



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA**  
**UNIDAD ACADÉMICA MAZATLÁN**  
**(QUÍMICA ACUÁTICA)**

**“DETERMINACIÓN DEL REQUERIMIENTO DE METIONINA PARA EL  
CRECIMIENTO DE JUVENILES DE PARGO FLAMENCO *Lutjanus guttatus*  
(Steindachner, 1869)”**

**TESIS**

**QUE PARA OBTAR POR EL GRADO DE:  
MAESTRO EN CIENCIAS**

**PRESENTA**

**IBQ. ALEJANDRA DE JESUS MARCOS LOPEZ**

**TUTOR**

**DRA. CRISANTEMA HERNÁNDEZ GONZÁLEZ**  
**POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA**

**COMITÉ TUTOR**

**DRA. MARTHA GABRIELA GAXIOLA CORTÉS**  
**UNIDAD MULTIDISCIPLINARIA DE DOCENCIA E INVESTIGACIÓN, FACULTAD  
DE CIENCIAS (SISAL, YUCATAN)**

**DR. LUIS HÉCTOR HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ**  
**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES DE IZTACALA**

**DRA. MARÍA CRISTINA CHÁVEZ SÁNCHEZ**  
**POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA**

**DR. CARLOS ALFONSO ÁLVAREZ GONZÁLEZ**  
**UNIVERSIDAD JUÁREZ AUTÓNOMA DE TÁBASCO**

**CIUDAD DE MÉXICO NOVIEMBRE DE 2016**



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.

## AGRADECIMIENTOS

A la **Universidad Nacional Autónoma de México** a través del **Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología**, por darme la oportunidad de pertenecer a su programa de posgrado y permitirme lograr un nuevo nivel académico. Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología**, por otorgarme el apoyo económico durante 24 meses, que han permitido mi sostenimiento durante mi preparación académica.

Al **Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C., Unidad Mazatlán en Acuicultura y Manejo Ambiental**, por aceptarme como uno de sus estudiantes y permitirme desarrollar la fase experimental, del proyecto de tesis.

A la **Doctora Crisantema Hernández González** por facilitarme los recursos económicos para la realización del proyecto, dirigir con su gran experiencia todos los aspectos de mi proyecto de tesis y formación académica. Mi total gratitud por confiar en mi desempeño y forma de trabajar, por sus atinadas observaciones y sugerencias que se reflejan en este trabajo, así como por su tolerancia y paciencia hacia mi persona. Gracias por enriquecer mi formación académica y personal.

A los miembros de mi comité tutor: **Dra. Martha Gabriela Gaxiola Cortés, Dr. Luis Héctor Hernández Hernández, Dra. María Cristina Chávez Sánchez y Dr. Carlos Alfonso Álvarez González**, por el aporte de sus experiencias a través de sus observaciones y recomendaciones que permitieron el enriquecimiento de este trabajo.

A la **Biol. Virginia Patricia Domínguez Jiménez** por el apoyo brindado en la determinación de aminoácidos y análisis de química sanguínea. A la **Dra. María Cristina Chávez Sánchez** y la **M.C. Selene María Abad Rosales**, por el apoyo y capacitación técnica para el análisis histológico. Al **Dr. Milton Espanoupulos Hernández** por permitir que realizara el análisis de cuantificación de proteínas en el laboratorio de Nutrición Acuícola del Instituto Tecnológico de Mazatlán. Al **Biol. Alan Jesús Humberto González Santos**, por el apoyo brindado durante la siembra.

A la **Dra. Gloria Vilaclara Fatjó, Lic. Margarita Cordero, Lic. Natalia Medina, Lic. Diana Juárez, Lic. Guadalupe Godoy, Lic. Gabriela Almaraz y Lic. Chantal Ruiz**, por el apoyo en todos los trámites pertinentes al posgrado.

A mis profesores: **Dr. Federico Páez, Dr. Carlos Green, Dr. Yovani Montaña, Dr. Mariano Sánchez, Dra. Cristina Chávez, M.C. Selene Abad** y el equipo encabezado por la **Dra. Gloria Vilaclara Fatjó**, que compartieron conmigo sus conocimientos. A mis compañeros del posgrado: **Estephanie Meza, Mateo Amillano, Brianda Ramos, Nancy Yolimar, Trixie Zavala, Jessica Orrante**, por compartir momentos agradables.

A los: **IBQ. Jonathan González, IBT. Paul Montaña, IBT. Iris Navarro, IBT. Jaheli Casillas, IBT. María García, IBQ Sara Reyna e I.Pesq. Rosa Montaña** por el apoyo brindado durante la realización de las biometrías y en la realización de los parámetros hematológicos, así como por su compañía, amistad y buenos momentos. A mis amigos de CIAD y UNAM: **Emyr Peña, Paul Montaña, María García, Danilu Couch, Sarahi Roos, Paloma Salazar, Perla López, Karina Ontiveros, Mateo Amillano, Helen López, Jonathan González, Elizabeth Osuna, Esmeralda Lizarraga y Melissa Tejeda** por su apoyo emocional, aprendizajes y sobre todo por su valiosa amistad.

A Sara Reyna por ser mi compañera de aventuras en CIAD, por brindarme su amistad, confianza, pláticas increíbles y hacer mi estancia más amena con sus locuras y aventuras. A Rosa Montaña por su amistad, cariño, apoyo desinteresado y momentos increíbles vividos. Las quiero.

A todos los anónimos que de forma involuntaria o voluntaria fueron alcanzados por este trabajo.

## **DEDICATORIA**

### **A Dios**

*Gracias por permitirme concluir mis estudios de maestría y hacer que el universo conspira a mi favor.*

### **A mis padres**

*Mauro Marcos y Roselia Lopez, gracias por enseñarme a luchar por mis sueños, metas e ilusiones, gracias por todo el amor, tiempo, dedicación y consejos brindados a mi persona, los amo.*

### **A mis hermanos**

*Marisa, Armando, Pedro y Sheimus, gracias por creer en mí y enseñarme a ser mejor persona, los quiero mucho.*

## Índice

	<b>Página</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	3
2.1. Morfología de la especie .....	3
2.2. Requerimientos de proteínas y lípidos .....	3
2.3. Aminoácidos .....	5
2.4. Biosíntesis de proteínas .....	6
2.5. Aminoácidos en peces .....	7
2.6. Rutas metabólicas de aminoácidos en peces .....	8
2.7. Metionina .....	10
2.8. Metabolismo de la metionina .....	12
2.9. Metionina en peces .....	13
2.10. Eficiencia de la DL-Metionina .....	17
2.11. Índices biológicos corporales en peces .....	18
2.12. Hematología en peces y química sanguínea .....	18
2.13. Composición de aminoácidos en el músculo del pez .....	19
<b>3. JUSTIFICACIÓN ACADÉMICA</b> .....	20
<b>4. HIPOTESIS</b> .....	21
<b>5. OBJETIVOS</b> .....	22
5.1. Objetivo General .....	22
5.2. Objetivos específicos .....	22

<b>6. MATERIALES Y MÉTODO</b> .....	23
6.1. Análisis proximal.....	23
6.1.1. Análisis de proteínas.....	23
6.1.2. Análisis de lípidos .....	23
6.1.3. Análisis de cenizas .....	23
6.1.4. Análisis de humedad.....	23
6.1.5. Análisis proximal corporal y muscular .....	23
6.2. Determinación de aminoácidos .....	24
6.2.1. Hidrólisis.....	24
6.2.2. Derivatización.....	24
6.3. Formulación de las dietas experimentales .....	25
6.4. Preparación de las dietas experimentales .....	27
6.5. Organismos experimentales.....	28
6.6. Sistema experimental .....	28
6.7. Parámetros ambientales.....	28
6.8. Diseño experimental .....	28
6.9. Alimentación .....	29
6.10. Evaluación biológica .....	29
6.10.1. Índices de crecimiento y utilización de alimento.....	29
6.11. Índices biológicos corporales .....	30
6.11.1. Cálculos de los índices biológicos corporales .....	30
6.12. Parámetros hematológicos.....	31
6.12.1. Hematocrito.....	31
6.12.2. Hemoglobina .....	31
6.12.3. Proteína plasmática .....	32
6.12.4. Triglicéridos.....	32

6.12.5. Colesterol.....	32
6.12.6. Glucosa.....	33
6.13. Análisis de histología normal y patológica de peces.....	33
6.14. Análisis estadístico.....	34
<b>7. RESULTADOS.....</b>	<b>35</b>
7.1. Análisis proximal del cuerpo y músculo del pargo.....	35
7.2. Evaluación biológica.....	36
7.2.1. Peso final (PF).....	37
7.2.2. Ganancia en peso (GP).....	37
7.2.3. Tasa de crecimiento (TC).....	38
7.2.4. Tasa específica de crecimiento (TCE).....	38
7.2.5. Consumo de alimento individual (CAI).....	38
7.2.6. Tasa de conversión alimenticia (TCA).....	39
7.2.7. Supervivencia (S).....	39
7.2.8. Índice de eficiencia proteínica (PER).....	39
7.3. Análisis hematológicos.....	39
7.3.1. Hematocrito.....	40
7.3.2. Proteína total.....	40
7.3.3. Hemoglobina.....	40
7.3.4. Glucosa.....	40
7.3.5. Triglicéridos.....	40
7.3.6. Colesterol.....	41
7.4. Índices biológicos corporales.....	41
7.4.1. Factor de condición.....	41
7.4.2. Índice hepatosomático.....	41
7.4.3. Índice viscerosomático.....	42

7.5. Perfil de aminoácidos del músculo del pargo.....	42
7.6. Análisis de histología normal y patológica de peces.....	43
7.7. Requerimiento nutricional de metionina.....	43
<b>8. DISCUSIÓN .....</b>	<b>44</b>
<b>9. CONCLUSIONES .....</b>	<b>51</b>
<b>10. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>53</b>

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Página</b>
<b>Figura 1.</b> Pargo flamenco. ....	3
<b>Figura 2.</b> Formula general de los aminoácidos. ....	5
<b>Figura 3.</b> Formula química de la metionina. ....	11
<b>Figura 4.</b> Crecimiento del pargo flamenco <i>Lutjanus guttatus</i> alimentado con las dietas experimentales durante un periodo de 12 semanas. ....	37
<b>Figura 5.</b> Gráfica de la tasa de crecimiento específica de los peces alimentados con las dietas experimentales durante un periodo de 12 semanas. ....	38
<b>Figura 6.</b> Regresión lineal con punto de quiebre que relaciona el peso ganado con respecto al nivel de inclusión de metionina. ....	43

## LISTA DE TABLAS

Página

<b>Tabla 1.</b> Aminoácidos en peces y otros animales acuáticos.....	7
<b>Tabla 2.</b> Composición proximal de las materias primas de las dietas utilizadas para la alimentación del pargo flamenco. ....	25
<b>Tabla 3.</b> Formulación y composición proximal de las dietas utilizadas para la alimentación del pargo flamenco. ....	26
<b>Tabla 4.</b> Composición de aminoácidos de las dietas experimentales utilizadas para la alimentación del pargo flamenco. ....	27
<b>Tabla 5.</b> Composición proximal en base húmeda del cuerpo entero del pargo flamenco al final de las 12 semanas de experimento.....	35
<b>Tabla 6.</b> Composición proximal en base húmeda del músculo del pargo flamenco al final de las 12 semanas de experimento.....	36
<b>Tabla 7.</b> Parámetros de evaluación biológica de pargo flamenco <i>Lutjanus guttatus</i> alimentado con las dietas experimentales durante un periodo de 12 semanas.....	36
<b>Tabla 8.</b> Parámetros hematológicos de pargo flamenco <i>Lutjanus guttatus</i> alimentado durante un periodo de 12 semanas. ....	39
<b>Tabla 9.</b> Índices biológicos de los organismos alimentados con los distintos tratamientos.....	41
<b>Tabla 10.</b> Determinación del perfil de aminoácidos en el músculo del pargo flamenco <i>Lutjanus guttatus</i> alimentado con las dietas experimentales.....	42

## RESUMEN

El propósito de este trabajo fue evaluar diferentes niveles de metionina en la dieta de juveniles de pargo flamenco *Lutjanus guttatus* para determinar su requerimiento nutricional, para ello se formularon 5 dietas con niveles de metionina de 0.72, 1.12, 1.52, 1.92 y 2.32 %. Las dietas contenían 45% de proteína cruda y 12 % de lípidos crudos. Las dietas se evaluaron por triplicado en 18 tanques de 300 litros, con flujo de agua y aireación constante. Un total de 15 organismos con un peso inicial de  $7.33 \pm 0.01$  g fueron alimentados a saciedad aparente tres veces al día por 12 semanas. Los organismos fueron pesados y medidos cada 14 días. Los valores promedio de temperatura, oxígeno disuelto y salinidad fueron registrados en  $31.01 \pm 0.2$  °C,  $5.6 \pm 0.2$  mg L<sup>-1</sup> y  $34.8 \pm 0.1$  ‰. Los mejores resultados de peso ganado (PG), tasa de crecimiento específica (TCE), tasa de conversión alimenticia (TCA) e índice de eficiencia proteínica (PER) los presentaron los peces alimentados con el tratamiento MET-1.52. Mientras que la supervivencia no se vio afectada por los diferentes niveles de metionina en la dieta. Los índices viscerosomático (VSI) y hepatosomático (HSI) no presentaron diferencias significativas. Mientras que, el factor de condición (CF) y los análisis de química sanguínea se vieron afectados por niveles deficientes de metionina. Así mismo, el nivel máximo de metionina provocó una disminución significativa en el porcentaje de lípidos en el cuerpo y músculo del pez, en la concentración de colesterol y triglicéridos en la sangre. El análisis histológico de ojo no mostró cambios patológicos representativos. El requerimiento de metionina fue obtenido en un valor de 1.52 % de acuerdo con la relación nivel de metionina y peso ganado.

## ABSTRACT

The purpose of this study was to evaluate different levels of methionine in the diet of juvenile snapper *Lutjanus guttatus* to determine their nutritional requirement. Five diets were formulated to contain methionine levels of 0.72, 1.12, 1.52, 1.92 and 2.32%. Test diets used in the experiment contained 45% crude protein, and 12 % lipid crude. Diets were evaluated for triplicate in 18 tanks with a volume of 300 liters, with water flow and constant aeration. A total of 15 organisms with  $7.33 \pm 0.01$  g of initial weight were used per tank and fed three times a day to apparent satiety by 12 weeks. The organisms were weighed and measured every 14 days. The mean values of temperature, dissolved oxygen and salinity were recorded at  $31.01 \pm 0.2$  ° C,  $5.6 \pm 0.2$  mg L<sup>-1</sup> and  $34.8 \pm 0.1$  ‰ respectively. The best results of weight gain (PG), specific growth rate (TCE), feed conversion rate (TCA) and protein efficiency index (PER) were presented by fish fed MET-1.52 treatment. While survival was not affected by the different levels of methionine in the diet. The viscerosomatic index (VSI) and hepatosomático index (HSI) did not present significant differences. While, the condition factor (CF) and blood chemistry analyzes were affected by methionine deficient levels. Likewise, the maximum level of methionine caused a significant decrease in the percentage of lipids in the body and muscle of the fish, in the concentration of cholesterol and triglycerides in the blood. Histological analysis of the eye showed no representative pathological changes. The requirement of methionine was obtained in a value of 1.52% according to the ratio methionine level and weight gained.

## 1. INTRODUCCIÓN

México presenta un creciente interés en el cultivo, comercialización y conservación de especies acuáticas vegetales y animales, principalmente peces. Para que un cultivo resulte viable es necesario conocer los aspectos nutricionales requeridos por las especies. Actualmente los requerimientos nutricionales establecidos en dietas para peces carnívoros de origen marino se basan principalmente en el consumo de alimentos con alto contenido proteínico, esto se debe a que estos obtienen principalmente la energía necesaria para realizar sus funciones biológicas y mecánicas mediante esta fuente (Wilson, 2002; Lunger *et al.*, 2007).

Durante muchos años, la harina de pescado ha sido la principal fuente proteica de muchos alimentos comerciales, debido a la palatabilidad, valor nutritivo y alto contenido proteínico que presenta; sin embargo, los altos costos, variaciones en la calidad y la alta demanda que existe para este tipo de productos han orillado a los productores a buscar fuentes proteicas alternas.

Hoy en día se realizan estudios e investigaciones que evalúan la viabilidad de sustituir parcial o totalmente la harina de pescado en alimentos para peces, así como el uso de fuentes alternativas de origen animal y vegetal para lograrlo (Regost *et al.*, 1999; Turchini *et al.*, 2009; Hardy, 2010). No obstante, la viabilidad de las fuentes proteicas alternas puede verse afectada por la deficiencia de uno o más aminoácidos esenciales en su composición, por ejemplo, las fuentes proteicas vegetales se caracterizan por presentar un desbalance en su perfil de aminoácidos, principalmente en aminoácidos esenciales metionina, lisina y arginina, estas deficiencias pueden disminuir la eficiencia del alimento (Takagi *et al.*, 2006a y Takagi *et al.*, 2006b), por lo que, su uso puede requerir la adición de uno o más aminoácidos sintéticos, para cubrir su deficiencia (NRC, 2011; Davies y Morris, 1997; Cheng *et al.*, 2003).

Hasta la fecha se ha demostrado que los peces requieren al menos 10 aminoácidos esenciales (AAE) en su dieta para su crecimiento (Wilson, 1985; Zhou *et al.*, 2007; Li *et*

*al.*, 2009) y que una deficiencia o ausencia de dichos AA puede causar una disminución del crecimiento, una mala conversión alimenticia e incluso enfermedades debido a que algunos aminoácidos regulan rutas metabólicas como la síntesis de proteínas, regulación de ingesta de alimento y reproducción (Wilson y Halver, 1986; Guillaume *et al.*, 2001), por lo que, es necesario realizar estudios e investigaciones que determinen el nivel de inclusión requerido para cada especie. Del total de AAE la metionina en particular es un aminoácido esencial que debe ser suministrado a través del alimento debido a que tiene un papel importante en el crecimiento y estado de salud de los peces (Wilson, 2002; Li *et al.*, 2009).

Actualmente, para determinar cuantitativamente el requerimiento de un AA, la técnica más utilizada actualmente es a través de la variación de niveles graduados del AA en la dieta, dentro de esta dieta la utilización de fuentes proteicas puede ser AA cristalinos en su totalidad o parcial (Wilson, 2002). Sin embargo, publicaciones más recientes utilizan una combinación de harina de pescado con fuentes vegetales como base proteica (harina de soya, gluten de trigo, gluten de maíz) y la inclusión de AA cristalinos para balancear los niveles de inclusión del AA a estudiar (Zhou *et al.*, 2006; Yan *et al.*, 2007; Zhou *et al.*, 2011).

El pargo flamenco *Lutjanus guttatus* (Steindachner, 1869) es una especie con alto potencial de cultivo, debido a que en condiciones de cautiverio presenta una gran capacidad de adaptación y control de reproducción (Ibarra-Castro & Duncan, 2007). Hasta el momento no existen estudios, que determinen el nivel de inclusión de metionina necesario en dietas para la alimentación de juveniles de pargo flamenco *Lutjanus guttatus*, por lo que, el presente trabajo está enfocado en determinar el requerimiento de metionina mediante un diseño de dosis-respuesta, usando dietas con diferentes niveles de metionina con el objetivo de determinar los efectos en crecimiento, utilización de alimento y estado de salud del pargo flamenco *Lutjanus guttatus*.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. Morfología de la especie

El pargo flamenco (Figura 1) es un pez de cuerpo oblongo, moderadamente comprimido, con cabeza triangular, hocico puntiagudo, boca terminal ligeramente protráctil y labio grueso. Posee fuertes dientes coniformes en ambas mandíbulas y otros dientes más pequeños en el paladar. La aleta dorsal es única y sus porciones anteriores (compuestas por espinas) y posterior (formada por radios blandos) son claramente distinguibles. La aleta anal es de forma similar a la parte blanda de la aleta dorsal y posee tres espinas anteriores bien desarrolladas; la aleta caudal es de forma truncada, las pélvicas son torácicas y el pedúnculo caudal robusto. Además, presenta una mancha oscura por debajo del extremo de la porción blanda de la aleta dorsal (Allen, 1985).



