyen en la actividad de los macrófagos. Las células fagocíticas, al ser

principalmente captadoras, pueden resultar muy sensibles a las concentraciones de compuestos azufrados en plasma, los cuales a su vez, dependen de la captación y de la capacidad de acumulación de dichos compuestos por otros tejidos, de tal suerte que, podría no observarse una clara asociación entre el crecimiento somático y la mayor actividad de las células fagocíticas. Es necesario entonces, discutir la actividad principal de los compuestos azufrados sobre el ERM, donde, la importancia radica en la capacidad antioxidante de los mismos, en este contexto, los compuestos con grupos tiol (SH) son los más reactivos y por consiguiente se pensaría son mejores antioxidantes, ejemplos de estos son: la cisteína, el glutatión y la homocisteína, los cuales tienen un grupo SH, el cual puede reaccionar con peróxidos o iones metálicos; sin embargo, estos presentan bajo ciertas circunstancias, una actividad pro oxidante y en algunos casos pueden favorecer la liberación de citocinas inflamatorias, lo cual genera estragos a la salud de los organismos. Un caso muy notable es el de la homocisteína, la cual puede favorecer la actividad de los macrófagos; pero a la vez puede generar aumento de interleucinas, generando daño a diversos tejidos (Zeng et al., 2004). Por el contrario la taurina que también favorece el ERM, actúa de una forma menos nociva, generando cloroaminas estables que tienen actividad bactericida pero que son inocuas para las células, la formación de estos compuestos elimina el efecto oxidativo de los hipocloritos (generados por la mieloperoxidasa) y además modula diferentes sustancias inflamatorias (Chorazy et al., 2004). Debido a esto el incremento en el ERM asociado a una elevación de la taurina plasmática podría ser más deseable.

8.2.4 Capacidad antioxidante de los hepatocitos.

La capacidad antioxidante de los hepatocitos es un aspecto importante en cuanto a composición y crecimiento se trata, ya que en este órgano se sintetizan una gran cantidad de compuestos útiles para diversos tejidos, los cuales al verse comprometida la integridad hepática (por ejemplo por estrés oxidativo), pueden comprometer el funcionamiento de todo el organismo. Existen trabajos en distintas especies marinas y dulceacuícolas (Qiu Xiao et al., 2008 y Bañuelos et al., 2014) que demuestran el efecto antioxidante de la taurina, aunque cabe aclarar que no se utilizaron los mismos métodos ni los mismos tejidos, en el presente estudio, la respuesta de la capacidad antioxidante de los hepatocitos generó dudas; sobre si la suplementación de taurina por si misma mejora la actividad antioxidante, ya que ninguna suplementación fue capaz de generar un aumento respecto a la dieta control. La taurina, como algunos trabajos en salmónidos lo demuestran (Espe et al., 2008, Page 1978; Yokoyama y Nakazoe, 1992 y Boonyoung et al., 2012), es

un aminoácido que estos pueden generar sin problemas, y su importancia en la supervivencia de los hepatocitos solo se ha demostrado en cultivos celulares (Espe y Holen 2012). La dieta comercial, al contrario de las suplementaciones, si generó una respuesta significativamente mayor a la dieta control. La explicación del aumento de la dieta comercial en la capacidad antioxidante respecto al resto de las dietas; podría ser por el hecho de que en la industria se utilizan muchos conservantes sintéticos o naturales que pueden influir en la capacidad antioxidante de los organismos.

8.2.5 Consumo de O₂ y excreción de PO₄ y NH₃.

El consumo de oxígeno, 12 horas y 24 horas después después de recibir alimento proporciona una idea del coste energético que genera la utilización de los nutrientes contenidos en un alimento, por tal motivo, al no encontrar diferencias entre las dietas y el alimento comercial se podría pensar que el coste energético para la utilización de los nutrientes podría ser igual o muy similar (Figura 7.19), a pesar de que el contenido más alto de la metionina en las dietas suplementadas podría significar un aumento en el consumo de energía, debido entre otras cosas, a la dependencia de ATP para el catabolismo de este aminoácido. Sin embargo, hay que mencionar que factores como la temperatura ambiental y el trabajo físico influyen de forma significativa en el consumo de oxígeno y en algunos casos podría enmascarar estos efectos. Otro aspecto importante a considerar es la manipulación de los organismos previa a la entrada a los recipientes, donde se llevó a cabo la prueba, lo cual pudo generar la gran variabilidad observada. También la variabilidad observada, pudo deberse al consumo de alimento, el cual puede ser muy distinto entre individuos.

En cuanto a la excreción de nitrógeno, su relación es mucho más directa con el metabolismo de compuestos nitrogenados, especialmente aminoácidos, los cuales sufren procesos de desaminación para poder ser utilizados como fuente de energía por el organismo, en este sentido, tanto la cantidad como la calidad de la proteína (entiéndase por esta como valor biológico) influyen de forma decisiva sobre dicha excreción (Romarheim et al., 2006). En este rubro, no se encontraron diferencias entre las dietas (Figura 7.20), lo cual podría indicar, que la suplementación con el 1% de aminoácidos azufrados no genera cambios importantes en la utilización de aminoácidos como fuente energética en esta especie, lo cual podría asociarse a una proteína de buena calidad y alta digestibilidad, así como una buena relación entre proteína y energía, ya que todos estos aspectos pueden influir de forma significativa sobre la excreción de NH₃. Al respecto

Bae et al. (2011) realizaron un estudio en donde suministraron mediante una sonda diferentes concentraciones de metionina, de 0.25% hasta 0.95%, con una concentración fija de cisteína de 0.5%, midiendo a las 5 hrs y 24 hrs el amonio presente en plasma, y detectaron una elevación cuando la concentración de metionina excedía el 0.6% a las 5hrs después de ser sondeados. La diferencia en el tiempo en que se realizaron las mediciones entre el estudio de Bae y el presente; las diferencias de consumo entre individuos así como las condiciones fisicoquímicas del agua, pudieron disimular las diferencias en la excreción entre las suplementaciones de la presente investigación.

Hay un efecto de los aminoácidos azufrados y la acidificación del plasma sanguíneo sobre la pérdida de calcio por orina en ratas (Whiting y Draper, 1981), lo cual pone de manifiesto la pérdida urinaria de minerales asociados al control de pH plasmático. El fósforo es un mineral que puede sufrir cambios en su concentración ante un descenso del pH, sin embargo, no se han reportado pérdidas de este mineral asociadas al aumento de AA azufrados en la dieta; al igual que lo observado en el presente trabajo, donde ninguna de las suplementaciones mostro algún efecto sobre la excreción de fósforo en los organismos (Figura 7.21). Lo que si se observó al igual que en el consumo de oxígeno y excreción de nitrógeno, fue una amplia variabilidad de los datos, que pudo estar influenciada por el estrés de la manipulación o las diferencias de consumo entre los individuos.

