

Uso de Isótopos Estables por Componente Especifico para Conocer los Requerimientos de Proteína en Peces Marinos

Viana MT y Barreto-Curiel F

Instituto de Investigaciones Oceanologicas, UABC,
México. Carretera Tij-Ens Km 106, Ensenada B. C., México.

E-mail: viana@uabc.edu.mx

Resumen

Uno de los grandes retos dentro de la fisiología del crecimiento en peces sigue siendo el conocer los requerimientos específicos de los nutrientes y en este caso de aminoácidos, para maximizar el crecimiento con un mínimo de ingestión de proteína y por ende, de pérdida de nitrógeno en el medio ambiente. La técnica de isótopos estables ha demostrado ser precisa dentro de la nutrición animal, para determinar el nivel de retención de la proteína de distintas fuentes en estudios previos dentro de nuestro laboratorio. No obstante que logramos determinar que fuente proteica es más retenida que la otra, aún nos queda conocer la relación proporcional de los aminoácidos retenidos y así conocer con mayor detalle los requerimientos pudiendo distinguir entre aquellos que se asimilan y retienen (enrutamiento). Existe una modificación de la técnica en donde las muestras son primero separadas por aminoácidos antes de pasar al analizador elemental acoplado al espectrómetro de masas (análisis de isótopos estables por compuestos específicos), y de esta manera se puede obtener la relación isotópica por aminoácido. El uso de los AA dentro del pez aún no se conocen con precisión para establecer los requerimientos exactos entre los que se retienen en los tejidos y los que son utilizados para las actividades metabólicas que es a lo que se refiere el enrutamiento o “*routing*” que nos lleva a la fisiología básica del metabolismo y crecimiento. De tal manera que cuando la proteína se ofrezca en exceso o restricción, el nivel de enriquecimiento será distinto. Es así que en el presente trabajo se presentan resultados obtenidos hasta ahora en donde se demuestra la capacidad de esta técnica para conocer con mayor detalle el uso y destino de los aminoácidos.

Palabras clave: Isótopos Estables, Enriquecimiento isotópico, proteína, componente específico

Introducción

La sustitución de harina de pescado (HP) es un problema prioritario dentro de la alimentación animal y particularmente en la nutrición acuícola, ya que se asocia como un ingrediente esencial para cubrir los requerimientos nutricionales de las especies de cultivo. Esto puede deberse al desconocimiento de los requerimientos puntuales por aminoácido para formular a proteína ideal y así obtener una eficiencia mayor de los nutrientes, con el fin de bajar el consumo de proteína cruda (Yamamoto *et al.*, 2005 y Gaylord T. y Barrows F. 2009). El uso de la técnica de isótopos estables en masa o por aminoácidos (componente específico) permite obtener el nivel de retención proteica así como la retención y tasa de recambio para cada uno de los aminoácidos esenciales en los distintos tejidos (McMahon K. *et al.*, 2010). Esta técnica, a diferencia de las evaluaciones productivas, permite el estudio de los requerimientos de manera puntual (Dalerum y Angerbjorn 2005; Martinez del Rio 2009). El uso de isótopos estables en estudios de retención representa una alternativa no invasiva, en donde la tasa de recambio de los isótopos en tejido se utiliza para determinar la contribución de las distintas dietas en individuos o poblaciones (Gamboa-Delgado y Le Vay, 2009). Esta técnica se basa en que todo elemento en la naturaleza está compuesto por una mezcla de isótopos que son átomos de un mismo elemento en los cuales varía la masa en el núcleo atómico. Los átomos ligeros son favorecidos energéticamente para ser utilizados antes que los pesados, lo que hace que a través de las cadenas tróficas los átomos pesados sean retenidos concentrándose en los organismos. Es así que utilizando ingredientes con distinta huella isotópica en experimentos de nutrición se puede conocer la proporción de lo que se retiene entre estos dos ingredientes. Si bien la retención del N es lo que más interesa al ser un elemento característico de la proteína, el contar con el valor isotópico del C nos permite hacer modelos de mezcla más sensibles, por lo que es importante contar con ambos en muestras desengrasadas si se quiere discriminar entre el C proveniente de la grasa y el de la proteína. En estudios anteriores utilizando los isótopos estables (Badillo *et al.*, 2014a y b) se demostró que, tanto en trucha como en *Totoaba macdonaldi*, una mezcla de una parte de harina de pescado (HP) por tres de subproducto de ave (HA) en la porción proteica dio los