**Figura 1.** Pargo flamenco (*Lutjanus guttatus*).

### 2.2. Requerimientos de proteínas y lípidos

Las proteínas son consideradas la principal fuente de obtención de energía de peces carnívoros, debido a la gran capacidad que presentan para metabolizarla. Los peces carnívoros requieren aproximadamente de 50 a 60% de contenido proteico en su alimentación para obtener un adecuado desarrollo y crecimiento; algunos peces al sufrir un incremento de temperatura tienden a requerir una mayor cantidad. Los requerimientos proteicos para el crecimiento varían con la especie y la talla (Tucker, 1998).

Las proteínas son el componente más caro e importantes en la preparación de dietas artificiales para peces (Gaylord y Barrows, 2009; Zhou *et al.*, 2011). Su función es reparar el tejido dañado o desgastado (mantenimiento del tejido) y la formación de tejido nuevo, la proteína suministrada en la dieta, puede ser catalizada y actuar como fuente de energía o puede servir como sustrato en la formación de lípidos y carbohidratos en el tejido (FAO, 2009). La calidad de la proteína alimenticia está determinada por distintos factores, entre los que destacan su perfil de aminoácidos (AA) y su digestibilidad (Guillaume *et al.*, 2004).

Por otro lado, los peces toleran elevados contenidos de lípidos, aunque un exceso en la dieta puede provocar una disminución en la calidad del pescado, por lo que, el nivel de lípidos recomendable en la dieta se encuentra en un rango de 10 a 20 % dependiendo de la especie. Numerosos estudios se han realizado sobre los requerimientos de proteína y lípidos en peces, sin embargo, los requerimientos de proteína para Lutjánidos son escasos. A continuación se presenta la información más relevante.

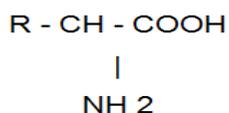
Catacutan *et al.* (2001), evaluaron tres dietas en juveniles de pargo rojo (*Lutjanus argentimaculatus*), las dietas contenían 35 %, 42.5 % y 50 % de proteína y 6 % y 12 % de lípidos. Los resultados mostraron que la dieta que contenía 50 % de proteína mostró la mejor tasa de crecimiento específico. De igual forma, se determinó que el contenido de lípidos no afectó de manera significativa el crecimiento de los peces. Mientras que, Miller *et al.* (2005) realizaron experimentos con huachinango del golfo (*Lutjanus campechanus*), en este caso los autores concluyeron que un buen crecimiento se logra utilizando una dieta con un nivel proteico entre 32 % y 36 %, y 10 % de lípidos.

Villa-López (2005), desarrolló dos experimentos con sub-adultos silvestres de pargo flamenco (140 g), para evaluar dietas con diferente nivel de proteína (30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 % y 60 %) y de lípidos (8 %, 11 %, 14 % y 17 %) respectivamente. Los resultados obtenidos mostraron que la dieta con inclusión de proteína del 40 % promovió mejor el crecimiento de los peces; así mismo, para este nivel de proteína se observó un contenido óptimo de lípidos de 11 %.

Abdo de la Parra *et al.* (2010), analizaron el efecto de diferentes niveles de proteína y lípidos totales en el crecimiento y supervivencia del pargo flamenco (*Lutjanus guttatus*), las formuladas contenían 40 %, 45 % y 50 % de proteína y 9 %, 12 % y 15 % de lípidos. Los resultados mostraron que las dietas con niveles de inclusión de 45 % y 50 % de proteína, presentaron los mejores resultados en incremento de peso y tasa específica de crecimiento. Así mismo, determinaron que las variaciones de los lípidos, no presentaron diferencias significativas en las dietas. Los autores recomiendan incluir en las dietas, un contenido proteico de al menos 45 % de proteínas y 9 % lípidos.

### 2.3. Aminoácidos

Los aminoácidos (AA) son las unidades más simples que componen a las proteínas, existen más de 300 AA en la naturaleza. Los AA pueden estar en forma libre o ligada a las proteínas, es decir, incorporados dentro de las cadenas peptídicas. La fórmula general de los aminoácidos se presenta en la Figura 2 (Guilluame *et al.*, 2001), está se encuentra constituida por un átomo de carbono  $\alpha$ -covalente unido a un átomo de hidrógeno, un grupo amino (NH<sub>2</sub>), un grupo carboxilo (COOH) y una cadena lateral llamadas grupo (R), que diferencia un AA de otro (Brody, 1999).



**Figura 2.** Formula general de los aminoácidos. Fuente: Guilluame *et al.* (2001)

Las propiedades de los aminoácidos resultan de la variación de la estructura de los diferentes grupos R, que influyen en el tamaño, forma, carga eléctrica, y otras características. Los aminoácidos pueden existir como D- o L-isómeros, o de la mezcla de los productos. Los aminoácidos son encontrados normalmente en la naturaleza en la configuración L, que son, con algunas excepciones, las formas biológicamente más activa. Los D-aminoácidos se producen en pequeñas cantidades en ciertas moléculas sintetizadas por invertebrados y bacterias (NRC, 2011).

Los aminoácidos desempeñan un importante papel en el metabolismo celular, debido a que todas las reacciones bioquímicas son catalizadas por enzimas constituidas por

residuos de aminoácidos. Los aminoácidos también son esenciales para la síntesis de proteína y otros compuestos importantes (p. ej. adrenalina, tiroxina, melanina, histamina, hemoglobina, pirimidinas, purinas, ácidos nucleicos, colina, ácido fólico, taurina, sales biliares, etc.) (Tacon, 1989).

De acuerdo con sus necesidades nutricionales, biodisponibilidad y capacidad de síntesis en el organismo los aminoácidos se clasifican en esenciales (AAE), no esenciales (AANE). Los AAE son aquellos que no pueden sintetizarse en el organismo, por lo cual estos deben ser proporcionados por la dieta. En cambio los AANE pueden ser sintetizados adecuadamente por el organismo (Voet *et al.*, 2006).

#### **2.4. Biosíntesis de proteínas**

Se conoce como síntesis de proteínas al proceso por el cual se componen proteínas a partir de los veinte aminoácidos. El ARN permite copiar la información contenida en el ADN y transportarla a las estructuras celulares encargadas de elaborar las distintas proteínas (Devlin, 2006). El lenguaje genético del ADN usa un alfabeto de cuatro letras, dos purinas “A y G” (adenina y guanina) y dos pirimidinas “C y T” (citosina y timina). La “A” siempre es pareada con una “T” y la “C” con una “G”. La biosíntesis de proteínas se conoce como traducción, ya que implica la traducción bioquímica de información entre estos lenguajes (Voet *et al.*, 2006).

La traducción requiere diversas especies de ARN: una molécula de ARN mensajero (Mrna) que contiene la información y que se exporta desde el núcleo, varios tipos de ARN de transferencia (ARNt) “bilingües” que leen el mensaje y ribosomas ricos en ARN que actúan como centros catalíticos y de organización en la síntesis proteica. En el ARNm la información también está codificada mediante un alfabeto de cuatro letras similar al del ADN, en el cual la base “U” (uracilo) sustituye a la “T” (timina) (Devlin, 2006). Las bases en una hebra de ADN, especifican el orden de las bases en una nueva hebra mensajera de ARN.

En el proceso de síntesis, el ARN polimerizado copia la información de un gen en una molécula mensajera (ARNm), los aminoácidos son transportados por ARN de

transferencia correspondiente para cada aminoácido hasta el ARN mensajero donde se unen en la posición adecuada para formar las nuevas proteínas. El ADN siempre permanece dentro del núcleo, pero el mensajero de ARN viaja hasta el citoplasma, ahí una maquina de producción de proteínas llamada ribosoma, lee el mensaje del ARN para crear una proteína en especial. Cada tres bases de moléculas mensajeras de ARN, codifica un aminoácido. Los polipéptidos se forman por adicción a la secuencia de aminoácidos, en un orden específico establecido por la información contenida en la secuencia de nucleótidos del ARNm. Las moléculas de ARN llevan el aminoácido correcto que el ribosoma une para crear una proteína. Al finalizar la síntesis de una proteína, se libera el ARNm y puede volver a ser leído, incluso antes de que la síntesis de una proteína termine, ya puede comenzar la siguiente, por lo cual, el mismo ARN mensajero puede utilizarse por varios ribosomas al mismo tiempo (Voet *et al.*, 2006).

## 2.5. Aminoácidos en peces

La composición de aminoácidos en la dieta es un factor que influye en el crecimiento y desarrollo de los peces. Los AAE son de suma importancia debido a sus efectos significativos sobre la deposición de músculo, los costos de alimentación y el crecimiento (Small y Soares, 1999). Para optimizar la calidad proteínica en un alimento es necesario conocer la composición de aminoácidos, por lo que, entre mejor balance exista en los aminoácidos esenciales mejor será la calidad y el aprovechamiento del pez.

En ocasiones los peces además de requerir aminoácidos esenciales, pueden requerir el uso de aminoácidos condicionales (AAC), AA que a pesar de ser sintetizados por los peces, no son producidos en cantidad suficiente, generalmente usados por organismos en condiciones de estrés o enfermedad (Li *et al.*, 2009).

**Tabla 1.** Aminoácidos en peces y otros animales acuáticos.

<b>Esenciales</b>	<b>No esenciales</b>	<b>Condicionales</b>
Arginina	Alanina	Cisteína
Histidina	Asparagina	Glutamina
Isoleucina	Ácido aspártico	Hidroxiprolina

Leucina	Ácido glutámico	Prolina
Lisina	Glicina	Taurina
Metionina	Serina	
Fenilalanina	Tirosina	
Treonina		
Triptófano		
Valina		

---

Fuente: Li *et al.* (2008)

Para asegurar un apoyo óptimo al organismo del pez, los AAE y AANE deben hallarse en una determinada proporción relativa, debido a que si ciertos aminoácidos se encuentran en exceso en esta relación, se origina trastornos metabólicos (desequilibrio de aminoácidos) que en casos extremos puede incluso ocasionar estados de toxicidad (Bergner y Kretz, 1969 en Steffens, 1989).

## **2.6. Rutas metabólicas de aminoácidos en peces**

Cuando las proteínas son hidrolizadas el pez obtiene aminoácidos libres que son el producto final de la digestión de la proteína (NRC, 2011), los cuales son absorbidos en el tracto gastrointestinal y distribuidos por la sangre a los diferentes órganos y tejidos donde son usados para la síntesis de nuevas proteínas.

En los procesos de digestión y absorción de la proteína se requiere la producción de enzimas que regulen todo el proceso de digestión. En el estómago la pepsina gástrica permite que las proteínas se hidrolicen a polipéptidos, oligopéptidos y algunos aminoácidos. El páncreas libera proteasas pancreáticas que permiten la obtención del 30 % de oligopéptidos y el 70 % de los aminoácidos. Las células intestinales mediante aminopeptidasas catalizan la hidrólisis de péptidos, que contienen un pequeño número de aminoácidos, los cuales se hidrolizan en el citoplasma de la célula mediante la acción de endopetididasas. Para que este proceso aporte el máximo rendimiento tiene que haber una buena actividad hepática, pancreática y digestiva. Es así que los aminoácidos asimilados son transportados por el sistema circulatorio a los diferentes órganos y tejidos, y al hígado, donde serán utilizados para formar nuevas proteínas; o pasarán al sistema sanguíneo donde se unirán a otros aminoácidos y por el

catabolismo de tejido se producirá energía para la síntesis de proteína y otros compuestos nitrogenados (Halver, 1980, Murai *et al.*, 1987; Deurenberg y Schutz, 1995 y Houlihan *et al.*, 2002).

Por otra parte los excesos de aminoácidos, son degradados en grupos cetoácidos (esqueletos de carbono) y amonio. Los cetoácidos pueden ser posteriormente usados para la síntesis de lípidos (lipogénesis), carbohidratos (glucogénesis) y también de aminoácidos no esenciales (Weatherly y Gill, 1987; Hephher, 1988). El producto final de la síntesis de proteínas es eliminado por el pez a través de las branquias, siendo el resto excretado por la orina, heces fecales y piel (Walton, 1987).

Existen pocos estudios sobre las rutas del metabolismo de aminoácidos en peces. Hasta donde se ha investigado, son similares o idénticas a las de los mamíferos omnívoros. Algunas variaciones tienen lugar, en la distribución según los órganos, de las enzimas que desaminan los aminoácidos de cadena ramificada (AACR), con la ausencia de cualquier evidencia convincente de que el antagonismo entre aminoácidos ramificados se presente en peces (cowey, 1995).

En mamíferos, la aminotransferasa de aminoácidos de cadena ramificada (AACR) se encuentra casi completamente en el músculo esquelético de tal manera que, de todos los aminoácidos absorbidos los AACR (diferentes a los que son usados para la síntesis de proteína en el hígado), estos son los únicos que pasan intactos ese órgano y realizan las primeras fases de su catabolismo en el músculo. Los cetoácidos de cadenas ramificadas después son transportados de regreso al hígado. Anteriormente se había reportado que en trucha los aminoácidos AACR son removidos de la vena portal a través del hígado (Murai *et al.*, 1987). De acuerdo con esto, muchos tejidos (incluyendo hígado) contienen una actividad apreciable de aminotrasferasa de AACR (Hughes *et al.*, 1983) pero las actividades en el músculo blanco son muy bajas (Teigland y Klungsoyr, 1983). Por su parte, en el riñón y en el músculo rojo hay una actividad elevada, pero la proporción de músculo rojo en peces es muy pequeña.

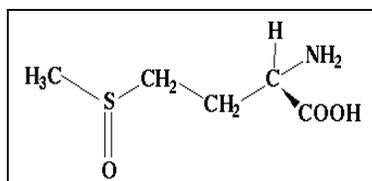
Otras variaciones, cuando ocurren, generalmente afectan rutas metabólicas secundarias más que primarias. En el caso de la serina por ejemplo, la principal ruta catabólica es a través de la hidroximetilserintransferasa; la segunda ruta es gluconeogénica. En mamíferos omnívoros esta ruta es vía serinadeshidratasa hasta piruvato y de ahí a fosfoenolpiruvato; en trucha, la ruta es vía serina piruvato aminotransferasa a hidroxipiruvato y de ahí a glicerato y fosfoglicerato antes de alcanzar el fosfoenolpiruvato (Walton y Cowey, 1979).

En este aspecto, el metabolismo de la metionina sigue la misma vía que en mamíferos (Cowey *et al.*, 1992). Los puntos de control ocurren a los niveles de S-adenosil metionina y de homocisteína pero las actividades de las enzimas involucradas (metionina adenosil transferasa y cistationina sintasa) no responden a cambios en la ingestión de metionina ni tampoco de proteína.

De acuerdo con lo mencionado, anteriormente había evidencia del control a nivel del sustrato: con baja ingestión de metionina hay una cantidad insuficiente de homocisteína disponible para la conversión a cistationina, consecuentemente la serina se acumula en el hígado y en el plasma, al mismo tiempo que los niveles de taurina tisular son reducidos a causa de la limitación en transulfuración. Con una ingestión alta de metionina ocurren cambios inversos, los niveles de serina tisular son reducidos y aquellos de taurina incrementados (Cowey *et al.*, 1992). Similarmente, Yokoyama y Nakazoe (1990) mostraron que los niveles de cistationina hepática aumentaron cuando se dio metionina adicional en la dieta.

## **2.7. Metionina**

La metionina (Figura 3) es un aminoácido esencial, que se puede obtener mediante el consumo de alimentos, debido a que el cuerpo no tiene la capacidad de sintetizarlo por sí solo; se encuentra presente en mayor cantidad en proteína de origen animal que en proteína vegetal (Zhou *et al.*, 2006).



**Figura 3.** Formula química de la metionina.

La metionina está representada por el codón AUG, que se refiere a las bases nitrogenadas adenina, uracilo y guanina (AUG). Las bases nitrogenadas del ARN van agrupadas de tres en tres, a cada grupo de tres se le llama codón o triplete. El codón AUG es el inicio del mensaje para el ribosoma que indica la iniciación de la síntesis de una proteína, por lo que este aminoácido siempre toma la primera posición en la proteína durante la traducción. El ARNt iniciador cargado con metionina forma parte del sistema ribosómico, y por tanto todas las proteínas empiezan por este aminoácido (a menos que exista una delección en alguna sección en algún paso posterior).

La metionina pertenece al grupo de los aminoácidos azufrados y es la principal fuente de azufre para el organismo. La metionina participa como precursor en la síntesis de proteínas, en la producción de S-adenosilmetionina (SAM) (Baker, 2006), homocisteína, cisteína, glutatión, taurina y otros fosfolípidos (Bender, 1992; Mai *et al.*, 2006). El SAM está involucrado en la síntesis de creatina, metilcobalamina, melatonina, fosfatidicolina, norepinefrina, coenzima Q10, carnitina, también participa en la formación de sulfato activo, poliaminas (espermina y espermidina) y en el metabolismo de la serotonina y la niacinamida (Miller, 2003). Además de participar en la inhibición de la actividad reductasa de metilación del tetrahidrofolato (THF), el cual forma N5-metil tetrahidrofolato.

Cuando el SAM se encuentra presente en grandes cantidades, facilita la degradación de metionina. El grupo metilo de la metionina al conjugarse con glicina produce serina. La metionina es también un aminoácido glucogénico y puede participar en la formación de D-glucosa y glucógeno. Además de presentar diversos papeles fisiológicos relacionados con la proliferación y crecimiento de las células (Murray *et al.*, 1996).

## 2.8. Metabolismo de la metionina

El catabolismo de la metionina parte de la conversión de metionina a S-adenosil metionina (SAM). La metionina se convierte en SAM por acción de la enzima metionina adenosil transferasa (MAT) (Baker, 2006; Zhou *et al.*, 2006), la cual principalmente se produce y consume en el hígado (órgano donde se realiza la degradación de la metionina). La SAM funciona como precursora para numerosas reacciones de transferencia de grupos de metilo. La descarboxilación del SAM sirve para formar S-adenosil-metil-tiol propilamina, en la síntesis intermedia de las poliaminas como son la putrescina, espermidina y esperina. Las cuales son importantes para la división celular y el crecimiento. En este aspecto, la remoción del grupo metilo de SAM forma el compuesto S-adenosilhomocisteína (SAH). La S-adenosilhomocisteína puede ser fraccionada a homocisteína y adenosina por la enzima S-adenosil homocisteína hidrolasa.

La homocisteína es metabolizada fundamentalmente a través de dos posibles vías: la remetilación y la transulfuración. En la vía de remetilación la homocisteína puede ser convertida de vuelta a metionina por acción de la homocisteína metiltransferasa (también llamada metionina sintasa), es una reacción que ocurre bajo condiciones de ahorro de metionina y es dependiente de la vitamina B12 (que en forma de metilcobalmina es el donante directo del grupo metilo a la homocisteína), folacina (como 5-metil tetrahidrofolato) (que sirve de fuente del grupo metilo para la formación de la metilcobamina) (Miller, 2003) y vitamina b6 (fosfato piridoxal) (como cofactor en el proceso de regeneración del N-metiltetrahidrofolato).