9. CONCLUSIONES.

- 1) La suplementación 0.75% taurina/ 0.25% metionina tiene un efecto positivo sobre el crecimiento de juveniles de trucha arcoíris alimentadas con un 100 % de proteína vegetal (APS y PS) independientemente de la talla y el ambiente.
- 2) La suplementación de taurina y metionina disminuye el contenido de lípidos hepáticos en truchas de 3.61 cm a 6 cm de longitud. La suplementación de 1% taurina aumenta el contenido de proteína en músculo en truchas de 8.9 cm a 15 cm de longitud.
- 3) Las suplementaciones 1% taurina, 1% metionina y 0.5% taurina/0.5% metionina mejoran la respuesta inmune no específica evaluada como el ERM en juveniles de trucha arcoiris. La suplementación 0.75% taurina/0.25% metionina tiene un efecto negativo sobre la respuesta inmune no específica medida como la actividad de la lisozima sérica en juveniles de trucha arcoiris.
- 4) La suplementación de taurina y metionina no generan efecto sobre: el factor de condición K, la conversión alimenticia, la digestibilidad aparente de la proteína, el contenido de lípidos en músculo, el contenido de proteína en hígado, el índice hepatosomático, el consumo de oxígeno y excreciones de fósforo y nitrógeno.
- 5) Estos experimentos fueron afectados por la talla de los peces y el ambiente, como hace evidente la respuesta diferida de los organismos a algunas suplementaciones.

10. LISTADO DE ABREVIATURAS.

AA: Aminoácidos

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

ANDEVA: Análisis de Varianza

APS: Aislado de Proteína de Soya

ATP: Trifosfato de Adenosina

CBS: Cistationina Beta Sintasa

CDA: Coeficiente de la Digestibilidad Aparente

CSAD: Ácido Sulfinico Descarboxilasa

DE: Desviación Estándar

DMG: Dimetil Glicina

EB: Energía Bruta

ELISA: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

ERM: Estallido Respiratorio de los Macrófagos

FES: Facultad de Estudios Superiores

GABA: Ácido Gama Amino butírico

GE: Gross Energy

GH: Hormona del Crecimiento (Growth Hormone)

GNMT: Glicina N Metiltransferasa

GP: Ganancia de Peso

HP: Harina de Pescado

IGF1: Insulin-like Growth Factor 1

IHS: Índice Hepatosomático

MAT: Metionina Adenosil transferasa

MJ: Mega Joules

MTHFR: Metileno Tetrahidrofolato Reductasa

NBT: Nitroblue Tetrazolium

NRC: National Research Council

OD: Optic Density

PB: Proteína Bruta

PEMT: Fosfatidil Etanolamina N Metiltransferasa

PS: Polvo de Spirulina

SAM: S-Adenosil Metionina

SP: Spirulina Powder

SPI: Soy Protein Isolate

SV: Supervivencia

TCE: Tasa de Crecimiento Específico

THF: Tetrahidrofolato

11. REFERENCIAS.

- A.O.A.C., 1995. Association of Official Analytical Chemists, Official methods of analysis. 16th edition, AOAC, Arlington, VA. 1832pp.
- AHMADZADE-NIA Y., NAZER A.D.L. K., GHAEMMAGHAMI S., HEJAZI M., HASSANPOUR S., CHAICHISEMSARI M., RIYAZI S., 2011. Effect of replacing different levels of Soybean meal with *Spirulina* on performance in Rainbow Trout. *Ann. Biol. Res.*, 3, 374-379.
- ANDERSON C.M., HOWARD A., WALTERS J.R., GANAPATHY V., THWAITES D.T., 2009. Taurine uptake across the human intestinal brush-border membrane is via two transporters: H⁺-coupled PAT1 (SLC36A1) and Na⁺- and Cl⁻-dependent TauT (SLC6A6). *J. Physiol.*, 15, 731-44.
- ANTHONY W. L., WOOSLEY R. L., HSU J. M. 1971. Urinary excretion of radiosulfur following S35-aurine injection in Zinc deficient rats. *hoc. Soc. Exp. Biol. Med.* 138,989-92
- ATMACA GULIZAR, 2004. Antioxidant Effects of Sulfur-Containing Amino Acids. *Yonsei. Med. J.*, 45,776-788
- AZAZA M.S., DHRAIEF M.N., KRAIEM M.M., BARAS E., 2010. Influences of food particle size on growth, size heterogeneity, food intake and gastric evacuation in juvenile Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *L. Aquaculture.*, 309, 193–202
- BAE J. Y., IM-HO O.K., LEE S., SILAS S. O. HUNG, TAE SUN MIN Y SUNGCHUL C. BAI., 2011. Re-evaluation of Dietary Methionine Requirement by Plasma Methionine and Ammonia Concentrations in Surgically Modified Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.*, 24, 974 – 981
- BAKER, D.H. 1977. Sulfur in nonruminant nutrition. National Feed Ingredients Association, West Des Moines, Iowa, USA., 1-123.
- BALOCCO C., BOGÉ G., ROCHE H., 1993. Neutral amino acid transport by marine fish intestine: role of the side chain. *J. Comp. Psychol.*, 163, 340-347
- BANERJEE R. Y ZOU C. G. 2005. Redox regulation and reaction mechanisms of human cystathionine beta-synthase: a PLP-dependent hemosensor protein. *Arch. Biochem. Biophys.*, 433,144–56.
- BAÑUELOS-VARGAS I., LÓPEZ L. M., PÉREZ-JIMÉNEZ A., PERES H., 2014. Effect of fishmeal replacement by soy protein concentrate with taurine supplementation on hepatic intermediary

metabolism and antioxidant status of totoaba juveniles (*Totoaba macdonaldi*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 170, 18–25

BARROS S.E. Y DE. GONZO G.M., 2006. Poblaciones naturalizadas de truchas arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) en la Puna de Argentina: bases ecológicas para su manejo. Museo de Ciencias Naturales- Universidad Nacional de Salta- Mendoza 2 (4400)

BARROWS F. T., STONE D. A. J., HARDY R. W., 2007. The effects of extrusion conditions on the nutritional value of soybean meal for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture.*, 265, 244-252

BARROWS F.T., GAYLORD T.G., STONE D.A.J., SMITH C.E., 2007. Effect of protein source and nutrient density on growth efficiency, histology, and plasma amino acid concentration of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss Walbaum*). *Aquacult. Res.*, 38, 1747-1758.