Viana MT y Barreto-Curiel F. 2015. Uso de Isótopos Estables por Componente Especifico para Conocer los Requerimientos de Proteína en Peces Marinos. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Rivas Vega, M. y Miranda Baeza, A. (Eds), Nutrición Acuicola: Investigación y Desarrollo, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, ISBN 978-607-27-0593-7, pp. 287-295.

mejores parámetros de crecimiento, en especial en totoaba, donde el crecimiento fue hasta tres veces mayor que los organismos alimentados exclusivamente con HP. Esta diferencia si bien no se pudo detectar mediante el uso de los isótopos estables en masa, se pudo observar que existe una tendencia a retener de manera más eficiente la HA sobre la HP.

Los isótopos estables han sido utilizados desde hace mucho tiempo como trazadores no invasivos para hacer estudios de ecología y, posteriormente, nutrición (Martínez del Río *et al.*, 2009). Esta técnica permite estimar, dependiendo del nivel de enriquecimiento isotópico, el grado de retención o recambio para cada tipo de tejido estudiado, aplicando modelos matemáticos de mezcla y utilizando los valores isotópicos del tejido alimentado con distintas proporciones de las mezclas en relación a los valores esperados contenidos en el alimento, bajo el supuesto de que ambas fuentes son retenidas de manera similar (Martínez del Río y Wolf, 2005). Dichos estudios también sirven para estudiar la calidad de la proteína, efecto de la frecuencia alimenticia, entre otros.

Si bien el uso de los isótopos estables en masa muestra de manera integral el comportamiento de los ingredientes a partir de los datos obtenidos del enriquecimiento del total del ^{15}N en relación del ^{14}N , y entre el ^{13}C y ^{12}C , e incluso entre la relación isotópica del hidrógeno (^1H , ^2H y ^3H), existen hoy en día enfoques más finos. Uno es mediante la separación de la proteína y grasa en sus componentes, ya sea aminoácidos o ácidos grasos previo a la estimación del valor isotópico. De esta manera se estudia el enriquecimiento isotópico por componente, sea por aminoácido o ácido graso. Esta técnica se denomina por componente específico y constituye una manera más fina de estudiar cada uno de los aminoácidos y su enrutamiento metabólico dentro del organismo cuando es alimentado con distintas fuentes proteicas y sea por tipo o calidad. Esta técnica consiste en la separación de los aminoácidos antes de pasar al analizador elemental acoplado al espectrómetro de masas (análisis de isótopos estables por compuestos específicos), y de esta manera se puede obtener la relación isotópica por aminoácido. El destino y uso de los aminoácidos dentro del pez no se conocen aún con precisión para establecer los requerimientos exactos entre los que se retienen en los tejidos y los que son utilizados para las actividades metabólicas, que es a lo que se refiere el enrutamiento o “*routing*” que nos lleva a la fisiología básica del metabolismo y crecimiento. De tal manera que cuando la proteína se ofrezca en exceso o

restricción, el nivel de enriquecimiento será distinto.

El presente trabajo tiene como objetivo el dar a conocer los avances de investigación de nuestro laboratorio en donde podremos evaluar la retención proteica en masa y por componente específico para lo cual se darán ejemplos de varios experimentos desarrollados en los últimos dos años. El estudio se enfocó en totoaba (*Totoaba macdonaldi*) proveniente del CREMES y de ejemplares de jurel (*Seriola lalandi*) obtenidos del cultivo comercial de la empresa Baja Seas S.A de C.V ubicada en Baja California.