La betaína generada en el hígado a partir de colina, provee un grupo metil el cual es transferido a homocisteína por la enzima hepática betaína homocisteína metil transferasa. Con la pérdida del grupo metilo, la betaína se convierte en dimetil glicina. Así mismo la dimetil glicina puede ser remetilada para generar glicina. Por lo tanto, la remetilación dependerá de la vitamina B12 y el folato, ya que provee el grupo metilo para la remetilación de la homocisteína y formar metionina (Miller, 2003). Por otro lado la vía de transulfuración representa la alternativa en el caso de que la metionina esté

en relativo exceso en el organismo y no se requiera su recuperación, permitiendo la síntesis del aminoácido cisteína.

La homocisteína para ser metabolizada en el cuerpo deberá de reaccionar con el aminoácido serina formando cistationina a través de la enzima cistationina  $\beta$ -sintetasa. Es necesaria la presencia de vitamina B6 en forma de coenzima (fosfato de piridoxal) para que ocurra esta reacción. Más adelante para el catabolismo de la cistationina se necesita la cistationina  $\gamma$ -liasa y otra vitamina B6 para formar la cisteína, en esta reacción se genera el  $\alpha$ -cetobutirato. Estas reacciones ocurren en el hígado, riñón, páncreas y los intestinos. La cisteína se utiliza para la síntesis de proteínas y otras necesidades del cuerpo, mientras que el  $\alpha$ -cetobutirato es descarboxilado y convertido a propionil-CoA.

## **2.9. Metionina en peces**

La metionina es un aminoácido esencial que influye en crecimiento y procesos metabólicos de vertebrados terrestres y peces. Es uno de los principales elementos de consolidación de las proteínas implicadas en la formación de células y tejidos, participa en la síntesis de proteínas y otras moléculas, es fuente de azufre y tiene diversas funciones en el organismo. Es el principal aminoácido limitante en fuentes de proteína vegetal usada en dietas para peces (Poston, 1986; Goff y Gatlin, 2004). La deficiencia de metionina puede causar crecimiento lento, reducción de eficiencia de la alimentación y el desarrollo de cataratas lenticular en ciertas especies de peces (Walton *et al.*, 1982; Keembiyehetty y Gatlin, 1993). Así mismo, podría inhibir la participación de metionina en la síntesis de proteínas. Mientras que el exceso causa pobre crecimiento, mala absorción y bajo aprovechamiento de otros aminoácidos. Probablemente, el nivel excesivo de metionina conduce a la acumulación y la oxidación de metionina a cetonas y otros metabolitos tóxicos que causan efectos adversos sobre el crecimiento (Murthy y Varghese, 1998). Además, de alterar la concentración de aminoácidos libres en el plasma (Hidalgo *et al.*, 1987; Griffin *et al.*, 1994; Schwarz *et al.*, 1998; Twibell *et al.*, 2000).

Los requerimientos cuantitativos de AAE en peces, tradicionalmente han sido determinados mediante el suministro de dietas experimentales en las que se incluyen niveles graduales de cada aminoácido, de tal modo que se obtienen las curvas de crecimiento respectivas (Ketola, 1982; Cowey y Luquet, 1983; Wilson, 1985). Para estimar un requerimiento es necesario que el perfil de aminoácidos de la dieta se balancee de tal modo que simule el perfil de aminoácidos de referencia. En las dietas de prueba usadas para determinar los requerimientos de aminoácidos, el componente proteínico es suministrado casi en su totalidad en forma de aminoácidos cristalinos o en combinación con fuentes proteínicas “completas” selectas (normalmente caseína, gelatina, zeína, gluten o harina de pescado). Por lo que, es común el uso de dietas purificadas y semipurificadas (Wilson y Halver, 1986).

Hasta el momento, son pocos los estudios realizados para determinar el requerimiento de metionina para peces. A continuación, se detallan una serie de investigaciones que presentan los requerimientos de metionina en algunos peces marinos, que al igual que los lutjánidos tienden a requerir un alto consumo de proteínas en su alimentación.

Thebault *et al.* (1985), realizaron un experimento para determinar el requerimiento de metionina en juveniles de róbalo (*Dicentrarchus labrax*), formularon 4 dietas practicas con 50 % de proteína y 12 % de lípidos crudos. Cada dieta con un nivel distinto de inclusión de L-metionina (0.67, 1.00, 1.30 y 1.60 g por 100 g de dieta). Los autores utilizaron harina de pescado, levadura, harina de soya como fuentes de proteína. El experimento se realizó en 8 tanques, con 20 organismos cada uno (peso promedio inicial de  $35 \pm 5$  g), durante un periodo de 85 días. El requerimiento óptimo para el máximo crecimiento fue de 1.3 g por 100 g de dieta.

Por su parte, Ruchimat *et al.* (1997) elaboraron y evaluaron 6 dietas prácticas con 43 % de proteína y 12 % de lípidos para juveniles de medregal del Japón (*Seriola quinqueradiata*). Cada dieta con un nivel distinto de inclusión de L-metionina (0.57, 0.77, 0.98, 1.20, 1.38 y 1.58 g por 100 g de dieta). Utilizaron harina de pescado, concentrado de proteína de soya, gelatina, harina de trigo y una mezcla de aminoácidos cristalinos como fuentes de proteína. El experimento se realizó en 12

tanques, con 20 organismos cada uno (peso promedio inicial de 23.3 g), durante un periodo de 30 días. La concentración de metionina en el cuerpo del pez fue de 0.94 g (43 g de proteína cruda). El requerimiento obtenido óptimo para el máximo crecimiento fue de 1.11 g por 100 g de dieta.

Luo *et al.* (2005), evaluaron en juveniles de mero de pintas naranjas (*Epinephelus coioides*) dietas con 48 % de proteína y 9 % de lípidos. Cada dieta con un nivel distinto de inclusión L-metionina (0.55, 0.84, 1.11, 1.34, 1.59 y 1.81 g por 100 g de dieta). Utilizaron harina de pescado, concentrado proteico de soya y una mezcla de aminoácidos cristalinos como fuentes de proteína. El experimento se realizó por triplicado, en 18 tanques, cada uno con 25 organismos (peso promedio inicial de  $13.25 \pm 0.19$  g), durante un periodo de 8 semanas. La concentración de metionina en el tejido del músculo del organismo fue de 1.62 g (48 % de proteína cruda). El requerimiento óptimo para el máximo crecimiento fue estimado en 1.31 g por 100 g de dieta.

Mai *et al.* (2006) evaluaron dietas con 43 % de proteína y 12 % lípidos en juveniles de corvina amarilla (*Pseudosciaena crocea*). Cada dieta con un nivel distinto de inclusión L-metionina (0.66, 0.89, 1.13, 1.41, 1.67 y 1.89 g por 100 g de dieta). Utilizaron harina de pescado, harina de soya, harina de trigo, levadura y una mezcla de aminoácidos cristalinos como fuentes de proteína. El experimento se realizó por triplicado, en 18 tanques, cada uno con 10 organismos (peso promedio inicial de  $1.23 \pm 0.02$  g), durante un periodo de 10 semanas. El contenido de metionina en el músculo para 43 % de proteína cruda fue de 1.33 g. El requerimiento óptimo para el máximo crecimiento fue estimado en 1.44 g por 100 g de dieta.

Zhou *et al.* (2006) evaluaron 6 dietas prácticas con 44 % de proteína y 16 % de lípidos en juveniles de cobia (*Rachycentron canadum*). Cada dieta con un nivel distinto de inclusión de L-metionina (0.61, 0.83, 1.05, 1.30, 1.48 y 1.68 g por 100 g de dieta). Utilizaron harina de pescado, harina de gluten de maíz, harina de trigo y una mezcla de aminoácidos cristalinos como fuentes de proteína. El experimento se realizó en 18 tanques, con 20 organismos cada uno (peso promedio inicial de  $11.61 \pm 0.16$  g),

durante un periodo de 56 días. El requerimiento óptimo para el máximo crecimiento fue de 1.19 g por 100 g de dieta.

Yan *et al.* (2007) evaluaron 6 dietas prácticas con 49 % de proteína y 10 % de lípidos en juveniles de perca negra (*Sebastes schlegelii*). Cada dieta con un nivel distinto de inclusión de L-metionina (0.58, 1.08, 1.58, 2.08, 2.58 y 3.08 g por 100 g de dieta). Utilizaron harina de pescado y una mezcla de aminoácidos cristalinos como fuentes de proteína. El experimento se realizó en 18 tanques, con 5 organismos cada uno (peso promedio inicial de  $43.61 \pm 0.37$  g), durante un periodo de 65 días. El contenido de metionina en el músculo para 49 % de proteína cruda fue de 2.05 g. El requerimiento óptimo para el máximo crecimiento fue de 1.37 g por 100 g de dieta.

Zhou *et al.* (2011) evaluaron en juveniles de besugo negro (*Sparus macrocephalus*) dietas con 38 % de proteína y 14 % de lípidos. Cada dieta con un nivel distinto de inclusión L-metionina (0.75, 1.09, 1.41, 1.72, 2.06 y 2.35 g por 100 g de dieta). Utilizaron harina de pescado, concentrado de proteína de soya y una mezcla de aminoácidos cristalinos como fuentes de proteína. El experimento se realizó por triplicado, en 18 tanques, cada uno con 20 organismos (peso promedio inicial de  $14.21 \pm 0.24$  g), durante un periodo de 8 semanas. El contenido de metionina en el músculo para 38 % de proteína cruda fue de 1.45 g. El requerimiento para el máximo crecimiento fue de 1.72 g por 100 g de dieta.

Niu *et al.* (2013) evaluaron en juveniles de pompano (*Trachinotus ovatus*) dietas con 43 % de proteína y 12 % de lípidos. Cada dieta con un nivel distinto de inclusión DL-metionina (0.86, 0.92, 1.04, 1.15, 1.32 y 1.45 g por 100 g de dieta). Utilizaron harina de pescado, harina de gluten de maíz, harina de soya, harina de cacahuate, concentrado de proteína de soya, harina de trigo y una mezcla de aminoácidos cristalinos como fuentes de proteína. El experimento se realizó por triplicado, en 18 tanques, cada uno con 20 organismos (peso promedio inicial de  $12.40 \pm 0.02$  g), durante un periodo de 56 días. El contenido de metionina en el músculo para 43 % de proteína cruda fue de 1.13 g. El requerimiento óptimo para el máximo crecimiento fue 1.06 g por 100 g de dieta.

Chu *et al.* (2014) evaluaron dietas con 44 % de proteína y 12 % de lípidos en juveniles de botia (*Myxocyprinus asiaticus*). Cada dieta con un nivel distinto de inclusión de L-metionina (0.64, 0.89, 1.15, 1.39, 1.65 y 1.89 g por 100 g de dieta). Utilizaron harina de pescado, harina de soya fermentada y una mezcla de aminoácidos cristalinos como fuente de proteína. El experimento se realizó por triplicado, en 21 tanques, cada uno con 30 organismos (peso promedio inicial de  $1.72 \pm 0.05$  g), durante un periodo de 8 semanas. El contenido de metionina en el músculo para 44 % de proteína cruda fue de 1.18 g. El requerimiento para el máximo crecimiento fue estimado en 1.41 g por 100 g de dieta.

Ahmed (2014) evaluó dietas con 40 % de proteína en juveniles de bagre indio (*Heteropneustes fossilis*). Cada dieta con un nivel distinto de inclusión de L-metionina (0.30, 0.55, 0.80, 1.05, 1.30 y 1.55 por 100 g de dieta). Utilizaron caseína, gelatina y una mezcla de aminoácidos cristalinos como fuente de proteína. El experimento se realizó por triplicado en 18 tanques, cada uno con 20 organismos (peso promedio inicial de  $4.33 \pm 0.52$  g), durante un periodo de 8 semanas. El requerimiento para el máximo crecimiento fue estimado en 1.09 g por 100 g de dieta.

Los factores principales que afectan el requerimiento de aminoácidos, son la especie, talla, ingredientes dietas, palatabilidad, régimen alimenticio y condiciones ambientales. Así mismo, el exceso de metionina también puede generar una acumulación y oxidación de metionina, produciendo cetonas y otros metabolitos tóxicos que afectan el crecimiento y conversión alimenticia. La desproporcionada cantidad de metionina también afecta la absorción y utilización de otros aminoácidos.

## **2.10. Eficiencia de la DL-Metionina**

Los aminoácidos que se encuentran en las proteínas son de la serie L, por lo que, estos son los que tienen una mayor participación en el metabolismo celular. Cabe mencionar que las formas L, con ciertas excepciones, son las utilizadas por las especies biológicas. Mientras que, los de la serie D se hallan en pequeños péptidos de las paredes celulares de las bacterias y en algunos antibióticos peptídicos (Armstrong y Bennett, 1982; Fornaguera y Gómez, 2004).

En ciertos casos y previa transformación a la forma L correspondiente, los animales disponen de enzimas capaces de utilizar la forma D, tal es el caso de la metionina en el que ambas formas son igualmente procesables. La metionina es uno de los aminoácidos de síntesis disponible para la fabricación de piensos. El uso de metionina sintética ayuda a disminuir los costos de formulación al suplementar el requerimiento de aminoácidos azufrados (metionina y cistina). En el mercado existen dos fuentes principales de esta familia de aminoácidos la DL-Metionina y metionina hidroxianáloga, ácido libre en forma líquida (MHA-FA), ambos productos son producidos por síntesis química. La DL-Metionina es un producto en polvo compuesto por un 99 % de metionina y 1% agua, está es una mezcla racémica de 50% de L-Metionina y D-Metionina. La D-Metionina de la DL-Metionina es convertida dentro del organismo de los animales a L-Metionina. Este proceso se da por medio de una transformación bioquímica por un keto-intermediario y la acción de enzimas de tipo oxidasas y dehidrogenasas que están presentes en grandes cantidades en el hígado, riñón, mucosa intestinal y músculo esquelético (Gordon y Sizer 1965; Dibner y Knight 1984; Dupuis *et al.* 1989; Dibner e Ivey, 1992), por lo que, la D-metionina es absorbidas de una manera muy eficiente por los animales.

### **2.11. Índices biológicos corporales en peces**

El factor de condición (FC) es utilizado para comparar la condición de salud de un pez o población, basándose en que los peces de mayor peso a una determinada longitud presentan una mejor condición (Froese, 2006). Por otro lado, el índice viscerosomático (IVSI) e índice hepatosomático (HSI) son indicadores biológicos que se han adaptado en los últimos años para medir el efecto nutricional de dietas experimentales en distintos organismos (Silveira, 2005). Cuanto más grande sea valor de HSI mejor será la condición nutricional del pez (Collins y Anderson, 1995).

### **2.12. Hematología en peces y química sanguínea**

La fisiología de la sangre frecuentemente se considera como un índice esencial para saber el estado de salud de peces (Mohammed y Sambo, 2007). Los parámetros sanguíneos en los peces indican su estado fisiológico y sirve para evaluar el

desbalance nutricional que pueden presentar durante el cultivo (Hrubec *et al.*, 2000). Mientras que las alteraciones en los parámetros hematológicos son considerados indicadores de la calidad de la dieta (Klinger *et al.*, 1996).

Las técnicas hematológicas se convierten en una herramienta diagnóstica y un apoyo en el estudio de diferentes aspectos de cultivo y la biología de las diferentes especies de peces, proveen información acerca de valores ya establecidos, así como cambios en las características del agua y estados de contaminación a los que son sometidos (Conroy, 1989; Hrubec *et al.*, 2000). Por este motivo, los análisis hematológicos son utilizados en diversos trabajos como herramienta para determinar el efecto en la salud de los organismos cuando son alimentados con dietas deficientes desde el punto de vista nutricional.

### **2.13. Composición de aminoácidos en el músculo del pez**

Mai *et al.* (2006) mencionan que la deficiencia de metionina en la dieta, podría inhibir la participación de la metionina en la síntesis de proteína y reducir su nivel de reserva de aminoácidos en el músculo.

Luo *et al.* (2005) obtuvieron en juveniles de mero alimentados con dietas con un alto nivel de metionina presentan una concentración alta de AAE en el músculo, y dietas con nivel bajo de metionina presentan una baja. Los autores mencionan que los resultados obtenidos son producto de la restricción dietética de uno de los AAE lo que causa un aumento en la oxidación de otros aminoácidos esenciales y no esenciales presentes en el nivel normal en las dietas.

### 3. JUSTIFICACIÓN ACADÉMICA

Dentro de los recursos pesqueros de interés se encuentran el pargo flamenco *Lutjanus guttatus* (Steindachner, 1869), especie importante por presentar una gran capacidad de adaptación y reproducción bajo condiciones de cautiverio, así como un gran potencial de cultivo y valor comercial (Ibarra-Castro y Duncan, 2007). Para que, su cultivo sea sostenible, debe efectuarse un adecuado control y manipulación de la especie y cubrir adecuadamente sus requerimientos nutricionales.

La harina de pescado es considerada la base de muchos alimentos comerciales para peces debido a la palatabilidad, valor nutritivo y alto contenido proteínico que presenta, sin embargo, los altos costos, variaciones en la calidad y la alta demanda que existe para este tipo de productos han orillado a los productores a buscar fuentes proteicas alternas (vegetales y animales) que permitan disminuir su uso (El-Sayed, 1999). No obstante, muchas fuentes alternativas presentan deficiencia de uno o más aminoácidos, generando un bajo aprovechamiento del alimento. Por lo que para optimizar el uso de fuentes alternativas es necesario conocer las necesidades nutricionales de las distintas especies.

La metionina es un aminoácido esencial que puede llegar a convertirse en uno de los principales aminoácidos limitantes si no hay suficiente. Es uno de los principales elementos de consolidación de las proteínas implicadas en la formación de células y tejidos, participa en la síntesis de proteínas y otras moléculas, es fuente de azufre para el cuerpo y tiene diversas funciones en el organismo. Hasta el momento no existen estudios que determinen el requerimiento de metionina para la alimentación del pargo flamenco *Lutjanus guttatus*, por lo que, es necesario determinar su requerimiento.

El presente estudio permitirá generar conocimiento sobre el tema, aprovechar mejor las fuentes proteicas que presenten deficiencia en metionina, mejorar la calidad proteica de las dietas y mantener un adecuado crecimiento y estado de salud en los peces.

#### **4. HIPOTESIS**

Diferentes niveles de metionina en la dieta del pargo flamenco (*Lutjanus guttatus*), en un intervalo de 0.72 a 2.32 %, permitirán identificar el requerimiento de metionina que favorece la utilización de alimento, crecimiento y estado de salud del pez.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1. Objetivo General

Determinar el requerimiento de metionina para el mejor crecimiento de juveniles de pargo flamenco *Lutjanus guttatus* (Steindachner, 1869).

### 5.2. Objetivos específicos

1. Evaluar el efecto de las diferentes niveles de metionina en la dieta para *Lutjanus guttatus*, en términos de crecimiento, supervivencia y eficiencia alimenticia.
2. Evaluar el estado de salud del pargo flamenco mediante un análisis histológico (ojo) y el análisis de los parámetros hematológicos (hematocrito, hemoglobina, proteína total, triglicéridos, colesterol y glucosa) e índices biológicos corporales (viscerosomático, hepatosomático y factor de condición).
3. Evaluar la concentración de metionina en el músculo del pargo flamenco (*Lutjanus guttatus*).
4. Determinar el requerimiento de metionina necesario para un óptimo crecimiento de juveniles de pargo flamenco.