BENEVENGA N.J., 1974. Toxicities of methionine and other amino acids, *J. Agr. Food Chem.*, 22, 2-9.

BLIGH E.G. Y DYER W.J., 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.*, 37,911-917

BODE B. P., 2001. Recent molecular advances in mammalian glutamine transport. *J. Nutr.*, 131, 2475–2485

BOLDYREV A., 2010. Molecular mechanisms of homocysteine toxicity and possible protection against hyperhomocysteinemia, *Recent Advances on Nutrition and the Prevention of Alzheimer's Disease.*, 127-143

BOONYOUNG S., HAGA Y., SATOH S., 2012. Preliminary study on effects of methionine hydroxyl analog and taurine supplementation in a soy protein concentrate-based diet on the biological performance and amino acid composition of rainbow trout [*Oncorhynchus mykiss* (Walbaum)]. *Aquacult. Res.*, 44, 1337-1349

BROER A., KLINGEL K., KOWALCZUK S., RASKO J.E., CAVANAUGH J., BROER S., 2004. Molecular cloning of mouse amino acid transport system B₀, a neutral amino acid transporter related to Hartnup disorder. *J. Biol. Chem.*, 279, 24467–24476

BRÖER S., 2002. Adaptation of plasma membrane amino acid transport mechanisms to physiological demands. *Pflugers. Arch.*, 444, 457–466

BRÖER S., 2008. Amino Acid Transport Across Mammalian Intestinal and Renal Epithelia. *Physiol. Rev.*, 88, 249-286

- BROSNAR J. T. Y BROSNAN M. E., 2005. The Sulfur-Containing Amino Acids: An Overview. *J. Nutr.* 136, 1636S–1640
- BUREAU D. P. Y ENCARNAÇÃO P. M., 2006. Adequately Defining the Amino Acid Requirements of Fish: The case example of lysine. *Avances en Nutrición Acuícola VIII. VIII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola.*, 29-54
- CABRERO C., PUERTA J., ALEMANY S., 1987. Purification and comparison of two forms of S-adenosyl L-methionine synthases from rat liver. *Eur. J. Biochem.*, 170, 299–304
- CAÑAS D. P., 2002. Rol biológico y nutricional de la taurina y sus derivados, *Rev. Chil. Nutr.*, 29, 286-292
- CARNEIRO E. M., LATORRACA M. Q., ARAUJO E., BELTRA M., OLIVERAS M. J., NAVARRO M., BERNA G., BEDOYA F. J., VELLOSO L. A., SORIA B., MARTIN F., 2009. Taurine supplementation modulates glucose homeostasis and islet function. *J. Nutr. Biochem.*, 20, 503-11.
- CHORAŻY-MASSALSKA M., KONTNY E., KORNATKA A., RELL-BAKALARSKA M., MARCINKIEWICZ J., MAŚLIŃSKI W., 2004. The effect of taurine chloramine on pro-inflammatory cytokine production by peripheral blood mononuclear cells isolated from rheumatoid arthritis and osteoarthritis patients. *Clin. Exp. Rheumatol.*, 22, 692–698
- CHRISTENSEN H. N., 1990. Role of amino acid transport and countertransport in nutrition and metabolism. *Physiol. Rev.*, 70, 43–77
- CLESCERI, L. S., A. E. GREENBERG Y EATON. A. E. 1998. Standard methods for the examination of water and wastewater. 20th. American Public Health Association. Washington, D.C., U.S.A. 1325 pp.
- CONAPESCA, 2009. Anuario Estadístico de Acuicultura y Pesca 2009, 300 p.
- COWEY COLIN B., YOUNG CHO C., JACOB G., WEERHEIM JUDY A., STUART DARRIN D., 1992. Methionine Intake in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*), Relationship to Cataract Formation and the Metabolism of Methionine. *J. Nutr.*, 122, 1154-1163
- DANIEL. R.G. Y WAISMAN H.A., 1969. Adaption of the weanling rat to diets containing excess methionine. *J. Nutr.*, 99,299-306
- DANIELS K.M. Y STIPANUK M.H., 1982. The effect of dietary cysteine level on cysteine metabolism in rats. *J. Nutr.*, 2, 2130-2141.
- DE LA ROSA J. Y STIPANUK M.H., 1985. Evidence for a rate-limiting role of cysteinesulfinate decarboxylase activity in taurine biosynthesis in vivo. *Comp. Biochem. Physiol.*, 81, 565-571.

DE LUCA A., PIERNO S., LIANTONIO A., CETRONE M., CAMERINO C., SIMONETTI S., PAPADIA F., CAMERINO D. C., 2001. Alteration of excitation-contraction coupling mechanism in extensor digitorum longus muscle fibres of dystrophic mdx mouse and potential efficacy of taurine. *Br. J. Pharmacol.*, 132, 1047-54.

DEANNA H. M., 2011. The effect of taurine on dystrophic muscle tissue function. Tesis, School of Biomedical and Health Sciences, Victoria University, Australia., 222pp.

DEMERS NORA E. Y BAYNE CHRISTOPHER J., 1997. The immediate effects of stress on hormones and plasma lysozyme in rainbow trout. *Dev. Comp. Immunol.*, 21, 363-373

EL-SAYED A. M., 2013. Is dietary taurine supplementation beneficial for farmed fish and shrimp? a comprehensive review. *Rev. Aquacult.*, 5, 1–15

EL-SAYED A.M., 1994. Evaluation of soybean meal, *Spirulina* meal and chicken offal meal as protein sources for silver sea bream (*Rhabdosargus sarba*) fingerlings. *Aquaculture.*, 127,169-176

ESPE A. M. Y ELISABETH HOLEN, 2012. Taurine attenuates apoptosis in primary liver cells isolated from Atlantic salmon (*Salmo salar*) 2012. *Br. J. Nutr.*, 110, 20-28

ESPE A. M., ERNST M. H., BJØRN L., ANDREAS L., ADEL EL-MOWAFIC, 2008. Methionine intake affect hepatic sulphur metabolism in Atlantic salmon *Salmo salar*. *Aquaculture.*, 247, 132-141

ESPE A. M., KARI RUOHONEN, ADEL EL-MOWAFI., 2012. Effect of taurine supplementation on the metabolism and body lipid-to-protein ratio in juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquacult. Res.*, 43, 349-360

FAO 1980. Training Course in Fish Feed Technology, held at the College of Fisheries. University of Washington, U.S.A., 395pp.