Metodología común

El diseño experimental en general se basó en una distribución al azar con un factor, cuatro tratamientos y tres repeticiones. Para esto se utilizaron lotes de juveniles de *Totoaba macdonalli* (3 ± 0.2 g) alimentados con una dieta comercial. Para cada experimento se colocaron cerca de 35 organismos en cada uno de los 12 estanques circulares con capacidad de 500 L (4 dietas con tres repeticiones en un diseño completamente al azar). Los organismos se alimentaron a saciedad aparente durante 60 días con cuatro raciones diarias o el tiempo necesario para obtener un 1000% de incremento en peso.

Para medir el nivel de optimización de los aminoácidos y establecer el nivel de enrutamiento de los mismos durante el periodo de inanición se utilizó al jurel (*Seriola lalandi*), por considerarlo un pez con una alta tasa metabólica (Booth *et al.*, 2010). Los organismos fueron proporcionados en primera instancia al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE), y posteriormente CICESE facilitó los organismos con los que se realizaron los experimentos descritos en el presente trabajo. Los peces se distribuyeron aleatoriamente en 4 estanques de 500 L. Uno de ellos fue alimentado 3 veces al día a saciedad aparente hasta los 35 días que duró el experimento, en tanto que los otros tres estanques se mantuvieron en inanición y bajo las mismas condiciones de calidad de agua y temperatura (26 °C). El muestreo se realizó de manera aleatoria en cada uno de los 4 estanques tomando 1 organismo cada 0, 2, 4, 6, 9, 12, 15, 19, 23, 27 y 35 días. Se tomaron muestras de hígado y músculo para medir el valor isotópico

en masa y por componente específico. Este último se realizó sólo en las muestras de hígado. Después de 35 días los organismos en inanición llegaron a perder hasta 30% de su peso inicial. Los organismos fueron sacrificados por hipotermia según la norma de ética establecida. Los organismos fueron etiquetados y metidos a una tina con hielo para posteriormente ser disectados y extraer el hígado y una porción de músculo.

El contenido isotópico en masa del C y N ($\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$) de ambos experimentos, además del análisis por componente específico de los aminoácidos de muestras de hígado y músculo se analizaron en la Universidad de Davis California (EEUU) de acuerdo a sus protocolos. Con los datos obtenidos se estimó el factor de discriminación trófica, el modelo Tiempo-Base (Hesslein *et al.* 1993), la tasa de recambio proteico (t_{50}) del N^{15} en el organismo así como la tasa de enriquecimiento por aminoácido.

Para estimar las diferencias significativas entre los índices biológicos de los tratamientos experimentales, se comprobó que los datos fueran normales y homocedásticos antes de proceder a un análisis de varianza de una vía y pruebas *a posteriori* de Tukey ($P < 0.05$) utilizando el programa Statistica 10.0 (Stat Soft, Inc. Tulsa, OK, USA).

En el experimento de *Totoaba macdoladi*, se demostró que los organismos que fueron alimentados con un contenido alto de proteína y lípidos (dieta “D”) presentaron diferencias significativas en su peso final, en el porcentaje de peso ganado, eficiencia proteica, tasa de eficiencia alimenticia y la tasa de conversión alimenticia. Sin embargo, en el coeficiente térmico de crecimiento, no se presentaron diferencias con los organismos alimentados con la dieta “C” pero si con la dietas “A” y “B”, mismas que contenían el nivel más bajo de proteína y lípidos. En lo que respecta a los isótopos de carbono y nitrógeno se demostró que los organismos que se alimentaron con un mayor contenido proteico, a los 12 días alcanzaron el equilibrio isotópico con su dieta en el hígado, realizando así un recambio isotópico más acelerado en este tejido. La diferencia en tiempo de recambio se da dependiendo del tejido, su actividad metabólica y etapa de crecimiento. Esto se corroboró en este mismo experimento, en donde se calculó el tiempo de recambio isotópico para

músculo, mostrando un mismo comportamiento de acuerdo al incremento de proteína, sin embargo su equilibrio con la dieta fue alcanzado desde los 50 a los 61 días respectivamente.