## **6. MATERIALES Y MÉTODO**

### **6.1. Análisis proximal**

Los análisis proximales de las materias primas se realizaron en el Laboratorio de Bromatología del CIAD unidad Mazatlán, mediante el uso de las técnicas estándar de la Association Of Official Analytical (AOAC, 2011). Así mismo, se analizaron las dietas, cuerpo y músculo de los peces al inicio y final del experimento.

#### **6.1.1. Análisis de proteínas**

La proteína se determinó por el método Kjeldahl AOAC 12.1.07 (2011), utilizando un equipo de digestión y destilación LABCONCO 65000.

#### **6.1.2. Análisis de lípidos**

Los lípidos se determinaron por el método de grasa cruda de Randall AOAC 4.5.05 (2011), usando éter de petróleo como solvente en un equipo MicroSoxtec System (Foss Tecator).

#### **6.1.3. Análisis de cenizas**

El contenido de cenizas se determinó por el método de calcinación AOAC 32.1.05 (2011), usando una mufla (Fisher Scientific, Reino Unido) a 550°C, durante 12 horas.

#### **6.1.4. Análisis de humedad**

El contenido de humedad se determinó por el método gravimétrico “perdida en el secado de alimentos” AOAC 4.1.06 (2011), usando un horno CRAFT ESP (CRAFT, China) a 105°C durante 12 horas.

#### **6.1.5. Análisis proximal corporal y muscular**

Para el análisis proximal corporal inicial se usó una muestra de 10 peces, todos pertenecientes al lote original usado en el experimento. Mientras que, para el análisis corporal final se usó una muestra de 9 peces por dieta (tres organismos por tanque). Los análisis proximales iniciales y finales del músculo se realizaron de acuerdo con el criterio mencionado. Los peces obtenidos fueron sacrificados por inmersión térmica y

homogéneos en un molino para muestras húmedas FOSS Knifetec 1095 (FOSS Scino Co., China). Las muestras fueron analizadas siguiendo las técnicas oficiales de la AOAC (2011).

## **6.2. Determinación de aminoácidos**

El perfil de aminoácidos se determinó de acuerdo con la técnica de Vázquez-Ortiz *et al.* (1995) para la detección y cuantificación de aminoácidos por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC por sus siglas en inglés). Este análisis se realizó a las dietas experimentales y músculo del pez. Para el análisis de aminoácidos se usó un equipo Varian Pro-Star modelo 510, para la preparación de las muestras fue necesario una hidrólisis y una derivatización.

### **6.2.1. Hidrólisis**

Aproximadamente 3 gr de la muestra se somete a la eliminación de humedad y grasa por los métodos establecidos por la AOAC, 4.1.06 y 4.5.05 respectivamente. Se pesan 3 mg de la muestra y se colocan en tubos para hidrólisis (Pierse 29560), se les adiciona 3 ml de HCL 6 M. Después se aplica vacío durante 3 min para posteriormente poner los tubos en un baño seco a 110 °C durante 12 horas. Para la eliminación del HCL 6 M y la obtención de la muestra, se procede a la rota evaporación de las mismas a una temperatura de 65°C (Brinkmann Buchi RE 121), mediante un lavado con agua destilada. Posteriormente la muestra se recoge con buffer de citrato de sodio pH 2.2.

### **6.2.2. Derivatización**

Se toma una alícuota de 100 µl del hidrolizado y se le añade 40 µl de estándar interno 2.5 µmol/ml, este se afora a 1 ml con buffer de citrato de Sodio pH 2.2. Después Se procede a tomar 250 µl del diluido y 250 µl de solución de o-ftaldehido (OPA) en una jeringa para cromatografía. La mezcla de estas dos soluciones debe durar un tiempo exacto de 2 minutos para inmediatamente ser pasado por un filtro (0.2 µm), por último se toma 10 µl del derivado y se eluye a 1 ml min<sup>-1</sup> en un cromatógrafo líquido con detector de fluorescencia (VARIAN ProStar, Alemania), equipado con una columna tipo C-18 a 40 °C, usando una mezcla tampón de acetato de sodio 0.1 M (pH = 7.2): metanol: tetrahidrofurano 900:90:10 (v:v:v) como disolvente A y se utiliza metanol como

disolvente B. el gradiente será: 100% de A (0-0.5 min), 85% de A (0.5-6.5 min), 55% de A (6.5-18 min), 20% de A (18-23 min) y 0% de A (23-30 min). La concentración de AA se determina usando el detector de fluorescencia a longitudes de onda de excitación y emisión de 340 y 455 nm, respectivamente y un estándar de AA de concentración conocida (Agilent Tehnologies, Alemania).

### 6.3. Formulación de las dietas experimentales

Se formularon 5 dietas experimentales a 45 % de proteína y 12 % de lípidos, con 5 niveles distintos de metionina (0.72 %, 1.12 %, 1.52 %, 1.92 % y 2.32 %) (0 %, 0.4 %, 0.8 %, 1.2 % y 1.6 % de DL-Metionina) suplementadas con una mezcla de aminoácidos cristalinos para balancear. Para la correcta formulación de la dietas, fue necesario obtener un contenido de metionina más bajo que el presente en el perfil del cuerpo del pez. Por lo que, para ajustar el nivel de metionina en la dieta fue necesario bajar el % de HP en la dieta y utilizar fuentes alternativas con bajo contenido de metionina (colágeno hidrolizado, harina de trigo integral, concentrado proteico de soya). En la Tabla 2 se muestra la composición proximal de las materias primas con las que se formularon las dietas. Se incluyo aceite de pescado como fuente de lípidos; el nivel de inclusión de lecitina de soya, carotenoides, antioxidantes, vitamina C, premezcla de minerales y premezcla de vitaminas se mantuvo constante en las dietas. Se utilizó alginato como aglutinante y almidón para ajustar al 100 %.

**Tabla 2.** Composición proximal de las materias primas de las dietas utilizadas para la alimentación del pargo flamenco.

Materias primas	Composición proximal (% en base seca)				
	Materia seca	Proteína	Lípidos	Cenizas	ELN
HP <sup>a</sup>	91.77 ±0.03	67.66±0.70	6.9±0.14	18.39±0.14	7.05±0.78
CPS <sup>b</sup>	93.98 ±0.09	64.34±1.15	0.72±0.03	6.30±0.01	28.64±0.02
HTI <sup>d</sup>	88.78 ±0.2	14.51±0.43	0.94±0.07	1.74±0.02	82.81±0.02

Los valores son la media ± SD, n=3.

ELN (Extracto libre de nitrógeno) incluye fibra.

ELN= (100 – (% proteína + % lípidos + % cenizas).

HP(Harina de pescado), CPS(Concentrado proteico de soya), HTI (Harina integral de trigo).

a Selecta de Guaymas, S.A. de C.V., Guaymas, Sonora, México.

b Vimifos, S.A. de C.V., Guadalajara, Jalisco, México.

d Malta Texo de México (Malta Cleyton), S.A. de C.V., Guadalajara, Jalisco, México.

e Droguería Cosmopolita. S.A. de C.V., México, D.F.

Valor teórico del Colágeno hidrolizado<sup>e</sup>: Materia seca 88 %, proteína 85.90 %, lípidos 0.1 % (NRC, 2011).

La Tabla 3 muestra la formulación y la composición proximal de las dietas, respetando los requerimientos de lípidos y proteínas establecidos para *Lutjanus guttatus* (Abdo *et al.* 2010; Hernández *et al.*, 2010). Mientras que la Tabla 4 muestra la composición de aminoácidos en la dieta.

**Tabla 3.** Formulación y composición proximal de las dietas utilizadas para la alimentación del pargo flamenco.

Ingredientes (g/kg <sup>-1</sup> )	Dietas				
	D1 MET- 0.72	D2 MET- 1.12	D3 MET- 1.52	D4 MET- 1.92	D5 MET- 2.32
Harina de pescado	12.1	12.1	12.1	12.1	12.1
Concentrado proteico de soya	22.1	22.1	22.1	22.1	22.1
Harina de trigo integral	28	28	28	28	28
Gelatina	17.1	17.1	17.1	17.1	17.1
Aceite de pescado	9.23	9.23	9.23	9.23	9.23
Almidón	1.17	1.17	1.17	1.17	1.17
Aminoácidos mix	2.84	2.84	2.84	2.84	2.84
Ácido glutámico	1.6	1.2	0.8	0.4	0
<b>Metionina</b>	0	0.4	0.8	1.2	1.6
Premezcla de vitaminas	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6
Premezcla de minerals	0.23	0.23	0.23	0.23	0.23
Carotenoides	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08
Antioxidantes	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
Lecitina de soya	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
Vitamina C	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Colina	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Fosfato dibásico de calcio	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Alginato	3	3	3	3	3
<b>Composición (% en base seca)</b>					
Materia seca	89.96 ± 0.21	89.96 ± 0.07	90.58 ± 0.02	89.92 ± 0.03	90.02 ± 0.05
Proteína	48.48 ± 0.54	48.96 ± 0.66	48.35 ± 0.38	48.42 ± 0.34	48.55 ± 0.22
Lípidos	11.45 ± 0.07	11.14 ± 0.02	10.61 ± 0.13	10.58 ± 0.18	10.88 ± 0.07
Cenizas	5.63 ± 0.22	5.81 ± 0.06	5.70 ± 0.15	5.76 ± 0.12	5.71 ± 0.14
ELN	34.43 ± 0.73	34.09 ± 0.63	35.33 ± 0.41	35.24 ± 0.32	34.86 ± 0.48

Los valores son la media ± SD, n=3.

**Tabla 4.** Composición de aminoácidos de las dietas experimentales utilizadas para la alimentación del pargo flamenco.

Aminoácidos	g de aminoácidos en 100 g de dieta				
	D1-MET-0.72	D2-MET-1.12	D3-MET-1.52	D4-MET-1.92	D5-MET-2.32
Arginina	1.43±0.22	1.26±0.03	1.22±0.02	1.57±0.36	1.65±0.21
Fenilalanina	2.67±0.03	2.40±0.25	2.10±0.16	2.62±0.13	2.79±0.31
Histidina	0.74±0.02	0.74±0.06	0.76±0.05	0.88±0.11	0.76±0.05
Isoleucina	1.09±0.01	1.14±0.03	1.15±0.07	1.09±0.8	1.13±0.02
Leucina	3.27±0.25	3.60±0.14	3.00±0.31	3.06±0.06	3.64±0.06
Metionina	0.71±0.02	1.12±0.00	1.52±0.00	2.32±0.07	2.67±0.05
Treonina	10.22±0.31	9.48±0.19	10.54±0.29	9.37±0.33	9.69±0.01
Valina	2.28±0.30	1.99±0.08	2.13±0.20	2.34±0.22	2.66±0.27
Ácido aspártico	4.05±0.03	5.17±0.27	4.65±0.21	4.09±0.13	3.21±0.18
Ácido glutámico	5.07±0.59	4.67±0.01	4.29±0.06	3.70±0.03	3.11±0.31
Alanina	4.49±0.31	5.03±0.10	4.28±0.27	4.49±0.44	3.92±0.30
Glicina	0.85±0.04	0.44±0.02	0.41±0.03	0.62±0.05	0.65±0.03
Lisina	3.66±0.11	3.29±0.29	4.01±0.24	3.98±0.18	3.88±0.15
Serina	2.52±0.35	2.85±0.03	2.56±0.24	2.34±0.16	2.82±0.07
Tirosina	3.99±0.05	4.26±0.14	3.23±0.34	3.55±0.31	3.64±0.09

Los valores son la media ± SD, n=3

#### 6.4. Preparación de las dietas experimentales

Las dietas experimentales se elaboraron en la Planta de Alimentos del CIAD-Unidad Mazatlán, de acuerdo con el protocolo establecido por Hernández *et al.* (2010). Primero se molieron las harinas en un pulverizador marca Micrón equipado con un tamiz de 250 µm. Posteriormente fueron pesados cada uno de los ingredientes de acuerdo con la formulación, en una balanza Mettler PM4800-Delta Ranger con precisión de 0.001 g y colocados en bolsas por separado para cada dieta. Después, los ingredientes de cada dieta se homogenizaron usando una mezcladora marca Hobart, modelo AT-200 de 5 kg de capacidad. Primero se mezclaron las harinas, posteriormente se les adicionó la premezcla de aminoácidos cristalinos, vitaminas, minerales y el aglutinante, seguido del aceite de hígado de bacalao, hasta formar una mezcla homogénea. La mezcla obtenida se peletizó en un triturador para carne marca TORREY, se secó en un secador de aire forzado (37°C) y cortó manualmente. Los pellets obtenidos fueron recibidos en

charolas tipo cernidores y etiquetados para su identificación. Una vez secas totalmente las dietas, se colocaron en bolsas de plástico etiquetadas y se almacenaron en un cuarto frío a una temperatura de 4 °C, con el fin de mantenerlas en buen estado hasta el momento de su utilización.

### **6.5. Organismos experimentales**

Los juveniles del pargo flamenco (*Lutjanus guttatus*) fueron proporcionados por la planta piloto de producción de peces marinos del CIAD Mazatlán.

### **6.6. Sistema experimental**

Para la realización de la evaluación de las dietas (bioensayo crecimiento) se utilizó un sistema experimental de 15 tanques circulares de fibra de vidrio color negro y fondo blanco, con una capacidad de 300 L cada uno. El drenaje central fue de 50 mm, mientras que la aireación y el flujo de agua (5 L min<sup>-1</sup>) eran continuos. Se utilizaron piedras difusoras de poro fino, para una mejor dispersión del aire en el agua. El agua del mar fue bombeada desde playa “Las brujas-Mazatlán” y transportada a través de filtros de arena y cartuchos. Cada tanque fue cubierto con malla sombra, misma que proporcionaba luz, evitaba la salida de los peces y facilitaba la limpieza de los tanques.

### **6.7. Parámetros ambientales**

Durante la realización del bioensayo se monitorearon y registraron mediante un refractómetro y un oxímetro los siguientes parámetros: temperatura 31.01 ±0.2 °C, oxígeno disuelto 5.6 ± 0.2 mg L<sup>-1</sup> y salinidad 34.8 ± 0.1 ‰.

### **6.8. Diseño experimental**

Las dietas se evaluaron por triplicado durante un periodo de 12 semanas; se emplearon 225 organismos con un peso inicial de 7.33 ± 0.01 g. El sistema experimental contó con un total de 15 tanques, en cada uno se colocaron 15 organismos, dando un total de tres réplicas por tratamiento. La distribución de los tratamientos se realizó al azar mediante sorteo sin remplazo, por lo que fue necesario etiquetar los tanques para su identificación.

## 6.9. Alimentación

Los organismos fueron alimentados a saciedad aparente tres veces al día (9:00 a.m., 1:00 p.m. y 5:00 p.m.), registrándose diariamente el consumo por tanque. Se les dio un periodo de aclimatación de 3 días.

## 6.10. Evaluación biológica

La evaluación biológica de peso y talla se realizó cada 14 días durante un periodo de 12 semanas, los peces eran capturados de los tanques con redes de cuchara y anestesiados con una solución de esencia de clavo a una concentración de 0.25 ml L<sup>-1</sup>. Los peces eran pesaron individualmente en una balanza analítica con precisión de 0.1 gramo, y la talla era obtenida mediante ictiómetro convencional.

### 6.10.1. Índices de crecimiento y utilización de alimento

Al finalizar la evaluación biológica, se calcularon los siguientes índices:

#### ➤ **Peso ganado**

PG = Peso promedio final – Peso promedio inicial

#### ➤ **Tasa de crecimiento (TC)**

$$TC (\%) = \frac{(\text{Peso final} - \text{Peso inicial})}{(\text{Peso Inicial})} \times (100)$$

#### ➤ **Tasa de crecimiento específica (TCE)**

$$TCE (\%) = \frac{(\ln \text{ peso final} - \ln \text{ peso inicial})}{(\text{Días})} \times (100)$$

#### ➤ **Supervivencia (%)**

$$S\% = \frac{\text{No. Final de organismos}}{\text{No. Inicial de organismos}} \times 100$$

#### ➤ **Tasa de conversión alimenticia (TCA)**

$$TCA = \frac{\text{Alimento consumido (g)}}{\text{Peso ganado (g)}}$$

➤ **Índice de eficiencia proteica (IEP)**

$$\text{PER} = \frac{\text{Peso ganado (g)}}{\text{Consumo de proteína (g)}}$$

**6.11. Índices biológicos corporales**

- Al terminar el experimento y 24 horas después de la última alimentación se seleccionaron dos peces por tanque para la determinación de los índices viscerosomático (VSI), hepatosomático (HSI), factor de condición (CF) y relación de grasa intraperitoneal (IPF), donde cada pez fue pesado y medido individualmente, tanto las vísceras como el hígado por separado.

**6.11.1. Cálculos de los índices biológicos corporales**

➤ **Índice viscerosomático**

$$\text{VSI} = \frac{\text{Peso de las vísceras (g)} \times 100}{\text{Peso corporal total}}$$

➤ **Índice hepatosomático**

$$\text{HSI} = \frac{\text{Peso del hígado (g)} \times 100}{\text{Peso corporal total}}$$

➤ **Factor de condición**

$$\text{FC} = \frac{\text{Peso corporal (g)} \times 100}{(\text{Longitud del cuerpo cm})^3}$$

➤ **Relación de grasa intraperitoneal**

$$\text{IPF} = \frac{\text{Peso húmedo grasa (g)} \times 100}{\text{Peso total del cuerpo (g)}}$$

## **6.12. Parámetros hematológicos**

Los peces fueron anestesiados con esencia de clavo (50 % de esencia de clavo y 50 % de alcohol). La extracción de la sangre al inicio y al final del bioensayo se obtuvo directamente de la vena caudal con jeringas para Tuberculina marca TERUMO de 1 ml. La sangre obtenida se depositó en tubos con K2EDTA de la marca BD Microtainer para obtener después la concentración de hemoglobina. Para el hematocrito, la sangre se recolectó directamente en los tubos capilares para hematocrito esto de acuerdo con la técnica descrita por Del Rio-Zaragoza *et al.* (2008). Para la determinación de la química sanguínea el resto de la sangre se colocó en tubos Eppendorf, y mediante el uso de una centrifuga se logró obtener el suero, para determinar posteriormente el resto de los análisis. La muestra de sangre inicial se obtuvo de una muestra de 10 peces. Las muestras de sangre obtenidas al final del experimento fueron extraídas de todos los peces de cada tratamiento. Los peces no se alimentaron durante 24 horas previas a la extracción de sangre.

### **6.12.1. Hematocrito**

Se tomaron muestras de sangre en tubos para hematocrito hasta completar 2/3 del tubo, se tapó un extremo con plastilina y se colocó en posición vertical. El tubo se centrifugó en una centrifuga SOL-BAT P600 por 10 minutos a 7000 rpm. Posteriormente se determinó el paquete celular con respecto al volumen total con un lector para microhematocrito SOL-BAT (Del Rio-Zaragoza *et al.*, 2008).

### **6.12.2. Hemoglobina**

La concentración de la hemoglobina se determinó mediante un kit colorimétrico (marca RANDOX laboratorios LTD, Reino Unido), basado en el método de cianometahemoglobina, por lo que se tomó 10 µl de sangre heparinizada de los tubos microtainer almacenados a -20 C y se hizo reaccionar con 2.5 ml de reactivo, se dejó reposar por un periodo de 3 min a temperatura ambiente y con un espectrofotómetro se determinó su absorbancia a una longitud de onda de 540 nm. Se comparó contra agua destilada. (Del Rio-Zaragoza *et al.*, 2008).

$$\text{Concentración de hemoglobina} = \text{Abs muestra} \times 36.77 \text{ g/dl}$$

### 6.12.3. Proteína plasmática

La proteína total se determinó del suero sanguíneo con ayuda de un kit colorimétrico (Bio Systems) basado en el método de Biuret y un espectrofotómetro, las lecturas de las muestras se realizaron a una longitud de onda de 540 nm, en la cual la cantidad de proteínas en la sangre es directamente proporcional a la intensidad de color (Del Rio-Zaragoza *et al.*, 2008). Se utilizó agua destilada como blanco y una solución de concentración conocida como patrón de referencia.