FAO 2014. Sistema de Información sobre Alimentos y Recursos Fertilizantes para la Acuicultura, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome (2014).

FERNANDES I., HAMPSON G., CAHOURS X., 1997. Abnormal sulfate metabolism in vitamin D-deficient rats. *J. Clin. Invest.*, 100, 2196-2203

FIERRO CASTRO M. C., 2009. Utilización de líneas celulares de *Oncorhynchus mykiss* para el estudio de la acción y para la selección de agentes inmunoestimulantes utilizables en acuicultura. Facultad de ciencias biológicas y ambientales, Universidad de León, España., 235pp.

FINKELSTEIN J. D., 2001. Regulation of homocysteine metabolism. In: Carmel R, Jacobsen DW, editors. Homocysteine in health and disease. Cambridge: Cambridge University Press., 2001, 92–99.

FINKELSTEIN J.D. Y MARTIN J.J., 1986. Methionine metabolism in mammals: adaptation to methionine excess. *J. Biol. Chem.*, 261,1582-1587

Food and Agriculture Organization (FAO), 2004. El estado mundial de la pesca y la acuicultura. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome., 182pp.

FREDLUND K., ISAKSSON M., ROSSANDER-HULTHÉN L., ALMGREN A., SANDBERG A.S., 2006. Absorption of Zinc and retention of calcium: dose-dependent inhibition by phytate. *J. Trace. Elem. Med. Biol.*, 20, 49-57

GAYLORD T. GIBSON, BARROWS FREDERIC T., TEAGUE APRIL M., JOHANSEN KATHERINE A., OVERTURF KEN E., SHEPHERD BRIAN, 2007. Supplementation of taurine and methionine to all-plant protein diets for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture.*, 269, 514–524

GLOVER CHRIS N. Y HOGSTRAND CHRISTER, 2001. Amino acid modulation of in vivo intestinal Zinc absorption in freshwater rainbow trout. *J Exp Biol.*, 205, 151–158

GREENPEACE MEXICO 2010. Lista roja de pescados y mariscos. www.greenpeace.org.mx

GROPPER S. S., SMITH. J. L., 2009. Advanced Nutrition and Human Metabolism. Wadsworth, Australia., 608pp.

GUILLAUME SALZE, EWEN MCLEAN, STEVEN R. CRAIG, 2012. Dietary taurine enhances growth and digestive enzyme activities in larval coho. *Aquaculture.*, 362-363

HARDING D.E., ALLEN O.W., WILSON R.P., 1977. Sulfur amino acid requirement of channel catfish: L-methionine and L-cystine. *J. Nutr.*, 107, 2031-2035.

HAYES K C Y STURMAN 1981 TAURINE IN METABOLISM, 1981. *Ann. Rev. Nutr.*, 1, 401-410

HEINONEN K., 1975. Effects of hypothyroidism and thyroxine substitution on the metabolism of L-methionine, L-cystathionine and taurine in developing rat brain. *Acta. Endocrinol.*, 80, 487-500

HENRY ERIC C., 2012. The use of algae in fish feeds as alternatives to fishmeal. *International Aqua Feed.*, 10-13.

HSU J. M. Y ANTHONY W. L., 1970. Zinc Deficiency and Urinary Excretion of Taurine-³⁵S and Inorganic Sulfate-³⁵S Following Cystine-³⁵S Injection in Rats. *jn.nutrition.org.*, 100, 1189-1196

HYDE R., TAYLOR P. M., HUNDAL. H. S., 2003. Amino acid transporters: roles in amino acid sensing and signaling in animal cells. *Biochem. J.*, 373, 1–18

- JACOBSEN J. G. Y SMITH L. H., 1968. Biochemistry and physiology of taurine and taurine derivatives. *Physiol. Revs.*, 48,424-5 1 1
- KETOLA GEORGE H., 1982. Amino acid nutrition of fishes: Requirements and supplementation of diets. *Comp. Biochem. Physiol.*, 73, 17-24
- KETOLA H. GEORGE, 1979. Influence of Dietary Zinc on Cataracts in Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*). *jn.nutrition.org.*, 109, 965-969
- KIM, K.I., KAYES, T.B. y AMUNDSON. C.H. 1984. Protein and arginine requirements of rainbow trout., *Fed. Proc.*, (abstract). 43, 3338.
- KIM. K.I., KAYES T.B., AMUNDSON C.H., 1992. Requirement for sulfur amino acids and utilization of D-methionine by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture.*, 101, 95-103.
- KLING P., JÖN SON E., NILSEN T., EINARSDOTTIR I. E., RØNNESTAD I., STEFANSSON S.O., BJÖRNSSON B. T., 2011. The role of growth hormone in growth, lipid homeostasis, energy utilization and partitioning in rainbow trout: Interactions with leptin, ghrelin and insulin-like growth factor I. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 175, 153–162
- KRISHEN J., RANA S. S., MOHAMMAD R. H., 2009. Impact of rising feed ingredient prices on aqua feeds and aquaculture production. *FAO fisheries and aquaculture technical paper.*, No. 541. Rome, 63pp.
- L'AMOREAUX W. J., CUTTITTA C., SANTORA ALLISON., BLAIZE J. F., TACHJADI J., EL IDRISSE A., 2010. Taurine regulates insulin release from pancreatic beta cell lines. *J. Biomed. Sci.*, 17(1), 11
- LAIDLAW S.A., SHULTZ T.D., CECCHINO J.T., 1988. Plasma and urine taurine levels in vegans. *Am. J. Clin. Nutr.*, 47, 660–663.
- LIU H., LI H.W., XU Y.J., SHI X.G., ZHU Z.C., 2006. Effects of taurine on growth and nutritional value of carps. *J. Food. Sci. Technol.*, 2008-2006
- LOWRY O.H., ROSEBROUGH W.J., FARR A.L., RANDALL R.J., 1951. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193,265-275.
- MAGALHAES FERREIRA FERNANDO, HYEONHO YUN, YOUNGJIN PARK, GUNHYUN PARK, SERA CHOI, SUNGCHUL C BAI., 2014. Effects of Taurine Supplementation on the Growth Performance of Juvenile Rock Bream *Oplegnathus fasciatus*. *Fish. Aquat. Sci.*, 17, 255-261
- MANTOVANI, J., DEVIVO, D. C. 1979. Effects of taurine on seizures and growth hormone release in epileptic patients. *Arch. Neurol.*, 35, 672-674
- MARKOVICH D., FORGO J., STANGE G., BIBER J., MURER H., 1993. Expression cloning of rat renal Na⁺/SO₄ cotransport. *Proc Nat Acad Sci USA.*, 90, 8073-8077

MARTINOV M.V., VITVITSKY V.M., MOSHAROV E.V., BANERJEE R., ATAULLAKHANOV F.I., 2000. A substrate switch. A new mode of regulation in the methionine metabolic pathway. *J. Theor. Biol.*, 204, 521–532.