En el enriquecimiento isotópico por aminoácido en hígado se muestra una distribución variante a lo antes reportado, sin dejar de mencionar que los pocos trabajos de isótopos por componente específico están realizados en músculo. Los aminoácidos esenciales deberían mostrar una huella isotópica idéntica a la de la dieta, teniendo en cuenta que estos no se pueden sintetizar *de novo* por los peces, por lo que adquieren el valor isotópico de la dieta proporcionada. Los aminoácidos que más se fraccionan son los no esenciales o mejor conocidos como aminoácidos tróficos, los cuales pueden ser sintetizados según su requerimiento. En el hígado de *totoaba* observamos que los aminoácidos esenciales son enriquecidos en isótopos pesados en las cuatro dietas proporcionadas. Sin embargo, con la dieta C y D se encontraron enriquecimientos mayores a 8‰ en isoleucina, valina y ácido glutámico. Este comportamiento inusual se pudiera estar dando por la actividad metabólica del tejido, por la proporción aminoacídica en la dieta y las necesidades nutricionales del pez. Los aminoácidos enriquecidos en los isótopos ligeros son mayormente utilizados antes que los isótopos pesados, por lo que pudimos observar que la huella isotópica fue enriqueciéndose en isótopos pesados.

En el experimento de inanición realizado con jurel, se demostró que en masa el nitrógeno en músculo no presentó cambios en la huella isotópica conforme avanzan los días en inanición. Sin embargo, en el hígado se nota claramente que a los dos días comienza a enriquecerse en isótopos pesados de 15‰ hasta 17.5‰ (35 días). En isótopo de carbono, se encontró un patrón similar para músculo, en el cual no cambia de manera significativa la huella isotópica del músculo inicial con la muestra de músculo a los 35 días en inanición. Sin embargo, para el hígado en este mismo isótopo, se muestra claramente que del día 4 al 12, el músculo se vuelve ligero y constante. Esto podría darse a medida que el hígado sintetizó *de novo* ácidos grasos o aminoácidos no esenciales. Sin embargo, posterior al día 12, el hígado comenzó a enriquecerse de isótopos pesados hasta alcanzar los -17‰. En lo que respecta a los isótopos estables por componente específico (aminoácido) en hígado, se

obtuvieron tres niveles de enriquecimiento respecto al hígado inicial e hígado final. Los aminoácidos que menos se enriquecieron fueron la metionina, lisina y fenilalanina mientras que en los no esenciales solo la glicina (0.5, 0.6, 1.2 y 1.4 respectivamente). Los aminoácidos mayormente enriquecidos fueron la isoleucina, leucina y valina como esenciales y prolina como no esencial (4.9, 4.4, 3.2 y 3.2). En los aminoácidos intermedios se obtuvo la alanina, glutamina y asparagina (2.4, 3.6 y 2.9).

Uno de los problemas que se enfrentan al formular las dietas con diferentes niveles de proteína, es que se cambian las proporciones de los diferentes ingredientes que la conforman para obtener un 100% de la dieta (por ejemplo al aumentar la proteína y disminuir el almidón para su formulación), dejando un contenido energético diferente o igual pero con diferentes porciones de proteína, lípido o carbohidrato. Por ello, en un experimento reciente con *Totoaba macdonaldi*, se formularon cuatro dietas con diferente contenido proteico (40, 43, 46 y 49) y mismo contenido de lípidos y carbohidratos, rellenado el déficit de las dietas con una mezcla de harina pollo/pescado (66 /33) tratada con formaldehído para fijar la proteína disponible y que no estuviera apta para la asimilación en el organismo. Se obtuvieron resultados en crecimiento con diferencias significativas, donde las dietas con mayor contenido proteico, C y D, presentaron un porcentaje de crecimiento del 1000% comparado con las dietas A y B, que solo obtuvieron el 600%. Mismo patrón se obtuvo en el la tasa específica de crecimiento de 4.05, 3.89, 3.34 y 3.08 (D, C, B, y A respectivamente). Actualmente estamos en espera de los resultados de isótopos por componente, mismos que nos pudieran revelar los requerimientos nutricionales para dicha especie.