Cálculos:

$$\frac{A_{\text{muestra}}}{A_{\text{patrón}}} \times C_{\text{patrón}} = C_{\text{muestra}}$$

Donde;

Amuestra = Absorbancia de muestra

CPatron = Concentración del patrón

APatron = Absorbancia del patrón

CMuestra = Concentración de muestra

### 6.12.4. Triglicéridos

Los triglicéridos fueron hidrolizados por una lipasa específica liberando ácidos grasos y glicerol. El procedimiento se llevó a cabo siguiendo las indicaciones del kit (Grupo Mexlab, México). El cual consiste en hacer reaccionar 1 ml de reactivo con 0.01 ml de suero y después dejar reposar a temperatura ambiente por 10 min, leer por espectrofotometría a una longitud de onda de 545 nm, usando reactivo como blanco. Se prepara un estándar para la cuantificación de triglicéridos con una solución de concentración conocida.

$$\text{Triglicéridos (mg dl}^{-1}\text{)} = \frac{\text{Absorbancia de la muestra}}{\text{Absorbancia estándar}} \times 200$$

### 6.12.5. Colesterol

El colesterol fue determinado por acción de las enzimas Colesterol ester hidrolasa y Colesterol oxidasa, mediante el kit Colesterol Total LS (Grupo Mexlab, México). El cual consiste en hacer reaccionar 1 ml de reactivo con 0.01 ml de suero y después dejar reposar 10 min a temperatura ambiente (>20°C), se lee por espectrofotometría a una

longitud de onda de 500-550 nm, usando reactivo como blanco. Se prepara un estándar para la cuantificación de colesterol con una solución de concentración conocida.

$$\text{Factor} = \frac{200}{\text{Absorbancia Standard}}$$
$$\text{Colesterol (mg/dL)} = \text{Factor} \times \text{Absorbancia desconocida}$$

#### **6.12.6. Glucosa**

La glucosa fue determinada mediante el método GOD-PAD enzimático colorimétrico utilizando un kit estándar Randox LABORATORIES LTD (Antrim-Reino Unido), se leyó a una longitud de onda de 500-546 nm, se midió frente a un blanco posteriormente se pipeteó en un tubo de ensayo 10 ml de sangre y 1000 ml reactivo (muestra), en otro tubo de ensayo se agregó 1000 ml del reactivo (blanco). Se mezcló bien y se incubó por 10 min a 37 C, por último se midió la absorbancia del patrón y la muestra frente al reactivo blanco antes de 60 min en un espectrofotómetro marca SHIMADZU, MODELO UV-1800 (Sozhout, Juangsu, China).

#### **6.13. Análisis de histología normal y patológica de peces**

Se realizó un análisis histológico de ojo para identificar la presencia de posibles patologías reportadas en la literatura cuando se evalúan dietas con bajos niveles de metionina. El análisis histológico se realizó en el laboratorio de histopatología del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, Unidad Mazatlán (CIAD, A.C.). Se utilizaron 10 organismos al inicio y 45 al final del bioensayo (9 peces/tratamiento); el tejido utilizado fue ojo.

En el presente estudio se realizó la técnica histológica descrita en Luna (1968), Drury y Wallington (1980) y Kamonporn *et al.* (1999). Por lo que fue necesario sacrificar a los organismos para extraer el órgano requerido en el análisis. Primero el órgano extraído se fijó con formalina al 10 % (100 ml de formaldehído al 37-40 %; 900 ml de agua de mar, 4.0 g de fosfato de sodio monobásico y 6.5 g de fosfato de sodio dibásico), con el objetivo de evitar la destrucción de células por autólisis o bacterias.

Posteriormente, el tejido fue sometido a un proceso de deshidratación siendo sumergido en diferentes concentraciones de alcohol (70, 80, 96, 100 %) para la extracción del agua y disolución del contenido lipídico. Una vez deshidratados se realizó el aclaramiento del tejido utilizando un solvente orgánico (xilol), el cual permitió la inclusión del tejido en parafina (Histoembebedor Leica Jung, EUA). Después se realizó el bloqueo de muestras con un micrótopo rotatorio (Jung HistoCut Leica #820) realizando cortes de 5  $\mu$ m. Finalmente, se obtuvo el corte histológico el cual fue colocado en un portaobjetos para su tinción con hematoxilina-eosina para la diferenciación de los componentes tisulares.

Una vez obtenidas las láminas se procedió a identificar las posibles patologías reportadas en la literatura.

#### **6.14. Análisis estadístico**

Los valores obtenidos fueron sometidos a una prueba de normalidad y homocedasticidad. Los valores que se presentan como porcentaje fueron transformados al arco-seno de la raíz cuadrada de la proporción correspondiente, para cumplir con el supuesto de normalidad. Posteriormente, se realizó el análisis de varianza de una vía (ANOVA). En caso de encontrar diferencias significativas se realizó una prueba de comparaciones múltiples de Tukey con un intervalo de confianza del 95 % (Zar, 1984). Los resultados fueron analizados mediante el programa Sigma Plot 11.0. El requerimiento de metionina se determinó mediante un análisis de regresión lineal con punto de quiebre (Robbins *et al.*, 2006).

## 7. RESULTADOS

### 7.1. Análisis proximal del cuerpo y músculo del pargo

A continuación se presentan la composición proximal en base húmeda del cuerpo y músculo de los organismos al inicio del experimento. El cuerpo presentó 14.97 % de proteína, 5.30 % de lípidos, 4.77 % de ceniza, 73.76 % de humedad y 1.20 % de extracto libre de nitrógeno (incluye fibra). Mientras que, el músculo presentó 19.73 % de proteína, 1.26 % de lípidos, 1.99 % de ceniza, 76.15 % de humedad y 0.87 % de extracto libre de nitrógeno (incluye fibra).

En la Tabla 5 se muestra los resultados obtenidos en el cuerpo del pez una vez finalizado el experimento. Los resultados se encuentran en porcentaje en base húmeda y son el promedio de 3 replicas  $\pm$  SD.

**Tabla 5.** Composición proximal en base húmeda del cuerpo entero del pargo flamenco al final de las 12 semanas de experimento.

Composición proximal (%)	Cuerpo del pez				
	D1-MET-0.72	D2-MET-1.12	D3-MET-1.52	D4-MET-1.92	D5-MET-2.32
Proteína	11.82 $\pm$ 0.31 <sup>d</sup>	15.26 $\pm$ 0.11 <sup>b</sup>	15.87 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup>	14.50 $\pm$ 0.14 <sup>c</sup>	14.38 $\pm$ 0.24 <sup>c</sup>
Lípidos	1.85 $\pm$ 0.05 <sup>d</sup>	4.20 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>	5.53 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>	4.18 $\pm$ 0.08 <sup>b</sup>	3.91 $\pm$ 0.04 <sup>c</sup>
Ceniza	5.08 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	4.52 $\pm$ 0.11 <sup>b</sup>	3.97 $\pm$ 0.12 <sup>c</sup>	4.16 $\pm$ 0.19 <sup>c</sup>	4.24 $\pm$ 0.11 <sup>bc</sup>
Humedad	80.50 $\pm$ 0.27 <sup>a</sup>	75.12 $\pm$ 0.02 <sup>bc</sup>	73.82 $\pm$ 0.64 <sup>c</sup>	76.36 $\pm$ 0.44 <sup>bc</sup>	76.56 $\pm$ 1.61 <sup>b</sup>
ELN	0.75 $\pm$ 0.38 <sup>a</sup>	0.90 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup>	0.81 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>	0.81 $\pm$ 0.23 <sup>a</sup>	0.90 $\pm$ 0.32 <sup>a</sup>

Los valores son la media  $\pm$  SD, n=3.

<sup>1</sup>ELN (Extracto libre de nitrógeno) incluyendo fibra.

<sup>1</sup>ELN=100-(% humedad + %Lípidos + % Proteína + % Ceniza)

En las Tabla 6 se muestra los resultados obtenidos en el músculo del pez una vez finalizado el experimento. Los resultados se encuentran en porcentaje en base húmeda y son el promedio de 3 réplicas  $\pm$  SD.

**Tabla 6.** Composición proximal en base húmeda del músculo del pargo flamenco al final de las 12 semanas de experimento.

Composición proximal (%)	Músculo				
	D1-MET-0.72	D2-MET-1.12	D3-MET-1.52	D4-MET-1.92	D5-MET-2.32
Proteína	17.38 ± 0.65 <sup>c</sup>	18.95 ± 0.36 <sup>b</sup>	19.03 ± 0.25 <sup>a</sup>	19.24 ± 0.42 <sup>a</sup>	19.51 ± 0.17 <sup>a</sup>
Lípidos	0.79 ± 0.03 <sup>d</sup>	0.97 ± 0.04 <sup>c</sup>	1.19 ± 0.06 <sup>a</sup>	1.10 ± 0.03 <sup>ab</sup>	1.03 ± 0.02 <sup>bc</sup>
Ceniza	1.79 ± 0.04 <sup>a</sup>	1.74 ± 0.07 <sup>a</sup>	1.67 ± 0.02 <sup>a</sup>	1.70 ± 0.02 <sup>a</sup>	1.72 ± 0.03 <sup>a</sup>
Humedad	77.48 ± 0.37 <sup>a</sup>	75.76 ± 0.88 <sup>b</sup>	75.23 ± 0.16 <sup>b</sup>	75.57 ± 0.26 <sup>b</sup>	75.27 ± 0.84 <sup>b</sup>
ELN	2.55 ± 0.68 <sup>a</sup>	2.58 ± 0.40 <sup>a</sup>	2.89 ± 0.07 <sup>a</sup>	2.39 ± 0.03 <sup>a</sup>	2.47 ± 0.04 <sup>a</sup>

Los valores son la media ± SD, n=3.

<sup>1</sup>ELN (Extracto libre de nitrógeno) incluyendo fibra.

<sup>1</sup>ELN=100-(% humedad + %Lípidos + % Proteína + % Ceniza).

## 7.2. Evaluación biológica

En la Tabla 7 se presentan los índices de evaluación biológica obtenidos en el pargo flamenco *Lutjanus guttatus* después de 12 semanas de experimentación, los parámetros calculados son peso inicial (PI), peso final (PF), ganancia en peso (GP), consumo de alimento individual (CAI), tasa de crecimiento (TC), tasa de crecimiento específico (TCE), tasa de conversión alimenticia (TCA), supervivencia (S) e índice eficiencia proteica (PER).

**Tabla 7.** Parámetros de evaluación biológica de pargo flamenco *Lutjanus guttatus* alimentado con las dietas experimentales durante un periodo de 12 semanas.

Parámetros biológicos	Dietas				
	D1-MET-0.72	D2-MET-1.12	D3-MET-1.52	D4-MET-1.92	D5-MET-2.32
PI (g)	7.34 ± 0.00 <sup>a</sup>	7.33 ± 0.01 <sup>a</sup>	7.33 ± 0.01 <sup>a</sup>	7.34 ± 0.00 <sup>a</sup>	7.33 ± 0.01 <sup>a</sup>
PF (g)	13.20 ± 1.07 <sup>c</sup>	23.86 ± 0.26 <sup>b</sup>	28.56 ± 1.19 <sup>a</sup>	27.80 ± 0.89 <sup>a</sup>	27.05 ± 0.78 <sup>a</sup>
GP (g)	5.86 ± 1.07 <sup>c</sup>	16.52 ± 0.26 <sup>b</sup>	21.23 ± 1.19 <sup>a</sup>	20.46 ± 0.89 <sup>a</sup>	19.72 ± 0.77 <sup>a</sup>
CAI (g)	24.55 ± 2.59 <sup>b</sup>	34.51 ± 0.62 <sup>a</sup>	36.22 ± 1.63 <sup>a</sup>	35.08 ± 1.39 <sup>a</sup>	34.73 ± 1.09 <sup>a</sup>
TCA	4.00 ± 0.43 <sup>b</sup>	2.09 ± 0.01 <sup>a</sup>	1.71 ± 0.05 <sup>a</sup>	1.71 ± 0.02 <sup>a</sup>	1.76 ± 0.02 <sup>a</sup>
TC (%)	79.86 ± 14.58 <sup>c</sup>	225.31 ± 3.61 <sup>b</sup>	289.80 ± 16.25 <sup>a</sup>	278.8 ± 12.11 <sup>a</sup>	269.01 ± 10.11 <sup>a</sup>
TCE (%.día)	0.70 ± 0.10 <sup>c</sup>	1.40 ± 0.01 <sup>b</sup>	1.62 ± 0.05 <sup>a</sup>	1.59 ± 0.04 <sup>a</sup>	1.55 ± 0.03 <sup>a</sup>
S (%)	91.11 ± 3.85 <sup>a</sup>	86.67 ± 6.67 <sup>a</sup>	93.33 ± 0.00 <sup>a</sup>	91.11 ± 10.2 <sup>a</sup>	88.89 ± 13.88 <sup>a</sup>
PER	0.49 ± 0.05 <sup>c</sup>	0.98 ± 0.01 <sup>b</sup>	1.21 ± 0.03 <sup>a</sup>	1.20 ± 0.01 <sup>a</sup>	1.17 ± 0.01 <sup>a</sup>

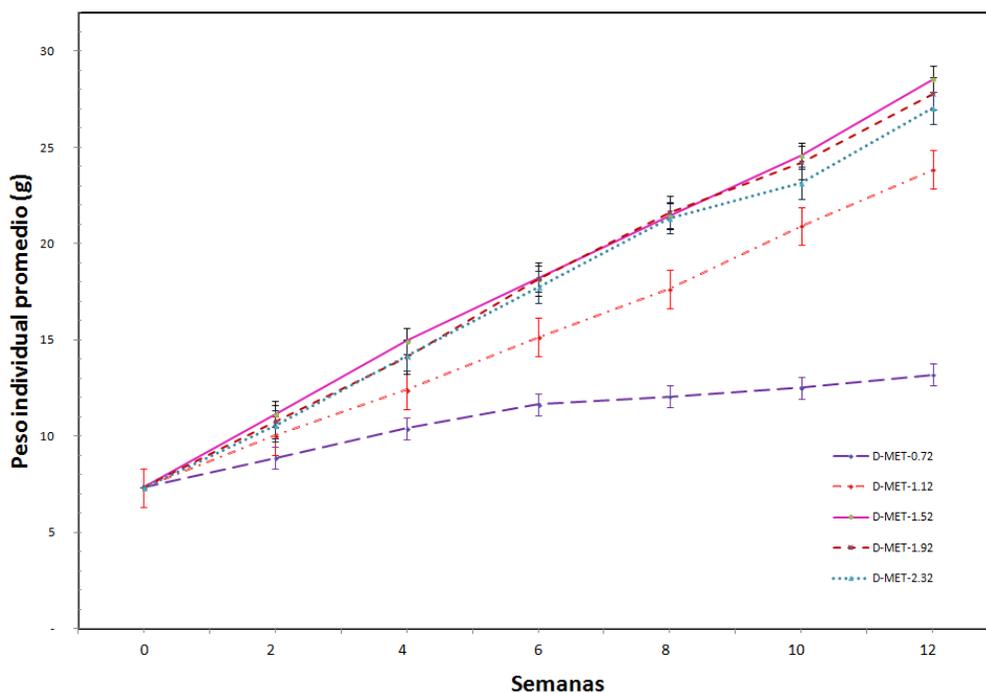
Los valores son la media ± SD, n=3. Promedios con el mismo superíndice dentro de cada fila indican que no hay diferencias significativas entre tratamientos P>0.05.

### 7.2.1. Peso final (PF)

El peso promedio individual final de los organismos alimentados con la dieta MET-1.52 fue el más alto (28.5 g), presentando diferencias significativas únicamente con las dietas MET-0.72 (13.20 g), MET-1.12 (23.86 g). Así mismo, las dietas MET-1.92 (27.80) y MET-2.32 (27.05 g) presentaron diferencias significativas con los tratamientos MET-0.72 y MET-1.12. Mientras que, MET-0.72 y MET-1.12 presentaron diferencias entre sí, ocupando el peso final más bajo MET-0.72.

### 7.2.2. Ganancia en peso (GP)

En la Figura 4 se muestra la ganancia en peso de los organismos durante 12 semanas de experimento. El tratamiento MET-1.52 (21.23 g) obtuvo una mayor ganancia en peso al término del experimento, sin embargo, no fue diferente significativamente de los tratamientos MET-1.92 (20.46 g) y MET-2.32 (20.46 g). Por otra parte, si resultó significativamente superior a los tratamientos MET-0.72 y MET-1.12.



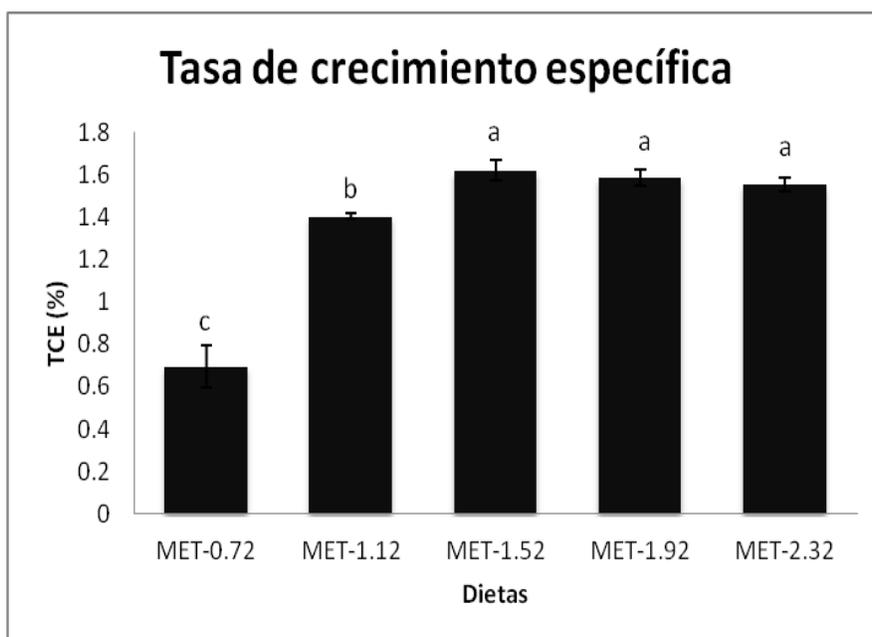
**Figura 4.** Crecimiento del pargo flamenco *Lutjanus guttatus* alimentado con las dietas experimentales durante un periodo de 12 semanas. Los datos son la media de  $n=45 \pm$  SD.

### 7.2.3. Tasa de crecimiento (TC)

El valor más alto de crecimiento se presentó con el tratamiento MET-1.52, el cual fue diferente de los peces alimentados con las dietas MET-0.72 y MET-1.12; Sin embargo, no presento diferencias con los tratamientos MET-1.92 y 2.32.

### 7.2.4. Tasa específica de crecimiento (TCE)

La TCE presenta la misma tendencia que la TC, el valor más alto se presentó con el tratamiento MET-1.52, el cual fue diferente de los peces alimentados con las dietas MET-0.72 y MET-1.12; Sin embargo, no presento diferencias con los tratamientos MET-1.92 y 2.32. Los resultados se muestran en la siguiente gráfica (Figura 5).