MASELLA ROBERTA, MAZZA GIUSEPPE., 2009. *Glutathione and Sulfur Amino Acids in Human Health and Disease*. John Wiley & Sons, USA., 528pp.

MÉDALE F., BOUJARD T., VALLÉE F., BLANC D., MAMBRINI M., ROEM A., KAUSHIK S. J., 1998. Voluntary feed intake, nitrogen and phosphorus losses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed increasing dietary levels of soy protein concentrate. *Aquat. Living. Resour.*, 11, 239-246.

MÉTAYER-COUSTARD S., MAMERI H., SEILIEZ I., CROCHET S., CRÉPIEUX P., MERCIER Y., GERAERT P.A., TESSERAUD S., 2010. Methionine deprivation regulates the S6K1 pathway and protein synthesis in avian QM7 myoblasts without activating the GCN2/eIF2 alpha cascade. *J. Nutr.*, 140, 1539-45

MONCADA P. LUIS FERNANDO., 2000. Puntos de control en la fabricación de alimentos balanceados para acuicultura. *Avances en Nutrición Acuícola III UNAL.*, 543-555

MORALES A. GABRIELA 2004, Crecimiento y eficiencia alimentaria de la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) en jaulas bajo diferentes regímenes alimenticios. Tesis, Facultad de agronomía, Universidad de Buenos Aires, Argentina., 51pp.

MOSHAROV E., CRAWFORD M.R., BANERJEE R., 2000. The quantitatively important relationship between homocysteine metabolism and glutathione synthesis by the transulfuration pathway and its regulation by redox changes. *Biochem.*, 39, 13005–11.

MURER H., MARKOVICH D., BIBER J., 1994. Renal and small intestinal sodium-dependent symporters of phosphate and sulphate. *J. Exp. Biol.*, 196, 167-181

NASREEN M. ABDULRAHMAN, 2014. Evaluation of *Spirulina* spp. as food supplement and its effect on growth performance of common carp fingerlings. *Inter. J. Fish. Aqua. St.*, 2, 89-92

NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC), 2011. *Nutrient Requirements of Fish and Shrimp*. National Academy Press, Washington DC, USA., 376pp.

OBEID R., 2013. The metabolic burden of methyl group deficiency, with focus on the betainehomocysteine methyltransferase (BHMT) pathway. *Nutrient (Special Issue on Folate)*, 5, 3481-95.

OGAWA H., 1996. Effect of dietary taurine on lipid metabolism in normocholesterolemic and hypercholesterolemic stroke-prone spontaneously hypersensitive rats. *Adv. Exp. Biol.*, 403, 107-

15

- PAGE J. W., 1978. Dietary sulfur requirements of fish: Nutritional and pathological criteria. Tesis, Cornell University, USA., 136pp.
- PALACIN M., ESTEVEZ R., BERTRAN J., ZORZANO A., 1998. Molecular biology of mammalian plasma membrane amino acid transporters. *Physiol. Rev.* 78, 969–1054
- PARK E., QUINN M.R., WRIGHT C.E., SCHULLER-LEVIS G. 1993. Taurine chloramine inhibits the synthesis of nitric oxide and the release of tumor necrosis factor in activated RAW 264.7 cells. *J. Leukoc. Biol.*, 54, 119–24.
- PARK S. H., LEE H., PARK T., 2004. Cortisol and IGF-1 synergistically up-regulate taurine transport by the rat skeletal muscle cell line. *L6. Bio. factors.*, 21 (1-4), 403-6.
- PEISKER M., 2001. Manufacturing of soy protein concentrate for animal nutrition. In : Bru fau J. (ed.), *Feed manufacturing in the Mediterranean region. Improving safety: From feed to food.* Zaragoza., 54, 103-107
- PENNELL W. & MCLEAN W., 1996. Early rearing. In: *Principles of Salmonid Culture* (eds W. Pennell & B.A. Barton). *Dev. Aquacult. Fish. Sci.*, 29, 365–465
- PERDOMO DANIEL ANTONIO, CASTELLANOS KATIUSKA JOSEFINA, GONZÁLEZ-ESTOPIÑÁN MARIO, PEREA-GANCHOU FERNANDO., 2013. Efecto de la estrategia alimenticia en el desempeño productivo de la trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*). *Rev. Sci.*, 23, 341 - 349
- QIU XIAO-CONG, ZHAO HONG-XUE, WANG YUAN-J, BAI WEN-XIAN., 2008. Effect of taurine on the non-specific immunity and antioxidative competence of carp. *Shanghai. Fish. Univ. J.*, 4, 429-434
- RANA S.K. Y SANDERS., 1986. Taurine concentrations in the diet, plasma, urine and breast milk of vegans compared with omnivores. *TAB. Br. J. Nutr.*, 56, 17–27.
- RHODES M., ROSSI W., HANSON J.R., T., 2011. Taurine: Critical Supplement For Marine Fish Feed. *Global aquaculture alliance.*, 34-35
- RODEHUTSCORD MARKUS, JACOBS STEPHAN, MICHAEL PACK, ERHST PFEFFER., 1993. Response of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Growing from 50 to 150 g to Supplements of DL Methionine in a Semipurified Diet Containing Low or High Levels of Cystine. *Jn. Nutrition. Org.*, 125, 964-969
- ROLLAND MARINE, SKOV PETER VILHELM, DALSGAARD ANNE, JOHANNE TANG., 2014. Effects of dietary methionine on feed utilization, plasma amino acid profiles and gene expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Charlottenlund : Technical University of Denmark. National Institute of Aquatic Resources., 159pp.

ROMARHEIM O. H., SKREDE A., GAO Y., KROGDAHL A., DENSTADLI V., LILLENG E., STOREBAKKEN T., 2006. Comparison of White flakes and toasted soybean meal partly replacing fish meal as protein source in extruded feed for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). University Guelph. Aquaculture., 354-364

RUMSEY, G.L. 1978. Recent advances in nutrition of salmonids. Salmonid. 2(3),17-26.