Después del análisis de los datos experimentales, se concluye que es posible utilizar la técnica de isótopos estables con mayor precisión a lo los resultados obtenidos de manera tradicional midiendo únicamente crecimiento y consumo de alimento.

La técnica de isótopos estables por componente (aminoácidos) tiene un gran potencial en la nutrición de peces, ya que nos revela un panorama más certero en el entendimiento de los procesos metabólicos de los aminoácidos esenciales y no esenciales

en los organismos marinos y así poder establecer una dieta balanceada a proteína ideal.

El enriquecimiento isotópico de los aminoácidos en el tejido del pez, nos puede mostrar el grado de necesidad y biosíntesis *de novo* de los aminoácidos no esenciales. De igual forma, nos muestra el reciclamiento de estos aminoácidos, ayudándonos a entender las necesidades nutricionales de los organismos marinos de una manera específica.

Referencias

- Badillo Z. D., Lazo J. P., Herzka S y Viana M. T., 2014. The effect of substituting fishmeal with poultry by-product meal in diets for *Totoaba macdonaldi* juveniles. *Aquaculture Research*. 1-12
- Badillo Z. D., Herzka S y Viana M. T., 2014. Protein Retention Assessment of Four Levels of Poultry By-Product Substitution of Fishmeal in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Diets Using Stable Isotopes of Nitrogen (δN) as Natural Tracers. *PLoS ONE* 9(9): e107523.doi:10.1371/journal.pone.0107523
- Booth A. M., Allan L. G y Pirozzi I. 2010. Estimation of digestible protein and energy requirements of yellowtail Kingfish *Seriola lalandi* using a factorial approach. *Aquaculture*. Vol. 307:247-259.
- Gamboa-Delgado J. and Lewis L. V. 2009. Natural stable isotopes as indicators of the relative contribution of soy protein and fish meal to tissue growth in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) fed compound diets. *Aquaculture*. VOL. 291:115–123.
- Gaylord T. y Barrows F. 2009. Multiple amino acid supplementations to reduce dietary protein in plant-based rainbow trout, *Oncorhynchus mukiss*, feeds. *Aquaculture*. Vol. 287:180-184.
- Hesslein H. R., Haallard A. K., Ramlal P. 1993. Replacement of sulfur, carbon and nitrogen in tissue of growing broad whitefish (*Coregonus nsus*) in response to a change in diet traced by $\delta^{34}S$, $\delta^{13}C$, $\delta^{15}N$. *Can J Fish Aquatic Sci*. Vol. 50:2071-2276.
- Martínez del Rio C., Wolf N., Carleton S. A y Gannes I. Z. 2009. Isotopic ecology ten years after a call for more laboratory experiments. *Biological Reviews* Vol. 84:91-111.
- McMahon W. K., Fogel L. M., Elsdon S. Travis and Thorrold R. S. 2010. Carbon isotope fractionation of amino acids in fish muscle reflects biosynthesis and isotopic routing from dietary protein. *Journal of Animal Ecology*. Vol. 79: 1132-1141.
- Yamamoto T., Surgita T y Furita H. 2005. Essential amino acid supplementation to fish meal-based diets with low protein to energy ratios improves the protein utilization in juvenile rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture*. Vol. 246:379-391.