**Figura 5.** Gráfica de la tasa de crecimiento específica de los peces alimentados con las dietas experimentales durante un periodo de 12 semanas. Los valores son la media  $\pm$  SD, n=3.

### 7.2.5. Consumo de alimento individual (CAI)

El consumo de alimento individual más bajo fue presentado en los peces alimentados con el tratamiento MET-0.72, mostrando diferencias significativas del resto de los tratamientos.

### 7.2.6. Tasa de conversión alimenticia (TCA)

El tratamiento MET-0.72 presentó diferencias significativas con el resto de los tratamientos. Cabe mencionar que la dieta MET-1.52 obtuvo la mejor TCA.

### 7.2.7. Supervivencia (S)

La supervivencia no se vio afectada por las dietas, debido a que los organismos mostraron una supervivencia superior al 86.67 %. Los tratamientos no presentaron diferencias significativas entre sí, por lo que, no se determinó un efecto negativo.

### 7.2.8. Índice de eficiencia proteínica (PER)

Los tratamientos MET-0.72 y MET-1.12 presentaron diferencias significativas entre sí, además de presentar diferencias significativas con el resto de los tratamientos. Mientras que MET-1.52, MET-1.92 y MET-2.32 no presentaron diferencias entre sí.

## 7.3. Análisis hematológicos

A continuación, se presentan los valores obtenidos de los parámetros sanguíneos iniciales: 39 % de hematocrito, 5.63 g dl<sup>-1</sup> de proteína total, 9.29 g dl<sup>-1</sup> de hemoglobina, 135.71 mg dl<sup>-1</sup> de glucosa, 503.93 mg dl<sup>-1</sup> de triglicéridos, 246.8 mg dl<sup>-1</sup> de colesterol. Así mismo, la Tabla 8 presenta los resultados de los parámetros sanguíneos finales obtenidos después de 12 semanas de experimento.

**Tabla 8.** Parámetros hematológicos de pargo flamenco *Lutjanus guttatus* alimentado durante un periodo de 12 semanas.

Parámetros hematológicos	Final				
	D1-MET-0.72	D2-MET-1.12	D3-MET-1.52	D4-MET-1.92	D5-MET-2.32
Hematocrito (%)	36.00 ± 7.13 <sup>b</sup>	48.00 ± 7.05 <sup>a</sup>	53.75 ± 4.37 <sup>a</sup>	55.50 ± 6.82 <sup>a</sup>	53.88 ± 4.70 <sup>a</sup>
Proteína total (g dl <sup>-1</sup> )	4.65 ± 0.39 <sup>b</sup>	5.22 ± 0.36 <sup>a</sup>	5.41 ± 0.23 <sup>a</sup>	5.35 ± 0.28 <sup>a</sup>	5.39 ± 0.21 <sup>a</sup>
Hemoglobina (g dl <sup>-1</sup> )	7.99 ± 3.91 <sup>b</sup>	9.81 ± 4.69 <sup>ab</sup>	13.45 ± 1.33 <sup>a</sup>	12.95 ± 2.27 <sup>a</sup>	12.47 ± 1.58 <sup>ab</sup>
Glucosa (mg dl <sup>-1</sup> )	52.25 ± 2.10 <sup>b</sup>	63.07 ± 4.65 <sup>a</sup>	52.57 ± 3.72 <sup>b</sup>	54.47 ± 2.26 <sup>b</sup>	52.09 ± 2.64 <sup>b</sup>
Trigliceridos (mg dl <sup>-1</sup> )	246.04 ± 22.68 <sup>b</sup>	269.55 ± 16.37 <sup>a</sup>	274.51 ± 10.05 <sup>a</sup>	264.73 ± 20.95 <sup>a</sup>	236.28 ± 11.75 <sup>b</sup>
Colesterol (mg dl <sup>-1</sup> )	181.10 ± 12.86 <sup>d</sup>	240.38 ± 18.73 <sup>c</sup>	297.68 ± 20.05 <sup>a</sup>	279.83 ± 16.00 <sup>ab</sup>	255.79 ± 7.84 <sup>bc</sup>

Los datos son la media de una  $n=9\pm SD$ . Superíndice igual no presenta diferencias significativas entre dietas ( $P>0.05$ ).

### **7.3.1. Hematocrito**

El análisis de hematocrito mostró el resultado más bajos en el tratamiento MET-0.72 (36.00 %), presentando diferencias significativas con el resto de los tratamientos. Mientras que, el resultado más alto lo presento el tratamiento MET-1.92, no presentando diferencias con los tratamientos MET-1.12, MET-1.52 y MET-2.32.

### **7.3.2. Proteína total**

La concentración de proteína plasmática más baja fue obtenida en el tratamiento MET-0.72 ( $4.65 \text{ g l}^{-1}$ ), presentando diferencias significativas con el resto de los tratamientos. El resultado más alto se obtuvo con el tratamiento MET-1.52 ( $5.41 \text{ g l}^{-1}$ ), no mostrando diferencias significativas con los tratamientos MET-1.12, MET-1.92, MET-2.32.

### **7.3.3. Hemoglobina**

El resultado más alto de hemoglobina se obtuvo con el tratamiento MET-1.52 ( $13.45 \text{ g dl}^{-1}$ ), seguido del tratamiento MET-1.92 ( $12.95 \text{ g dl}^{-1}$ ), ambos resultados presentaron diferencias significativas con el tratamiento MET-0.72 ( $7.99 \text{ g dl}^{-1}$ ). Mientras que, los tratamientos MET-1.12 y 2.32 no mostraron diferencias significativas.

### **7.3.4. Glucosa**

La concentración más alta de glucosa fue obtenida con el tratamiento MET-1.12 ( $63.07 \text{ mg dl}^{-1}$ ), presentando diferencias significativas con los tratamientos MET-0.72, MET-1.52, MET-1.92 y MET-2.32. El resto de los tratamientos no presento diferencias significativas entre sí.

### **7.3.5. Triglicéridos**

La concentración más alta de triglicéridos se obtuvo con el tratamiento MET-1.52 ( $2.74 \text{ mg dl}^{-1}$ ), seguido de MET-1.12 y MET-1.92. Los tratamientos mencionados no presentaron diferencias entre sí, sin embargo, presentaron diferencias significativas con los tratamientos MET-0.72 y MET-2.32. Mientras que, MET-0.72 y MET-2.32 no presentan diferencias significativas entre sí.

### 7.3.6. Colesterol

El resultado más alto fue obtenido con el tratamiento MET-1.52 (297.68 mg dl<sup>-1</sup>), no presentando diferencias con el tratamiento MET-1.92. Por su parte, el tratamiento MET 1.92 mostró diferencias con los tratamientos MET-0.72, MET-1.12. Mientras que, el tratamiento MET-2.32 mostró diferencias con los tratamientos MET-0.72 y MET-1.52. Cabe mencionar que el tratamiento MET-0.72 (181.10 mg dl<sup>-1</sup>) obtuvo el valor más bajo, presentando diferencias significativas con todos los tratamientos.

### 7.4. Índices biológicos corporales

En la Tabla 9 se presentan los resultados de los índices biológicos, el factor de condición, el índice hepatosomático y el índice viscerosomático, de los peces alimentados con los diferentes tratamientos.

**Tabla 9.** Índices biológicos de los organismos alimentados con los distintos tratamientos.

Índice biológico	Dietas				
	D1-MET-0.72	D2-MET-1.12	D3-MET-1.52	D4-MET-1.92	D5-MET-2.32
CF	1.41 ± 0.13 <sup>b</sup>	1.49 ± 0.13 <sup>ab</sup>	1.60 ± 0.13 <sup>a</sup>	1.58 ± 0.12 <sup>a</sup>	1.55 ± 0.07 <sup>ab</sup>
HSI	0.64 ± 0.20 <sup>a</sup>	0.66 ± 0.14 <sup>a</sup>	0.70 ± 0.09 <sup>a</sup>	0.75 ± 0.20 <sup>a</sup>	0.66 ± 0.14 <sup>a</sup>
VSI	3.42 ± 0.39 <sup>a</sup>	3.66 ± 0.36 <sup>a</sup>	3.84 ± 0.56 <sup>a</sup>	3.65 ± 0.39 <sup>a</sup>	3.69 ± 0.51 <sup>a</sup>
IPF	0.50 ± 0.29 <sup>d</sup>	0.91 ± 0.25 <sup>cd</sup>	1.54 ± 0.34 <sup>bc</sup>	2.28 ± 0.64 <sup>ab</sup>	2.57 ± 0.83 <sup>a</sup>

CF (Factor de condición), HSI (Índice hepatosomático), VSI (Índice viscerosomático), IPF (Relación de grasa intraperitoneal).

Los datos son la media de una n=6±SD. Superíndice igual no presenta diferencias significativas entre dietas (P>0.05).

#### 7.4.1. Factor de condición

El factor de condición más bajo se obtuvo con los peces alimentados con la dieta MET-0.72 (1.41), estos resultados fueron significativamente diferentes de los tratamientos MET-1.52 (1.60) y MET-1.92 (1.58). El resto de tratamientos no presentaron diferencias entre sí.

#### 7.4.2. Índice hepatosomático

La relación del peso hígado contra el peso cuerpo, no resultó estadísticamente diferente entre los tratamientos. El hígado más grande se obtuvo con los peces del tratamiento MET-1.92 (0.75) y el más pequeño con el tratamiento MET-0.72 (0.64).

### 7.4.3. Índice viscerosomático

El paquete visceral con respecto al peso total del cuerpo, no resultó estadísticamente diferente entre los tratamientos. El mayor peso visceral se obtuvo con los peces del tratamiento MET-1.52 (3.84), mientras que, el menor peso lo presentaron los organismos del tratamiento MET-0.72 (3.42).

### 7.4.4. Relación grasa intraperitoneal

El contenido de grasa visceral aumento con forme incremento el nivel de metionina en la dieta. El resultado más alto fue obtenido en el tratamiento MET-2.32, presentando diferencias significativas con los tratamientos MET-0.72, MET-1.12 y MET-1.52. Mientras que, el tratamiento MET-0.72 obtuvo los resultados más bajos, presentando diferencias significativas con los tratamientos MET-1.52, MET-1.92 y MET-2.32.

### 7.5. Perfil de aminoácidos del músculo del pargo

En la Tabla 10, se presentan los resultados de las concentraciones de aminoácidos en el músculo del pargo flamenco alimentado con los diversos tratamientos. La mayoría de los aminoácidos presentaron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) al menos con algún tratamiento. Por otro lado, los músculos que presentaron mejor retención de metionina fueron los de la dieta MET-1.52, presentando diferencias significativas con la metionina retenida en los músculos del tratamiento MET-0.72 y MET-1.92.

**Tabla 10.** Determinación del perfil de aminoácidos en el músculo del pargo flamenco *Lutjanus guttatus* alimentado con las dietas experimentales.

Aminoácidos	g de aminoácidos en 100 g de proteína				
	D1-MET-0.72	D2-MET-1.12	D3-MET-1.52	D4-MET-1.92	D5-MET-2.32
Fenilalanina	2.82±0.01 <sup>ab</sup>	2.72±0.30 <sup>ab</sup>	2.85±0.33 <sup>a</sup>	2.38±0.14 <sup>ab</sup>	2.19±0.12 <sup>b</sup>
Histidina	15.40±1.49 <sup>ab</sup>	15.80±1.35 <sup>ab</sup>	14.57±0.67 <sup>b</sup>	18.23±0.95 <sup>a</sup>	15.31±0.87 <sup>ab</sup>
Isoleucina	2.65±0.12 <sup>a</sup>	2.51±0.24 <sup>a</sup>	2.84±0.27 <sup>a</sup>	1.88±0.10 <sup>b</sup>	1.85±0.11 <sup>b</sup>
Leucina	5.63±0.53 <sup>ab</sup>	5.37±0.62 <sup>ab</sup>	6.66±0.70 <sup>a</sup>	5.05±0.28 <sup>b</sup>	5.15±0.30 <sup>b</sup>
Metionina	2.57±0.02 <sup>b</sup>	2.65±0.24 <sup>ab</sup>	3.02±0.13 <sup>a</sup>	2.48±0.14 <sup>b</sup>	2.64±0.0.15 <sup>ab</sup>
Treonina+Arginina	27.61±1.35 <sup>ab</sup>	30.55±1.16 <sup>a</sup>	25.35±1.36 <sup>b</sup>	30.91±1.42 <sup>a</sup>	30.60±0.81 <sup>a</sup>
Valina	3.55±0.23 <sup>ab</sup>	3.10±0.34 <sup>bc</sup>	3.80±0.21 <sup>a</sup>	2.72±0.16 <sup>c</sup>	2.64±0.15 <sup>c</sup>
Ácido aspártico	7.00±0.63 <sup>a</sup>	5.58±0.36 <sup>b</sup>	6.37±0.37 <sup>ab</sup>	5.48±0.31 <sup>b</sup>	5.31±0.30 <sup>b</sup>
Ácido glutámico	14.59±0.71 <sup>ab</sup>	13.47±0.86 <sup>b</sup>	16.14±1.16 <sup>a</sup>	12.99±0.84 <sup>b</sup>	12.99±0.74 <sup>b</sup>

Alanina	4.68±0.42 <sup>a</sup>	4.63±0.27 <sup>a</sup>	4.54±0.20 <sup>a</sup>	3.51±0.31 <sup>b</sup>	4.34±0.24 <sup>a</sup>
Glicina	3.68±0.42 <sup>a</sup>	3.67±0.21 <sup>a</sup>	3.91±0.20 <sup>a</sup>	3.69±0.19 <sup>a</sup>	3.88±0.21 <sup>a</sup>
Lisina	1.15±0.17 <sup>d</sup>	1.81±0.08 <sup>c</sup>	1.83±0.12 <sup>c</sup>	2.69±0.13 <sup>a</sup>	2.18±0.09 <sup>b</sup>
Serina	3.24±0.15 <sup>ab</sup>	2.65±0.16 <sup>c</sup>	3.35±0.15 <sup>ab</sup>	3.00±0.16 <sup>bc</sup>	3.65±0.21 <sup>a</sup>
Tirosina	4.65±0.26 <sup>a</sup>	3.88±0.42 <sup>ab</sup>	3.69±0.42 <sup>b</sup>	2.71±0.24 <sup>c</sup>	4.34±0.25 <sup>ab</sup>

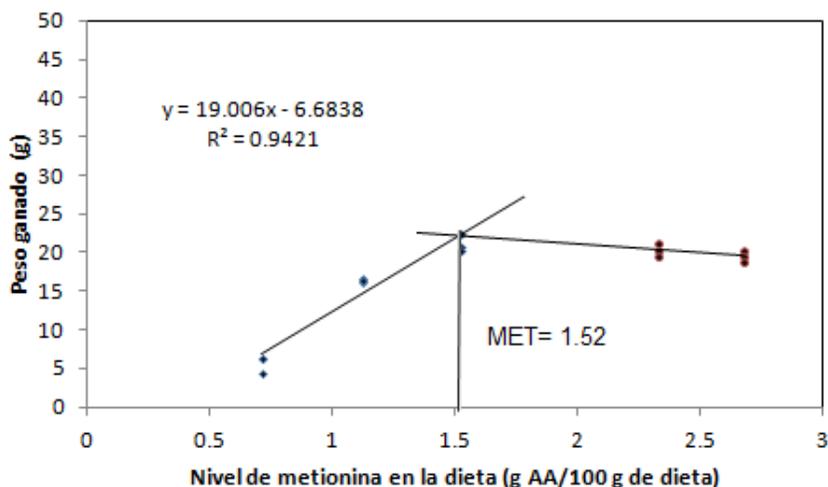
Los valores son la media ± SD, n=3.

## 7.6. Análisis de histología normal y patológica de peces

Con respecto a los ojos de los peces, estos no presentaron cambios patológicos como respuesta a los distintos niveles de metionina. Por lo que son considerados normales.

## 7.7. Requerimiento nutricional de metionina

El requerimiento de metionina fue obtenido mediante regresión lineal con punto de quiebre, usando la relación del peso ganado y el nivel de metionina presente en la dieta (Figura 6), obteniendo un requerimiento de 1.52 % de metionina.



**Figura 6.** Regresión lineal con punto de quiebre que relaciona el peso ganado con respecto al nivel de inclusión de metionina.

## 8. DISCUSIÓN

Los resultados del experimento demostraron que incluir metionina en la dieta mejora las respuestas de crecimiento. Esto se debe a que la metionina es un aminoácido esencial que influye en crecimiento y procesos metabólicos, así como que la deficiencia de metionina puede causar crecimiento lento (Walton *et al.*, 1982 y Keembiyehetty y Gatlin, 1993; Ruchimat *et al.*, 1997; Luo *et al.*, 2005; Mai *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2011 y Niu *et al.*, 2013). Hevroy *et al.* (2007) y Rolland *et al.* (2015) consideran que el bajo contenido de metionina en la dieta podría inhibir la expresión del Gen IGF-I (factor de crecimiento insulínico tipo 1) y que esta podría ser la razón de la supresión del crecimiento de los peces. La deficiencia de metionina también puede reducir los reservorios de escape de los antioxidantes ácido ascórbico, glutatión y la vitamina E en diversos tejidos del pez, lo que puede resultar en estrés oxidativo irreversible, retraso del crecimiento y depresión (Li *et al.*, 2009).

Con respecto a la tasa de crecimiento específica (TCE), el mejor resultado fue obtenido con el tratamiento MET-1.52, después la TCE disminuyó sin presentar diferencias significativas; coincidiendo con la tendencia del pompano (Niu *et al.*, 2013) y el mero (Zhou *et al.*, 2005) cuyos niveles de metionina no fueron suficientemente altos para generar una disminución significativa en el crecimiento. Resultados contrarios a los obtenidos en la corvina amarilla (Mai *et al.*, 2006), cobia (Zhou *et al.*, 2006) y besugo negro (Zhou *et al.*, 2011) cuyo valor disminuyó significativamente con niveles altos de metionina en la dieta. Las diferencias generadas en los resultados obtenidos de los distintos experimentos podrían deberse a la acumulación y oxidación de metionina a otros metabolitos (Murthy y Varghese, 1998), estrés nutricional (Baker, 2006; Zhou *et al.*, 2006), y/o a las concentraciones de aminoácidos azufrados en el cuerpo del pez o al gasto extra de energía para desaminación y excreción (Walton, 1985; Choo *et al.*, 1991; Murthy y Varghese, 1998 y Sveier *et al.*, 2001).

Cabe mencionar que dietas que contienen grandes cantidades de aminoácidos cristalinos en su composición generan tasas de crecimiento menores en comparación con dietas en las que todos sus aminoácidos provienen de una fuente proteica (Wilson

*et al.*, 1978; Robinson *et al.*, 1981; Walton *et al.*, 1986). Las proteínas contenidas en los alimentos requieren digerirse a péptidos pequeños y aminoácidos para poder ser absorbidos, mientras que los aminoácidos cristalinos no requieren digestión y son absorbidos directamente (Mora, 2002), por lo que, los aminoácidos incorporados a la dieta en forma libre son asimilados más rápidamente. Para que una síntesis proteínica óptima tenga lugar es necesario que todos los aminoácidos estén presentes simultáneamente en el tejido. Si dicho equilibrio no es alcanzado entonces sobreviene un catabolismo de los aminoácidos, reflejándose en una disminución en el crecimiento y en la eficiencia alimenticia (Tacon, 1989).