RURNSEY G.L., PAGE J.W., SCOTT M.L., 1983. Methionine and cysteine requirements of rainbow trout. Prog. Fish-Cult., 45, 139-143.

RYAN N. D. Y DAVID H. B. 2008. Excess Dietary L-Cysteine Causes Lethal Metabolic Acidosis in Chicks., J. Nutr. 138, 1628–1633.

SATOH S., 1987. Availability to rainbow trout of Zinc in white fishmeal and of various Zinc compounds. Nippon. Suisan. Gakk., 53,595–599

SAURABH SHAILESH Y SAHOO P. K., 2008. Lysozyme: an important defence molecule of fish innate immune system. Aquacult. Res., 39 (3), 223–239

SCHAFFER S.W., JONG C.J., RAMILA K.C., AZUMA J., 2010. Physiological roles of taurine in heart and muscle. J. Biomed. Sci., 24, 17-20.

SCOTT LISA A., 1998. Essential Amino Acid Requirements of Atlantic Salmon (*Salmo salar*) Reared in Sea Water, with Emphasis on Histidine and Methionine. Tesis, Dalhousie University ,Canada., 128pp.

SCOTT SNYDER G. A., GAYLORD T. GIBSON, BARROWS FREDERIC T., KENNETH OVERTURF , CAIN KENNETH, HILL RODNEY A., HARDY RONALD W., 2012. Effects of carnosine supplementation to an all plant protein diet for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture., 338-341

SECOMBES C.J., 1990. Isolation of salmonid macrophages and analysis of their killing activity, En Techniques in fish Immunology. Estolen, J.S., Fletcher, T.C., Anderson, D.P., Robertson, B.S. y Van Muiswinkel W.B. (Eds). SOS Publications USA., 137-154.

SERES TAMAS, KNICKELBEIN ROY G., WARSHAW JOSEPH B., JOHNSTON RICHARD B., 2000. The Phagocytosis-Associated Respiratory Burst in Human Monocytes Is Associated with Increased Uptake of Glutathione. J. Immunol., 165, 3333-3340.

SHILS M. Y OLSON R. Nutrición en salud y enfermedad. 9ª edición. México, ed. Mc Graw Hill. Vol. II, 2002, 1598 pp.

SILVE CAROLINE, 2000. Tubular handling and regulation of sulphate. Nephrol. Dial. Transplant., 15, 34-35

SLIGER S. J., CHO C. Y., HOLUB B. J., 1997. Effect of water temperature on protein and fat requirements of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Nutr. Conf. Feed., 1-5

SORIANO-GARCÍA JUAN F., TORRAS-LLORT MONICA, FERRER RUTH AND MORETO MIQUEL, 1998. Multiple pathways for methionine transport in brush-border membrane vesicles from chicken. *Jejun. Physiol.J.*, 509, 527—539

STEEL, R. D. G. Y. TORRIE. J. H 1980. Principles and procedures of statistics, a biometrical approach. McGraw-Hill, New York, New York, USA.

STORELLI C. y VERRI T., 2008. Nutrient Transport in Fish: Studies with Membrane Vesicles. Coastal and Estuarine Studies Aquaculture: Fundamental and Applied Research., 139pp.

STURMAN J.A., 1978. Vitamin B6 and the metabolism of sulfur amino acids. In Human vitamin B6 requirements, Washington DC: Natl. Acad. Sci., 341-371.

SURESH SHASTRY Y LEIGHTON R JAMES, 2009. Homocysteine-induced macrophage inflammatory protein-2 production by glomerular mesangial cells is mediated by PI3 Kinase and p38 MAPK. *Inflamm. J.*, 6, 1-10

SVEND HØIME HANSEN, MOGENS LARSEN ANDERSEN, CLAUS CORNETT, ROBERT GRADINARU, NIELS GRUNNET., 2010, A role for taurine in mitochondrial function: Review. *Biomed. Sci. J.*, 17, 23

TACON A.G., 1992. Nutritional fish pathology. Morphological signs of nutrient deficiency and toxicity in farmed fish. FAO Fisheries Technical Paper, Rome., 75pp.

TACON, A.G.J., HAASTER, J.V., FEATHERSTONE, P.B., KERR, K., JACKSON, A.J., 1983. Studies on the utilization of full-fat soybean and solvent extracted soybean meal in a complete diet for rainbow trout., *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 49, 1437-1443.

TRUDEAU1 V. L., KAH O., CHANG J. P., SLOLEY B. D., DUBOURG P., FRASER E. J., PETER R. E., 2000. The inhibitory effects of g-aminobutyric acid (GABA) on growth hormone secretion in the goldfish are modulated by sex steroids. *Exp Biol. J.*, 203, 1477—1485

TSUBOYAMA-KASAOKA N., SHOZAWA C., SANO K., KAMEI Y., KASAOKA S., HOSOKAWA Y., EZAKI O., 2006. Taurine (2-aminoethanesulfonic acid) deficiency creates a vicious circle promoting obesity. *Endocrin.*, 147, 3276-3284.

UCHIDA S., NAKANISHI T., KWON H.M., PRESTON A.S., HANDLER J. S., 1991. Taurine behaves as an osmolyte in Madin-Darby canine kidney cells. Protection by polarized, regulated transport of taurine., *J. Clin. Invest.*, 88, 656—662

- VITVITSKY V., MOSHASOV E., TRITT M., ATAULLAKHANOV F., BANERJEE R., 2003. Redox regulation of homocysteine-dependent glutathione synthesis. *Redox. Rep.*, 8, 57–63.
- WALTON. M.J., COWEY C.B., ADRON J.W., 1982. Methionine metabolism in rainbow trout fed diets of differing methionine and cystine content. *J. Nutr.*, 1 12, 1525-1 535.
- WHITING SUSAN J. Y DRAPER ANDH. H., 1981, Effect of a Chronic Acid Load as Sulfate or Sulfur Amino Acids on Bone Metabolism in Adult Rats. *J. Nutr.*, 3, 1721-1726
- YOKOYAMA M Y NAKAZOE J-I., 1992. Accumulation and excretion of taurine in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed diets supplemented with methionine, cystine and taurine. *Biochem. Physiol. J.*, 102, 565–568.
- YUEMING DERSJANT-LI, 2002. The Use of Soy Protein in Aqua feeds. *Avances en Nutrición Acuícola VI, Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola.*, 541-558
- YUEXING ZHANG, MARGARETH ØVERLAND, KARL D. SHEARER, METTE SØRENSEN, LIV TORUNN MYDLAND, TROND STOREBAKKEN, 2012. Optimizing plant protein combinations in fish meal-free diets for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by a mixture model. *J. Aquaculture.*, 360-361, 25-36
- ZEMBRON-LACNY AGNIESZKA, OSTAPIUK JOANNA, SZYSZKA KAZIMIERZ., 2009. Effects of Sulphur-Containing Compounds on Plasma Redox Status in Muscle-Damaging Exercise. *Chin. J. Physiol.*, 52, 289-294,
- ZENG X.K., REMICK D.G., WANG X., 2004. Homocysteine induces production of monocyte chemoattractant protein-1 and interleukin-8 in cultured human whole blood. *Acta. Pharmacol. Sin.*, 25, 1419-1425

12. ANEXOS

Anexo 1.

Determinación del porcentaje de cromo en heces.

1. Se pesan 0.05 g de heces secas (con cromo) y se coloca en un matraz de bola.
2. Se agregan 5ml de ácido nítrico 84382 Sigma-Aldrich y se calienta con un mechero en una campana de extracción.
3. Se calienta hasta que se eliminen todos los vapores ocre y el líquido se vuelva verde traslucido después de esto se espera a que se enfríe.
4. Se agregan 3 ml de ácido perclórico 244252 Sigma-Aldrich y se calienta hasta que aparezca una nube blanca arriba de la muestra y la muestra se vuelva amarilla.
5. Enfriar y si la solución se vuelve a poner verde se tiene que calentar de nuevo, si aparece un anillo rojo ya está lista la muestra para ser medida.
6. Se lleva la muestra a 25 ml (Con agua destilada) y se lee en el HACH DR 2800 (espectrofotómetro) a 540nm y se mide la Absorbancia.

Anexo 2.

Medición del nitrógeno excretado.

1. Se colocan 16.6ml de muestra en la cubeta
2. Se adiciona 2 gotas de estabilizador (2376626 HACH Company) y se agita suavemente
3. Se adicionan 2 gotas a alcohol polivinílico (2376526 HACH Company) y se agita de nuevo
4. Se agregan 0.66ml del reactivo Nessler (2119449 HACH Company) y se deja reaccionar durante 1 minuto
5. Los resultados serán reportados en el HACH DR 2800 (espectrofotómetro) en mg/L método 8038.

Anexo 3.

Medición del fósforo excretado.

1. Se colocan 10ml de muestra en la cubeta
2. Se adiciona 0.5ml de molibdovanadato (2076032 HACH Company)
3. Se deja actuar durante 7 minutos
4. La cantidad de fósforo aparecerá en mg/L (método 8114).

Anexo 4.

Determinación de lípidos en vísceras.

1. Se pesa 0.2 g de muestra (base húmeda).
2. Se deposita en un tubo de centrifuga, se agregan 3ml de metanol 322415 Sigma-Aldrich y 1.5 ml de cloroformo 151858 Sigma-Aldrich.
3. Se agita durante 2 minutos en un vaso con hielo para evitar la evaporación.
4. Se agregan 1.5 ml más de cloroformo y se agita durante 2 minutos con hielo.
5. Se pasa a la centrifuga y se pone a 5000 rpm durante 10 minutos
6. Se pasa el sobrenadante a un embudo de separación se agregan 0.8 ml de agua y se agita. Si forma dos capas se separa la porción inferior, si no se formaron agregar 2 gotas de agua y volver a agitar, si se llegaron a formar 3 capas preparar 1 ml de clorometanol y agregarlo.
7. Una vez separada la capa inferior, secar en un tubo de ensayo mediante aireación.
8. Con unos guantes pesar un frasco ámbar y después diluir el contenido del tubo de ensayo con 1ml de clorometanol y colocarlo en el frasco ámbar.
9. Secar la solución del frasco ámbar mediante aireación
10. Volver a pesar el frasco ámbar para obtener una diferencia de peso que es proporcional al % de lípidos en la muestra.

Anexo 5.

Determinación de proteína en músculo.

1. Se pesa la muestra (0.01 g en base húmeda)
2. Se deposita en un tubo de ensayo y se agrega 1ml de agua destilada y se agita durante 2 minutos.
3. Se agregan 1 ml de reactivo Lowry L3540 Sigma-Aldrich y se deja reaccionar durante 20 minutos
4. Pasados los 20 min agregar 0.5 ml del reactivo Follin F9252 Sigma-Aldrich y esperar 30 minutos
5. Aforar a 10 ml y leer en el HACH (espectrofotómetro) a 540 nm y se mide la Absorbancia.

Anexo 6.

Capacidad antioxidante de los hepatocitos (QuantiChrome Antioxidant Assay Kit)

1.- Se pesaron 50 mg de hígado y se homogenizaron en 500 μ l de 1 x PBS en un tubo Eppendorf mediante el uso de un homogenizador (Polytron) en un recipiente con hielo seco para evitar en lo posible la elevación de la temperatura. Posteriormente la muestra se centrifugo a 14000 rpm durante 10 minutos para separar los remanentes sólidos.

2.-Para la realización del ensayo se utilizó una placa de ELISA en la cual se agregaron 20 μ l de dilución de Trolox (BioAssay Systems DTAC 002) para obtener la curva patrón quedando las concentraciones como se muestran en el siguiente cuadro:

No	1 mM Trolox + H ₂ O	Vol (μ L)	Trolox (μ M)
1	100 μ L + 0 μ L	100	1000
2	60 μ L + 40 μ L	100	600
3	30 μ L + 70 μ L	100	300
4	0 μ L + 100 μ L	100	0

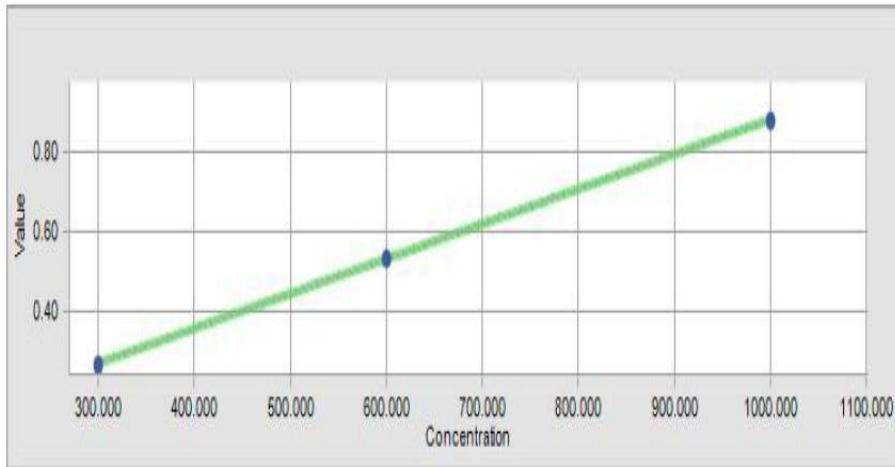
Figura 12.1 Diluciones de mM de Trolox

Posteriormente se le agregaron 100 μ l del reactivo A (BioAssay Systems DTAC 002) y 8 μ l de reactivo B (BioAssay Systems DTAC 002) por pocillo quedando un volumen total de 128 μ l

3.- Se prepararon 70 pocillos correspondientes a las 7 dietas evaluadas, donde se utilizaron 20 μ l del sobrenadante del homogeneizado celular anteriormente preparado más los 108 μ l de los reactivos A y B. Los pocillos ya preparados se dejaron incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente.