Las diferencias obtenidas en el consumo de alimento individual (CAI) en el tratamiento MET-0.72, se pueden deber a una reducción en la palatabilidad de la dieta debido a su composición de ingredientes (Walton *et al.*, 1982 y Keembiyehetty y Gatlin, 1993). Ruchimat *et al.* (1997), Luo *et al.* (2005), Mai *et al.* (2006), Zhou *et al.* (2006), Zhou *et al.* (2011) y Niu *et al.* (2013) mencionan que la palatabilidad podría incrementar debido al incremento del aminoácido azufrado metionina en la dieta, debido a que es la única variable presente en la composición de las dietas, sin embargo consideran que se requieren más estudios para atribuirlo directamente.

Por su parte, la supervivencia no se vio afectada por los diferentes niveles de metionina en la dieta, al igual que en los experimentos realizados en medregal del Japón (Ruchimat *et al.*, 1997), mero (Zhou *et al.*, 2005), corvina amarilla (Mai *et al.*, 2006), cobia (Zhou *et al.*, 2006), perca negra (Yan *et al.*, 2007), besugo negro (Zhou *et al.*, 2011) y pompano (Niu *et al.*, 2013).

Los índices hepatosomático y viscerosomático no presentaron diferencias significativas entre sí. Los índices aumentaron con el incremento de metionina en la dieta y después disminuyeron ligeramente sin presentar diferencias, resultados similares fueron obtenidos en mero (Luo *et al.*, 2005) y diferentes en pompano (Niu *et al.*, 2013) y besugo negro (Zhou *et al.*, 2011), donde los índices aumentan con el incremento de metionina en la dieta. Por los distintos niveles de metionina evaluados en este experimento no reflejan una relación directa con estos índices. Con respecto al FC,

este aporta información fundamental sobre estrategias de crecimiento y estado nutricional. Los resultados obtenidos muestran que un nivel bajo de metionina entorpece la relación peso talla del organismo. Esto se debe a que la metionina ayuda a la formación de células y tejidos, participa en la síntesis de proteínas y otras moléculas. Zhou *et al.* (2011) mencionan no haber encontrado diferencias significativas con el FC obtenido en su experimento, lo cual sugiere que los autores no evaluaron un nivel suficientemente bajo de metionina para presentar tal efecto.

La mejora en la deposición de proteínas en el cuerpo y músculo podría estar relacionada con la síntesis de proteínas y metabolismo de aminoácidos. En el caso de la proteína en el músculo, ésta incrementa significativamente y después del tratamiento MET-1.52 se mantiene conforme aumenta el nivel de metionina en la dieta. Mientras que en el caso de la proteína en el cuerpo disminuyó a partir del tratamiento MET-1.52, presentando diferencias significativas con el tratamiento MET-2.32. Las diferentes tendencias en músculo y cuerpo pueden deberse a que el músculo del pez retiene una mayor cantidad de aminoácidos, debido a que la aminotransferasa de aminoácidos de cadena ramificada (AACR) se encuentra casi completamente en el músculo esquelético de tal manera que, de todos los aminoácidos absorbidos los AACR (diferentes a los que son usados para la síntesis de proteína en el hígado) son los únicos que pasan intactos a ese órgano y realizan las primeras fases de su catabolismo en el músculo (Cowey, 1995).

La disminución del contenido de lípidos crudos en el cuerpo y músculo en los tratamientos que presentan bajo crecimiento se podrían deber a una movilización de lípidos causada por la necesidad de energía de los organismos (Regost *et al.* 1999). La disminución en el contenido de lípidos en el cuerpo del pargo a partir de la dieta MET-1.92 podrían deberse a que la metionina es un compuesto lipotrópico (Walton *et al.* 1984) que favorece la movilización de las grasas y limita la acumulación de grasa en el hígado. Aunado a eso, puede sumarse un posible gasto extra de energía para desaminación y excreción causado por exceso de metionina u otros aminoácidos (Walton, 1985; Choo *et al.*, 1991; Murthy y Varghese, 1998 y Sveier *et al.*, 2001). Otra causa podría ser la reducción de lipoproteínas, lo cual genera un bajo transporte de las

grasas. Esto ocurre cuando altas concentraciones de metionina entran al organismo y provocan una producción excesiva de homocisteína, normalmente la homocisteína tienden a formar cistationina y después cisteína, sin embargo, cuando se produce más homocisteína de la que se puede canalizar se genera homocisteína tiolactona un intermediario altamente reactivo que forma tiolatos al robar los grupos amino libres de las lipoproteínas de baja densidad (Devlin, 2004).

Por ejemplo, Vélez *et al.* (2007) obtuvo que ratones alimentados con un alta dosis de metionina y baja cantidad de folato presentan una mayor concentración de homocisteína, menor cantidad de lipoproteínas de alta densidad HDL y una pérdida del 20% de su peso corporal comparados con ratones que fueron alimentados con una dieta baja en metionina y folato. Esto sugiere el impacto de otros compuestos para el adecuado metabolismo de la metionina. Mientras que Wang *et al.* (2015) en cobia obtuvieron una disminución del contenido de lípidos crudos en el hígado y una leve disminución en los lípidos crudos del cuerpo, así como una disminución de las lipoproteínas de colesterol de baja densidad y colesterol de alta densidad. Las diferencias obtenidas pueden deberse a la diferencia en los niveles de metionina evaluados. No obstante, se requieren más estudios para saber a ciencia cierta que está ocurriendo con los lípidos del cuerpo y músculo de los tratamientos con niveles más alto de metionina.

Con respecto a las concentraciones de colesterol y triglicéridos, Wang *et al.* (2015) obtuvieron resultados similares a los obtenidos en este experimento, el valor más alto de colesterol y triglicéridos lo obtuvieron en su mejor tratamiento, después de este los valores disminuyeron. Los resultados obtenidos pudieron verse afectados por las mismas causas que los valores de lípidos en el cuerpo y músculo del pez. Por lo que, se recomiendan realizar más estudios sobre el tema para saber a ciencia cierta que está ocurriendo.

En el caso de los parámetros hematológicos, hemoglobina, hematocrito y proteína total los resultados pasan el rango establecido por Del Rio-Zaragoza *et al.* (2011) para organismos con un cuadro clínico saludable. Sin embargo, los resultados muestran que

niveles bajos de metionina influyen significativamente en los valores de estos parámetros, las diferencias obtenidas podrían estar reflejando una baja calidad en la dieta (Klinger *et al.*, 1996), lo que estaría provocando un desbalance nutricional en el pez (Hrubec *et al.*, 2000).

Los resultados de glucosa obtenidos muestran que el tratamiento MET-1.12 presentó diferencias significativas del resto de los tratamientos. Este resultado no podría ser considerado una respuesta relacionada directamente con el nivel de metionina debido a que no se marca una tendencia, el valor puede verse afectada por otros factores como la manipulación y estrés del organismo. Es necesario mencionar que los valores obtenidos son considerados normales debido a que se encuentran dentro de los niveles de glucosa reportados en peces en otros experimentos (Barcellos *et al.* 2010; Caruso *et al.*, 2011; Hernández *et al.*, 2014a; Peres *et al.* 2014a).

Con respecto a la histología del ojo, en este experimento no se encontraron daños histológicos en los peces alimentados con los diferentes tratamientos. Los resultados difieren de los obtenidos por Walton *et al.* (1982) en juveniles de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) con un peso promedio de 25 g, los autores mencionan que al terminar las 12 semanas de experimento los organismos alimentados con dietas deficientes en metionina (0.51 %) presentaron cataratas. De igual forma, Rumsey *et al.* (2011) reportaron cataratas bilaterales en peces trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss Gairdneri*) (con un peso de inicial de 1.5 g) alimentados con dietas deficientes en metionina (0.30%). Las diferencias obtenidas pueden deberse a que el nivel de metionina usado en este experimento no fue lo suficientemente deficiente para generar un cambio patológico en los ojos de los peces. No obstante, se desconocen los daños causados por un mayor tiempo de exposición.

El nivel bajo de metionina en el músculo del tratamiento MET-0.72 podría deberse a una baja síntesis de proteínas producida por una deficiencia de metionina en la dieta. Mientras que el resultado del músculo del tratamiento MET-1.92 puede deberse al nivel excesivo de metionina presente en las dietas. Se cree que al llegar a un cierto nivel de acumulación de metionina en el tejido este comienza a movilizarla o excretarla. Esto

sugiere que la metionina cubre un requerimiento nutricional en el pez, que permite que los otros AA se necesiten en igual proporción, para que los AA cumplan sus funciones. Cuando los aminoácidos exceden las necesidades del organismo pueden ser metabolizados en glucógeno o grasa y posteriormente utilizados para el metabolismo energético, u oxidarse directamente como combustible metabólico, sin embargo, esto dependerá de la presencia de una o más enzimas requeridas para realizar tal proceso (Guedes *et al.*, 2011).

La variabilidad de los aminoácidos presentes en el músculo al final de experimento, podría deberse a que la metionina entorpece la absorción y aprovechamiento de otros aminoácidos, cowey *et al.* (1992) menciona que una baja ingesta de metionina puede producir una cantidad insuficiente de homocisteína disponible para conversión a cistationina, por lo que la serina tiende a acumularse en el hígado y en el plasma, al mismo tiempo que los niveles de taurina tisular son reducidos a causa de la limitación en transulfuración. Mientras que, con una ingestión alta de metionina ocurren cambios inversos, los niveles de serina tisular son reducidos y aquellos de taurina incrementados. Yokoyama y Nakazoe (1990) reportan que los niveles de cistationina hepática aumentan cuando se da metionina adicional en la dieta. Ingham y Arme (1977) mencionan que la absorción de leucina puede ser inhibida por el exceso de metionina en la trucha arco iris. Mientras que Mai *et al.* (2005) reporta que el exceso de metionina afecta la concentración de isoleucina muscular de corvina amarilla. Los autores concuerdan que la variabilidad de los aminoácidos podría deberse a que el exceso de metionina podría entorpecer la absorción y utilización de otros aminoácidos. No obstante, se recomiendan estudios más profundos sobre el tema, para saber que sucede exactamente y si tiene una relación directa.

Con respecto al requerimiento de metionina, el valor obtenido en este experimento para juveniles de pargo flamenco (*Lutajnus guttatus*) es de 1.52 % de metionina (g de AA/ 100 g de dieta) tomando en cuenta la respuesta de crecimiento (PG). Cabe mencionar que los valores pueden variar de acuerdo con la especie, tamaño, ingredientes de la dieta, palatabilidad de la dieta, régimen de alimentación y condiciones ambientales (Tacon y Cowey de 1985). Tal es el caso de los valores obtenidos en juveniles de

robalo, medregal del Japón, mero, corvina amarilla, cobia, perca negro, besugo negro, botia, bagre indio, pompano cuyo requerimiento de metionina abarcan desde 1.11 % a 1.72 % (g de AA/ 100 g de dieta), cuando se toma en cuenta la relación nivel de inclusión y crecimiento (Thebault *et al.*, 1985; Ruchimat *et al.*, 1997 ; Luo *et al.*, 2005; Zhou *et al.*, 2006; Yan *et al.*, 2007; Zhou *et al.*, 2011 ; Niu *et al.*, 2013; Chu *et al.*, 2014; Ahmed, 2014).

## 9. CONCLUSIONES

De acuerdo con el análisis de regresión lineal con punto de quiebre, los juveniles de pargo flamenco requieren en su dieta 1.52 % de metionina para obtener las mejores respuesta de crecimiento cuando se usa la relación peso ganado y nivel de metionina presente en la dieta, siempre y cuando los organismos sean alimentados con una dieta basada en ingredientes deficientes de metionina respetando las condiciones realizadas en este experimento.

El consumo de alimento no se mostró afectado por los niveles máximos de metionina en la dieta, por lo que la disminución de la palatabilidad no fue un elemento que elevó la tasa de conversión alimenticia (TCA) de los tratamientos (MET-1.12, MET-1.52, MET-1.92 y MET-2.32). No obstante, niveles mínimos de metionina en la dieta entorpecen la palatabilidad y afectan la TCA (MET-0.72).

El nivel de metionina en la dieta no es un factor que afecte la supervivencia de acuerdo con los resultados obtenidos en este experimento, sin embargo, se desconoce las consecuencias de otorgar estas dietas por un periodo más largo.

Los índices hematológicos (hematocrito, hemoglobina y proteína total) no se mostraron afectados por los niveles máximos de metionina, sin embargo, niveles mínimos (MET-0.72) influyeron significativamente en la concentración de estos.

El nivel de metionina es un factor que influyó en el metabolismo de lípidos, debido a que en este experimento el nivel máximo de metionina (MET-2.32) provocó una disminución significativa en el porcentaje de lípidos en el cuerpo y músculo del pez, en la concentración de colesterol y triglicéridos en la sangre, sin embargo, se recomienda seguir realizando estudios para comprobar dicha relación y generar más conocimiento sobre el tema.

Niveles altos de metionina (MET-2.32) generan una disminución en el porcentaje de proteína presente en el cuerpo del pez, debido a que influye en la disminución de las

reservas de grasa en el pez y podrían entorpecer el aprovechamiento de los aminoácidos.

La histología del ojo no se mostró afectada por los diferentes niveles de metionina, sin embargo, se desconocen las posibles consecuencias de alimentar a los organismos durante un mayor tiempo de exposición.

## 10. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

- Abdo de la Parra, I., Rodríguez-Ibarra, E.G., Hernández, C., Hernández-Mendoza, K., González-Rodríguez, B., Martínez-Rodríguez, I. & García Ortega, A. 2010. Effect of dietary and lipid level on growth performance and survival of juvenile spotted rose snapper *Lutjanus guttatus*. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 45(3): 433-439.
- Ahmed, I. 2005. Dietary essential amino acid requirements of cultivable Indian major carp, *Cirrhinus mrigala* (Hamilton). 116 pp. Ph. D. Thesis. Department of Zoology, Aligarh Muslim University, Aligarh, India.
- Allen, G. 1985. Snappers of the world and annotated and illustrated catalogue of lutjanid species known to date. *FAO Fisheries Synopsis*, 125 (6): 1-208.
- Armstrong, F.B. & Bennett. T. P. 1982. *Bioquímica*. P. 82.
- AOAC. (1984). *Association Official Analytical Chemists. Official Method of Analysis*. The association: Arlington, VA. P. 1141.
- AOAC. 1984. *Official Methods of Analytical of the Association of Official Analytical Chemists*, 14th edn. AOAC, Arlington, VA.
- Baker, D.H. 2006. Comparative species utilization and toxicity of sulfur amino acids. *Journal of Nutrition* 136s: 1670-1675.
- Ballestrazi, R., Lanari, D., Agaro, E. & Mion, A. 1994. The effect of dietary protein level and source on growth, body composition, total ammonia and reactive phosphate excretion of growing sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture*, 127: 197-206.
- Bender, D.A. 1992. *Nutritional Biochemistry of the vitamins*. Cambridge University Press, New York.
- Blackwell, B., Seamans, T., Helon, D. & Dolbeer, R. 2000. Early loss of Herring Gull glutches after egg-oiling. *Wildlife Society Bulletin* 28(1):70-75.
- Brody, T. 1999. *Classification of biological structure. Nutritional Biochemistry*, Second edition. San Diego, CA: Academic Press. P. 1-56.
- Castro, C.E. 1994. Control de calidad de insumos y dietas acuícolas. *Manual de capacitación*. Tomo I. FAO-ITALIA. Proyecto Aquila II. Documento de campo No. 16. Fundación Chile. P. 269.

- Catacutan, M.R., Pagador, G.E. & Teshima, S. 2001. Effects of dietary protein and lipid levels and protein to energy ratios on growth, survival and body composition of the mangrove red snapper, *Lutjanus argentimaculatus* (Forsskal, 1755). *Aquaculture research*, 32: 811-818.
- Cheng, Z.J., Hardy, R.W. & Usry, J.L. 2003. Plant protein ingredients with lysine supplementation reduce dietary protein levels in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* diets, and reduce ammonia nitrogen and phosphorus excretion. *Aquaculture* 218:553–565.
- Choo, P-S., Smith, T.K., Cho, C.Y. and Ferguson, H.W. 1991. Dietary excesses of leucine influence growth and body composition of rainbow trout. *J. Nutr.*, 121: 1932-1939.
- Collins, A.L. & Anderson, T.A. 1995. The regulation of endogenous energy stores during starvation and refeeding in the somatic tissues of the golden perch. *J. Fish Biol.* 47: 1004-1015.
- Conroy, D.A. 1989. Manual de técnicas de uso común en la hematología pisciaria. Maracay: Universidad Central de Venezuela. P. 25.
- Cowey, C.B., Cho, C.Y., Sivak, J.G., Weerheim, J.A. & Stuart, D.D. 1992. Methionine intake in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), relationship to cataract formation and the metabolism of methionine. *J. Nutr.*, 122: 1154-1163.
- Cowey, C.B., 1995. Protein and amino acid requirements: A critique of methods. *J. Applied Ichthyol.* 11, 199-204.
- Del Río-Zaragoza, O., Hernández, M., & Bückle, L. 2008. Thermal stress effect on tilapia *Oreochromis mossambicus* (Pisces: Cichlidae) blood parameters. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, 41(2):135–145.
- Davies, S.J. & Morris, P.C. 1997. Influence of multiple amino acids supplementation on the performance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), fed soya based diets. *Aquac. Res.* 28, 65-74.
- Devlin, T.M. 2006. Bioquímica. Ed. Reverte. Pág. 245-254.
- Devlin, T. M. 2004. Bioquímica libro de texto con aplicaciones clínicas. Editorial reverté, S.A. Cuarta edición. Barcelona España. Pág. 805

- Dibner, J.J. & Knight, C.D. 1984. Conversion of 2-hydroxy- 4-(methylthio) butanoic acid to L-methionine in the chick: a stereospecific pathway. *J Nutr* 114, 1716–1723.
- Dibner, J.J. & Ivey, F.J. 1992. Capacity in the liver of the broiler chick for conversion of supplemental methionine activity to L-methionine. *Poult Sci* 71, 700–708.
- Dupuis, L., Saunderson, C.L., Puigserver A. and P. Brachet. 1989. Oxidation of methionine and 2-Hydroxy-4-methylthiobutanoic acid stereoisomers in chicken tissues. *Brit. J. Nutr.* 62, 63-75.
- Doi, M. & Singhagraiwan, T. 1993. Biology and cultura of red snapper, *Lutjanus argentimaculatus*. Res. Proj. Fishery Resource Dev. Kingdom of Thailand. P. 51.
- Drew, M. D., A. G. Van Kessel, and D. D. Maenz. 2003. Absorption of methionine and 2-hydroxy-4-methylthiobutanoic acid in conventional and germ-free chickens. *Poult. Sci.* 82:1149–1153.
- El-Sayed, A.F. 1999. Alternative dietary protein sources for farmed tilapia, *Oreochromis spp.* *Aquaculture*, 179: 149-168.
- Escobar-Fernández, R. & Siri, M. 1997. Nombres vernáculos y científicos de los peces del Pacífico mexicano. Universidad Autónoma de Baja California. Sociedad Ictiológica Mexicana, A. C./SIMAC. 102.
- FAO. 2009. El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2008. Departamento de pesca y acuicultura de la FAO. Roma, 196 p.
- Fornaguera, J. & Gómez, G. 2004. Bioquímica: la ciencia de la vida. P. 40.
- Froese, R. 2006. Cube law, condition factor and weight-length relationships: history, meta-analysis and recommendations. *Journal of Applied Ichthyology* 22:241-253
- García-Ortega, A., Muy-Rangel, D., Puello-Cruz, A., Villa-López, Y., Escalante-Rojas, M. & Preciado-Iñiguez, K. 2010. Uso de ingredientes de origen vegetal como fuentes de proteína y lípidos en alimentos balanceados para peces marinos carnívoros. En: Cruz-Suarez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J. (Eds), *Avances en Nutrición Acuícola X - Memorias del Décimo Simposio Internacional de Nutrición*

- Gaylord, T.G. & Barrows, F.T. 2009. Multiple amino acid supplementations to reduce dietary protein in plant-based rainbow trout. *Oncorhynchus mykiss*, feeds. *Aquaculture* 287, 180-184.
- Goff, J.B. & Gatlin III, D.M. 2004. Evaluation of different sulfur amino acid compounds in the diet of red drum. *Sciaenops ocellatus*, and sparing value of cystine for methionine. *Aquaculture* 241, 465-477.
- Gordon, R.S. & Sizer, I.W. 1965. Conversion of methionine hydroxy analogue to methionine in the chick. *Poult Sci* 44, 673–678.
- Griffin, M.E., White, M.R. & Brown, P.B. 1994. Total sulfur amino acid requirement and cysteine replacement value for juvenile hybrid striped bass (*Morone chrysops* × *M. saxatilis*). *Comp. Biochem. Physiol.* 108A, 423–429.
- Guedes, R.L.M., F. Prosdocimi, G.R. Fernandes, L.K. Moura, H.A.L. Ribeiro, and J.M. Ortega. 2011. Amino acids biosynthesis and nitrogen assimilation pathways: A great genomic deletion during eukaryote evolution. *BMC Genomics* 12(Suppl. 4):S2; doi: 10.1186/1471-2164-12-S4-S2.
- Guillaume, J., Kaushik, S., Bergot, P. & Métailler, R. 2001. *Nutrition and Feeding of Fish and Crustaceans*. Springer Verlag, Praxis publishing, Chichester, 407 p.
- Halver, J.E. 1980. Protein and amino acid. *Fish feed technology*. Lectures presented at the FAO/UNDP Training course in Fish Feed Technology, held at the College of Fisheries, University of Washington, Seattle, Washington, USA.
- Halver, J.E. 2002. The vitamins. In: *Fish Nutrition* 3<sup>rd</sup> edn. (ed. By J.E. Halver. & R.W. Hardy), pp 61-141 Academic Press, San Diego CA, USA.
- Hardy R.W. 2010. Utilization of plant proteins in fish diets: effects of global demand and supplies of fishmeal. *Aquaculture Research* 41(5), 770-776.
- Hepher, B. 1988. *Nutrition of pond fishes*. University Press. Cambridge, p 388.
- Hernández-González, C., González-Santos, A., Hardy, W. R., Valverde-Romero, M., Olvera-Novoa, M.A., Gonzalez-Rodriguez, B. & Abdo de la Parra, M. I. 2010. Evaluation of balanced diet supplemented with conventional protein in grow-out for spotted rose snapper (*Lujanus guttatus*). Xth Simposio Internacional de Nutrición Acuicola.