4.-Posterior la preparación de las placas se procedió a darles lectura mediante el Varioskanflash versión 4.00.53 a una longitud de onda de 570 nm.

5.-Mediante el software propio del aparato se obtuvo la ecuación de la curva patrón que se presenta en la siguiente imagen:



$$\text{Abs} = 0.00087(\text{Trolox } \mu\text{Mol}) + 0.0064$$

$$R^2 = 0.99$$

Abs= Absorbancia

Figura 12.2 Gráfica de la curva patrón para el ensayo de la capacidad antioxidante de los hepatocitos

También se obtuvieron las lecturas de absorbancia de los distintos tratamientos

6.-Usando la formula obtenida en la curva patrón se procedió a obtener la concentración de Trolox μMol equivalentes de los tratamientos para posteriormente dividirse entre la cantidad de muestra en relación al volumen (mg/ml) que para el caso de este ensayo fue de 100 mg /ml, para obtener los Trolox $\mu\text{Mol}/\text{mg}/\text{ml}$.

Anexo 7.

Actividad de la lisozima en suero.

- 1.-Se determinó el contenido de proteína en suero mediante el método de Lowry
- 2.-Se realizó una suspensión de *Micrococcus lysodeikticus* (células liofilizadas, Sigma-ALDRICH Chemical company, St. Louis, Mo, USA) 0.3 mg/ml en una solución de PBS 50mM con un pH de 6.2
- 3.- Se agregaron 100 µl de suero por cada 900 µl de suspensión de *Micrococcus* y se dejó incubar a temperatura ambiente (25C°), como blanco se utilizó la misma proporción de *Micrococcus* más 100 µl de buffer PBS.
- 4.- Se leyeron las muestras y el blanco en un espectrofotómetro (HACH DR 2800) a una longitud de onda de 530 nm y se determinó su absorbancia en distintos tiempos (a los 0.5 min, 5min y 20 min).
- 5.-Las unidades activas se definieron como la cantidad de enzima que causa un descenso en la absorbancia de 0.001/mg de proteína y se dividieron entre los minutos en que fueron obtenidas dichas mediciones, para obtener las Unidades Activas (UA)/mg de proteína/minuto.

Anexo 8.

Estallido respiratorio de los macrófagos.

- 1.- Para el aislamiento de las células fagocíticas, se extrajeron los riñones y se colocaron en 5ml del medio L-15 L4386 Sigma-Aldrich (Medio de Leibovitz 14g/l con 0.1% de suero fetal bovino), para posteriormente realizar un macerado (en un campo estéril) filtrando el contenido en una malla de 100 μm .
- 2.-Se extrajo el sobrenadante por pipeteo (de 200 μl) y se pasaron a un pocillo de micro placas (placas de 96 pocillos) ocupando 5 pocillos por muestra.
- 3.-Se realizaron recambios totales del medio cada 24 horas durante los cuales se eliminaron células no adherentes y detritos. Se mantuvo el cultivo durante 3 días tiempo después del cual se observó crecimiento de células en el fondo de los pocillos.
- 4.-Para el ensayo se agregó 50 μl de una solución 2mg/ml de azul de nitrotetrazolio (NBT) a cada pocillo y se utilizó como blanco 150 μl de medio L-15 y 50 μl de NBT.
- 5.-Las placas se dejaron incubar durante 1 hora y fueron medidas en un lector de placas de ELISA PR 3100 TSC a 620 nm para obtener su absorbancia.
- 6.-Se le resto a las muestras la absorbancia obtenida por el blanco y para obtener el aumento real de unidades de densidad óptica (OD).
- 7.-Al término del ensayo mediante agitación del fondo de los pocillos se obtuvieron las células fagocíticas para ser contabilizadas en la cámara de Neubauer, fácilmente reconocibles por el color azulado generado de la reducción del NBT a formazán.
- 8.-Las unidades de densidad óptica fueron reportadas por cada 10 000 células (10^4).

Anexo 9.

Aminograma de la dieta control.

AMINO^{Lab}[®]

Analytical Report

Evonik Degussa Mexico (1643), Mexico, D.F., Mexico

Descripción: Dieta control Dait (Tilapia)

Código del Lab.: DE14-0001597-001

Fecha de entrega: 27 August 2014

Fecha de reporte: 19 September 2014

Proteína cruda (%)*: 45.81

Proteína cruda (% tal cual): 49.95

Materia seca (%): 97.56

Resultado del análisis de aminoácidos / Contenido total después de la hidrólisis de proteína

Aminoácido	Contenido (%)*	AA (%) en CP	Contenido (% tal cual)
Metionina	0.614	1.341	0.670
Cistina	0.646	1.409	0.704
Metionina + Cistina	1.260	2.751	1.374
Lisina	2.117	4.621	2.308
Treonina	1.491	3.255	1.626
Arginina	2.855	6.232	3.113
Isoleucina	1.987	4.338	2.167
Leucina	3.403	7.427	3.710
Valina	2.048	4.470	2.233
Histidina	1.020	2.226	1.112
Fenilalanina	2.341	5.111	2.553
Glicina	1.755	3.832	1.914
Serina	2.231	4.871	2.433
Prolina	3.146	6.867	3.430
Alanina	1.699	3.710	1.853
Acido Aspártico	4.309	9.405	4.698
Acido Glutámico	10.583	23.101	11.539
Total (sin NH 3)	42.246	92.218	46.063
Amoniaco	1.233	2.691	1.344
Total	43.479	94.909	47.407

* Valores estandarizados para un contenido de materia seca de 88%

AA = aminoácido, CP = Proteína cruda