- Hidalgo, F., Alliot, E. & Thebault, H. 1987. Methionine- and cystine-supplemented diets for juvenile sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture* 64, 209–217.
- Hrubec, T.C., Cardinale, J.L. & Smith, S.A. 2000. Hematology and Plasma Chemistry Reference Intervals for Cultured Tilapia (*Oreochromis Hybrid*). *Veterinary Clinical Pathology*, 29, 7-12.
- Ibarra-Castro, L & Duncan, N.J. 2007. GnRH $\alpha$ -induced spawning of wild-caught spotted rose snapper *Lutjanus guttatus*. *Aquaculture Elsevier*, 272: 737-746.
- Ingham, D.E., Arme, C., 1977. Intestinal absorption of amino acids by rainbow trout. *J. Comp. Physiol.* 117, 323–334.
- Kaushik, S.J., F. Medale. (1994) Energy requirements, utilization and dietary supply to salmonids. *Aquaculture* 124: 81-97.
- Keembiyehetty, C.N. & Gatlin III, D.M. 1993. Total sulfur amino acid requirement of juvenile hybrid striped bass (*Morone chrysops*\_*M. saxatilis*). *Aquaculture* 110, 331– 339.
- Klinger, C.R., Blazer, S.V. & Echevarria, C. 1996. Effects of dietary lipid on the hematology of channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Aquaculture* 147, 225-233.
- Koban, H. G. & Koberstein, E. 1984. Kinetics of hydrolysis of dimeric and trimeric methionine hydroxy analogue free acid under physiological conditions of pH and temperature. *J. Agric. Food Chem.* 32:393–396.
- Lemme, A., D. Hoehler, J. J. Brennan, & P. F. Mannion. 2002. Relative effectiveness of methionine hydroxy analog compared to DL-methionine in broiler chickens. *Poult. Sci.* 81:838–845.
- Lemme, A. & A. Petri. 2003. The effectiveness of liquid methionine hydroxy analogue relative to DL-methionine – a scientific review. *Degussa AMINONews®* Vol. 4(3): 1 – 10.
- Li, P., Mai K., Trushenski, J. & Wu, G. 2009. New developments in fish amino acid nutrition: towards functional and environmentally oriented aqua feeds. *Amino Acids* 37: 43-53.
- Li, P., Burr, G.S., Wen, Q., Goff, J.B., Murthy, H.S. & Gatlin, .D.M. III. 2009. Dietary sufficiency of sulfur amino acid compounds influences plasma ascorbic acid

- concentrations and liver peroxidation of juvenile hybrid striped bass (*Morone chrysops* · *M. saxatilis*). *Aquaculture*, 287, 414–418.
- Luo, Z., Liu, Y.J., Mai, K.S., Tian, L.X., Yang, H.J., Tan, X.Y. & Liu, D.H. 2005. Dietary L-methionine requirement of juvenile grouper *Epinephelus coioides* at a constant dietary cystine level. *Aquaculture* 249, 409-418.
- Mai, K.S., Zhang, L., Ai, Q.H., Duan, A.Y., Zhang, C.X. & Li, D.H. 2006. Dietary lysine requirement of juvenile Japanese seabass, (*Lateolabrax japonicus*). *Aquaculture* 258, 535-542.
- Martin-Venegas, R., Soriano-Garcia, J.F., Vinardell, M.P., Geraert, P.A. & Ferrer, R. 2006. Oligomers are not the limiting factor in absorption of dl-2-hydroxy-4-(methylthio) butanoic acid in the chicken small intestine. *Poult. Sci.* 85, 56-63.
- Martin-Venegas, R., Rodriguez-Langunas, M.J., Geraert P.A. and R. Ferrer, 2007. Monocarboxylate Transporter 1 mediates DL-2-hydroxy-4- (methylthio) Butanoic Acid Transport across the apical membrane of Caco-2 cell Monolayers. *J. Nutr.* 137: 49-54.
- Martin-Venegas, R., Geraert P.A. & Ferrer, R. 2008. Partial Na<sup>+</sup> Dependence of DL-2-Hydroxy-4-(methylthio) butanoic acid uptake in the chicken small intestine. *Poult. Sci.* 87, 1392-1394.
- Martin-Venegas R., Brafa M.T., Mercier, Y., Geraert, P.A. & Ferrer, R. 2011. Intestinal cell conversion of DL-2-hydroxy-(4-methylthio) butanoic acid in vitro: dietary up-regulation by this methionine precursor. *Br. J. Nutr* 106, 350-356.
- Miller, C. L.; Davis, D.A. & Phelps. R. P. 2005. Effects of dietary protein and lipid on growth and body composition of juvenile red snapper *Lutjanus Campechanus*. *Aquaculture Research*, 36: 52-60.
- Miller, L. A. 2003. The Methionine-Homocysteine Cycle and Its Effects on Cognitive Diseases. *Alternative Medicine Review*, 8 (1): 7-19.
- Mohammed, A.K. & Sambo A.B. 2007. Haematological assessment of the Nile tilapia *Oreochromis niloticus* exposed to sublethal concentrations of Portland cement powder in solution. *International Journal of Zoological. Research* 4, 48-52.
- Murai, T., Ogata, Il., Hirasawa, T., Akiyama, T. & Nose, T. 1987. Portal absorption and hepatic uptake of amino acids in rainbow trout force fed complete diets

- containing casein or crystalline amino acids. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish 53: 1847-1859.
- Murray, R.K., Granner D.K., Mayes, P.A. & Rodwell, V.W. 1996. Harper's Biochemistry, 24 th edn. Pp.868. Appleton y Lange, Stamford C.T.
- Murthy, R.K. & Varghese, T.J. 1998. Total sulphur amino acid requirement of the Indian major carp, *Labeo rohita* (Hamilton). Aquac. Nutr. 4, 61–65.
- Nengas, I., Alexis, M. N. & Davies, S. J. 1996. Partial substitution of fishmeal with soybean meal products and derivatives in diets for the gilthead sea bream (*Sparus aurata*). Aquaculture Research, 27: 147-156.
- Niu, J., Du, Q., Lin, H.Z., Cheng, Y.Q., Huang, Z., Wang, Y., Wang, J. & Chen, Y.F. 2013. Quantitative dietary methionine requirement of juvenile golden pompano *Trachinotus ovatus* at a constant dietary cystine level. Aquaculture Nutrition 19, 677-686.
- NRC (National Research Council). 1993. Nutrient Requirement of Fish. National Academy Press, Washington DC, USA.
- NRC (National Research Council) (2011) Nutrient Requirement of Fish and Shrimp. National Academy of Press, Washington, D.C., 57-101.
- Polovina, J. & Ralston, S. 1987. Tropical snapper and grouper: Biology and Fisheries Management. Westview Press Inc., Boulder. P. 561-603.
- Poston, H.A. 1986. Response of rainbow trout to source and level of supplemental dietary methionine. Comp. Biochem. Physiol. 83, 739– 744.
- Randall, J.E. 1967. Food habits of reef fishes of the West Indies. Studies in Tropical Oceanography, 5: 665-847.
- Rennie, M.D. & Verdón, R. 2008. Evaluation of condition indices for the lake whitefish, *Coregonus clupeaformis*. North American Journal of Fisheries Management 28:12701293.
- Regost, C., Arzel, J. & Kaushik, S.J. 1999. Partial or replacement of fish meal by corn gluten meal in diet for turbot (*Psetta maxima*). Aquaculture, 180, 99–177.
- Robaina, L., Izquierdo, M.S., Moyano. F.J., Socorro, J., Vergara. J.M., Montero, D. & Fernández-palacios, H. 1995. Soybean and lupin seed meals as protein sources

- in diets for gilthead seabream (*Sparus aurata*): nutritional and histological implication. *Aquaculture*, 130: 219-233.
- Robbins, K.R., Saxton, A.M & Southern, L.L. 2006. Estimation of nutrient requirements using broken-line regression analysis. *Journal of animal science* 84, 55-65.
- Robinson, E.H., Wilson, R.P., Poe, W.E. 1981. Arginine requirement and apparent absence of a lysine–arginine antagonist in fingerling channel catfish. *J. Nutr.* 111, 46-52.
- Ruchimat, T., Masumoto, T. & Hosokawa, H. 1997. Quantitative methionine requirement of yellowtail (*Seriola quinqueradiata*). *Aquaculture* 150, 113-122.
- Rumsey, G.L., Page, J.W. & Milton, L.S. 2011. Methionine and cystine requirements of Rainbow Trout. *Journal The Progressive Fish-Culturist* 45, 1983 - Issue 3.
- Silva-Carillo, Y., Hernández, C., Hardy, R.W., González, B. & Castillo, S. 2012. The effect of substituting fish meal with soybean meal on growth, feed efficiency, body composition and blood chemistry in juvenile spotted rose snapper *Lutjanus guttatus* (Steindachner, 1869). *Aquaculture* 364-365, 180-185.
- Sánchez-Rodríguez, E. 2013. Efecto de la sustitución parcial de la harina de pescado por una mezcla de krill-soya en la dieta de juveniles de pargo *Lutjanus guttatus* (Steindachner, 1869). Tesis de maestría. Instituto de Ciencias del Mar y Limnología. México, D.F. p 24.
- Silveria, C. R. 2005. Índices hematológicos y celulares como bioindicadores de estrés en *Oreochromis aureus* Steindachner (tilapia) de cultivo. Tesis de Maestría. CIBNOR. La paz, México. 200 p.
- Small, B.C. & Soares, J.H. 1999. Quantitative dietary threonine requirement of juvenile striped bass, *Morone saxatilis*. *Journal of World Aquaculture Society* 30, 319-323.
- Schwarz, E.J., Kirchgessner, M. & Deuringer, U. 1998. Studies on the methionine requirement of carp (*Cyprinus carpio* L.). *Aquaculture* 161, 121–129.
- Sveier, H., Norda° s, H., Berge, G.E. & Lied, E. 2001 Dietary inclusion of crystalline D- and L-methionine: effects on growth, feed and protein utilization, and digestibility in small and large Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquac. Nutr.*, 7,169–181.

- Tacon, A. 1989. Nutrición y alimentación de peces y camarones cultivados. Manual de capacitación. Tomo I. FAO-ITALIA. Proyecto Aquila II. Documento de campo No. 4. Brasil. 176 pp.
- Takagi, S., Murata, H., Goto, T., Hayashi, M., Hatate, H., Endo, M., Yamashita, H. & Ukawa, M. 2006a. Hemolytic suppression roles of taurine in yellotail *Seriola quinqueradiata* fed non-fishmeal diet based on soybean protein. Fisheries Science. 72; 546-555.
- Takagi, S., Murata, H., Goto, T., Hayashi, M., Hatate, H., Hatate, H., Endo, M., Yamashita, H., & Ukawa, M. 2006b. Efficacy of taurine supplementation for preventing green liver syndrome and improving Growth performance in yearling read sea bream *Pargus major* fed low-fishmeal diet. Fisheries Science. 72; 1191-1199.
- Teijon, J.M., Blanco, M.D., Agrasal, C. & Olmo, R. (2001) Bioquímica estructural. P. 54-60.
- Thebault, H., Alliot, E. & Pastoureaud, A. 1985. Quantitative methionine requirement of juvenile seabass (*Dicentrarchus labrax*). Aquaculture 50, 75-87.
- Thomson, D., Findley, L. & Kerstitch, A. 2000. Reef fishes of the Sea of Cortez: The rocky-shore fishes of the Gulf of California. Revised Edition. 1st University of Texas Press Ed.
- Trudel, M., Tucker, S., Morris, J., Higgs, D. & Welch, D. 2005. Indicators of energetic status in juvenile coho and chinook salmon. North American Journal of Fisheries Management 25:374-390.
- Tucker, J.W. 1998. Marine Fish Culture. Kluwer Academic Publishers. Norwell. Massachussetts. P. 750.
- Turchini, G.M., Torstensen, B.E. & Ng W.K. 2009. Fish oil replacement in finfish nutrition. Review Aquaculture 1, 10–57
- Twibell, R.G., Wilson, K.A. & Brown P.B. 2000. Dietary sulphur amino acid requirement of juvenile yellow perch fed the maximum cystine replacement value for methionine. Journal of Nutrition 130, 612-616.

- Vázquez-Ortiz, F., Caire, G., Higuera-Ciapara, I. & Hernández, G. 1995. High performance liquid chromatographic of free amino acids in shrimp. *Journal of Liquid Chromatography y Related Technologies*, 18, 2059-2068.
- Velez-Carrasco, W., Merkel, M., Twiss, C.O. & Smith, J. D. (2008). Dietary methionine effects on plasma homocysteine and HDL metabolism in mice. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 19, 362–370.
- Villa-López, A. 2005. Efecto de diferentes niveles de proteína y lípidos en el crecimiento y sobrevivencia del pargo lunarejo *Lutjanus guttatus* (Steindachner, 1896) (Pisces: *Lutjanidae*). Tesis de Licenciatura de la Facultad de Ciencias del Mar, Mazatlán, México. P. 61.
- Voet, D., Voet, J. & Pratt, C. 2006. *Fundamentos de Bioquímica*. 2da edición. Ed. Médica Panamericana, S.A. Pág. 76-85 y 960-1991.
- Walton, M.J. and Cowey, C.B. 1979. Gluconeogenesis from serine in rainbow trout, *Salmo gairdneri*, liver. *Comp. Biochem. Physiol.*, 62B: 497-499.
- 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.* 112, 1525– 1535.
- Walton, M.J. (1985) Aspects of amino acid metabolism in teleost fish. In: *Nutrition and Feeding in Fish* (Cowey, C.B., Mackie, A.M. & Bell, J.G. eds), pp. 47–67. Academic Press, London.
- Walton, M.J., Adron, J.W., Coloso, R.M., Cowey, C.B. 1986. Dietary requirements of rainbow trout for tryptophan, lysine and arginina as determined by growth and biochemical measurements. *Fish Physiol. Biochem.* 2, 161–169.
- Walton, M.J. 1987. Metabolismo de proteínas y aminoácidos en peces. In: J. Espinosa y U. Labarta (Eds.). *Nutrición en Acuicultura*. CAICYT. Madrid 1: 225-271.
- Wan, S., Maí, K., Xu, W., Zhang, Y., Liu, Y., Ai, K. 2015. Dietary methionine level influences growth and lipid metabolism via GCN2 pathway in cobia (*Rachycentron canadum*). *Aquaculture*, 454: 148-156.
- Weatherly, A.H. & Gill, H.S. 1987. *The biology of fish growth*. Academic Press. London, pp 443.

- Wilson, R.P., Allen, O.W., Robinson, E.H., Poe, W.E. 1978. Tryptophan and threonine requirements of fingerling channel catfish. *J. Nutr.* 108, 1595–1599.
- Wilson, R.P. 1985. Amino acid and protein requirements of fish. In: *Nutrition and Feeding in Fish* (Cowey, C.B., Mackie, A.M. & Bell, J.G. eds), pp. 1–15. Academic Press, London.
- Wilson, R.P. & Halver, J. E. 1986. Protein and amino acid requirements of fishes. *Annual reviews Further*, 6:225-244.
- Wilson, R.P. 2002. Amino acids and proteins. En: J. E. Halver & R. W. Hardy (eds.). *Fish nutrition. Tercera edición.* Academic press. San Diego, CA, USA. 143-179.
- Wolf, C. J. & Wolfe, J. M. 2005. A brief overview of nonneoplastic hepatic toxicity in fish. *Toxicol Pathol* 33, 75-85.
- Yan, Q., Xie, S., Zhu, X., Lei, W. & Yang, Y. (2007). Dietary methionine requirement for juvenile rockfish, *Sebastes schlegeli*. *Aquaculture Nutrition* 13, 163-169.
- Yokoyama, M. & Nakazoe, J. 1990. Induction of cysteine dioxygenase activity in rainbow trout liver by dietary sulfur amino acids. In: M. Takeda and T. Watanabe (Editors), *The Current Status of Fish Nutrition in Aquaculture*. Tokyo University of Fisheries, Tokyo, Japan, pp. 367-372.
- Zar, J. 1984. *Biostatistical analysis*. 2nd edition. Englewood Cliffs, NJ: PrenticeHall. P. 30.
- Zhou, Q.C., Wu, Z.H., Tan, B.P., Chi, S.Y. & Yang, Q.H. 2006. Optimal dietary methionine requirement for juvenile Cobia (*Rachycentron canadum*). *Aquaculture* 258, 551-557.
- Zhou, Q.C., Wu, Z.H. & Chi, S.Y. 2007. Dietary lysine requirement of juvenile cobia (*Rachycentron canadum*). *Aquaculture*, 273, 634–640.
- Zhou, F., Xiao, J., Hua, Y., Ngandzali, B. & Shao, Q. 2011. Dietary L-methionine requirement of juvenile black sea bream (*Sparus macrocephalus*) at a constant dietary cystine level. *Aquaculture Nutrition* 17, 469-481.